

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİS (İPF) TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE NİNTEDANİB VE miR-29b YÜKLÜ
LİPOPLEKS FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE TEDAVİ ETKİNLİKLERİNİN
İPF HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Ceren DURALOĞLU

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİS (İPF) TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE NİNTEDANİB VE miR-29b YÜKLÜ
LİPOPLEKS FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE TEDAVİ ETKİNLİKLERİNİN
İPF HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Ceren DURALOĞLU

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN**

ANKARA

2024

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İDİYOPATİK PULMONER FİBROZİS (İPF) TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE NİNTEDANİB VE miR-29b YÜKLÜ LİPOPLEKS
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZE EDİLMESİ
VE TEDAVİ ETKİNLİKLERİNİN İPF HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Ceren DURALOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN

Bu tez çalışması 15/08/2024 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Teknoloji Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Erem BİLENSOY*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN*
(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç.Dr. Devrim DEMİR DORA*
(Akdeniz Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

16 Ağustos 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

15/08/2024

Ecz. Ceren DURALOĞLU

“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

⁽¹⁾ Madde 6.1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, **tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

⁽²⁾ Madde 6.2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında **tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

⁽³⁾ Madde 7.1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* **Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Ceren DURALOğLU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında bana gösterdiği kıymetli rehberliği, emekleri ve destekleri için çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sn. Betül ARICA YEGİN'e,

Doktora çalışmalarım boyunca değerli katkıları, destekleri ve sağladıkları olanaklar için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanları, Prof. Dr. Sn. Levent ÖNER'e ve Prof. Dr. Sn. Erem BİLENSOY'a,

Tez çalışmalarım boyunca göstermiş olduğu çok kıymetli katkıları, desteği ve emekleri için çok değerli hocam Prof. Dr. Sn. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye,

Tez izleme sürecimde bilgi ve birikimleri ile büyük katkısı olan değerli hocam Prof. Dr. Sn. Yalçın ÖZKAN'a,

Tez çalışmalarım kapsamında hücre kültürü çalışmalarındaki yardım ve destekleri için Doç. Dr. Sn. İpek BAYSAL'a,

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcılara,

Doktora çalışmalarım boyunca YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Bursu desteği sağlayan YÖK'e, ve TSA-2020-18783 nolu proje kapsamında destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Doktora tez çalışmaları süresince gösterdikleri destek için değerli yöneticilerim Dr. Sn. Gonca ÖZDEMİR IŞIK'a (Novartis) ve Sn. Zeynep KUTLU KABAŞ'a (Bilim İlaç),

Doktora eğitimim süresince manevi desteklerini esirgemeyen değerli hayat arkadaşım Canberk IŞIKLI'ya ve çok kıymetli IŞIKLI Ailem'e,

Hayatımın her anında yanımda olan, bana güç veren ve koşulsuz sevgileriyle daima destek olan bir tanecik annem Nihal DURALOĞLU'na, babam Emekli J.Mu.Kd.Alb. Erol DURALOĞLU'na ve sevgili kardeşim Dt. Ceyda DURALOĞLU'na,

En içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ecz. Ceren DURALOĞLU

ÖZET

Duraloğlu, C., İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nintedanib ve miR-29b Yüklü Lipopleks Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Karakterize Edilmesi ve Tedavi Etkinliklerinin İPF Hücre Kültürü Modelinde Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024.

İdiyopatik pulmoner fibrozis (İPF), akciğerde hücrel stres ve doku hasarının neden olduğu, ECM bileşenlerinin aşırı birikimiyle akciğer yapısını ve işleyişini bozarak ilerleyen, yüksek mortalite oranına sahip bir hastalıktır. Mevcut tedavi seçenekleri yan etkileri nedeniyle sınırlı olup, alternatif tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Bu çalışma, İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) tedavisinde Nintedanib ve miR-29b yüklü katyonik lipopleks formülasyonunun (LP-NIN-miR) geliştirilmesini ve bu formülasyonun in vitro akciğer fibrozis modelinde anti-fibrotik etkilerini incelemeyi amaçlamaktadır. Çalışmada, katyonik lipozomlar Tasarımla Kalite Yaklaşımı (QbD) ile optimize edilmiştir. Optimize edilmiş lipozom formülasyonu DOTAP, CHOL, DOPE ve DSPE-mPEG 2000 kullanılarak hazırlanmıştır. Nintedanib yüklü lipozomlar (LP-NIN) mikroakışkanlaştırma yöntemiyle üretilmiş ve miR-29b ile inkübe edilerek LP-NIN-miR elde edilmiştir. LP-NIN-miR'in partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli sırasıyla $87,3 \pm 0,9$ nm, $0,184 \pm 0,003$ ve $+24 \pm 1$ mV olarak belirlenmiştir. Nintedanib ve miR-29b'nin enkapsülasyon etkinlikleri %99'un üzerinde bulunmuştur. Sitotoksisite çalışmaları, LP-NIN-miR'nin güvenli bir taşıyıcı sistem olduğunu, transfeksiyon çalışmaları ise anti-fibrotik terapötik etkisini kanıtlamıştır. Bu çalışma, İPF tedavisinde yenilikçi bir terapötik yaklaşımın geliştirilmesi adına önemli bir adımdır.

Anahtar Kelimeler: nintedanib, miRNA, idiyopatik pulmoner fibrozis, lipopleks, mikroakışkanlaştırma.

Destekleyen Kurumlar: Hacettepe Üniversitesi BAP Desteği (Proje numarası: TSA-2020-18783) ve YÖK - 100/2000 Doktora Bursu

ABSTRACT

Duraloğlu, C., Development and Characterization of Nintedanib and miR-29b Loaded Lipoplex Formulations for the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) and Evaluation of Their Therapeutic Efficacy in an IPF Cell Culture Model, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Doctor of Philosophy Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara, 2024.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a disease with a high mortality rate, caused by cellular stress and tissue damage in the lungs, leading to the excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) components that disrupts lung structure and function. Current treatment options are limited due to their side effects, highlighting the need for alternative therapies. This study aims to develop a cationic lipoplex formulation loaded with Nintedanib and miR-29b (LP-NIN-miR) for the treatment of IPF and to investigate its anti-fibrotic effects in an in vitro lung fibrosis model. In this study, cationic liposomes were optimized using a Quality by Design (QbD) approach. The optimized liposome formulation was prepared using DOTAP, CHOL, DOPE, and DSPE-mPEG 2000. Nintedanib-loaded liposomes (LP-NIN) were produced using a microfluidization method and incubated with miR-29b to obtain LP-NIN-miR. The particle size, polydispersity index, and zeta potential of LP-NIN-miR were determined to be 87.3 ± 0.9 nm, 0.184 ± 0.003 , and $+24 \pm 1$ mV, respectively. The encapsulation efficiencies of Nintedanib and miR-29b were found to be over 99%. Cytotoxicity studies demonstrated that LP-NIN-miR is a safe delivery system, and transfection studies confirmed its anti-fibrotic therapeutic effect. This study marks an important step toward the development of an innovative therapeutic approach for IPF treatment.

Key words: nintedanib, miRNA, idiopathic pulmonary fibrosis, lipoplex, microfluidization.

Supported by: Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (Project no: TSA-2020-18783) and the Council of Higher Education (YÖK) - 100/2000 PhD Scholarship.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xix
TABLolar	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF)	2
2.2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) Tedavisi Yaklaşımları	3
2.3. Nintedanib	6
2.4. miR-29b	9
2.5. Lipozomal İlaç ve Gen Taşıyıcı Sistemler	13
2.6. Lipozomların / Lipoplekslerin Üretim Yöntemleri	24
2.7. Lipozomların / Lipoplekslerin Karakterizasyonu	25
2.7.1.Partikül Boyutu ve Partikül Boyutu Dağılımı	26
2.7.2.Zeta Potansiyeli	29
2.8. Nintedanib ve miRNA Yüklü Lipoplekslerde Yerine Koyma Etkinliği Tayin Yöntemleri	30
2.8.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31
2.8.2.Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler	36
3.2. Kullanılan Cihazlar	37
3.3. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları	38
3.4. Tasarımla Kalite Yaklaşımı ile Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi	39

3.5. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması	43
3.6. Lipoplekslerin Karakterizasyonu	45
3.6.1. Lipoplekslerin Partikül Boyutu, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Tayini	45
3.6.2. Lipoplekslerin Morfolojik Değerlendirilmesi	45
3.6.3. Nintedanib Miktar Tayini ve Analiz Yöntemi Validasyonu	45
3.6.4. Nintedanib Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	48
3.6.5. miR-29b Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	49
3.6.6. Lipoplekslerden <i>in vitro</i> Nintedanib ve miR-29b Salım Çalışmaları	49
3.7. Stabilite Çalışmaları	50
3.8. Hücre Kültürü ve <i>in vitro</i> İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Modeli Oluşturulması	50
3.9. <i>in vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	51
3.10. Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları	53
3.11. <i>in vitro</i> Terapötik Etkinliğin Belirlenmesi	53
3.12. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR	56
4.1. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları	56
4.2. Tasarımla Kalite Yaklaşımı ile Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi	57
4.3. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	65
4.3.1. Lipoplekslerin Partikül Boyutu, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Tayini	65
4.3.2. Lipoplekslerin Morfolojik Değerlendirilmesi	68
4.3.3. Nintedanib Miktar Tayini ve Analiz Yöntemi Validasyonu	69
4.3.4. Nintedanib Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	76
4.3.5. miR-29b Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	77
4.3.6. Lipoplekslerden <i>in vitro</i> Nintedanib ve miR-29b Salım Çalışmaları	79
4.4. Stabilite Çalışmaları	81
4.5. Hücre Kültürü ve <i>in vitro</i> İPF Modeli Oluşturulması	86
4.6. <i>in vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	88
4.7. Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları	91
4.8. <i>in vitro</i> Terapötik Etkinliğin Belirlenmesi	92

5. TARTIŞMA	95
5.1. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları	95
5.2. Tasarımla Kalite Yaklaşımı ile Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi	95
5.3. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	97
5.3.1. Lipoplekslerin Partikül Boyutu, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Tayini	97
5.3.2. Lipoplekslerin Morfolojik Değerlendirilmesi	99
5.3.3. Nintedanib Miktar Tayini ve Analiz Yöntemi Validasyonu	99
5.3.4. Nintedanib Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	101
5.3.5. miR-29b Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	102
5.3.6. Lipoplekslerden <i>in vitro</i> Nintedanib ve miR-29b Salım Çalışmaları	102
5.4. Stabilite Çalışmaları	103
5.5. Hücre Kültürü ve <i>in vitro</i> İPF Modeli Oluşturulması	104
5.6. <i>in vitro</i> Sitotoksikite Çalışmaları	105
5.7. Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları	106
5.8. <i>in vitro</i> Terapötik Etkinliğin Belirlenmesi	107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	109
7. KAYNAKLAR	112
8. EKLER	
EK-1: TURNİTİN DİJİTAL MAKBUZ	
EK-2: TURNİTİN ORJİNALLİK RAPORU	
EK-3: TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

α-SMA	Alfa-Düz Kas Aktini
ζ	Zeta Potansiyel
λ	Dalga boyu
%EE	Enkapsülasyon Etkinliği
%GC	Guanin Ve Sitozin İçeriği Yüzdesi
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
6-FAM	Siglo Yeşil Transfeksiyon Göstergesi (6-Karboksifloresein)
a/a	Ağırlık / ağırlık
a/h	Ağırlık / hacim
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
Akt	Protein Kinaz B
ALC-0159	2-[(polietilen glikol)-2000]-N,N-ditetradesilasetamid
ALC-0315	4-hidroksibütil azandiil bis(hekzan-6,1-diil) bis(2-hekzildekanoat)
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
ATP	Adenozin Trifosfat
AUC	Analitik Ultrasantrifüj Ölçüm Hücresi
BCAT	O-(2R-1,2-Di-O-(1,9-Z-Oktadekadienil)-Gliserol)-3-N-(Bis-2-Aminoetil)-Karbamat
BSS	Bağıl standart sapma
CHOL	3 β -Hidroksi-5-Kolesten (Kolesterol)
CO₂	Karbondioksit
COL1A1	Kollajen 1a1
COL4A1	Kollajen 4a1
COL4A2	Kollajen 4a2
COVID-19	Koronavirüs Hastalığı 2019
CQA	Kritik Kalite Özellikleri (<i>Critical Quality Attributes</i>)

CTAB	Trimetilhekzadesil Amonyum Bromür
CTGF	Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DC-Chol	3 β -[N-(N',N'-Dimetilaminoetan)-Karbamoil]Kolesterol Hidroklorür
DCS	Diferansiyel Santrifüj Sedimentasyon
DDAB	Dimetil Dioktadesil Amonyum Bromür
DEPC	Di-erusoilfosfatidilkolin
df	Serbestlik Derecesi
DLin-MC3-	N,N-Dimetil-3,3-dioktakadesilaminopropan
DMA	
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco'nun Minimum Temel Besi Ortamı (<i>Dulbecco's Minimum Essential Media</i>)
DMPC	L-alfa-dimiristoilfosfatidilkolin
DMPG	L-alfa-dimiristoilfosfatidilgliserol
DMRIE	1,2-dimiristoloksipropil-3-dimetil-hidroksietil amonyum bromür
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid Trifosfatlar
DODMA	1,2-Dioleiloksi-3-Dimetilaminopropan
DoE	Deney Tasarımı (<i>Design of Experiments</i>)
DOGS	Dioktadesilamidoglisilspermin
DOPC	1,2-Dioleoil-Sn-Glisero-3-Fosfatidilkolin
DOPE	1,2-Dioleoil-Sn-Glisero-3-Fosfoetanolamin
DOSPA	(+)-N,N-Dimetil-N-[2-(Sperminkarboksamido)Etil]-2,3-Bis(Dioleiloksi)-1-Propaniminyum Pentahidroklorür
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoiloksi)Propil]-N, N, N-Trimetilamonyum Klorür
DOTMA	1,2-Di-O-Oktadesenil-3trimetilamonyum Propan

DPPA	1-[(fosfonoksi)metil]-1,2-etandiil ester, monosodyum tuzu
DPPC	1,2-Dipalmitoil-Sn-Glisero-3-Fosfatidilkolin
DPPG	1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfo-rac-(1-gliserol)
DSPC	1,2-Distearoil-Sn-Glisero-3-Fosfatidilkolin
DSPG	Distearoil Fosfatidilgliserol
DTT	Ditiotreitol
EAA	Analitik Ultrasantrifüjleme
ECM	Ekstraselüler Matriks
ELISA	Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi
ELN	Elastin
EM	Elektron Mikroskobu
EMT	Epitel-Mezenkimal Geçiş
EPC	1,2-Dioleoil-Sn-Glisero-3-Etilfosfokolin
EPG	Yumurta Fosfatidilgliserol
ERK	Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
EtBr	Etidyum Bromür
EYL	Yumurta lesitini
F	İleri Primerin Sekansı
F	Fisher Oranı
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FBN-1	Fibrillin
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR-1,-2,-3	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörleri-1,-2,-3
FIFFF	Akış Alanı-Akış Fraksiyonlaması
FMT	Fibroblast-Mezenkimal Geçiş
FRR	Organik/Inorganik Faz Akış Hızı Oranı
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz

GUV	Dev Tek Tabakalı Keseciklerdir
h/h	Hacim / hacim
HSPC	Hidrojene Soya Fosfatidilkolin
ICH	Uluslararası İnsan Kullanımına Yönelik İlaçlara İlişkin Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi
IV	Intravenöz
İPF	İdiyopatik Pulmoner Fibrozis
L	Lipitler
LMV	Çok tabakalı lipozomlar
LOD	saptama sınırı
LOQ	miktar tayini sınırı
LP	Boş lipozom
LP-miR	miR-29b içeren lipopleks formülasyonları
LP-NIN	Nintedanib İçeren Lipozom
LP-NIN-miR	Nintedanib ve miR-29b içeren lipopleks formülasyonları
LUV	Büyük Tek Tabakalı Kesecikler
M	Mannitol
MALS	Çok Açılı Işık Saçılımı
MEK	Mitogenle Aktive Olan Protein Kinaz/ Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
mg	miligram
MHF	Mikro Hidrodinamik Odaklama
miRNA	mikroRNA
ml	Mililitre
MPEG5000	N-(metoksipolietilen glikol 5000 karbamoil)-1,2-dipalmitoil-sn-
DPPE	glisero-3-fosfatidiletanolamin, monosodyum tuzu
MPL	3-O-desasil-4'-monofosforil lipit A
MPS	Mononükleer Fagosit Sistemi
MS	Ortalama Kare
mV	Milivolt

MVL	Multi-Veziküler Lipozomlar
MWCO	Moleküler Ağırlık Kesme Değeri
ng	Nanogram
NIN	Nintedanib
nm	Nanometre
NTA	Nanopartikül İzleme Analizi
OND	Oligonükleotid
OOPS	1,2- dioleoilfosfatidilserin
p	Olasılık
PA	L-A-Fosfatidik Asit
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PC	Fosfatidilkolin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCS	Foton Korelasyon Spektroskopisi
PDGF	Platelet kaynaklı büyüme faktörü
PDGFR-α,β	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörleri-A,-B
PDI	Polidispersite İndeksi
PDMS	Polidimetilsiloksan
PE	Fosfatidil Etanolamin
PEG 2000- DSPE	1,2-Distearoil-Sn-Glisero-3-Fosfoetanolaminin PEG Türevi
PEG2000-C- DMG	Polietilen Glikol 2000 konjuge edilmiş Dimiristoilgliserol
PEGilasyon	Polietilen Glikol ile Kaplama
PG	1,2-Dimiristoil-Sn-Glisero-3-Fosfo-(1'-Rac-Glisero)
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PKC	Protein Kinaz C
pol II	RNA Polimeraz II
POPC	1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilkolin

PS	1,2-Dimiristoil-Sn-Glisero-3-Fosfo-L-Serin
QbD	Tasarım ile Kalite (<i>Quality by Design</i>)
QTPP	Kalite Hedefli Ürün Profili (<i>Quality Target Product Profile</i>)
R	Revers Primerin Sekansı
R²	Belirleme Katsayısı
Radj²	Düzeltilmiş R ²
RAF	Hızlı İvme Kazanan Fibrosarkom Kinaz
RAS	Rat Sarkom Virüsü Onkogeni Proteini
RES	Retiküloendotelyal Sistem
RISC	RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SARS-CoV-2	Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüs 2
SAXS	Küçük Açılı X Işını Saçılması
SBO	Soya fasulyesi yağı
siRNA	Küçük Müdahaleci RNA
SM-102	Heptadekan-9-il 8-((2-hidroksietil)(6-okso-6-(undekiloksi) heksil)amino)oktanoat
SS	Standart sapma
SS	Kareler Toplamı
SUV	Küçük Tek Tabakalı Kesecikler
T	Trehaloz
TAE tamponu	Tris-Asetat-EDTA Tamponu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TFR	Toplam Akış Hızı
TGF-β	Transforme edici büyüme faktör-beta
Tm	Erime Sıcaklığı °C
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü-A
UV	Ultraviyole

V	Volt
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR-1,-2,-3	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörleri-1,-2,-3
VK	Varyasyon katsayısı
\bar{x}	Ortalama
XRD	X-Işını Kırınımı
XTT	([3-(4,5-Dimetiltiazol-2-Il)-2,5-Difeniltetrazolium Bromür])

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Nintedanib'in fibrotik akciğer hastalıklarındaki etki mekanizması.	5
2.2. Nintedanib'in kimyasal yapısı	7
2.3. Nintedanib'in polifarmakolojisi ve sinyal yolları.	8
2.4. miRNA biyogenezinin şematik gösterimi.	10
2.5. Mikroakışkanlaştırma yönteminde yer alan çip ile lipozomların elde edilmesinin şematik gösterimi	25
2.6. PCR yöntemi aşamaları	33
2.7. ELISA türleri ve yöntem esasları	34
3.1. Mikroakışkanlaştırma yönteminde kullanılan kıvrımlı çipin yapısı (SM3-300um-Z300 Serpentine Mixing Microfluidics Chip, uFluidic).	39
3.2. A) Mikroakışkanlaştırma yöntemiyle LP-NIN elde edilmesi, B) İnkübasyon yöntemi ile LP-NIN-miR elde edilmesinin şematik gösterimi.	44
3.3. Nintedanib ve miR-29b içeren lipopleks taşıyıcı sisteminin şematik gösterimi.	48
3.4. XTT deney planının şematik gösterimi (n=3).	53
3.5. Fare fibroblast hücrelerine TGF- β 1 uygulanması sonrası, A) İPF oluşumunun analizi, B) serbest Nintedanib, LP-NIN, serbest miR-29b, LP-miR ve LP-NIN-miR formülasyonlarının inkübasyonu sonrasında gerçekleştirilen ELISA ve PCR çalışmalarının şematik gösterimi.	55
4.1. Ön formülasyon denemelerine ait partikül boyutu dağılımı grafiği.	57
4.2. Ön formülasyon denemelerine ait zeta potansiyeli grafiği.	57
4.3. 3 ³ faktöriyel formülasyon tasarımında yer alan formülasyon değişkenlerinin A) Partikül Boyutu, B) PDI ve C) Zeta Potansiyeli üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği.	60

4.4.	A) Kontur grafiği ve B) üst üste bindirme grafiği, lipozomal formülasyonun optimize edilmesi için tasarım alanını göstermektedir.	62
4.5.	Nintedanib içeren lipozom formülasyon denemelerine (LP-NIN #1, #2 ve #3) ait partikül boyutu dağılımı grafiği.	64
4.6.	30:1 lipit molar oranında hazırlanan LP-NIN-miR formülasyonuna ait A) partikül boyutu dağılımı ve B) zeta potansiyeli grafikleri.	66
4.7.	Kriyoprotektanlar (trehaloz ve/veya mannitol) ile liyofilize edilmiş LP-NIN-miR formülasyonuna ait a) partikül boyutu ve b) polidispersite indeksi, lipit:kriyoprotektan ağırlık oranları 1:1 - 1:12 (lipit:trehaloz 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 ve 1:12, a/a; lipit:mannitol 1:0, 1:2, 1:4, 1:8 ve 1:12, a/a; lipit:trehaloz:mannitol 1:4:4, a/a) (L: Lipitler, T: Trehaloz, M: Mannitol).	67
4.8.	LP-NIN-miR formülasyonuna ait TEM görüntüleri (ölçek: A) 500 nm ve B) 200 nm).	68
4.9.	LP-NIN-miR formülasyonuna ait TEM görüntüsü A) hidrofilik çekirdek, B) lipid çift tabakası. (Ölçek: 100 nm).	68
4.10.	LP-NIN-miR formülasyonuna ait Nintedanib UV spektrumu.	69
4.11.	Nintedanib'e ait UV spektrofotometre ($\lambda=393$ nm) kalibrasyon doğrusu ve denklemi.	70
4.12.	Farklı konsantrasyondaki Nintedanib çözeltilerine ait UV spektrumu.	72
4.13.	LP-NIN-miR (Nintedanib içeren) ve LP-miR (Nintedanib içermeyen) formülasyonlarına ait Nintedanib UV spektrumu	76
4.14.	Farklı lipit:miR-29b molar oranlarında hazırlanan LP-NIN-miR formülasyonlarında miR-29b'nin enkapsülasyon etkinliğini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.	78
4.15.	Nintedanib'in kümülatif salım grafiği ($n=3$, $\bar{x} \pm SS$).	80
4.16.	miR-29b'nin salım grafiği ($n=3$, $\bar{x} \pm SS$).	81
4.17.	A) LP, B) LP-NIN (0,1 μ M Nintedanib), C) LP-NIN (0,2 μ M Nintedanib) formülasyonlarına ait partikül boyutu dağılımı stabilite sonuçları grafikleri.	84
4.18.	LP-NIN-miR formülasyonuna ait miR-29b miktar tayini stabilite sonuçları.	86

- 4.19.** *In vitro* idiyopatik pulmoner fibrozis modelinin RT-PCR ile karakterizasyonu. (Kontrol TGF- β 1 (-) elde edilen GAPDH sonuçları, normalizasyon faktörleri olarak kullanılmıştır (n=3, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, iki yönlü Student t testi). 87
- 4.20.** NIH-3T3 fare pulmoner fibroblast hücrelerine ait mikroskop görüntüsü. 88
- 4.21.** NIH/3T3 hücrelerinin canlılığı grafiği (n=3, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, iki yönlü Student t testi). 90
- 4.22.** *In vitro* NIH/3T3 hücrelerinde miR-29b'nin LP-NIN-miR aracılığıyla hücre içine alımının değerlendirilmesi. 91
- 4.23.** LP-NIN-miR'in *in vitro* İPF modelinde terapötik etkilerinin RT-PCR ile değerlendirilmesi (n=3) (*: TGF- β 1 (+) ile karşılaştırılmıştır., *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$) (#: TGF- β 1 (-) ile karşılaştırılmıştır., #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$). 93
- 4.24.** LP-NIN-miR'in *in vitro* İPF modelinde terapötik etkilerinin ELISA ile değerlendirilmesi (n=3) (*: TGF- β 1 (+) ile karşılaştırılmıştır., *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$) (#: TGF- β 1 (-) ile karşılaştırılmıştır., #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$). 94

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Katyonik lipozomların yapısında kullanılan lipitler	16
2.2. Nötr lipozomların yapısında kullanılan lipitler	18
2.3. Anyonik lipozomların yapısında kullanılan lipitler	19
2.4. Klinik çalışmaları tamamlanmış lipozomal piyasa preparatları	20
3.1. Lipozomların üretimi için 3 ³ faktöriyel tasarımında kullanılan farklı değişkenler ve seviyeleri.	40
3.2. Kalite Hedefli Ürün Profili (QTPP) ve gerekçeleri.	42
3.3. Kritik Kalite Özellikleri (CQA) ve gerekçeleri.	43
3.4. RT-PCR deneylerinde kullanılacak olan primer dizileri.	51
4.1. Ön formülasyon denemelerine ait değişkenler.	56
4.2. Ön formülasyon denemelerine ait partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli analiz sonuçları (n=3, $\bar{x} \pm SS$).	56
4.3. 3 ³ faktöriyel formülasyon tasarımı ile elde edilen LP formülasyonlarına ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri için Varyans Analizi (ANOVA).	59
4.4. Optimize edilmiş LP formülasyonuna ait yanıtların teorik ve pratik ortalama değerleri ve arzu edilebilirlik değeri.	63
4.5. Nintedanib içermeyen / içeren lipozom (LP, LP-NIN) formülasyonlarına ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli analiz sonuçları	64
4.6. LP, LP-NIN, LP-miR ve LP-NIN-miR formülasyonlarına ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.	65
4.7. Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk, % geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).	71

4.8.	Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait tekrar edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).	72
4.9.	Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait tekrar elde edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).	73
4.10.	Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).	74
4.11.	Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait gün içi tekrar edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).	74
4.12.	LP-NIN ve LP-NIN-miR formülasyonlarına ait Nintedanib %EE değerleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$).	76
4.13.	Farklı lipit:miR-29b molar oranlarında hazırlanan LP-NIN-miR formülasyonlarına ait miRNA enkapsülasyon etkinliği tablosu.	79
4.14.	Ön Formülasyon denemelerine ait stabilite sonuçları.	82
4.15.	LP ve LP-NIN formülasyon denemelerine ait stabilite sonuçları.	83
4.16.	LP-NIN-miR (lipit:miRNA molar oranı 30:1) formülasyon denemesine ait stabilite sonuçları.	86
4.17.	LP-NIN-miR formülasyonuna ait miR-29b sızma stabilitesi sonuçları.	86

1. GİRİŞ

İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF), akciğerdeki interstisyel dokunun kronik ve ilerleyici fibrotik bir hastalığıdır ve yüksek mortalite oranları ile karakterizedir (1). Tanı sonrası genellikle 3-5 yıl gibi kısa bir sağkalım süresine sahiptir (2). Hastalık, hücresel stres ve doku hasarı nedeniyle bozulmuş doku onarımı ile ilişkilidir ve bu durum ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerinin aşırı birikimine yol açarak akciğer yapısını ve işlevini etkiler (3).

Geleneksel tedavilerin sınırlı etkinliği ve potansiyel yan etkileri nedeniyle, İPF'nin tedavisi sınırlıdır (4). Ancak, son yıllarda Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan Nintedanib (NIN) ve Pirfenidon gibi yeni ilaçlar, İPF tedavisinde umut vaat etmektedir. Bununla birlikte, bu ilaçların yan etkileri ve etkinliklerinin sınırlı olması, yeni ve etkili tedavilerin arayışını sürdürmektedir (5).

Gen ekspresyonunu düzenleyen küçük RNA molekülleri mikroRNA (miRNA) olup, İPF patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (6). Özellikle, miR-29b'nin İPF'de ECM bileşenlerinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı ve fibrozisi inhibe edebileceği gösterilmiştir (7). Bu nedenle, miR-29b'nin İPF tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olduğu düşünülmektedir.

Bu tez, İPF tedavisinde yeni bir yaklaşım olarak Nintedanib ve miR-29b'nin birlikte kullanıldığı lipopleks formülasyonlarının geliştirilmesini ve karakterizasyonunu ele almaktadır. Bu çalışma, İPF hücre kültürü modeli ile geliştirilen lipopleks formülasyonlarının hastalığın ilerlemesini yavaşlatma veya durdurma etkinliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bu çalışmanın sonuçları, İPF tedavisinde yeni ve etkili bir terapötik stratejinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir ve hastaların yaşam kalitesini artırabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF)

İPF, akciğerlerdeki interstisyel alanda aşırı miktarda ECM birikimi ve rekonstrüksiyonunun neden olduğu, ilerleyici bir fibrozlu interstisyel akciğer hastalığıdır (8). Dünya genelinde 3 milyondan fazla insanı etkileyen bu hastalık, genellikle kısa bir sağkalım süresi ile karakterizedir (9-12). İPF'nin patolojisi, tekrarlayan alveolar epitelyal hücre hasarı, düzensiz doku onarımı, fibrozis ve ECM'nin aşırı birikmesi ile karakterizedir (6,13,14). Birincil patolojik olay, alveolar epitelyal hücrelerdeki hasardır. Bu hasarın ardından, fibroblastlar ve myofibroblastlar gibi interstisyel hücreler, hasarlı bölgeye göç eder ve fibrozisin başlamasına neden olur. Fibrozis, normal akciğer dokusunun yerini fibröz dokunun almasıyla karakterizedir. Bununla birlikte, hastalığın etiyolojisi net olmamakla birlikte, sigara içme, çevresel maruziyet, viral enfeksiyonlar, mide asidi reflüsü ve genetik yatkınlığın rol oynadığı öne sürülmüştür (13). Koronavirüs Hastalığı 2019 (COVID-19), özellikle ciddi vakalarda, akciğerdeki doku hasarı ve inflamasyonla ilişkili olup, iyileşme sonrasında fibrotik komplikasyonlara yol açabilir. Bu durum, Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) enfeksiyonu geçiren hastalarda virüsün neden olduğu akciğer hasarı, İPF görülme riskinin artmasına neden olabilir (8,9,15).

Profibrotik sitokinler ve büyüme faktörleri, İPF patogenezinde önemli bir rol oynar. Örneğin, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), fibroblastların çoğalması ve ECM sentezi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahiptir (13). Ayrıca, transforme edici büyüme faktör-beta (TGF- β) gibi faktörler, fibroblastların miyofibroblastlara dönüşmesini ve ECM sentezini artırarak fibrozisin ilerlemesine katkıda bulunur (13). Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörlerin fibroblast proliferasyonunu ve ECM sentezini etkiler (16). Ayrıca, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi büyüme faktörlerinin de İPF'de belirgin etkileri vardır. Özellikle, PDGF fibroblastların mitojenik aktivitesini uyararak miyofibroblastların genişlemesine ve ECM birikimine

katkıda bulunabilir (13). Benzer şekilde, FGF'ler de fibroblastlar için güçlü mitojenlerdir ve akciğer fibroblastlarında kollajen sentezini artırabilir (16). Bu faktörlerin anlaşılması, İPF'nin patogenezinin derinlemesine anlaşılmasına ve etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir.

2.2. İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) Tedavisi Yaklaşımları

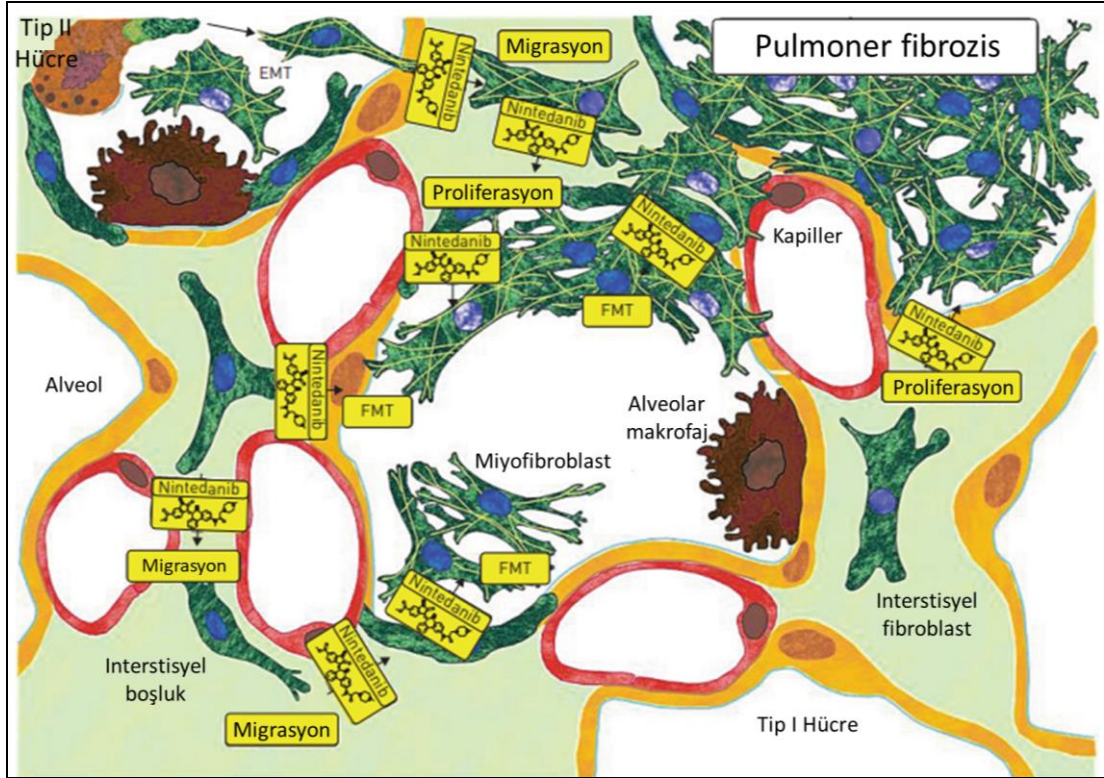
İPF, kronik, progresif ve genellikle ölümcül bir interstisyel akciğer hastalığıdır. İPF'nin etiyojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, genetik ve çevresel faktörlerin hastalığın gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Hastalık, alveoler epitel hücrelerinde tekrarlayan hasar ve anormal yara iyileşmesi sonucu interstisyel fibrozis ile karakterizedir. Tedavi yaklaşımları, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmaya ve semptomları hafifletmeye yöneliktir. İPF'nin tedavisinde, ECM'nin aşırı kollajen sentezini engellemeye yönelik yaklaşımlar, İPF'nin ilerlemesini yavaşlatabilir veya durdurabilir (6).

İPF için tavsiye edilen tedavi seçenekleri oksijen takviyesi ve akciğer nakli ile sınırlıdır (6). Yüksek tıbbi gereksinime rağmen, İPF'nin kronik tedavisi için herhangi bir spesifik farmakolojik tedavi önerilmemiştir (13). Hastalara, kortikosteroidler ve immünosupresif ilaçlar gibi destekleyici tedaviler önerilmiştir, ancak bu tedaviler sınırlı fayda sağlamaktadır ve ciddi yan etki riski taşımaktadır (17,18).

2014 yılına kadar etkin bir tedavisi bulunmayan İPF, Pirfenidon ve Nintedanib etken maddelerinin onaylanmasıyla tedavi seçenekleri genişlemiş, hastaların yaşam kalitesi ve sağkalım süresini artırmada önemli bir rol oynamıştır (9,19-22). Pirfenidon, anti-fibrotik ve anti-inflamatuar özellikleri ile fibroblast proliferasyonunu ve kolajen sentezini inhibe ederken, Nintedanib ise tirozin kinaz inhibitörü olarak fibroblastlar, endotel hücreleri ve perisitlerdeki büyüme faktörü reseptörlerini hedef alarak fibrozis sürecini baskılar. Şekil 2.1'de Nintedanib'in İPF patolojisindeki etki mekanizması, epitel hücre hasarı sonucunda alveoler epitel hücrelerinin apoptoza uğrayarak ve tip II hücrelere dönüşerek epitel-mezenkimal

geçiş (EMT) ve fibroblast-mezenkimal geçiş (FMT) süreçlerine katıldığı gösterilmektedir. Epitel hücrelerin hasarı ile birlikte, rezidüel akciğer fibroblastlarının interstisyuma göç ederek proliferasyona uğradığı ve yaralanma bölgesine taşındığı gözlemlenmektedir. Aşırı fibroblast proliferasyonu, fibroblast migrasyonu ve myofibroblastlara dönüşüm, fibrozise yol açmaktadır. Nintedanib'in inhibitör aktiviteleri, fibroblast ve myofibroblastların göçünü, proliferasyonunu ve fibroblastların myofibroblastlara dönüşümünü inhibe etmektedir. Bu inhibitör etkiler, fibroblastların ve myofibroblastların sayısının azalmasına, ECM birikiminin ve depozisyonunun engellenmesine yol açmaktadır. Nintedanib'in EMT üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamaktadır. Nintedanib, fibroblast ve myofibroblastların proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ederek, fibrozis sürecini yavaşlatmakta ve akciğer dokusunun zarar görmesini engellemektedir (13).

Birçok çalışma, akciğer hastalıklarında dolaşımdaki miRNA seviyelerinin düzensizliğini bildirmiştir. Fibroz dahil çeşitli hücrel süreçlerin temel düzenleyicileri olmalarının yanı sıra miRNA'lar, SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve patogenezi ile ilişkili farklı mekanizmalar yoluyla da rol oynamaktadır. Ek olarak, miRNA'ların COVID-19 ile ilişkili belirtiler, özellikle pulmoner fibrozis, üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (8). İPF tanısı için biyobelirteçlerin araştırılması önemli bir alanı kapsar ve miRNA'lar bu konuda potansiyel biyobelirteçler olarak incelenmiştir. İPF hastalarında belirli miRNA'ların aşağı (miR-29 ve let-7d gibi) veya yukarı (miR-21, miR-154, miR-185, miR-210, miR-302c, miR-376c ve miR-423-5p gibi) regüle edildiği gözlemlenmektedir (6,23-29). Bu değişiklikler, ECM'nin dengesiz bir şekilde birikmesine ve fibrozisin ilerlemesine katkıda bulunabilir. Dolayısıyla İPF tedavisinde, aşağı regüle edilen miRNA'ların replasman tedavisi ile seviyelerinin yükseltilmesi ve yukarı regüle edilen miRNA'ların inhibisyon tedavisi ile seviyelerinin azaltılması hedeflenmektedir. Bu tedavi stratejisi, ECM bileşenlerinin düzenlenmesi ve fibrozisin durdurulması üzerinde olumlu bir etki sağlayarak İPF'nin ilerlemesini yavaşlatabilir veya durdurabilir (19).



Şekil 2.1. Nintedanib'in fibrotik akciğer hastalıklarındaki etki mekanizması (13).

ECM birikimi ve EMT dahil olmak üzere çeşitli süreçleri hedef alan miRNA'ların pulmoner fibrozun temel düzenleyicileri olduğu iyi bilinmektedir. Akciğerdeki fizyolojik durumun korunmasına katılan miRNA dengesi İPF sırasında bozularak pulmoner fibrozun ilerlemesine katkıda bulunur (30-33). Benzer şekilde, COVID-19'da düzensiz olan miRNA'ların, kollajen birikimini ve miyofibroblast dönüşümünü indükleyerek akciğer fibrozisine neden olmaktadır (8).

İPF'de miktarı azalan anti-fibrotik miRNA'ların (anti-fibromiR'lerin) miktarının artırılması, miktarı artan fibrotik miRNA'ların (fibromiR'lerin) bloke edilmesi farklı bir tedavi yaklaşımı olarak çalışmalarda yer almıştır (34-36). Bleomisin ile indüklenen fibrozis fare modelinde miR-29b'nin terapötik etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (6,37). TGF- β 'dan bağımsız olarak bir ECM ve BM (bazal membran) ile ilişkili gen alt grubunu kontrol eden miR-29'nin ekspresyonunun azalmasıyla kollajen ve ECM ilişkili genlerde azalma meydana gelir. Aşırı ekspresyonunun ise, pulmoner fibroziste TGF- β 1, CTGF ve Smad3 sinyalini inhibe ettiği bildirilmiştir (23,38,39).

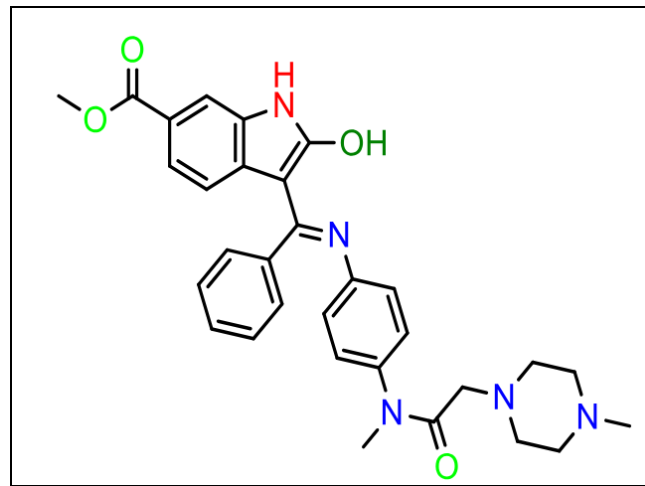
İPF'nin karmaşık patogenezi, farklı tedavi yaklaşımlarının araştırılmasını gerektirir. Nintedanib ve miR-29b'nin, İPF tedavisinde birlikte kullanıldığı çalışmalar literatürde yer almamaktadır. Ancak bu kombinasyonun, farklı tedavi mekanizmaları sayesinde aditif bir etki sağlayabileceği düşünülmektedir (40). Literatürde, farklı etken maddeler ile miRNA'nın aynı taşıyıcı sistem içerisinde formüle edilerek aditif terapötik etki sağlandığı birçok örnek bulunmaktadır (41-47). Bu yaklaşım İPF tedavisinde yeni bir strateji olabilir ve hastaların yaşam süresini ve kalitesini artırabilme potansiyeli gösterebilir.

2.3. Nintedanib

Nintedanib, 6-metoksikarbonil ile substitüe edilmiş bir indolinondur ve kimyasal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir (kimyasal formül: metil(3Z)-3-[[4-[metil-[2-(4-metilpiperazin-1-il)asetil]amino]anilino]-10-fenilmetiliden]-2-okzo-1H-indol-6-karboksilat; moleküler formül $C_{31}H_{33}N_5O_4$). Nintedanib'in molekül ağırlığı 539,62 g/mol'dür. Farklı ortamlar kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, nintedanib'in çözünürlüğü ve yağ/su dağılım katsayısı incelenmiştir. Literatürde yer alan Nintedanib çözünürlük çalışması sonuçlarına göre, Nintedanib'in pH 6,8 PBS tamponunda çözünürlüğü $11.98 \pm 1.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Aynı ortamda %0,5 Tween 80 ilavesiyle bu değer önemli ölçüde artarak $441,67 \pm 10,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'ye ulaşmıştır. pH 7,4 PBS tamponunda ise çözünürlük $5,13 \pm 1,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak saptanmıştır. Yine bu ortamda %0,5 Tween 80 varlığında çözünürlük değeri $132,42 \pm 8,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'ye yükselmiştir (48).

Nintedanib'in yağ/su dağılım katsayısı (LogP) ise pH 6.8 PBS tamponunda 2.40 ± 0.15 olarak ölçülmüştür. %0.5 Tween 80 eklenmesiyle bu değer 1.68 ± 0.12 'ye düşmüştür. pH 7.4 PBS ortamında LogP değeri 2.85 ± 0.24 olarak belirlenmiş olup, %0.5 Tween 80 ilavesiyle bu değer 2.39 ± 0.17 'ye gerilemiştir. Bu sonuçlar, nintedanib'in çözünürlüğünün ortamın pH'ına ve Tween 80 gibi yüzey aktif maddelerin varlığına bağlı olarak önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir. Ayrıca, yağ/su dağılım katsayısı da ortam koşullarına göre farklılık göstermektedir (48).

Nintedanib, antifibrotik etken maddeler grubuna ait bir protein kinaz inhibitörüdür ve platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR)- α ,- β , fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (FGFR)-1,-2,-3 ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR)-1,-2,-3 gibi çeşitli tirozin kinazları hedef alır (13,16,48). Nintedanib, bu reseptörlerin adenosin trifosfat (ATP) bağlayan bölgelerine kompetitif olarak bağlanarak intraselüler sinyalizasyonu bloke eder. Böylece İPF patolojisinde kritik rol oynayan akciğer fibroblastlarının proliferasyon, migrasyon ve farklılaşmasını engeller (13,16).



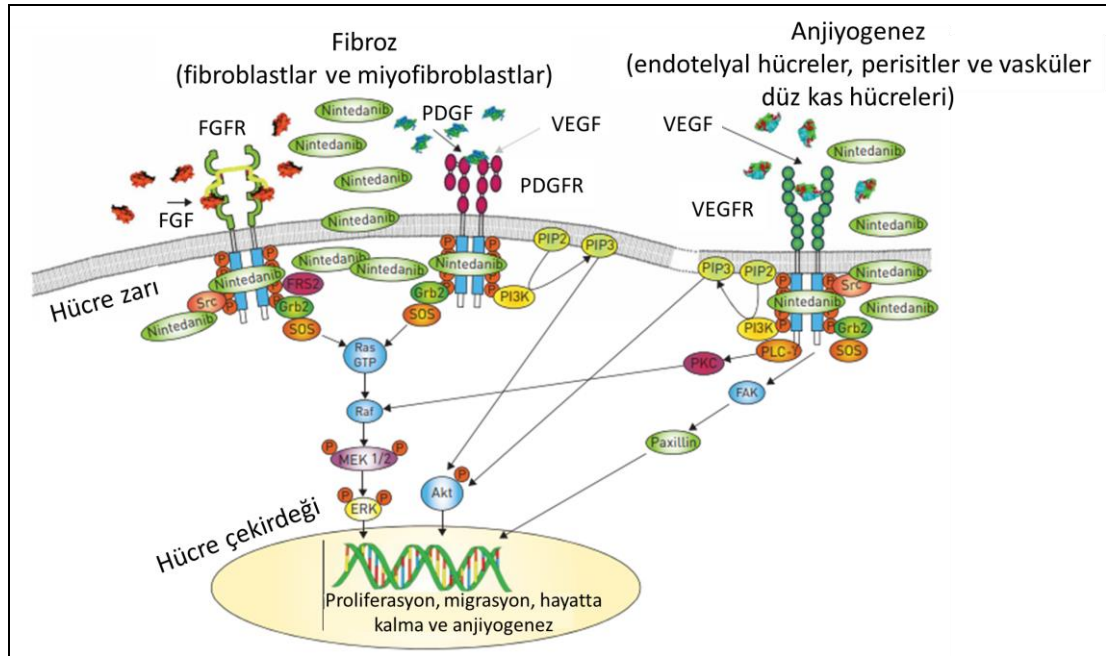
Şekil 2.2. Nintedanib'in kimyasal yapısı (49).

Nintedanib'in polifarmakolojisini ve sinyal yollarını Şekil 2.3'te gösterilmektedir. Nintedanib, FGFR, PDGFR ve VEGFR reseptörlerinin hücre içi ATP bağlanma bölgelerine bağlanarak bu reseptörlerin otofosforilasyonunu ve sinyal kaskadlarını inhibe eder. Bu inhibisyon, fibroblast ve myofibroblastların proliferasyonunu ve migrasyonunu azaltarak fibrozisi önler. Özellikle FGFR'nin inhibisyonu fibroblast proliferasyonunu engellerken, PDGFR'nin inhibisyonu fibroblast migrasyonunu durdurur (13).

Anjiyogenezde ise, VEGFR'ye bağlanarak anjiyogenezi inhibe eder ve Fosfatidilinositol 3-Kinaz (PI3K), Protein kinaz C (PKC) ve Fokal adezyon kinaz (FAK) gibi sinyal moleküllerinin aktivasyonunu engeller. PDGFR inhibisyonu, vasküler hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu azaltır ve Protein Kinaz B (Akt) ve Paksillin gibi sinyal moleküllerini inhibe ederek anjiyogenezi baskılar. Bu

mekanizmalar, İPF gibi hastalıkların tedavisinde hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve anjiyogenezi azaltarak önemli rol oynar. Nintedanib, çeşitli reseptörleri hedef alarak hem fibrozis hem de anjiyogenez süreçlerini kontrol altına alır ve hastalık progresyonunu yavaşlatır. Bu mekanizmalar, Nintedanib'in çok yönlü etkilerini ve terapötik potansiyelini açıklar (13).

Nintedanib, oral yolla alındığında yaklaşık 2-4 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşır ve biyoyararlanımı %4,69'dur. Emilimi ve biyoyararlanımı taşıyıcı etkiler ve ilk geçiş metabolizması ile azalır. İlacın plazmada yüksek protein bağlanma oranı vardır ve tercihli olarak plazmada dağılır. Nintedanibin başlıca metabolik yolu esterazlar tarafından hidrolitik kırılma olup, sonrasında glukuronidasyon ile metabolize edilir. İlacın eliminasyonu başlıca fekal/safra yolu ile gerçekleşir ve terminal yarılanma ömrü 10-15 saat arasındadır. Bu özellikler, nintedanibin etkinliğini ve güvenliğini artırarak İPF tedavisinde önemli bir seçenek olmasını sağlar (50-52).



Şekil 2.3. Nintedanib'in polifarmakolojisi ve sinyal yolları (*FGFR*: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü, *PDGFR*: Platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü, *FGF*: Fibroblast büyüme faktörü, *RAS*: Rat Sarkom Virüsü Onkogeni proteini, *RAF*: Hızlı İvme Kazanan Fibrosarkom kinaz, *MEK*: Mitogenle Aktive Olan Protein Kinaz/ Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz, *ERK*: Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz, *Akt*: Protein Kinaz B, *VEGFR*: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü, *VEGF*: Vasküler endotelial büyüme faktörü, *PI3K*: Fosfatidilinositol 3-Kinaz, *PKC*: Protein kinaz C, *FAK*: Fokal adezyon kinaz, *Paksillin*: Paksillin proteini) (10).

Nintedanib'in piyasa preparatının (Ofev®), farmasötik dozaj formu yumuşak jelatin kapsüldür ve oral yolla uygulanmaktadır (53). Ancak, Nintedanib'in oral uygulaması gastrointestinal yan etkilere, özellikle mide bulantısı ve diyareye neden olabilir (54-56). Ek olarak, oral yoldan uygulanması entübe ve mekanik ventilasyona ihtiyaç duyan İPF hastalarında ve COVID-19 gibi solunum yetmezliği olan hastalarda kullanımlarını kısıtlar (9). Gastrointestinal yan etkilerin önlenmesi veya entübe ve mekanik ventilasyona ihtiyaç duyan hastalarda kullanımı için Nintedanib'in lipozom taşıyıcı sistemlerle intravenöz olarak uygulanması düşünülebilir (57).

Nintedanib, akciğer fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu, fibroblast motilitesini, TGF- β ile uyarılan fibroblasttan myofibroblasta farklılaşmasını, TGF- β 'nin indüklediği kollajen sekresyonunu ve birikimini azaltır. Ayrıca İPF'li hastalardan alınan akciğer fibroblastlarında büyüme faktörü kaynaklı proliferasyonu, fibroblast motilitesini ve TGF- β ile uyarılan fibroblasttan myofibroblasta farklılaşmayı inhibe eder. Bu hücrelerde TGF- β 'nin indüklediği kollajen sekresyonunu ve birikimini azaltır (58-60).

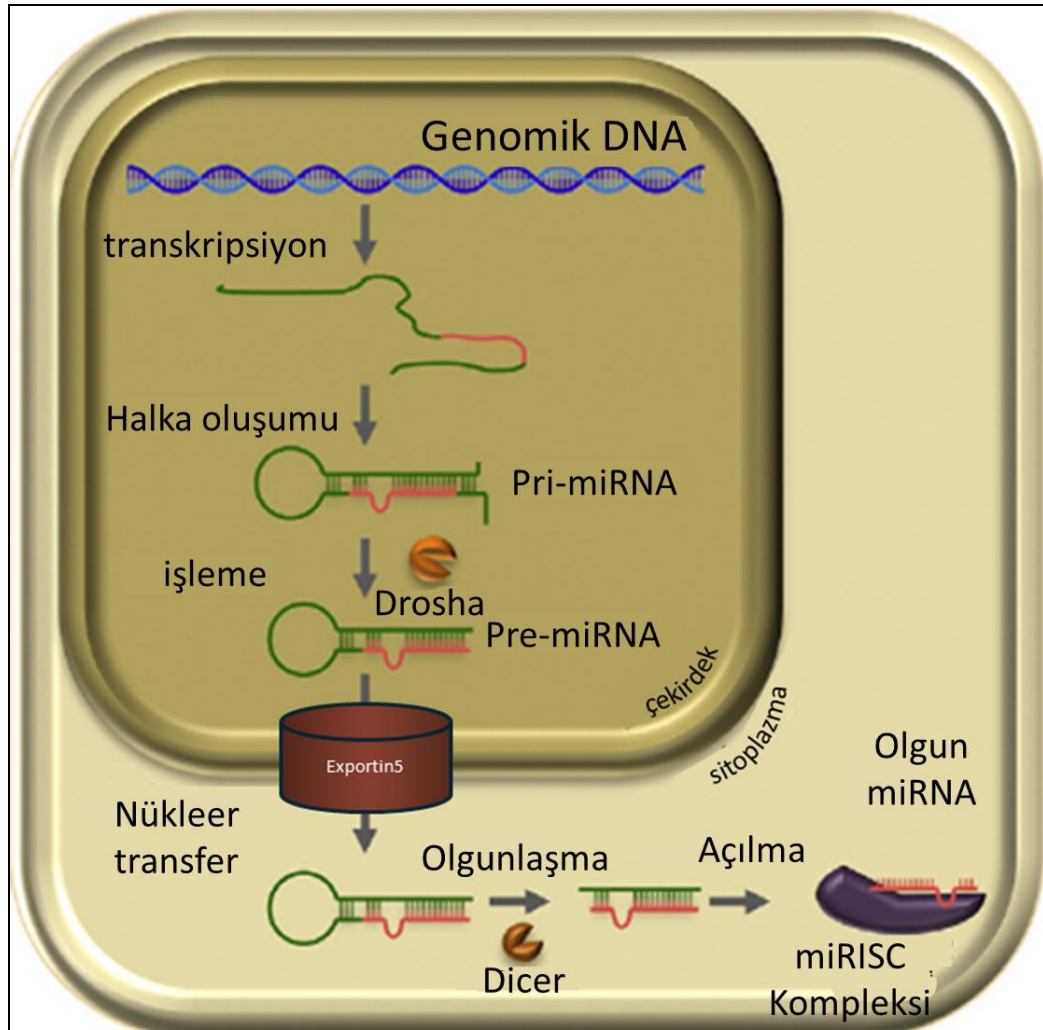
İki tekrarlı faz III INPULSIS® çalışmasında, nintedanib'in, İPF'li hastalarda hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir (13). Klinik dışı modellerde, Nintedanib'in antifibrotik ve antiinflamatuvar etkiler gösterdiği ve İPF hastalarından alınan akciğer fibroblastlarının çoğalmasını ve dönüşümünü inhibe ettiği görülmüştür (61).

2.4. miR-29b

18-22 nükleotid uzunluğunda, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan kodlamayan RNA'lar miRNA olarak adlandırılır. İnsan genomu, transkripsiyon sonrası baskı yoluyla birçok farklı mRNA hedefini düzenleyebilen, 2588 miRNA içerir (62). miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3' çevrilmemiş bölgelerine antisens olarak bağlanır ve translasyonu bloke ederek veya hedef mRNA'ların

bozulmasını indükleyerek gen ekspresyonunu transkripsiyonel olarak modüle ederler (8).

miRNA biyogenezi Şekil 2.4'te gösterilmiştir. İlk adımda RNA polimeraz II (pol II), miRNA genlerini uzun birincil transkriptlere (pri-miRNA'lar) kopyalar. Sonraki adımda, nükleer RNaz III Drosha, pri-miRNA'ları pre-miRNA'lara, yani kök-döngü ara maddelerine dönüştürür. Pre-miRNA'lar, nükleositoplazmik taşıyıcı faktör Exportin-5 ve RanGTPase tarafından sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmada, RNase III endonükleaz Dicer, pre-miRNA'nın ilmek bölgesini keserek 22 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA'yı oluşturur. RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) aracılığıyla olgun miRNA, hedef mRNA'lara bağlanır (62).



Şekil 2.4. miRNA biyogenezinin şematik gösterimi (62).

Tek bir miRNA, birden fazla mRNA'yı hedef alabilir; bu şekilde etkilediği yolak ile ilişkili hastalığın oluşumuna veya engellenmesine katkıda bulunabilir (63). Bu nedenle son yıllarda miRNA temelli terapötik yaklaşımlar ilgi çekici hale gelmiştir. MiRNA'ların ekspresyon profilleri ve mikrodizilerinin analizi, miRNA'ların insan hastalıklarındaki patojenik süreçlerde yer aldığını göstermektedir (64). Bu bulgular ışığında, miRNA mimik veya antagomir kullanımının, miRNA düzensizliğinin neden olduğu hastalıklar için yeni tedavi stratejileri olarak düşünülmesi gerekmektedir. MiRNA terapötik yaklaşımları, hedef miRNA'nın ekspresyon durumuna bağlı olarak *inhibisyon ve replasman tedavisi* olarak sınıflandırılabilir (62,65,66).

Hastalık patolojisinde yukarı regüle edilmiş miRNA tarafından yürütülen protein ekspresyonunu inhibe etmek için *miRNA inhibisyon tedavisi* kullanılabilir (67). *Replasman tedavisinde* ise aşağı regüle olmuş miRNA'nın yukarı regülasyonunu sağlamak amacıyla olgun endojen miRNA ile aynı diziyi içeren ve doğal olarak üretilen miRNA ile aynı biyolojik fonksiyona sahip tek veya çift sarmallı miRNA mimikleri kullanılır (68). Ancak, miRNA'nın taşınması ve stabilitesi, bu terapötik stratejilerin etkinliğini belirleyen kritik faktörlerdir. Çıplak miRNA ribonükleazlar tarafından parçalanır, bunun sonucunda kandaki yarılanma ömrü çok kısa olur (66). Stabil, biyolojik olarak parçalanabilen, biyoyumlu ve hedeflenebilir bir taşıyıcı sistemi tasarlanarak miRNA'nın hedef bölgeye ulaştırılması sağlanabilir (62,69,70).

Retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından hızlı temizlenmeleri nedeniyle, miRNA'lar serumda yaklaşık 5 dakikalık bir yarı ömre sahiptirler ve bu nedenle serumda çok düşük bir stabiliteye sahiptirler (71,72). Polianyonik ve makromoleküler yapıları nedeniyle hücre içi alımları zayıftır. Viral ve viral olmayan taşıyıcı sistemleri geliştirilerek enzimatik bozulmaya karşı koruma sağlanarak fizyolojik koşullardaki stabiliteleri ve hücresel alım artırılır (73). Viral taşıyıcı sistemler yüksek toksisiteye sahip olup, bağışıklık tepkisi oluşturma riskini artırır. Büyük çapta üretimlerinde bazı zorluklar vardır ve tedavileri de aşırı pahalıdır.

Bunun tersine, viral olmayan taşıyıcı sistemler güvenlidir ve yüksek enkapsülasyon verimine sahiptir (62).

Viral olmayan taşıyıcı sistemleri geliştirmek için çeşitli biyomateryaller önerilmiştir. Etkili bir şekilde miRNA taşınımı için lipit, polimer ve inorganik bazlı nanopartiküller kullanılmıştır ancak bu yaklaşımlar arasında lipit yapılı nanotaşıyıcılar en çok incelenen miRNA taşıyıcı sistemleridir (74,75). Biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalarının yanı sıra, formülasyonları ve ölçek büyütme üretim süreçleri oldukça basittir (76).

21-25 nükleotid uzunluğunda küçük, tek sarmallı RNA molekülü olan miR-29b genellikle hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (77). Olgun miR-29b'nin nükleotid dizilimi 5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3' şeklindedir. Kimyasal olarak, miR-29b, riboz şekerleri, fosfat grupları ve adenin, guanin, sitozin, urasil gibi dört bazdan oluşan nükleotidlerin polimerizasyonu ile yapılandırılmıştır (78). Bu moleküler yapı, miR-29b'nin stabilitesini ve biyolojik işlevlerini etkiler.

miR-29b'nin kimyasal özellikleri, biyolojik fonksiyonları ve etkileşimleri açısından büyük önem taşır. Nükleotid dizilimi, miR-29b'nin hedef mRNA'lar ile tamamlayıcı baz eşleşmesi yapabilme yeteneğini belirler. Bu baz eşleşmesi, miR-29b'nin spesifik mRNA moleküllerine bağlanarak translasyonu inhibe etmesine veya mRNA yıkımını tetiklemesine olanak tanır (79,80). miR-29b'nin hedef genler üzerindeki etkisi, özellikle kollajen ve diğer ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezini düzenleyen genler üzerinde yoğunlaşmıştır.

Kimyasal stabilite açısından, miR-29b, RNaz enzimi tarafından kolayca parçalanabilir. Bu nedenle, miR-29b'nin terapötik uygulamaları için uygun taşıyıcı sistemlerin kullanılması önemlidir (81,82). Örneğin, lipozomlar veya polimerik nanopartiküller gibi taşıyıcı sistemler, miR-29b'nin koruyucu bir ortamda taşınmasını sağlayarak hedef hücrelere etkin bir şekilde ulaştırılmasını sağlar (83).

Bu kimyasal özellikler, miR-29b'nin terapötik potansiyelini artırmak için geliştirilmiş taşıyıcı sistemler ile birleştirilerek, özellikle fibrotik hastalıklar gibi kronik ve tedavisi zor koşullarda önemli bir tedavi seçeneği sunar (37).

2.5. Lipozomal İlaç ve Gen Taşıyıcı Sistemler

İlaç ve gen taşıyıcı sistemler, farmasötik alanında ilaçların etkin bir şekilde taşınması ve hedef dokulara ulaştırılması için önemlidir. Bu sistemler, ilaçların biyoyararlanımını artırarak istenmeyen yan etkileri azaltabilir ve tedaviye spesifik bir yaklaşım sunabilir (84). Gen taşıyıcı sistemler ise gen terapisi alanında büyük bir öneme sahiptir; genetik materyalin hücrelere aktarılmasını ve gen ifadesinin düzenlenmesini sağlar (85).

Genel olarak, ilaç ve gen taşıyıcı sistemler iki ana kategori altında incelenebilir: viral ve viral olmayan taşıyıcılar. *Viral taşıyıcılar*, genellikle retrovirüsler veya adenovirüsler gibi virüslerin genetik materyalini hücrelere taşımak için modifiye edilmiş halde kullanılır. Bunlar, yüksek transdüksiyon verimliliği sağlayabilirken, toksisite ve immünojenisite gibi sakıncalarla da ilişkilendirilebilirler (86). *Viral olmayan taşıyıcılar* ise genellikle lipit bazlı veya polimerik nanopartiküllerdir (87). Bu taşıyıcılar, genlerin korunmasını sağlayarak hedef dokulara taşınmasını kolaylaştırır.

Özellikle lipit bazlı taşıyıcılar arasında lipozomlar önemli bir yere sahiptir. Lipozomlar, lipit çift tabakalarından oluşan küresel yapılar olarak tanımlanır ve ilaç/genlerin lipofilik çekirdeğine enkapsüle edilmesine olanak tanır (88,89). Lipozomlar, toksisite ve immünojenisite gibi sorunları en aza indirirken, istenilen hedef dokulara yönlendirilebilirler (90). Bu özellikleri, lipozomların ilaç ve gen taşıyıcı sistemlerinde tercih edilmesini sağlar.

Lipozomlar, genellikle amfifilik lipit, fosfolipid çift tabakası ve sulu bir çekirdekten oluşan, mezomorfik yapıya sahip, toksik olmayan, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen sentetik keseciklerdir (91). Yapılarında polar bir

hidrofilik baş ve iki apolar hidrofobik zincir bulunur ve temel olarak gliserofosfolipitler ve sfingomiyelinler dahil olmak üzere iki ana kategoriyi içeren fosfolipitlerden oluşurlar (92). Hidrofobik kuyrukta bulunan hidrokarbon zincirlerinin sayısı, uzunluğu ve doyunluğu lipozomların yapısında önemli rol oynar. Çift kuyruklu lipit molekülleri, tek kuyruklu lipit moleküllerinden daha az toksiktir. Lipozomun transfeksiyon etkinliği, kuyruk uzunluğunun ve doymamışlığın artmasıyla artar (93). Farklı morfolojik özelliklere ve bileşime sahip çeşitli boyutlardaki lipozomlar tekrarlanabilir ve kolay bir şekilde üretilebilir (94).

Lipozomlar, hedef hücre ve dokularda hidrofilik, lipofilik ve amfifilik maddeleri kapsülleyerek, taşıyarak ve salarak aktif bileşiklerin etkinliğini, stabilitesini ve raf ömrünü arttırmaları (95). Hidrofilik moleküller sulu çekirdekte kapsülendirken, hidrofobik moleküller çift tabakalı membran içinde tutulabilir (91). Lipozom yapısındaki lipit sınıfı, doyunluk derecesi, boyutu ve lipozomun hazırlanma yöntemi, partiküllerin kapsülendirilmesi ve salınması gibi özellikleri belirler (96).

Lipozomlar, boyut ve tabaka gibi yapısal özelliklerine veya yüzey yüklerine göre sınıflandırılabilir. Lipozomlar tabaka yapılarına göre 3 gruba ayrılır: Tek tabakalı, çok tabakalı ve oligolameller (97). Tek tabakalı lipozomlar, küçük tek tabakalı kesecikler (SUV; yaklaşık 100 nm'ye kadar), büyük tek tabakalı kesecikler (LUV; yaklaşık 100 nm ile 1 µm arasında) ve boyutu 1 µm'den büyük dev tek tabakalı keseciklerdir (GUV'ler). Çok tabakalı lipozomlar (LMV) genellikle 500 nm'den büyüktür ve birçok eşmerkezli tabakadan oluşur. Bunların dışında az sayıda eşmerkezli çift tabakalı ve 0,1-1 µm boyutunda ve çok eşmerkezli birbirine bağlı tek tabakalı veya birden fazla eşmerkezli olmayan çift tabakalı ve boyutu 1 µm'den büyük olan oligolameller lipozomlar da bulunmaktadır (98). Multi-veziküler lipozomlar (MVL) da bu sınıflandırmaya dahildir (94,96). Lipozomların bu boyutsal ve yapısal sınıflandırmaları aynı zamanda ilaç taşıma özelliklerini de etkiler (99). Tek tabakalı lipozomlar büyük bir sulu çekirdeğe sahip olduklarından genellikle hidrofilik malzemelerin taşınmasında kullanılır (100). Çok tabakalı kesecikler ise iki tabakalı lipit yapıya sahip olduklarından hidrofobik maddelerin taşınmasında

kullanılır (101). Boyutlarından dolayı membran model sistem olarak GUV'ler kullanılmaktadır (102).

Boyut ve tabakalılığın yanı sıra lipozomlar yüzey yüküne veya fonksiyonel yüzey değişikliklerine göre de sınıflandırılabilir (94). Lipozomları oluşturan lipit molekülleri, hidrofilik başlarının yüklerine göre pozitif yüzey yükü (katyonik), negatif yüzey yükü (anyonik) ve nötr lipozomlar olarak 3'e ayrılır (93,96).

Katyonik lipozomlar, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler yoluyla negatif yüklü bileşikleri taşıyabilirler (103). Deoksiribonükleik Asit (DNA), miRNA, Küçük Müdahaleci RNA (siRNA) veya Oligonükleotid (OND) taşınmasında yer alan katyonik lipozomlara lipopleks denir (102,104). Katyonik başa sahip lipitlerden oluşan lipozomlar, negatif yüklü hücre zarına daha yüksek bir afinite gösterir ve hücre alımı artırır. Ayrıca, bu pozitif yüklü baş, proton süngeri etkisiyle lipozomdan kaçarak, lipozomun taşıdığı molekülü parçalanmaktan korur (103).

Lipozomların yapısında yaygın olarak kullanılan başlıca katyonik lipitler Tablo 2.1'de sunulmuştur. Katyonik lipit formülasyonlarında en yaygın kullanılan lipit olan N-[1-(2,3-Dioleoiloksi)propil]-N, N, N-trimetilamonyum klorür (DOTAP), yaklaşık 30 yıl önce sentezlenmiş olup, fizyolojik pH'da ester bağının biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle nispeten düşük toksisiteye sahiptir. DOTAP'a yapısal olarak benzer olan 1,2-di-O-oktadesenil-3-trimetilamonyum propan (DOTMA), ester bağı yerine bir eter bağına sahiptir. DOTAP kimyasal olarak kararsız olmasına rağmen, biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle katyonik lipozom formülasyonlarında sıkça kullanılır. Diğer yandan, DOTMA biyolojik olarak parçalanamaz ve stabil bir yapıya sahiptir. Ticari transfeksiyon reaktifi Lipofectin, DOTMA ve 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE) içerir (93).

Tablo 2.1. Katyonik lipozomların yapısında kullanılan lipitler.

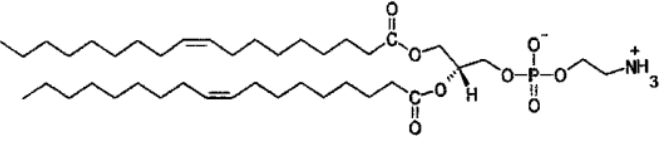
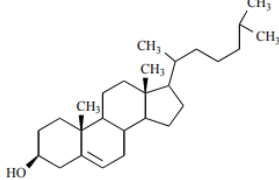
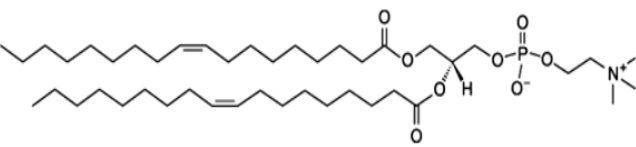
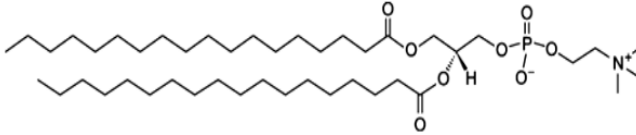
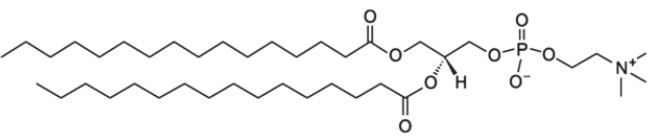
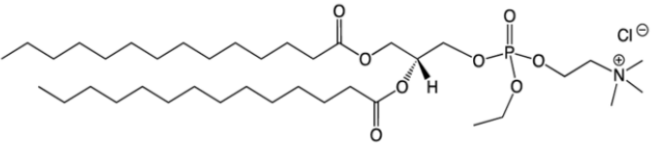
Lipidin Adı	Kimyasal Adı	Kimyasal Yapısı	Referans
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleiloksi)propil]-N, N, N-trimetilamonyum klorür		(105-107)
DDAB	dimetil dioktadesil amonyum bromür		(74,106)
CTAB	trimetilhekzadesil amonyum bromür		(108)
DC-Chol	3β-[N-(N',N'-dimetilaminoetan)-karbamoil]kolesterol hidroklorür		(106,109)
DODMA	1,2-dioleiloksi-3-dimetilaminopropan		(74,106)
DOTMA	1,2-di-O-oktadesenil-3-trimetilamonyum propan		(74,105, 106)
DOSPA	(+)-N,N-dimetil-N-[2-(sperminkarboksamido)etil]-2,3-bis(dioleiloksi)-1-propaniminyum pentahidroklorür		(106,110)
DOGS	Dioktadesil amidoglisilspermin (Transfectam®)		(106,111)
BCAT	O-(2R-1,2-di-O-(1,9-Z-oktadekadienil)-gliserol)-3-N-(bis-2-aminoetil)-karbamat		(112)
DMRIE	1,2-dimiristoloksiipropil-3-dimetilhidroksietil amonyum bromür		(110)

Katyonik lipit molekülleri ile negatif yüklü nükleik asit molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimler sayesinde stabil bir kompleks oluşur. Bu da nükleik asitleri nükleaz enzimlerine karşı koruyarak lipoplekslerin *in vivo* transfeksiyon verimliliğini artırır (103). Katyonik lipozomlar, ilaç taşıma konusunda üstün özelliklere sahip olmalarına rağmen, negatif yüklü hücrel bileşenler ve katyonik lipitler arasındaki etkileşim nedeniyle sitotoksik veziküller olarak kabul edilirler (103,113,114). Polietilen glikol ile kaplama (PEGilasyon) ile katyonik lipozomların RES tarafından tanınması azaltılabilir ve böylece hücrel sitotoksositeye neden olma olasılığı düşürülebilir (103,113,115).

Nötr lipozomların yapısında kullanılan lipitler Tablo 2.2’de sunulmuştur. Nötr yüzey yükleri sayesinde yüksek vezikül stabilitesine ve *in vitro/in vivo* performansa sahiptirler (103). Nötr lipitler kullanılarak geliştirilen lipozomlar, düşük toksisite ve yüksek verim sağlar (115).

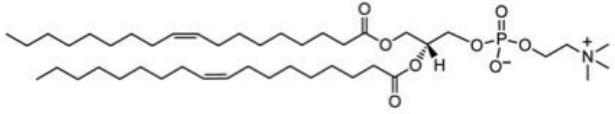
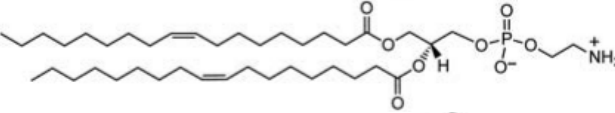
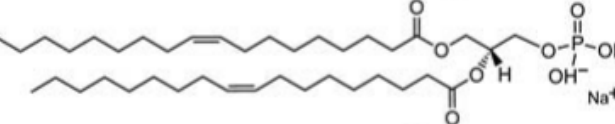
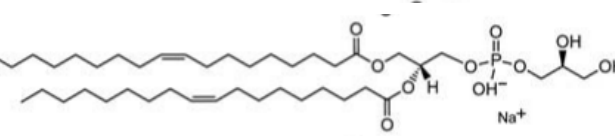
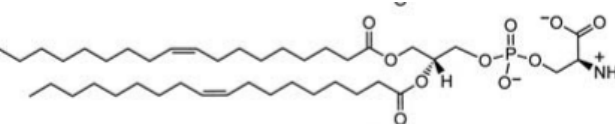
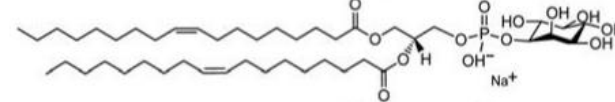
Nötr lipitler, anyonik veya katyonik lipozomların formülasyonunu iyileştirmek için yardımcı lipitler olarak da kullanılabilirler. Katyonik lipozom yapısına yardımcı bir lipid dâhil edildiğinde, daha yüksek hücrel alım ve endozomal kaçış sağlanabilir, böylece stabilitesi artırılabilir (103,113,114). Katyonik lipozom formülasyonlarında, genellikle DOPE ve 3 β -Hidroksi-5-kolesten (Kolesterol, CHOL) gibi lipitler yardımcı lipid olarak kullanılır (104,114,116-118). Bunun dışında sıkça kullanılan diğer yardımcı lipitler arasında 1,2-dioleoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin (DOPC) ve 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin (DSPC) bulunmaktadır (92). DOPE ve CHOL gibi yardımcı lipitlerin kullanımıyla, lipit membran yapısı stabilize edilir ve opsonizasyon ve RES tarafından tutulma azaltılır (93). Bu durumda, lipozomların taşıyıcı verimliliği ve *in vivo* transfeksiyon etkinliği artırılmış olur.

Tablo 2.2. Nötr lipozomların yapısında kullanılan lipitler.

Lipidin Adı	Kimyasal Adı	Kimyasal Yapısı	Referans
DOPE	1,2-diöleoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin		(106,119)
Kolesterol, CHOL	3β-Hidroksi-5-kolesten		(106,115,120)
DOPC	1,2-diöleoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin		(106,119, 121)
DSPC	1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin		(106,122)
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfatidilkolin		(106,123)
EPC	1,2-diöleoil-sn-glisero-3-etilfosfokolin		(106,124)

Anyonik lipozomların düşük sitotoksitesinden dolayı nükleik asit iletimi için uygun olabileceği düşünülmektedir. Ancak lipitler ve miRNA arasında elektrostatik etkileşimlerin olmaması nedeniyle yükleme kapasiteleri sınırlıdır (113,115). Anyonik lipozomların yapısında kullanılan lipitler Tablo 2.3'te sunulmuştur.

Tablo 2.3. Anyonik lipozomların yapısında kullanılan lipitler.

Lipidin Adı	Kimyasal Adı	Kimyasal Yapısı	Referans
PC	Fosfatidilkolin		(106,111)
PE	fosfatidil etanolamin		(106,111)
PA	L-α-fosfatidik asit		(106,111)
PG	1,2-dimiristoil-sn-glisero-3-fosfo-(1'-rac-glisero)		(106,111)
PS	Fosfatidilgliserol 1,2-dimiristoil-sn-glisero-3-fosfo-L-serin		(106,111)
PI	Fosfatidilinositol		(111)

Nötr veya anyonik lipozomlar, düşük opsonizasyon eğilimi, pro-enflamatuar reaksiyonlara neden olmama, plazma proteinlerine bağlanma ve non-spesifik bağışıklık tepkilerini indükleme gibi üstünlüklere sahiptir. Yüklü lipozomların aksine, nötr lipozomlar biyolojik sıvılarda daha az agregasyona eğilimlidirler, bu nedenle fagositoz yapan makrofajlar tarafından daha az tutulurlar ve endotelyuma yapışmazlar (104). Klinik çalışmaları tamamlanmış birçok lipozomal preparat piyasada bulunmaktadır (103) ve Tablo 2.4'te sunulmuştur. Sonuç olarak, lipozomal taşıyıcı sistemler, gen terapisi ve çeşitli hastalıklarında tedavisinde önemli bir taşıyıcı sistemdir. Yapılarının ve bileşenlerinin uygun şekilde tasarlanması, formülasyon stratejilerinin optimize edilmesi ve klinik uygulamaların geliştirilmesi, lipozomal taşıyıcı sistemlerin terapötik etkinliklerinin artırılmasını sağlayabilir (125, 126).

Tablo 2.4. Klinik çalışmaları tamamlanmış lipozomal piyasa preparatları.

Piyasa Preparatı	Lipitler	Lipit molar oranları / Toplam lipit konsantrasyonu	Etken Madde	Partikül boyutu	Endikasyon	Onay Yılı	Referans
Doxil® (Caelyx®) (Jenerik ürün Lipo- Dox®)	HSPC : CHOL : PEG 2000- DSPE	56 : 39 : 5	doksorubisin	~ 100 nm	meme ve yumurtalık kanseri kaposi sarkomu	1995	(127-132)
Myocet®	EPC : CHOL	55 : 45	doksorubisin	~ 180 nm	metastatik meme kanseri	2000	(127-129,133, 134)
DaunoXome®	DSPC : CHOL	2 : 1	daunorubisin	45 - 80 nm	kaposi sarkomu	1996	(127-131,135)
Marqibo®	DSPC : CHOL	57,4 : 42,6	vinkristin sülfat	130 – 150 nm	akut lenfoblastik lösemi	2012	(130,135-138)
Mepact®	POPC : OOPS	7 : 3	mifamurtid	2,0 – 3,5 µm	miyosarkom	2009	(130,135,136)
Vyxeos®	DSPG : DSPC : CHOL	2 : 7 : 1	daunorubisin ve sitarabin	~ 110 nm	akut lenfoblastik lösemi	2017	(130,135,136, 139,140)
Doxoves	HSPC : CHOL : mPEG2000-DSPE	56,2 : 38,5 : 5,3	doksorubisin	~ 95 nm	Meme kanseri	1995	(141)
Onivyde®	DSPC : Chol : MPEG-2000- DSPE	3 : 2 : 0,015	irinotekan	~ 110 nm	metastatik pankreas adenokarsinoması	2015	(130,134-136)

Tablo 2.4. (Devam) Klinik çalışmaları tamamlanmış lipozomal piyasa preparatları.

Piyasa Preparatı	Lipitler	Lipit molar oranları / Toplam lipit konsantrasyonu	Etken Madde	Partikül boyutu	Endikasyon	Onay Yılı	Referans
Lipo-Dox®	DSPC : CHOL : PEG 2000-DSPE	56 : 39 : 5	doksorubisin	~ 100 nm	meme ve yumurtalık kanseri kaposi sarkomu	2013	(127,131,142)
Ambisome®	DSPC : CHOL : DSPG	2 : 0,8 : 1	amfoterisin B	50 – 100 nm	sistemik fungal enfeksiyonlar	1997	(127,130,131,135)
DepoCyt®	(DepoFoam®) CHOL : Triolein : DOPC : DPPG	11 : 1 : 7 : 1	sitarabin	20 µm	lenfoma	1999	(127,130,131,135,136,143)
Visudyne®	EPG : DMPC	3 : 5	Verteporfin	< 100 nm	Yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), patolojik miyopi ve oküler histoplazmozis	2000	(130,131,135)
Abelcet®	DMPC : DMPG	7 : 3	Amfoterisin B	1,6 - 11 µm	şiddetli invaziv fungal enfeksiyonlar	1995	(130,131,134,144)
Arikayce® (Alis®)	DPPC : CHOL	2 : 1	Amikasin	200 – 300 nm	Mycobacterium avium kompleksi (MAC) akciğer hastalığı	2018	(135,145)
Definity®	DPPA : DPPC : MPEG5000 DPPE	10 : 82 : 8	Perflutren	1,1 – 3,3 µm	ultrason kontrast maddesi	2001	(130,146)
DepoDur®	(DepoFoam®) CHOL : Triolein : DOPC : DPPG	11 : 1 : 7 : 1	Morfin sülfat	17 - 23 µm	Ağrı	2004	(131,135,143,147)

Tablo 2.4. (Devam) Klinik çalışmaları tamamlanmış lipozomal piyasa preparatları.

Piyasa Preparatı	Lipitler	Lipit molar oranları / Toplam lipit konsantrasyonu	Etken Madde	Partikül boyutu	Endikasyon	Onay Yılı	Referans
Shingrix®	MPL : DOPC : CHOL	50 mcg : 1 mg : 0,25 mg, 0,5 mL ⁻¹	Rekombinant varicella zoster virüsü yüzey glikoprotein E (gE) antijen bileşeni	50 – 100 nm	Zona (<i>herpes zoster</i>)	2017	(135,148)
Diprivan® (Propofol-Lipuro® / Propofol®)	SBO : EYL (DepoFoam®)	1 : 1	Propofol	160 – 180 nm	Anestezi, sedasyon	1989	(130,149-151)
Exparel®	Trikaprilin : CHOL : DPPG : DEPC	2,0 : 4,7 : 0,9 : 8,2 mg.mL ⁻¹	Bupivakain	24 - 31 µm	Ağrı	1972	(135,143,152)
Lipusu®	Lecithin : CHOL	72 : 10,8 g.1500 mL ⁻¹	Paklitaksel	400 nm	Meme kanseri, over kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri	2003	(153,154)
Onpattro®	DLin-MC3-DMA : DSPC : CHOL : PEG2000-C-DMG	13,0 : 3,3 : 6,2 : 1,6 mg.mL ⁻¹	Patisiran (siRNA)	60 -100 nm	transtiretin (TTR) aracılı amiloidoz	2018	(130,155,156)
Comirnaty® (jenerik ürün Tozinameran®)	ALC-0315 : ALC-0159 : DSPC : CHOL	0,43 : 0,05 : 0,09 : 0,19 mg, 0,3 mL ⁻¹	SARS-CoV-2 virüsünün proteinini kodlayan mRNA	80–85 nm	COVID-19	2020	(130,157,158)

Tablo 2.4. (Devam) Klinik çalışmaları tamamlanmış lipozomal piyasa preparatları.

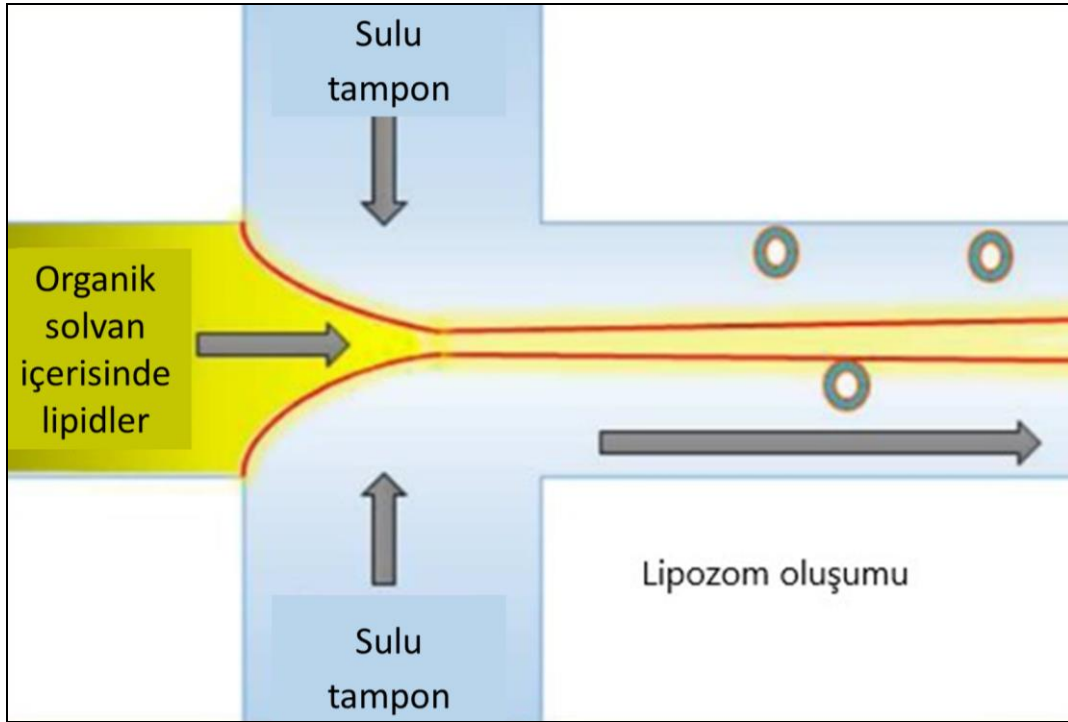
Piyasa Preparatı	Lipitler	Lipit molar oranları / Toplam lipit konsantrasyonu	Etken Madde	Partikül boyutu	Endikasyon	Onay Yılı	Referans
Moderna®	SM-102 : PEG2000-C-DMG : DSPC : CHOL	Toplam lipit konsantrasyonu: 1,93 mg.0,5 mL ⁻¹	SARS-CoV-2 virüsünün proteinini kodlayan mRNA	75 nm	COVID-19	2020	(130,159,160)
Spikevax®	SM-102 : PEG2000-C-DMG : DSPC : CHOL	Toplam lipit konsantrasyonu: 1,01 mg.0,5 mL ⁻¹	SARS-CoV-2 virüsünün proteinini kodlayan mRNA	60 nm	COVID-19	2022	(158,161,162)
Epaxal®	DOPC : DOPE	75 : 25	İnaktive edilmiş hepatit A virüsü (RG-SB suşu)	~ 150 nm	Hepatitis A	1996	(131,134,163)
Inflexal V (InflectoVac® Flu, Isiflu® V, Viroflu®)	DOPC : DOPE	75 : 25	İnaktive edilmiş A ve B tipi İnfluenza virüs suşlarının hemaglutinini	~ 150 nm	Influenza	1997	(131,134,164)

HSPC: hidrojene soya fosfatidilkolin, *PEG 2000-DSPE*: 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolaminin PEG türevi, *EPC*: 1,2-Dioleoil-Sn-Glisero-3-Etilfosfokolin, *DSPC*: 1,2-Distearoil-Sn-Glisero-3-Fosfatidilkolin, *POPC*: 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilkolin, *OOPS*: 1,2- dioleoilfosfatidilserin, *DSPG*: distearoil fosfatidilgliserol, *DOPC*: dioleoilfosfatidilkolin, *DPPG*: 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfo-rac-(1-gliserol), *EPG*: Yumurta Fosfatidilgliserol, *DMPC*: L-alfa-dimiristoilfosfatidilkolin, *DMPG*: L-alfa-dimiristoilfosfatidilgliserol, *DPPC*: Dipalmitoilfosfatidilkolin, *DPPA*: 1-[(fosfonoksi)metil]-1,2-etandiil ester, monosodyum tuzu, *mPEG5000-DPPE*: N-(metoksipolietilen glikol 5000 karbamoil)-1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfatidiletanolamin, monosodyum tuzu, *MPL*: 3-O-desasil-4'-monofosforil lipit A, *SBO*: Soya fasulyesi yağı, *EYL*: Yumurta lesitini, *DEPC*: Di-erusoilfosfatidilkolin, *DLin-MC3-DMA*: N,N-Dimetil-3,3-dioktadesilaminopropan, *PEG2000-C-DMG*: Polietilen Glikol 2000 konjuge edilmiş Dimiristoilgliserol, *ALC-0315*: 4-hidroksibütül azandiil bis(hekzan-6,1-diil) bis(2-hekzildekanoat), *ALC-0159*: 2-[(polietilen glikol)-2000]-N,N-ditetradesilasetamid, *SM-102*: Heptadekan-9-il 8-((2-hidroksietil)(6-okso-6-(undekiloksi)heksil)amino)oktanoat.

2.6. Lipozomların / Lipoplekslerin Üretim Yöntemleri

Lipozom/lipopleks formülasyonlarının hazırlanmasında konvansiyonel ve yeni yöntemler kullanılmaktadır. Konvansiyonel yöntemler arasında etanol/eter enjeksiyonu, ince film hidrasyonu, ters faz buharlaştırma, deterjan diyalizi ve yüksek basınçlı homojenizasyon bulunmaktadır (165). Bu yöntemler, lipozomların ve lipoplekslerin geleneksel olarak üretildiği, iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan tekniklerdir. Yeni yöntemler, mikro hidrodinamik odaklama (MHF), süper kritik ters faz buharlaştırma, püskürterek kurutma ve çapraz akış enjeksiyonu gibi modern ve gelişmiş teknikleri içerir (166). Yeni yöntemler, kontrollü ve verimli lipozom/lipopleks formülasyonları sağlamak amacıyla geliştirilmiştir ve genellikle yüksek verimlilik ve stabilite sunar (167).

Mikroakışkanlaştırma teknolojisi, MHF yöntemini esas alarak monodispers lipozomların/lipoplekslerin oluşumunu sağlamaktadır (168). Mikroakışkanlaştırma yönteminde, organik fazın (etanol, izopropil alkol, tert-bütül alkol) sulu faz ile mikrokanaallar içerisinde karıştırılması sonucunda, lipit moleküllerinin çözündüğü organik fazın konsantrasyonunda bir azalma meydana gelir. Düşük organik faz konsantrasyonu polaritede artışa ve bunun sonucunda lipitlerin lipozom oluşturmak üzere çökmesini sağlar (Şekil 2.5) (169,170). Bu teknik, yüksek enkapsülasyon verimliliği ve ölçeklenebilirlik gibi üstünlükler sunar (171). Ayrıca, mikroakışkanlar için pompa kullanılarak toplam akış hızı ve inorganik/organik faz akış hızı oranı ayarlanabilmektedir.



Şekil 2.5. Mikroakışkanlaştırma yönteminde yer alan çip ile lipozomların elde edilmesinin şematik gösterimi (168).

2.7. Lipozomların / Lipoplekslerin Karakterizasyonu

Lipozomlar, suda az çözünen ilaçların biyoyararlanımını arttırmak, hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçları taşımak ve *in vitro* ve *in vivo* bozunmaya karşı koruma sağlamak için sıklıkla kullanılır (172). Lipozomların karakterizasyonu stabilite, güvenlik ve etkinlik açısından çok önemlidir. Lipozomların karakterizasyonu, *in vitro* ve *in vivo* davranış ve stabilitenin kontrolünü sağlar (173). Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin ticarileşebilmesi ve kliniğe girebilmesi için ürünün kalitesinin, güvenliğinin ve etkinliğinin çeşitli karakterizasyon ve stabilite çalışmaları ile kanıtlanması gerekmektedir (95,174). Optimum klinik sonuçlara ulaşmak için, bitmiş ürün spesifikasyonlarının hedeflenen sınırları dahilinde stabil ve dar boyutlu dağılımlı lipozomal ürünlerin geliştirilmesi gereklidir. Lipozomların partikül boyutu, boyut dağılımı, yüzey özellikleri ve yük potansiyeli gibi özellikler çeşitli tekniklerle karakterize edilir (175). Lipozomların karakterizasyonunda kullanılan yöntemlerin hızlı, tekrarlanabilir ve anlamlı olması gerekmektedir (95).

2.7.1. Partikül Boyutu ve Partikül Boyutu Dağılımı

Lipozomların partikül boyutları, kapsüllenmiş maddelerin salımı üzerinde etkiye sahiptir ve partikül boyutu küçüldüğünde, yüzey alanı büyür. Ayrıca küçük boyutlu partiküller, ilacın verilmesi sırasında hedef dokuda birikme eğilimindedir ve dolayısıyla stabilitesi artar (176).

Lipozom formülasyonunun karakterizasyonu için vezikül boyutu ve boyut dağılımının belirlenmesi gerekir. İlaç taşıyıcı sistemlerde keseciklerin boyutu ve ilaçların kapsüllenmesi doğru orantılı olduğu gibi, lipit bileşenleri ve keseciklerin boyut dağılımı da lipozomların organlardaki dağılım ve farmakokinetik gibi *in vivo* özelliklerini etkilemektedir. Lipozomların boyutu arttıkça kandaki antikorların lipozom yüzeyine etkili bir şekilde bağlanma olasılığı artar (177). Bu nedenle, LMV'ler, SUV'lere kıyasla daha yüksek bir terapötik etkiye sahip olabilir (178). Lipozom boyutu arttıkça karaciğerdeki Kupffer hücreleri ve dalaktaki mononükleer fagosit sistemi (MPS) hücreleri tarafından veziküllerin dolaşımdan temizlenmesi artar, dolayısıyla hedef dokuya dağılımı önemli ölçüde azalır. Lipozomların boyutunun küçültülmesiyle bu istenmeyen tutulma azaltılır ve dolaşımdaki yarı ömür uzatılır (177).

Lipozomların karakterizasyonunda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Mikroskopi, kırınım ve saçılma teknikleri ve hidrodinamik yöntemler, lipozomların partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımlarını belirlemek için kullanılan yöntemlerdir (179). Optik mikroskopi, konfokal mikroskopi, taramalı elektron mikroskobu, floresan mikroskobu, taramalı prob mikroskobu, kriyo-elektron geçirimli elektron mikroskobu ve negatif leke elektron mikroskobu teknikleri, genel olarak mikroskopi olarak adlandırılan partikül boyutu ölçümünde kullanılan yöntemlerdir (180). Hidrodinamik teknikler arasında jel geçirgenlik kromatografisi, alan akış fraksiyonu, akış sitometrisi, santrifüjlü sedimentasyon ve ultrasantrifüj yöntemleri yer alırken, foton korelasyon spektroskopisi ve lazer ışığı saçılımı kırınım ve saçılma teknikleridir (181).

- Lipozomların boyut ve boyut dağılımını belirlemek için en yaygın kullanılan yöntem, yarı elastik saçılma veya foton korelasyon spektroskopisi olarak da adlandırılan Dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemidir. Bu yöntem, partiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu varsayımı ile Brown hareketi gösteren partiküllerden saçılan ışığın zamana bağlı dalgalanmasını ölçer (177). DLS aynı zamanda foton korelasyon spektroskopisi (PCS) olarak da adlandırılır (182). Bu teknikte partikül boyutu esas olarak süspansiyondaki partiküllere gönderilen ışığın saçılma açısına ve enerjisine göre hesaplanır. Bu yöntem genellikle 1-500 nm boyut aralığına sahip tek modlu taşıyıcı partiküllerin boyut analizinde kullanılır (182). DLS cihazı temel olarak lazer kaynağı, numune tutucu ve ışık dedektörü bileşenlerinden oluşur (176,183).
- Lazer kırınım spektroskopisi, DLS yöntemine göre daha geniş tespit aralığına sahip, tek başına veya PCS ile birlikte kullanılabilen bir partikül boyutu ölçüm yöntemidir. Lazer ışığı saçılımı olarak da adlandırılan bu yöntem, lazer ışınının partikül içeren bir numunenin içinden geçtikten sonra ışığı partiküllerin boyutuna göre farklı açılarda saçması prensibine dayanmaktadır. Partikül boyutu arttıkça ışık daha dar açılarda saçılır ve bu yöntemle elde edilen sonuçlar, Mie teorisine göre küresel partikül yarıçapını tahmin etmek için kullanılır (184). Geniş bir boyut aralığını (1 nm-100 µm) ölçmek için kullanılabilmesi, partiküllerin çoklu dağılımının doğru tahmin edilmesine olanak sağlar (176).
- Partikül boyutlarının analizinde mikroskobik yöntemler kullanılır; bu yöntemler, tek tek partikül ölçümü sağladığı için ışık saçılımına dayalı tekniklere göre üstünlük gösterir. Elektron mikroskobu (EM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) en sık kullanılan mikroskopik yöntemlerdir (185,186). Işık saçılımı yöntemlerinde partiküllerin küresel bir şekle sahip olduğu varsayılırken, mikroskobik yöntemlerde partiküllerin gerçek boyutları değerlendirilir (187). EM, partiküllerin boyutu ve şekli hakkında görsel olarak ayrıntılı bilgi sağladığı için oldukça geçerli bir yöntemdir (176). DLS ve elektron mikroskobu yaygın olarak kullanılan yöntemler olmasına rağmen

partikül boyutunun hızla değiştiği sistemler için uygun değildir ve analiz süreci uzundur (176,188).

- Diferansiyel santrifüj sedimentasyon (DCS) yöntemi, aynı yoğunluktaki partiküllerin boyutlarına göre çökme hızlarının karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu yöntem çok yüksek çözünürlük sağlar (176,189).
- Analitik ultrasantrifüjleme (EAA) tekniğinde, veziküller, sulu bir ortamda analitik ultrasantrifüj ölçüm hücresini (AUC) kullanarak bir merkezkaç kuvveti altında hareket etmeye zorlanır ve daha büyük partiküller daha hızlı çökeldikçe fraksiyonlama meydana gelir (190). Farklı fraksiyonların çökme oranları ultraviyole (UV) emilimi, kırılma indisi veya ışık saçılımı/bulanıklık dedektörleri ile ölçülür. Yöntemin en önemli üstünlükleri numune hazırlama gerektirmemesi, sadece numuneyi seyrelterek analiz etmesi ve yakalanan molekülün UV görünür bölgesinde spesifik bir absorpsiyon bandına sahip olması durumunda serbest ve enkapsüle edilmiş ilaç oranı hakkında bilgi vermesidir (177,191).
- Nanopartikül izleme analizi (NTA), partiküllerin Brownian hareket hızı ve partikül çaplarını aynı anda kullanarak partiküllerin polidispersitesinin ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesine olanak sağlar. Partiküllerin üzerine lazer ışını gönderilir ve aydınlatma sırasında saçılan ışığa bağlı olarak partiküllerin boyutu belirlenir. DLS yönteminden farklı olarak her partikülden gelen saçılımı bağımsız olarak izleyerek ayrıntılı ve doğru bir analiz sağlar (176,192,193).
- X-ışını kırınımı (XRD), partiküllerin şeklini ve boyutunu karakterize etmek için yaygın olarak kullanılan çok yönlü bir yöntemdir (194,195). Bu yöntemde, X-ışınlarının geniş açılı elastik saçılımı, aynı dalga boyundaki bir boşluktan geçen monokromatik radyasyona dayanmaktadır (196). Bu yöntemde, sıvı içinde dağılmış olan partiküller santrifüj yardımıyla sıvıdan ayrıştırılır ve numunenin fırında kurutulmasıyla tüm nemin uzaklaştırılmasının

ardından analiz yapılır (197). XRD atomik seviyede partikül karakterizasyonu sağlar ancak partiküllerin tek bir konformasyonundan sonuç elde etme kısıtlamasına sahiptir (176,194).

- Küçük açılı X ışını saçılması (SAXS) yönteminde partiküllerden elastik olarak saçılmış ışının bir bölümü bu ışına dik yönde iki boyutlu bir düz X ışını dedektörü üzerinde bir saçılma modeli oluşturması ve bu saçılma ışınının gücünün belirlenmesi esas alınır (198). Bu şekilde partiküllerin şekli, boyutu, boyut dağılımı ve yapıları incelenebilir (176,199).
- Akış alanı-akış fraksiyonlaması (FIFFF) olarak adlandırılan elüsyon tekniğinde, akış eksenine dik bir yönde bir alan uygulanarak kesecikler ince bir kanalda sıyrılır. Bu bölgeye maruz kalan kesecikler boyutlarına göre birikim duvarı adı verilen bir kanal duvarına doğru yönlendirilir (200). Kesecik boyutu arttıkça daha güçlü bir alana maruz kalan partiküller birikime daha da yaklaşır ve partiküller birikim duvarına yakınlıklarına göre farklı hızlarda aşağı doğru sürüklenir (201). Takiben bir fraksiyon toplayıcıya veya detektöre aktarılır. FIFFF tekniği, heterojen ve çok dağılmış karışımlarda doğru partikül boyutu dağılımını ölçmek için çevrimiçi çok açılı ışık saçılımı (MALS) ve DLS ile birlikte kullanılır (177,202).

2.7.2. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli, lipozomların yüzey yüklerinin ve stabiliteilerinin değerlendirilmesi açısından kritik bir parametredir. Zeta potansiyeli, hareket halindeki bir katı yüzeyine bağlı ince sıvı tabakasını (karşı iyonlardan oluşan) ayıran hayali bir yüzey olan kayma düzlemindeki elektrik potansiyelini ifade eder (203). Yüksek zeta potansiyeli değerleri, lipozom ve lipoplekslerin daha kararlı olduğunu ve agregasyon veya flokülasyon eğilimlerinin azaldığını gösterir (204). Zeta potansiyel ölçümünde kullanılan yöntemler arasında DLS, Elektroakustik Yöntemler, Kapiller Elektforez ve Zetafotometreler bulunmaktadır (205,206).

- *DLS*, partiküllerin boyut dağılımını ve zeta potansiyelini ölçmek için yaygın olarak kullanılır (176).
- *Elektroakustik teknikler* partiküllerin akustik dalgalar altında hareketlerini ölçerek zeta potansiyelini belirler ve yüksek konsantrasyonlu çözeltiler için uygundur (207-209).
- *Kapiller elektroforez*, partiküllerin bir kapiller tüp içinde elektrik alan altında hareket etmelerini analiz ederek yüksek çözünürlük ve hassasiyetle zeta potansiyelini ölçer (210).
- *Zetafotometreler* ise elektroforetik hareketliliği doğrudan ölçerek zeta potansiyelini belirler ve optik dedektörlerle donatılmış olup partiküllerin hareket hızlarını izler (211,212).

2.8. Nintedanib ve miRNA Yüklü Lipoplekslerde Yerine Koyma Etkinliği Tayin Yöntemleri

Bu tezde İPF’de miktarı azalan anti-fibromiR’lerden miR-29b seçilerek, miRNA *yerine koyma (replasmanı)* ile İPF modeli oluşturulmuş hücrelerde miR-29b miktarının artırılması yoluyla İPF tedavisine yönelik etkin ve güvenilir bir lipit yapılı taşıyıcı sistem olan lipopleks geliştirilmesi ile İPF tedavisinde alternatif bir yaklaşım sunulması hedeflenmektedir.

Hücrelerde eksik veya anormal miRNA seviyelerini düzeltmek veya değiştirmek amacıyla miRNA yerine koyma tedavisi yaklaşımı kullanılır. Bu tedavi stratejisi, gen ifadesini düzenlemek ve hastalıklı hücrelerin işlevlerini geri kazandırmak için tasarlanmıştır (68). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi miRNA yerine koyma tedavisinin etkinliğini belirlemek için önemlidir (213). PCR, hedeflenen miRNA'nın varlığını ve miktarını hassas bir şekilde tespit etmek için kullanılır (214). Örneğin, hücrelerden veya doku örneklerinden elde edilen RNA'nın, hedeflenen miRNA'yı içerip içermediğini belirlemek için PCR spesifik primerler

kullanılır. PCR ayrıca, miRNA yerine koyma tedavisi sonrasında hedeflenen miRNA'nın ekspresyon düzeyindeki değişiklikleri ölçmek için kullanılabilir (215). Bu, tedavinin hücrel yanıtını ve potansiyel terapötik etkilerini değerlendirmek için önemli bir araçtır. PCR'nin yüksek duyarlılığı ve özgünlüğü, miRNA yerine koyma tedavisinin etkinliğini değerlendirmede güvenilir bir yöntem olmasını sağlar. Bu nedenle, PCR, miRNA yerine koyma tedavisinin geliştirilmesi ve klinik uygulaması sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (216-218).

Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi (ELISA) yöntemi de miRNA yerine koyma tedavisinin etkinliğini belirlemek için kullanılabilir. ELISA, belirli proteinlerin veya biyomoleküllerin varlığını ve miktarını tespit etmek için yüksek duyarlılık ve özgünlük sunan bir yöntemdir. miRNA yerine koyma tedavisinde, ELISA, miRNA hedeflerinin ve bu hedeflerle etkileşen proteinlerin ekspresyon düzeylerini ölçmek için kullanılabilir. Bu yöntem, miRNA'nın hedef proteinlerle olan ilişkisini ve tedavinin hücrel düzeydeki etkilerini değerlendirmek için önemlidir. ELISA'nın kullanımı, miRNA yerine koyma tedavisinin biyolojik etkilerini ve tedaviye yanıtları kapsamlı bir şekilde analiz etmeye olanak tanır (219). Sonuç olarak, PCR ve ELISA yöntemleri, miRNA yerine koyma tedavisinin etkinliğini ve terapötik potansiyelini değerlendirmede kullanılan yöntemlerdir.

2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

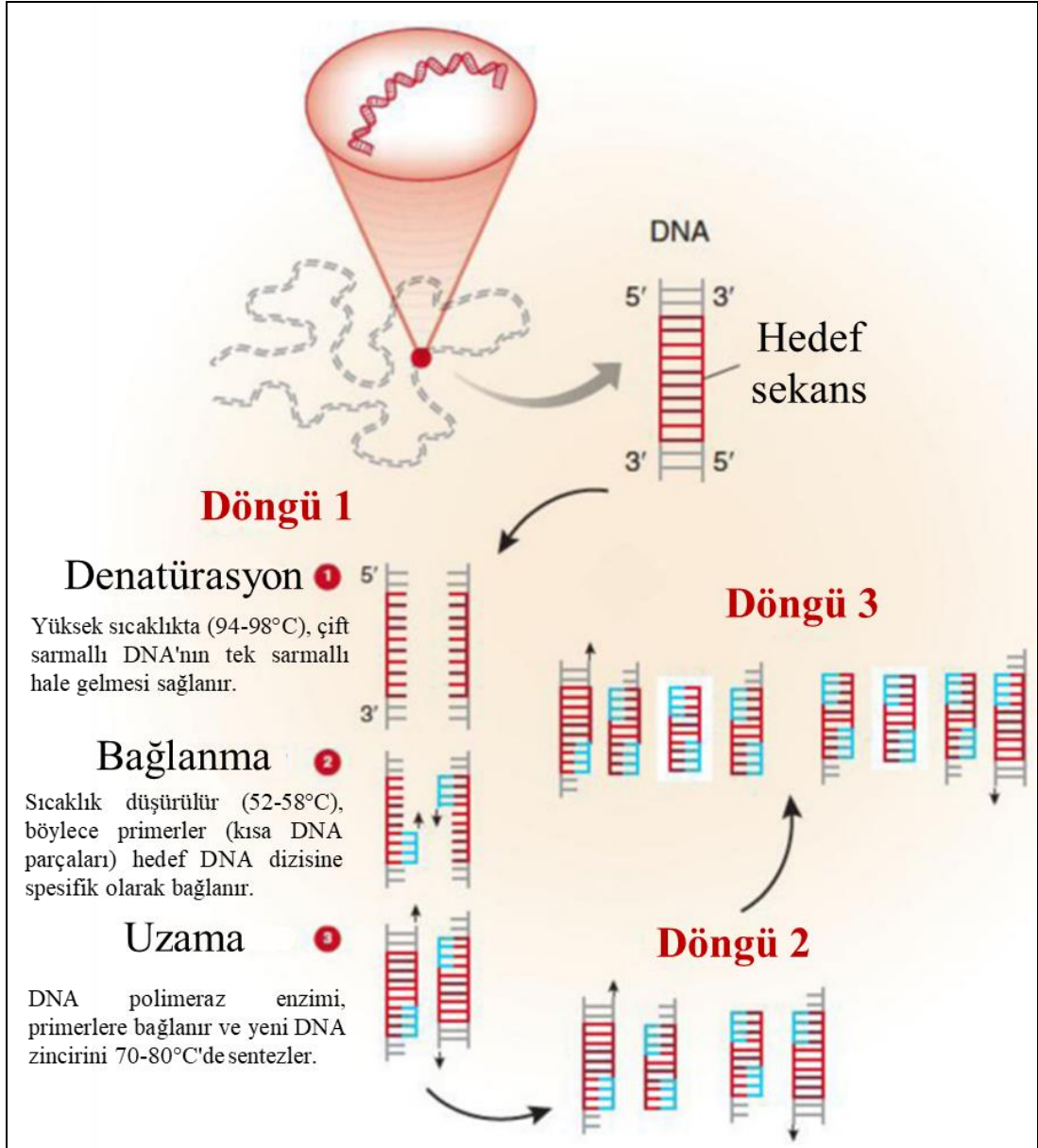
PCR, laboratuvar ortamında DNA veya RNA'nın büyük miktarlarda kopyalanmasını sağlayan moleküler bir tekniktir. PCR, belirli bir DNA veya RNA dizisini hedef alarak, hedeflenen bölgenin milyonlarca kopyasını oluşturur (220).

PCR'nin başlangıç aşamasında, PCR karışımına hedeflenen DNA veya RNA örneği eklenir; bu örnek, kopyalanmak istenen spesifik bir genin veya bölgenin DNA veya RNA'sını içerir. Denatürasyon adımında, PCR karışımı yüksek sıcaklığa maruz bırakılır, bu işlem çift sarmallı DNA veya RNA'nın ayrılmasına ve tek zincirli hale gelmesine neden olur. İkinci adımda, primer adı verilen kısa, spesifik DNA parçaları, hedef bölgeye spesifik olarak bağlanır ve bu primerler, DNA polimerazın kopyalama

işlemine başlaması için gerekli olan başlangıç noktalarını sağlar. Uzama (elongasyon) adımında, DNA polimeraz enzimi primerlere bağlanır ve hedef bölge boyunca hareket ederek yeni DNA zinciri sentezler; her DNA zincirinin oluşturulması, PCR karışımına eklenen her döngüde artar. Soğutma aşamasında, sentezlenen DNA zincirleri tekrar çift sarmal haline gelir ve PCR reaksiyonunun bir sonraki döngüsüne hazır hale gelir. Bu süreç, birkaç döngü boyunca tekrarlanır ve her döngüde hedeflenen DNA veya RNA'nın milyonlarca kopyası üretilir (Şekil 2.6) (221,222).

PCR, genetik testler, DNA dizileme, gen ifadesi analizi ve patojen tespiti gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (223,224). Yüksek hassasiyeti, özgünlüğü ve çoğaltma kapasitesi, PCR'nin genetik araştırmalarda ve tıbbi teşhislerde temel bir araç haline gelmesini sağlamıştır (225).

Sonuç olarak, PCR yöntemi, lipoplekslerin taşıdığı genlerin hücrelere başarılı bir şekilde aktarılıp aktarılmadığını hücrelere taşınan genetik materyal ile ilişkili gen ekspresyon seviyelerini ölçerek doğrular.

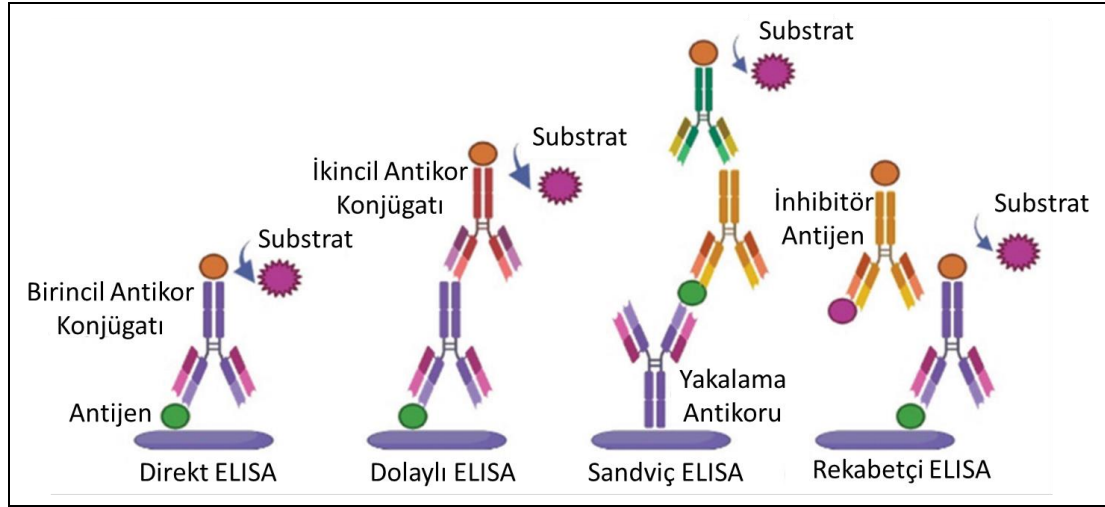


Şekil 2.6. PCR yöntemi aşamaları (225,226).

2.8.2. Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

ELISA, hedeflenen bir protein veya molekülün varlığını tespit etmek ve miktarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (227). Özellikle biyolojik sıvılardaki (örneğin serum, plazma, hücre kültürü örnekleri) belirli bir proteini veya molekülü hızlı ve hassas bir şekilde ölçmek için kullanılır. Bu yöntem, hedef molekülün immobilize edilmesi, takiben özel antikorların eklenmesi ve renk değişiminin ölçülmesi adımlarını içerir (228). ELISA'nın farklı türleri (Şekil 2.7),

özellikle de direkt, dolaylı, sandviç ve rekabetçi ELISA, çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (229,230). Bu yöntem, özellikle spesifik antikorların, çözünen antijenlerin veya hücre yüzey antijenlerinin tespitinde kullanılmaktadır (231).



Şekil 2.7. ELISA türleri ve yöntem esasları (230).

ELISA, hedef miRNA'nın varlığını ve miktarını tespit etmek için antikor-tabanlı bir immünolojik testtir (219,232). PCR'nin aksine, ELISA, miRNA'nın spesifik proteinlerle etkileşimini tespit eder ve miRNA'nın işlevsel aktivitesini yansıtabilir. Örneğin, hücrelerden veya doku örneklerinden elde edilen protein örneklerindeki miRNA seviyelerini ölçmek için ELISA kullanılabilir. miRNA yerine koyma tedavisi sonrasında hedeflenen miRNA'nın protein düzeylerindeki değişiklikler ELISA ile belirlenebilir (233). ELISA'nın yüksek duyarlılığı ve ölçeklenebilirliği, miRNA yerine koyma tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesinde güvenilir bir yöntem olmasını sağlar. Bu nedenle, PCR ile birlikte ELISA'nın kullanılması, miRNA yerine koyma tedavisinin hücresel yanıtlarını ve terapötik etkilerini kapsamlı bir şekilde analiz etmek için önemlidir (234).

ELISA'nın ilk adımı, örnek içinde bulunan hedef proteini veya molekülü belirlemektir (235); örneğin, miRNA yerine koyma tedavisi sonrası hücre kültürü örneğinde hedef miRNA'nın varlığını tespit etmek için ELISA kullanılabilir (227). Örnek içindeki hedef protein veya molekül, mikrotitre plakaları gibi bir taşıyıcı

yüzey üzerine immobilize edilir ve bu adım, hedef molekülün plaka yüzeyine bağlanmasını sağlar. Örnekteki immobilize edilmiş hedef molekül üzerine özel bir antikor eklenir ve bu antikor, hedef molekülle spesifik bir şekilde etkileşime girer. Antikorum bağlanmasını takiben, plaka yıkanır ve ardından bir ikincil antikor eklenir. İkincil antikor, bir enzimle işaretlenmiştir ve hedef molekülle bağlanan birincil antikorla etkileşime girer. Enzim, özel bir substrat eklenmesiyle reaksiyona girer ve bir renk değişimine neden olur. Renk değişimi, spektrofotometre gibi bir cihaz kullanılarak ölçülür ve bu, hedef molekülün miktarını belirlemek için kullanılır. Renk değişimi, örnekte yüksek konsantrasyonda hedef molekül olduğunu gösterir (236,237).

Sonuç olarak, ELISA yöntemi, nintedanib ve miR-29b içeren lipopleks formülasyonlarının ve İPF tedavisindeki etkinliğinin in vitro hücre kültürlerinde analiz edilmesinde kritik bir rol oynar. Bu yöntem, spesifik proteinlerin ve biyomoleküllerin miktarını hassas bir şekilde ölçerek, tedavi edici bileşenlerin hücreler üzerindeki etkilerini değerlendirir. ELISA, hücre kültürlerinde nintedanib ve miR-29b'nin antifibrotik etkilerini ve gen ekspresyon değişikliklerini belirlemek için kullanılır. Elde edilen veriler, İPF tedavisinde kullanılan bu kombinasyonun potansiyel terapötik etkilerini ortaya koyarak, daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler

Nintedanib	MCE, ABD
miRIDIAN mmu-miR-29b-3p taklitçi (olgun mikroRNA dizisi: 5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3')	Dharmacon, Kolombiya
DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonyum-propan) tozu	MCE, ABD
DOPE (1,2-Dioleoil-sn-glisero-3- fosfoetanolamin) tozu	Avanti Polar Lipids, ABD
Kolesterol (Bitki kökenli, SyntheChol®)	Sigma Aldrich, Almanya
18:0 PEG2000 PE (DSPE-mPEG2000) (1,2- distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N- [metoksi(polietilen glikol)-2000]	Avanti Polar Lipids, ABD
Etil Alkol (%96 h/h)	Dr. Derman, Türkiye
RNaz içermeyen distile su	ABT, ABD
TRizol ajanı	ABT, ABD
5x siRNA Tamponu	Merck, Almanya
Total RNA izolasyonu çözeltisi	GeneAll, Kore
PBS (fosfat tampon çözeltisi)	Sigma Aldrich, Almanya
NIH/3T3 Hücre hattı	ATCC, ABD
Hücre kültür ortamı " <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> " (DMEM)	Capricorn, Almanya
Tripsin-EDTA çözeltisi, %0,25, steril filtre edilmiş	Capricorn, Almanya
Fetal sığır serumu (FBS)	Capricorn, Almanya
Pen-Strep (Penisilin-Streptomisin Çözeltisi)	Capricorn, Almanya
microRNA SYBR® Green PCR Kiti	ABT, ABD
miRNA PreAMP PCR Kiti	ABT, ABD

iQuant RNA HS Test Kiti	ABT, ABD
NA elektroforezi için RNA örnek yükleme tamponu	ABT, ABD
RNA stabilizasyon çözeltisi	GeneAll, Kore
Hybrid-R kiti	GeneAll, Kore
Saf su	Millipore, ABD
Trehaloz	Sigma Aldrich, Almanya
siGLO yeşil transfeksiyon göstergesi (6-FAM, 6-Karboksiflorescin)	Dharmacon, Kolombiya
α -SMA, FBN-1, ELN, COL1A1, COL4A1 ve COL4A2 enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) kitleri	BT Lab, Çin

3.2. Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı	Shimadzu, Japonya
Ultra saf su düzeneği	Millipore, ABD
Mikroakışkanlaştırıcı çip (SM3-300um-Z300 Serpentine Mixing Microfluidics Chip)	uFluidic, ABD
Şırınga pompası	New Era Pump Systems, ABD
Float-a-lyzer G2 diyaliz torbası	Spectrum Labs, ABD
Çok noktalı manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, ABD
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Vorteks	IKA, Almanya
Ultrasantrifüj	Hettich, Almanya
Ultrasantrifüj	Ohaus, ABD
Liyofilizatör	Labconco, ABD

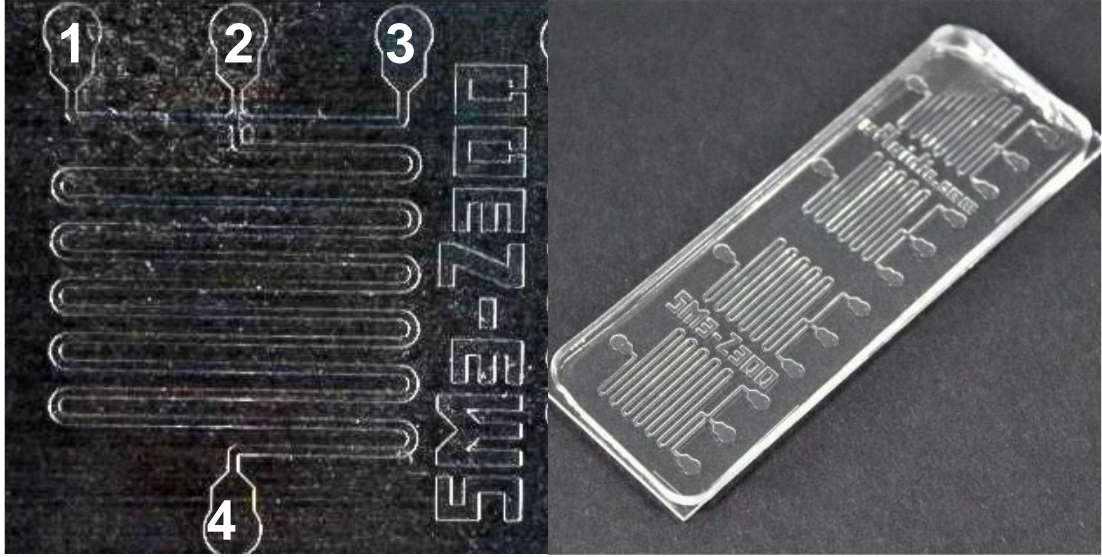
Yatay çalkalayıcı su banyosu	Memmert, Almanya
Partikül boyutu ve zeta potansiyel tayin cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
UV Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Floresan mikroskop	Leica, Almanya
Karbondioksitli inkübatör	MCO-20AIC, Sanyo, ABD
Qubit™ 4 florometre cihazı	Thermo Fischer Scientific, ABD
EC3 Tezgah üstü UV Transillüminatör	UVP Bioimaging Systems, ABD

3.3. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu optimizasyon çalışmaları, mikroakışkanlaştırma yöntemiyle ön formülasyon çalışmaları ile başlamıştır. Bu amaçla toplam lipit konsantrasyonu $5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ ve DOTAP:DOPE:CHOL:DSPE-mPEG2000 lipit molar oranları 10:2:7:1 olacak şekilde 3 ayrı formülasyon hazırlanmıştır. Bunun için DOTAP, DOPE, CHOL ve DSPE-mPEG2000 tartılmış ve üzerine etanol (%96, h/h) eklendikten sonra lipitler tamamen çözüne kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan formülasyonların üretiminde akış hızının ayarlanabildiği şırınga pompaları, bağlantı kanalları, şırıngalar, mikroakışkanlaştırıcı çip ve toplama kapları kullanılmıştır.

Mikroakışkanlaştırma yönteminde akış ve karıştırma sağlayan 3 girişli - 1 çıkışlı mikroakışkanlaştırıcı çip (SM3-300um-Z300 Serpentine Mixing Microfluidics Chip, uFluidic) kullanılmıştır. Bu yöntemde, Şekil 3.1.'de gösterilen 3 girişli çipin 1. ve 3. girişinden su fazının (inorganik fazın), 2. girişinden etanol (organik faz) içerisinde çözüldürülmüş farklı oranda lipitlerin akışı sağlanmıştır. Çipin kıvrımlı kısmında (mikrokariştirici kısım) lipozom oluşumu gerçekleşmiş ve 4 numara ile gösterilen çıkış kısmından ise oluşan lipozomlar toplanmıştır. Çözünmüş lipitleri içeren etanol fazının akış hızı $100 \mu\text{l.dk}^{-1}$ olarak sabitlenmiş olup, farklı etanol:su fazı akış hızı oranları (1:1, 1:2,5 ve 1:5) sırasıyla denenmiştir. Elde edilen formülasyonlar oda sıcaklığında 24 saat manyetik karıştırıcıda bekletilerek

içerisindeki etanolün uçurulması sağlanmıştır. Formülasyonlar partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli açısından analiz edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1. Mikroakışkanlaştırma yönteminde kullanılan kıvrımlı çipin yapısı (SM3-300um-Z300 Serpentine Mixing Microfluidics Chip, uFluidic) (238).

3.4. Tasarımla Kalite Yaklaşımı ile Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Tasarım ile Kalite (*Quality by Design, QbD*) yaklaşımının benimsenmesi, nihai formülasyonun güvenliğini ve etkinliğini göz önünde bulundurarak, hasta odaklı bir yaklaşımla Kalite Hedefli Ürün Profilinin (*Quality Target Product Profile, QTPP*) tanımlanmasıyla başlatılmıştır (239-246). Uluslararası İnsan Kullanımına Yönelik İlaçlara İlişkin Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi (ICH) Q8 kılavuzlarında belirtilen tavsiyeler doğrultusunda değerlendirme yapılmıştır (247). Uygulama yolu, dozaj formu, enkapsülasyon etkinliği, partikül boyutu ve salım profili gibi kritik parametrelere, ürünün geliştirilmesi süresince önem verilmiştir. Ayrıca, ürün kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olan temel Kritik Kalite Özellikleri (*Critical Quality Attributes, CQA*) tanımlanmış ve istenen ürün kalitesine ulaşılmasını sağlamak için bu CQA'lar titizlikle izlenmiş ve kontrol edilmiştir (248).

Deney Tasarımı (*Design of Experiments*, DoE) - 3³ Faktöriyel Tasarım metodolojisi (240,249), çeşitli değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkisini incelemek için *Design Expert® 13* yazılımı (Deneme Sürümü 13, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (250). DOTAP (A), DOPE (B) ve CHOL (C) lipid molar oranlarını içeren formülasyon faktörleri, düşük (-1), orta (0) ve yüksek (+1) olmak üzere üç farklı seviyede incelenmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Lipozomların üretimi için 3³ faktöriyel tasarımda kullanılan farklı değişkenler ve düzeyleri

Faktörler Formülasyon Değişkenleri	Düzeyleyler		
	Düşük (-1)	Orta (0)	Yüksek (+1)
A (DOTAP)	6	10	12
B (DOPE)	1	2	3
C (CHOL)	4	7	10
Yanıtlar			
Y1 (Partikül boyutu)	100 - 150 nm		
Y2 (Polidispersite İndeksi)	0,0 – 0,2		
Y3 (Zeta Potansiyeli)	(+30 – (+)60 mV		

Seçilen yanıtlar, partikül boyutu dağılımı (Y1), Polidispersite İndeksi (PDI) (Y2) ve zeta potansiyeli (Y3) kapsamaktadır. Bu tasarımda, toplam lipid konsantrasyonu 15 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ olarak sabit tutulmuş (251) ve yüzey modifikasyon ajanının (DSPE-mPEG2000) molar oranı düzeyi 1 olarak sabit tutulmuştur (252). Çalışmalar sırasında, TFR 3000 $\mu\text{L.dk}^{-1}$ olarak sabit tutulurken, FRR 1:5 oranında uygulanmıştır. Uygun partikül boyutu ve dağılımı ile lipozom oluşumu, akış ve karışım sağlayan bir 3-girişli/1-çıkışlı mikroakışkanlaştırıcı çip (SM3-300um-Z300 Serpentine Mixing Microfluidics Chip, uFluidic) kullanılarak elde edilmiştir. Sonuç olarak, toplamda 27 deneme çalışması yapılmıştır. Yanıt etkileşimlerinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi, 3 boyutlu yanıt grafiklerinin oluşturulmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonun optimize edilmesi çalışmaları sırasında, partikül boyutu 100-150 nm aralığında (95), PDI değeri $<0,2$ (95) ve zeta potansiyeli değeri $(+30-(+)60$ mV (253) aralığında olması hedef özellikler olarak belirlenmiştir. Optimizasyon süreci, 0 ile 1 arasındaki arzu edilebilirlik aralığında dengeli bir çözüm elde etmeyi amaçlamıştır. Optimize edilmiş formülasyon için gözlemlenen sonuçlar, tahmin edilen değerlerle karşılaştırılmıştır.

3^3 faktöriyel deneysel tasarım çalışmalarının sonucunda, partikül boyutu (100<partikül boyutu<150 nm), PDI ($<0,2$) ve zeta potansiyeli (ζ) değeri ($30 \text{ mV} \leq \zeta \leq 60 \text{ mV}$) uygun olan optimum formülasyon, mikroakışkanlaştırma yöntemiyle Nintedanib ile birleştirilerek Nintedanib içeren lipozomların (LP-NIN) üretilmesi için kullanılmıştır. DOTAP, CHOL, DOPE ve DSPE-mPEG 2000, etanolde (%96 h/h) çözündürülmüştür. Nintedanib, lipid karışımına Nintedanib konsantrasyonu 0,2 μM olacak şekilde eklenmiştir. Etanol fazı, 2. girişten sağlanırken, sulu faz, 3 girişli polidimetilsiloksan (PDMS) mikroakışkanlaştırıcı çipinin 1. ve 3. girişlerinden sağlanmıştır. Elde edilen LP-NIN formülasyonları, organik çözücü kalıntısını buharlaştırmak için oda sıcaklığında 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiş (254) ve 0,22 μm şırınga filtresi ile sterilize edilmiştir (57).

QbD çerçevesinde, boş lipozom (LP) üretim süreci için QTPP'ler ve CQA'lar tanımlanmıştır. Bu stratejinin genel amacı, formülasyonun etkinliğini, kalitesini ve hastanın güvenliğini sağlamaktır. QTPP'ler ve CQA'lar hakkında kapsamlı bilgiler Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te sunulmuştur.

Tablo 3.2. Kalite Hedefli Ürün Profili (QTPP) ve gerekçeleri.

Kalite Hedefli Ürün Profili (QTPP)	Hedefler	Gerekçeler
Dozaj Formu	İntravenöz (iv) enjeksiyon için steril süspansiyon formunda lipozomal taşıyıcı sistemler	Steril süspansiyon formundaki lipozomal taşıyıcı sistemler, iv uygulama yoluyla kullanılabilir. Bu yöntem, dozajı ve yan etkileri azaltarak hasta uyumunu artırmayı amaçlar (255).
Enkapsülasyon Etkinliği (İlaç / miRNA)	Birincil amaç, nihai formülasyon içindeki ilaç konsantrasyonunu arttırmak için daha yüksek bir enkapsülasyon etkinliğine (%EE) ulaşmaktır.	Yüksek %EE, üretim maliyetlerinin azaltılmasına ve farklı dozaj seçeneklerinin sağlanmasına olanak tanır (256).
İlaç / miRNA salım profili	Terapötik etkinliği sürdürmeli	İlacın/miRNA'nın bir lipozomal sistemden kontrollü ve kesin olarak salınması, bunun terapötik etkinliğinin ve genel etkisinin belirlenmesinde çok önemli bir rol oynar (257).
Sterilite	Steril olmalı	iv lipozomal formülasyonlar için sterilitte çok önemlidir, çünkü formülasyondaki herhangi bir mikrobiyal kontaminasyon, tedaviyi alan hastalar için ciddi sağlık riskleri oluşturabilir. Lipozomal ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları, 0,22 µm'lik bir filtreden geçirilerek sterilize edilir (57).
Stabilite	Fiziksel, kimyasal ve terapötik hedeflerin sürdürülmesi	Kullanım noktasına/raf ömrüne kadar karakteristik değerlerin önerilen aralıklarda kalması esastır (88).

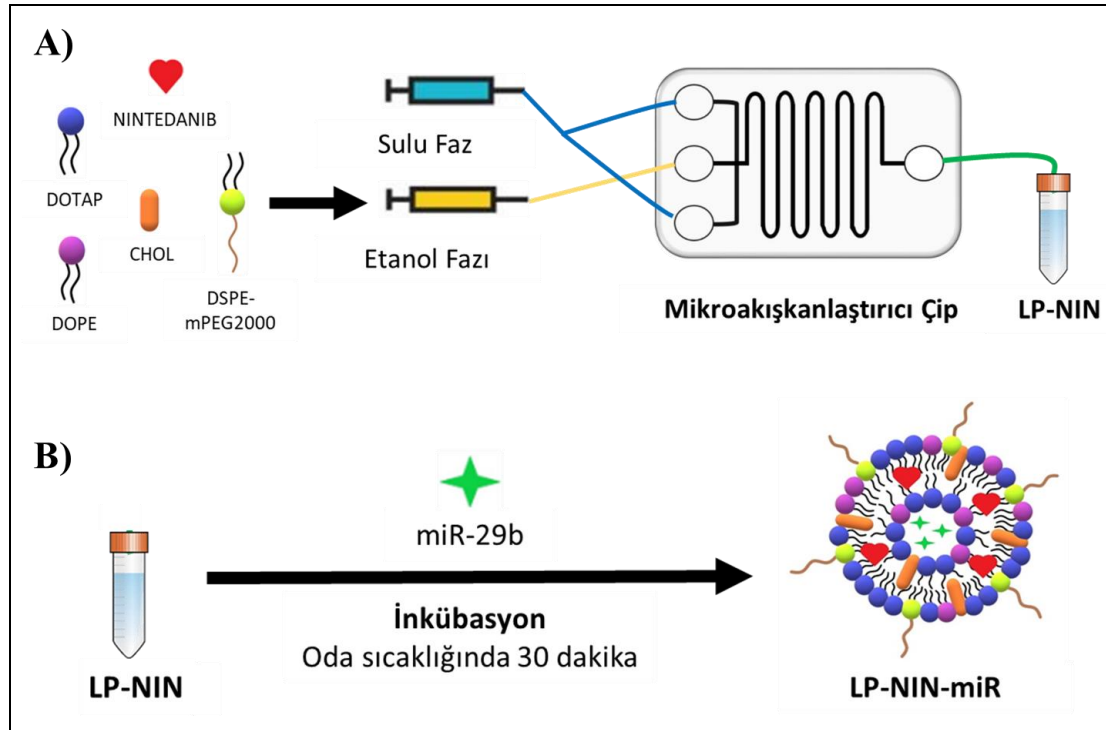
Tablo 3.3. Kritik Kalite Özellikleri (CQA) ve gerekçeleri.

Kritik Kalite Özellikleri (CQA)	Hedefler	Gerekçeler
Partikül Boyutu (Y ₁)	100 - 150 nm	Kan damarlarında dolaşan 100-150 nm çapındaki lipozomlar, akciğer kılcal damarlarında uzun süre kalarak ilaç taşınmasını sağlar (95).
PDI (Y ₂)	< 0.2	PDI partiküllerin boyut dağılımının homojen olmama derecesini tanımlamak için kullanılır. PDI'nin sayısal değeri 0,0 (partikül boyutuna göre homojen bir numune için) ile 1,0 (yüksek derecede çok dağılımlı bir numune için) arasında değişir. Lipozom formülasyonlarında PDI değerinin 0,3 ve altında olması kabul edilebilir olup homojen bir partikül boyutu dağılımını göstermektedir (95).
Zeta Potansiyeli (Y ₃)	(+)30 – (+)60 mV	Zeta potansiyeli (ζ) ile lipozom/lipopleks stabilitesi arasındaki ilişki, ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğini belirlemede kritik bir faktördür. Yüksek ζ değeri, partiküller arasındaki elektrostatik itme kuvveti sağlayarak stabiliteye katkıda bulunabilir, ancak bu mutlak bir gereklilik değildir. $ \zeta \geq 30$ mV ve $ \zeta \leq 60$ mV değerleri daha stabil olarak kabul edilmektedir (253).

3.5. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması

Mikroakışkanlaştırma yöntemiyle elde edilen LP ve LP-NIN (Şekil 3.2 A) üzerine 1xsiRNA tamponu (pH=7,4) içerisindeki miR-29b farklı lipit:miR-29b ağırlık oranlarında (Lipit:miRNA 1:1, 5:1, 10:1, 12,5:1, 15:1, 20:1 ve 30:1, a/a) eklenerek, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonu sağlanmış (258-260) ve miR-29b içeren lipopleks formülasyonları (LP-miR, LP-NIN-miR) elde edilmiştir (Şekil 3.2 B). miRNA enkapsülasyon etkinliği agaroz jel elektroforez ve florometre yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. 1xTris-Asetat-EDTA tamponu (TAE tamponu) içerisinde 5 μ L Etidyum Bromür (EtBr) eklenerek %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 10 μ L numune ile 2 μ L 6xYükleme Tamponu karıştırılarak, 10 ve 14'lü hücre plakaları ile

oluşturulmuş kuyucuklara yüklenmiştir. Numunelerin 120V - 30 dakika koşullarında yürütülmesi sağlanmıştır. miRNA içeren formülasyonlar partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli açısından analiz edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. A) Mikroakışkanlaştırma yöntemiyle LP-NIN elde edilmesi, **B)** İnkübasyon yöntemi ile LP-NIN-miR elde edilmesinin şematik gösterimi.

Trehaloz ve/veya mannitol (261), 1:1 - 1:12 lipid:kriyoprotektan ağırlık oranlarında (lipit:trehaloz 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 ve 1:12, a/a; lipit:mannitol 1:0, 1:2, 1:4, 1:8 ve 1:12, a/a; lipit:trehaloz:mannitol 1:4: 4, a/a) lipoplekslere kriyoprotektan olarak eklenmiştir. Lipopleks numuneleri -20°C'de dondurulmuş ve -80°C'de 24 saat boyunca 0,010 mbar'da liyofilize edilmiştir (Heto Power Dry PL3000 liyofilizatör, Danimarka). Liyofilize numuneler -20°C'de saklanmıştır. Liyofilize numuneler dondurucudan çıkarılmış ve gerektiğinde 1xsiRNA tamponu kullanılarak oda sıcaklığında gerekli konsantrasyona kadar rekonstitüe edilmeden önce 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur. Rekonstitüe edilen lipopleksler, numuneler tamamen dağılıncaya kadar oda sıcaklığında vortekslenmiştir.

3.6. Lipoplekslerin Karakterizasyonu

3.6.1. Lipoplekslerin Partikül Boyutu, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Tayini

Hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli ölçümleri, Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, UK) kullanılarak DLS yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler 25°C'de yapılmış ve her ölçüm 3 kez tekrarlanmış, ortalama (\bar{x}) \pm standart sapma (SS) olarak rapor edilmiştir.

3.6.2. Lipoplekslerin Morfolojik Değerlendirilmesi

LP-NIN-miR'in morfolojisi, Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) (FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin CTEM, Oregon, ABD) ile karakterize edilmiştir. Bu yöntemde lipopleksler bir TEM bakır ızgarası üzerinde kurumaya bırakılmış ve TEM altında incelenmiştir.

3.6.3. Nintedanib Miktar Tayini ve Analiz Yöntemi Validasyonu

Bu tez çalışmasında kullanılan Nintedanib etken maddesinin *in vitro* miktar tayini ve validasyonu UV spektrofotometre yöntemi ile yapılmıştır (262). Analitik yöntem validasyonunda Nintedanib için kullanılan yöntemin doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve özgüllük parametreleri incelenmiştir (263).

Nintedanib'in miktar tayini için dalga boyu (λ) seçimi amacıyla, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ standart çözeltisi hazırlanmış ve elde edilen çözelti ile, 190–800 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır.

Doğrusallık (*Linearity*)

Nintedanib'in kalibrasyon denkleminin belirlenebilmesi için farklı konsantrasyonlarda (0, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 5 ve 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) Nintedanib stok çözeltileri

hazırlanmıştır. UV spektrofotometre kullanılarak 190-800 nm dalga boyunda analizleri gerçekleştirilmiştir. 393 nm dalga boyunda elde edilen veriler sonucunda kalibrasyon doğru çizilerek, kalibrasyon denklemi bulunmuş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Doğruluk (*Accuracy*)

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun değerlendirilebilmesi için, kalibrasyon sınırları içerisinde bulunan, 3 farklı konsantrasyonda olmak üzere (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) 3 seri çözelti hazırlanarak UV spektrofotometre analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda teorik ve pratik konsantrasyonlar ile % geri kazanım ve % bağıl standart sapma (BSS) (varyasyon katsayısı, VK) hesaplanmıştır.

Kesinlik (*Precision*)

Tekrar Edilebilirlik (*Repeatability*)

Tekrar edilebilirlik çalışması için, Nintedanib'in 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisinin üç ayrı kez ölçümü gerçekleştirilmiştir. Her bir ölçümde elde edilen absorbans değerleri, kalibrasyon eğrisi kullanılarak pratik konsantrasyonlara dönüştürülmüş ve bu pratik konsantrasyonlar üzerinden % VK hesaplanmıştır.

Tekrar Elde Edilebilirlik (*Reproducibility*)

Nintedanib'in 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisinin tekrar elde edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, farklı bir analist tarafından üç ayrı ölçüm yapılmıştır. Her bir ölçümde elde edilen absorbans değerleri, önceden oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak pratik konsantrasyonlara dönüştürülmüştür. Elde edilen pratik konsantrasyonlar üzerinden % Varyasyon Katsayısı (VK) hesaplanmıştır.

Günler Arası Tekrar Edilebilirlik

Nintedanib'in günler arası tekrar edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltinin üç farklı günde üç ayrı kez ölçümü gerçekleştirilmiştir. Her bir gün için elde edilen absorbands değerleri, önceden oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak pratik konsantrasyonlara dönüştürülmüştür. Elde edilen pratik konsantrasyonlar üzerinden her gün için ayrı ayrı % VK hesaplanmış, ardından günler arası % VK değeri belirlenmiştir.

Gün İçi Tekrar Edilebilirlik

Nintedanib'in gün içi tekrar edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltinin aynı gün içinde farklı zaman dilimlerinde (0., 4. ve 8. saatlerde) üç ayrı ölçüm yapılmıştır. Her bir ölçümde elde edilen absorbands değerleri, kalibrasyon eğrisi kullanılarak pratik konsantrasyonlara dönüştürülmüştür. Elde edilen pratik konsantrasyonlar üzerinden % VK hesaplanmıştır.

Duyarlılık

Analitik yöntemin duyarlılığını değerlendirmek amacıyla, saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) değerleri belirlenmiştir. Bu değerlere ulaşmak için, sinyal/gürültü oranına dayalı bir yöntem kullanılmıştır. LOD, analitin tespit edilebileceği en düşük konsantrasyonu temsil eder ve sinyalin gürültüye oranının en az 3 olduğu durumlar esas alınmıştır. LOQ ise, analitin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak ölçülebileceği en düşük konsantrasyonu ifade eder ve sinyalin gürültüye oranının en az 10 olduğu durumlar temel alınmıştır.

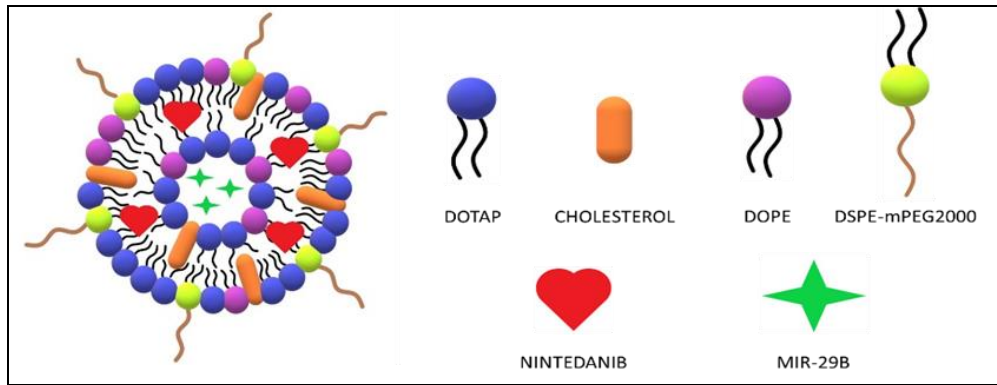
Özgüllük (Seçicilik) (*Specificity*)

Nintedanib'in UV spektrofotometrik analizinde, yöntemin özgüllüğü (seçiciliği), boş örneklerin (Nintedanib içermeyen lipozomlar) UV spektrumlarının,

Nintedanib standart çözeltisi ile karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Örneklerin 190 ila 800 nm dalga boyu aralığında taraması yapılmış ve ilgili dalga boylarındaki absorbans değişiklikleri incelenmiştir.

3.6.4. Nintedanib Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Hidrofobik özelliğe sahip bir etken madde olan Nintedanib'in hazırlanan lipopleks taşıyıcı sistemin hidrofobik arayüzeyinde tutunması; hidrofilik özelliğe sahip nükleik asit miR-29b'nin ise hazırlanan lipopleks taşıyıcı sistemin hidrofilik iç kısmında tutunması beklenmektedir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Nintedanib ve miR-29b içeren lipopleks taşıyıcı sisteminin şematik gösterimi.

Nintedanib'in enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla ultrasantrifüj yöntemi uygulanarak Nintedanib yüklü lipozomların süpernatanda kalması, enkapsüle edilmemiş Nintedanib'in ise çökmesi sağlanmıştır (264). Enkapsüle edilmemiş Nintedanib'in çöktürülmesi ultrasantrifüj yöntemi (10000 rpm, 30 dakika, 25°C) kullanılarak sağlanmış ve Nintedanib'in enkapsülasyon etkinliği UV spektrofotometre yöntemiyle (dalga boyu: 393 nm) belirlenmiştir (265,266). Nintedanib %EE aşağıda verilen *Eşitlik 3.1* kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EE_{\text{Nintedanib}}(\%) = [(m_1 - m_2)/m_1] \times 100 \quad (3.1.)$$

m_1 = Başlangıçtaki (formülasyona eklenen) Nintedanib miktarı (mg)

m_2 = çökeltideki (enkapsüle edilmemiş) Nintedanib miktarı (mg)

3.6.5. miR-29b Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Santrifüj yöntemi uygulanarak miR-29b yüklü lipozomların süpernatanda kalması, enkapsüle edilmemiş miR-29b'nin ise çökmesi sağlanarak miR-29b'nin enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi sağlanmıştır (264). Enkapsüle edilmemiş miR-29b'nin çöktürülmesi, santrifüjleme yöntemi (7500 rpm, 30 dakika, +4°C) kullanılarak sağlanmış ve %EE, florometre ve jel elektroforez yöntemleriyle ölçülmüştür (267). Florometre yönteminde ölçümler *iQuant™ HS RNA* miktar tayini kiti (ABP Biosciences, ABD) ile *Qubit™ 4* florometre cihazı (Thermo Fischer Scientific, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Agaroz jel elektroforez yönteminde 1xTAE tampon içerisine 5 µL EtBr ilave edilerek %1 (a/h) agaroz jel hazırlanmıştır. Çökeltinin 1xsiRNA tamponu ile çözülmesiyle numuneler hazırlanmıştır. 10 µL numune ve 2 µL 6xYüklemeye Tamponu karıştırılarak 10 ve 14 kuyucuklu hücre plakalarıyla oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir. Numunelerin 120 V'da 30 dakika yürütülmesi ile bantlar elde edilmiştir (268). Jelde oluşan bantlar EC3 Benchtop UV Transilluminator (UVP Bioimaging Systems, ABD) ile görüntülenmiştir. miR-29b %EE aşağıda verilen *Eşitlik 3.2* kullanılarak hesaplanmıştır.

$$EE_{miR-29b}(\%) = [(m_1 - m_2) / m_1] \times 100 \quad (3.2.)$$

m_1 = Başlangıçtaki (formülasyona eklenen) miR-29b miktarı (µg)

m_2 = çökeltideki (enkapsüle edilmemiş) miR-29b miktarı (µg)

3.6.6. Lipoplekslerden *in vitro* Nintedanib ve miR-29b Salım Çalışmaları

In vitro salım çalışması, diyaliz membran yöntemiyle (moleküler ağırlık kesme değeri (MWCO) 12,000–14,000 Da) LP-NIN, LP-miR ve LP-NIN-miR formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma, fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH=7.4) salım ortamında, sürekli manyetik karıştırma (100 rpm) altında 37±0.5°C'de gerçekleştirilmiştir (269). Belirli zaman aralıklarında (Nintedanib için 0., 0.5., 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48. ve 72. saatte; miR-29b için 0., 2., 4., 8., 12., 24. ve 48. saatte) salım ortamından numuneler alınmıştır. Nintedanib ve miR-29b'nin *in*

vitro salım profilleri sırasıyla UV spektrofotometre ve florometre yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. LP-NIN, LP-miR ve LP-NIN-miR formülasyonlarında yer alan Nintedanib ve miR-29b'nin *in vitro* salım profili, serbest Nintedanib ve serbest miR-29b'nin salım profiliyle karşılaştırılmıştır.

3.7. Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışması, LP'lerin ve LP-NIN'lerin uzun süreli depolama koşullarında fiziksel ve kimyasal özelliklerinin nasıl değiştiğini değerlendirmek için yapılmıştır. Bu çalışma, ürünlerin raf ömrünü belirlemek ve depolama süresince ürün kalitesinin korunmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, LP-NIN-miR lipoplekslerinin farklı sıcaklık koşullarında saklanırken stabilitesinin incelenmesi, ürünün depolama ve taşıma süreçlerinde karşılaşılabileceği değişikliklere yanıt verme kapasitesini anlamak için önemlidir. Bu çalışma, ilaçların ve miRNA'nın lipozomal sistemden kontrollü salınımının stabilitesini ve etkinliğini belirlemeyi amaçlamaktadır.

LP'ler ve LP-NIN, 24 ay boyunca $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklanırken, LP-NIN-miR lipopleksleri 1 ay boyunca $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. LP-NIN ve LP-NIN-miR'de Nintedanib ve miRNA'nın sızıntı stabilitesi, sırasıyla UV spektrofotometri ve florometri yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Takiben partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri DLS yöntemiyle ölçülmüştür.

3.8. Hücre Kültürü ve *In Vitro* İdiyopatik Pulmoner Fibrozis Modeli Oluşturulması

In vitro hücre kültüründe NIH/3T3 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler antibiyotiklerle desteklenen (100 U.mL^{-1} penisilin, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomisin), 4 mM L-Glutamin, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 Fetal bovine serum (FBS) içeren Dulbecco'nun Minimum Temel Besi Ortamı (*Dulbecco's Minimum Essential Media*, DMEM) ile kültüre edilmiştir (270).

DMEM ile süspande edilen hücreler deneysel plana göre hücre kültürü plaklarına aktarılmıştır, 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli atmosferli ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben, yüzeye tutunmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Tutunmuş olan hücreler antibiyotiklerle desteklenen (100 U.mL⁻¹ penisilin, 100 µg.mL⁻¹ streptomisin), %10 oranında FBS içeren DMEM içerisinde çoğaltılmıştır. Kültüre edilen hücrelerde idiyopatik pulmoner fibrozis modeli oluşturmak için hücrelere TGF-β1 (5, 10, 15 ve 20 ng.mL⁻¹) uygulanmış ve 96 saat inkübe edilmiştir (271). İPF modelinin oluşumu, Tablo 3.4'te yer alan İPF belirteçlerine ait spesifik gen ekspresyon düzeylerinin Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir.

Tablo 3.4. RT-PCR deneylerinde kullanılacak olan primer dizileri.

Gen	Sekans (5'→3')	Tm	%GC
COL1A1	F:GGAGAGAGCATGACCGATGG	59.97	60.00
	R:GGTAGGGAAGTAGACGGGGT	60.03	60.00
COL4A1	F:TCCTCACTGTGGATCGGCTA	59.97	60.00
	R:TTGGATCAGGAGCGCCATTT	60.03	60.00
COL4A2	F:CGAGAGGCGTCTCTGGATTC	59.97	60.00
	R:CGCCTTTTGAGATTACGCCG	59.97	55.00
ELN	F:GTACCACTAAGCTGGCTGGG	60.11	60.00
	R:AAACCCAAAGAGCACACCAA	58.14	45.00
FBN-1	F:AGGGACTGAAACTCCTGGCT	60.47	55.00
	R:GAGGAGCAATTCTCCCGAGG	59.89	60.00
α-SMA	F:CCTTCGTGACTACTGCCGAG	59.97	60.00
	R:TCAGCAATGCCTGGGTACAT	60.03	60.00
GAPDH	F:GCATCTTCTTGTGCAGTGCC	60.11	55.00
	R:TACGGCCAAATCCGTTTACA	59.96	50.00

F: İleri primerin sekansı, *R*: Revers primerin sekansı, *Tm*: Erime sıcaklığı °C, *%GC*: Guanin ve Sitozin içeriği yüzdesi, *COL1A1*: Kollajen 1A1, *COL4A1*: Kollajen 4A1, *COL4A2*: Kollajen 4A2, *ELN*: Elastin, *FBN-1*: Fibrillin, *α-SMA*: Alfa-Düz Kas Aktini, *GAPDH*: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrojenaz

3.9. *In Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

In vitro hücre kültüründe NIH/3T3 fare fibroblast hücre hattı temin edilerek, hücreler antibiyotiklerle desteklenen (100 U.mL⁻¹ penisilin, 100 µg.mL⁻¹ streptomisin), 4 mM L-Glutamin, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 FBS içeren DMEM ile kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Kültüre edilen hücreler ile hücre canlılık testi gerçekleştirilmiştir.

Nintedanib ve miR-29b yüklü lipoplekslerin pulmoner fibroblast hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkilerinin saptanabilmesi için kolorimetrik bir yöntem olan XTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür]) yöntemi kullanılmıştır. Canlı hücreler tarafından sarı renkli tetrazolyum, mor renkli formazan kristallerine dönüştürülür. Oluşan formazan kristalleri ek bir çözünme işlemine gerek duyulmadan, ortamda oluşan renk, spektrofotometrik olarak absorbans ölçümü ile belirlenmektedir. Dolayısıyla bu yöntem, herhangi bir terapötik ajanın hücre üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (272).

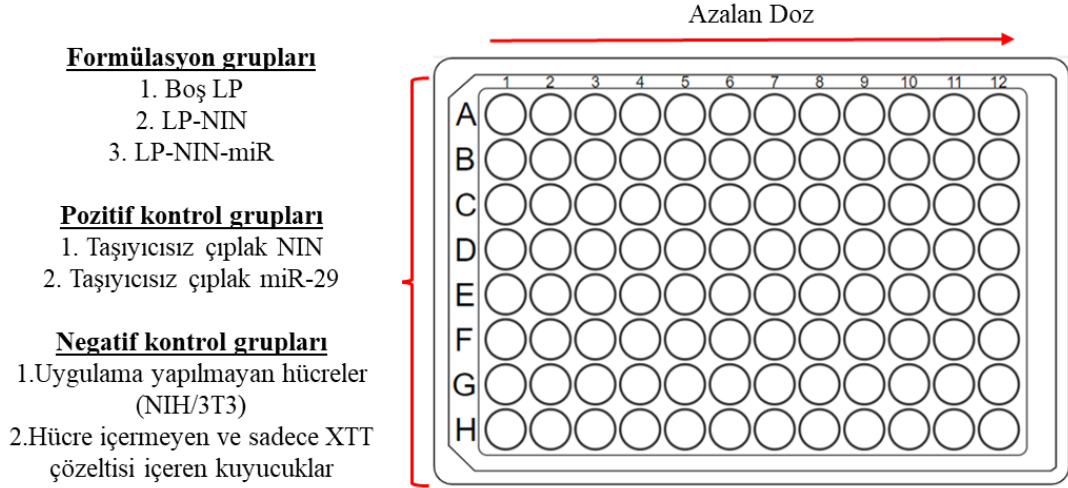
NIH/3T3 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat boyunca aç bırakılmıştır. Hücre canlılık testi öncesinde liyofilize toz halinde olan formülasyonlar DMEM kültür ortamında disperse edilmiştir. Hücrelere 100 μL olacak şekilde 3 farklı miR-29b (0,01-0,5 μM) ve Nintedanib (0,1-0,6 μM) konsantrasyonlarında DMEM kültür ortamındaki formülasyonlar (LP, LP-NIN, serbest NIN, serbest miR-29b ve LP-NIN-miR) uygulanmış ve hücreler 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol grupları olarak Nintedanib süspansiyonu ve LP-miR kullanılmış ve kontrol hücrelerine sadece kültür ortamı uygulanmıştır. XTT deneyi, 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Kuyu başına 10 μL 5 mg.mL^{-1} XTT solüsyonu eklendikten ve 4 saat inkübe edildikten sonra absorbanslar bir plaka okuyucuda 590 nm'de okunmuş ve kontrol grubunun absorbansıyla karşılaştırılarak % hücre canlılığı *Eşitlik 3.3* kullanılarak hesaplanmıştır (273). Deneyin planı Şekil 3.4.'te şematize edilmiştir.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{A_{(\text{örnek})} - A_{(\text{pozitif kontrol})}}{A_{(\text{negatif kontrol})} - A_{(\text{pozitif kontrol})}} \times 100 \quad (3.3.)$$

$A_{\text{örnek}}$: Örneğin 590 nm'deki absorbans değeri.

$A_{\text{pozitif kontrol}}$: Pozitif kontrolün 590 nm'deki absorbans değeri.

$A_{\text{negatif kontrol}}$: Negatif kontrolün 590 nm'deki absorbans değeri.



Şekil 3.4. XTT deney planının şematik gösterimi (n=3).

3.10. Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları

Hücresel alımı değerlendirmek için serbest miR-29b ve LP-NIN-miR, siGLO Yeşil Transfeksiyon Göstergesi (6-FAM, 6-Karboksiflorescein), ile 1:1 oranında etiketlenmiştir (261). 50 nM konsantrasyonda 6-FAM-miR-29b, LP-NIN-6-FAM-miR ve taşıyıcı kontrol grubu olarak 100 nM 6-FAM-miR-29b NIH/3T3 hücrelerine uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkanmış ve hücre çekirdekleri 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile boyanmıştır. Hücresel alım floresans mikroskopisi yöntemi ile gösterilmiştir.

3.11. *In Vitro* Terapötik Etkinliğin Belirlenmesi

LP-NIN-miR'in terapötik etkilerini karakterize etmek için NIH/3T3 hücreleri, 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve bir gece boyunca 4 mM L-Glutamin, 1 mM sodyum piruvat, %10 FBS ve antibiyotikler (100 U.mL⁻¹ penisilin, 100 µg.mL⁻¹ streptomisin) ile desteklenmiş DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Hücreler, *in vitro* İPF modelini oluşturmak için 96 saat boyunca 20 ng.mL⁻¹ TGF-β1 ile inkübe edilmiştir. Takiben hücreler serbest Nintedanib (0,6 µM), LP-NIN (0,6 µM), serbest miR-29b (0,2 µM), LP-miR (0,2 µM) ve LP-NIN-miR (miR-29b: 0,2 µM, Nintedanib: 0,6 µM) formülasyonları ile 48 saat süreyle inkübe edilmiştir (n=3). Hücreler ve büyüme ortamları toplanarak gen ekspresyon

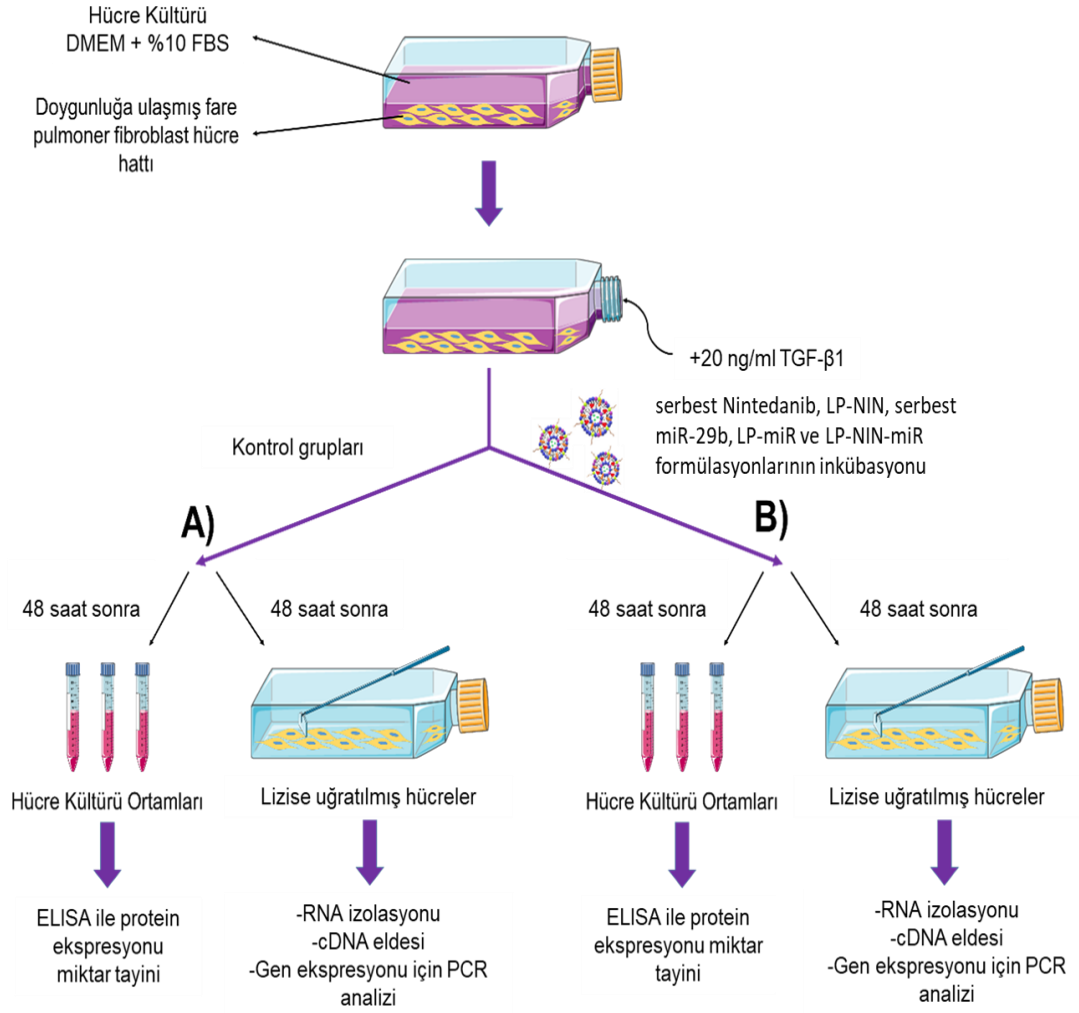
düzeyleri RT-PCR yöntemi ve bu genlerin ifade ettikleri proteinlerin düzeyleri ELISA yöntemi kullanılarak gösterilmiştir.

Pulmoner fibroblastlardan total RNA izolasyonu, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak RNA ekstraksiyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek zincirli cDNA, 1 µg total RNA'dan ters transkriptaz kullanılarak sentezlenmiştir. Bu işlem, üretici firmanın yönergelerine göre 100 U Superscript II Ters Transkriptaz Enzimi, 0,25 µg random primer, 0,5 mM Deoksiribonükleotid Trifosfatlar (dNTP), 5 mM Ditiotritol (DTT) ve 32 U RNase inhibitörü ile birlikte 60 dakika boyunca 42°C'de, toplam hacim 20 µL olacak şekilde ters transkripsiyon tamponu içinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerde kontaminasyon olmadığı, Superscript II kullanılmadan hazırlanan negatif kontrol örnekleri ile doğrulanmıştır.

RT-PCR analizleri, SYBR Green PCR Master Mix ve 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak ABI ViiA™ 7 (Applied Biosystems) sekans tespit sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon reaksiyonu (25 µl), üretici firmanın talimatlarına göre 1:5 oranında seyreltilmiş; 5 µl örnek ile üçlü kontrol sistemi uygulanarak yürütülmüştür. Her deneyde araştırılan genin ifadesi, iç kontrol gen (*housekeeping gene*; GAPDH) ifadesi ile normalize edilmiştir (83,274).

Fibrotik süreçte protein düzeyindeki ekspresyonlarının değişmesi ya da sabit kalması beklenen proteinlerin miktar tayinleri ELISA kitleri (Bioassay Technology, Çin) ile yapılmış ve ölçümler kullanılan kitlerin üretici protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları Şekil 3.5'te özetlenmiştir.



Şekil 3.5. Fare fibroblast hücrelerine TGF-β1 uygulanması sonrası, **A)** İPF oluşumunun analizi, **B)** serbest Nintedanib, LP-NIN, serbest miR-29b, LP-miR ve LP-NIN-miR formülasyonlarının inkübasyonu sonrasında gerçekleştirilen ELISA ve PCR çalışmalarının şematik gösterimi.

3.12. İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde ve istatistiksel analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve Student t test kullanılmıştır. İn vitro deneylerde sonuçlar $\bar{x} \pm SS$ olarak rapor edilmiştir. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları

MHF yönteminin bir parçası olan mikroakışkanlaştırma teknolojisi, organik fazın (etanol) konsantrasyonunu düşürerek sulu faz ile karıştırılması suretiyle uniform lipozomlar oluşturmak için kullanılmıştır (275). Organik faz konsantrasyonundaki bu azalma, polariteyi artırır, bu da lipit çökmesine ve lipozom oluşumuna neden olur. Ortaya çıkan taşıyıcı sistemin özellikleri, partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli, enkapsülasyon verimliliği ve hücresel alım verimliliği gibi faktörler, lipit bileşimi ve mikroakışkanlaştırma sırasında FRR tarafından etkilenir (276). Bu nedenle, formülasyon geliştirme çalışmalarından önce, optimum FRR ön formülasyon çalışmaları ile belirlenmiştir.

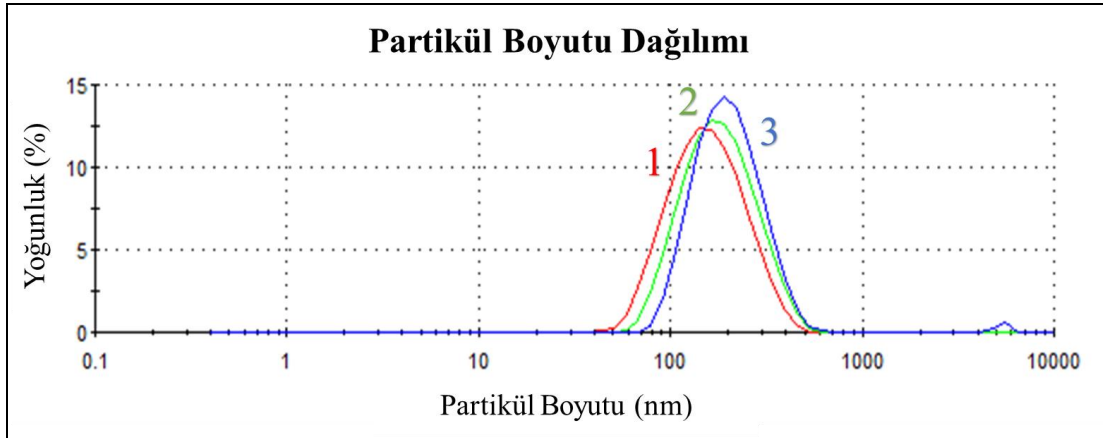
Ön formülasyon denemelerinde mikroakışkanlaştırma yöntemiyle elde edilen LP'lere ait değişkenler Tablo 4.1'de, partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli analiz sonuçları Tablo 4.2, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de sunulmaktadır.

Tablo 4.1. Ön formülasyon denemelerine ait değişkenler.

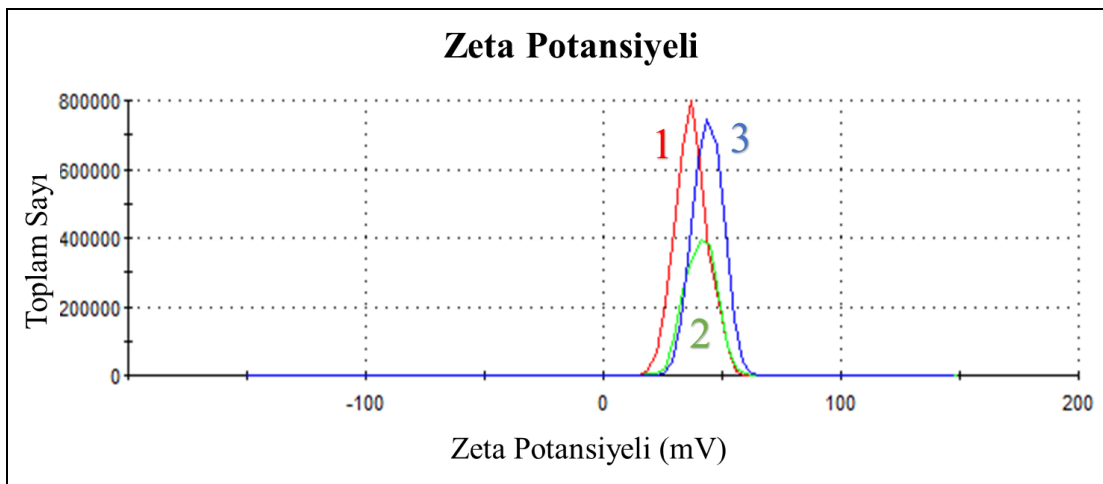
Formülasyon Kodu	Değişkenler						
	DOTAP	DOPE	CHOL	DSPE-mPEG 2000	Etanol Fazı Akış Hızı ($\mu\text{L}\cdot\text{dk}^{-1}$)	Su Fazı Akış Hızı ($\mu\text{L}\cdot\text{dk}^{-1}$)	FRR
LP#1	10	2	7	1	100	500	1:5
LP#2	10	2	7	1	100	250	1:2,5
LP#3	10	2	7	1	100	100	1:1

Tablo 4.2. Ön formülasyon denemelerine ait partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli analiz sonuçları ($n=3$, $\bar{x} \pm \text{SS}$).

Formülasyon Kodu	Yanıtlar		
	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)	Zeta potansiyel (mV)
LP#1	137,5 \pm 1,1	0,181 \pm 0,005	37 \pm 4
LP#2	160,8 \pm 1,9	0,170 \pm 0,010	41 \pm 3
LP#3	189,0 \pm 0,4	0,178 \pm 0,028	44 \pm 1



Şekil 4.1. Ön formülasyon denemelerine ait partikül boyutu dağılımı grafiği.



Şekil 4.2. Ön formülasyon denemelerine ait zeta potansiyeli grafiği.

FRR arttıkça, partikül boyutunda ve zeta potansiyelinde bir azalma gözlenmiştir. Ön formülasyon deneme sonuçları ve üretim süreci süresi analiz edildiğinde, gelecekteki formülasyon geliştirme çalışmalarında etanol akış hızı oranının 1:5 olarak uygulanması gerektiği belirlenmiştir.

4.2. Tasarımla Kalite Yaklaşımı ile Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Taşıyıcı sistem formülasyonlarının geliştirilmesi amacıyla 3^3 faktöriyel formülasyon tasarımı uygulanmıştır. Formülasyon tasarımı oluşturulurken toplam lipit konsantrasyonu $15 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ olarak ve DSPE-mPEG2000 molar oranı düzeyi 1

olarak sabit tutulmuş olup; DOTAP, DOPE ve CHOL için farklı molar oranı düzeyleri kullanılmıştır.

Tablo 4.3'te sunulduğu gibi, ANOVA sonuçları, üç parametrenin de p değerleri " $<0,0001$ " ile ifade edilmektedir, ve bu parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Formülasyon değişkenlerinin lipozomların partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkisi sırasıyla *Eşitlik 4.1, 4.2 ve 4.3*'te verilmiştir. Bu ilişkiler, 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri ile Şekil 4.3'te gösterilmiş olup, partikül boyutu ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,8719$), PDI ($p = 0,0487$, $R^2 = 0,4856$) ve zeta potansiyeli ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,9854$) için istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

$$\text{Partikül Boyutu (Y}_1\text{)} = 22,40 + 0,36x_A - 8,02x_B + 16,39x_C - 0,11x_{AB} - 0,62x_{AC} + 0,50x_{BC} \quad (4.1.)$$

$$\text{PDI (Y}_2\text{)} = 0,72 - 0,05x_A - 0,25x_B - 0,07x_C + 0,03x_{AB} - 0,01x_{AC} + 0,04x_{BC} - 0,004x_{ABC} \quad (4.2.)$$

$$\text{Zeta Potansiyel (Y}_3\text{)} = 2,50x_A + 7,30x_B + 3,83x_C + 0,02x_{AB} - 0,26x_{AC} - 0,96x_{BC} \quad (4.3.)$$

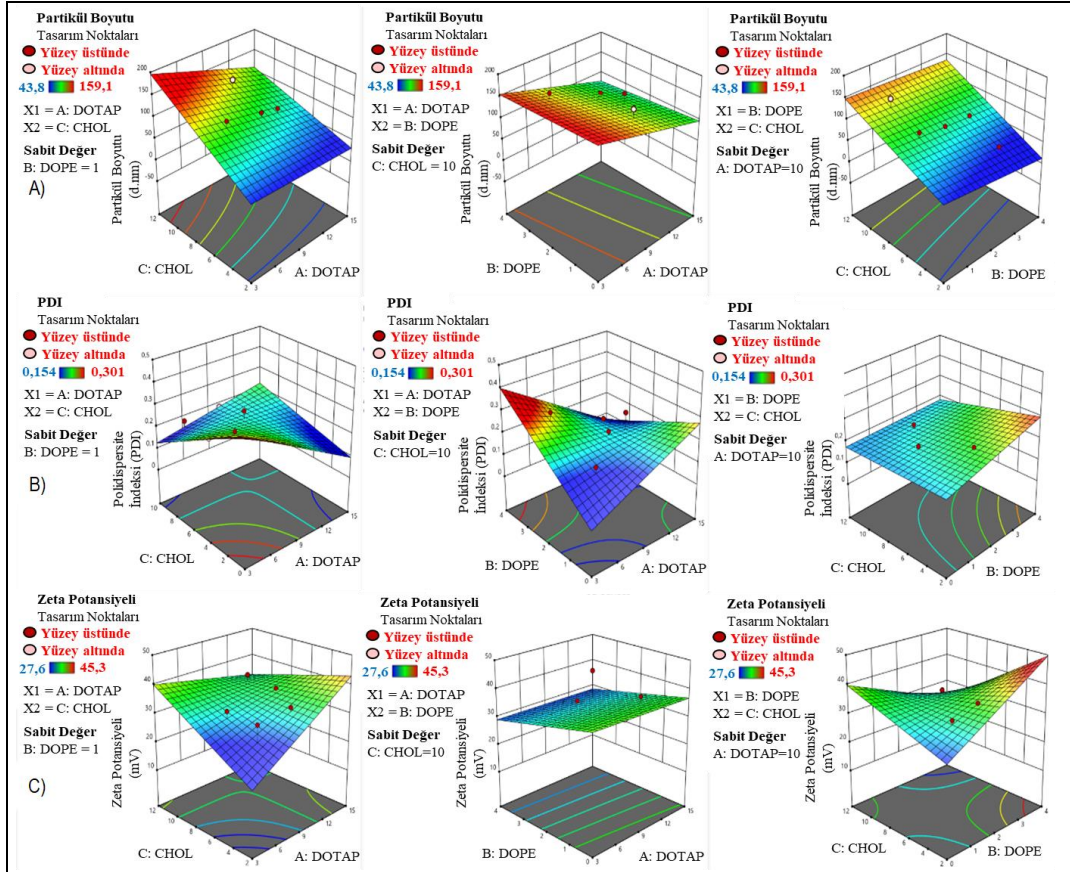
Eşitlik 4.1, 4.2 ve 4.3 değerlendirildiğinde, DOTAP (A) ve CHOL (C) konsantrasyonları arttıkça partikül boyutu artmakta, DOPE (B) konsantrasyonu arttıkça partikül boyutu azalmaktadır. Ayrıca AB, AC ve BC etkileşim terimleri de partikül boyutu üzerinde önemli ancak bireysel etkilerden daha küçük etkilere sahiptir. DOTAP (A), DOPE (B) ve CHOL (C) konsantrasyonları arttıkça PDI azalmakta ve partiküllerin homojenliği artmakta olup, AB, AC ve BC etkileşim terimleri de PDI üzerinde daha az etkilere sahiptir. DOTAP (A), DOPE (B) ve CHOL (C) konsantrasyonları arttıkça zeta potansiyeli ve dolayısıyla partiküllerin stabilitesi artmakta, ayrıca AB, AC ve BC etkileşim terimleri de zeta potansiyeli üzerinde daha az etkilere sahip olmaktadır. DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının partikül boyutu (Y1) üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi vardır ($p < 0,05$). PDI (Y2) üzerinde de anlamlı bir etki bulunmakla birlikte ($p = 0,0487$), düşük R^2 değeri (0,4856) etkisinin zayıf olduğunu gösterir. Zeta potansiyeli (Y3) üzerinde ise bu değişkenlerin güçlü ve anlamlı bir etkisi vardır ($p < 0,0001$, $R^2 = 0,9854$).

Tablo 4.3. 3^3 faktöriyel formülasyon tasarımı ile elde edilen LP formülasyonlarına ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri için Varyans Analizi (ANOVA).

Formülasyon Değişkenleri	Partikül Boyutu (Y ₁)					PDI (Y ₂)					Zeta Potansiyeli (ζ) (Y ₃)				
	SS	df	MS	F-değeri	p-değeri	SS	df	MS	F-value	p-value	SS	df	MS	F-değeri	p-değeri
Model	25784,87	6	4297,48	22,70	< 0,0001 *	0,0213	7	0,0030	2,56	0,0487 *	32749,61	6	5458,27	235,76	< 0,0001 *
A: DOTAP	1,43	1	1,43	0,0075	0,9317	0,0014	1	0,0014	1,17	0,2937	297,78	1	297,76	12,86	0,0017 *
B: DOPE	49,97	1	49,97	0,2639	0,6131	0,0005	1	0,0005	0,4124	0,5284	83,24	1	83,24	3,60	0,0718
C: CHOL	2072,02	1	2072,02	10,94	0,0035 *	0,0044	1	0,0044	3,67	0,0704	298,66	1	298,66	12,90	0,0017 *
AB	1,45	1	1,45	0,0076	0,931	0,0043	1	0,0043	3,65	0,0712	0,0469	1	0,0469	0,0020	0,9645
AC	387,03	1	387,03	2,04	0,1682	0,0013	1	0,0013	1,08	0,3108	116,17	1	116,17	5,02	0,0360 *
BC	27,30	1	27,30	0,1442	0,7082	0,0068	1	0,0068	5,75	0,0269 *	120,59	1	120,59	5,21	0,0330 *
ABC	-	-	-	-	-	0,0107	1	0,0107	9,01	0,0073 *	-	-	-	-	-
Artık	3786,73	20	189,34	-	-	0,0226	19	0,0012	-	-	486,19	21	23,15	-	-
Toplam	29571,60	26	-	-	-	0,0226	26	-	-	-	33235,80	27	-	-	-
Standart sapma			13,76					0,0345					4,81		
Ortalama (\bar{x})			88,87					0,2116					34,80		
Varyasyon Katsayısı (VK) (%)			15,48					16,30					13,83		
R ²			0,8719					0,4856					0,9854		
R _{adj} ²			0,8335					0,2961					0,9812		
Tahmin Edilmiş R ²			0,7316					-0,3047					0,9775		
Yeterlilik Hassasiyeti			15,2990					6,7136					7,1376		

SS: Kareler Toplamı, df: Serbestlik Derecesi, MS: Ortalama Kare, F: Fisher Oranı, p: Olasılık, PDI: Polidispersite İndeksi, ζ: Zeta Potansiyeli, R²: Belirleme Katsayısı, R_{adj}²: Düzeltilmiş R².

(*p < 0,05)



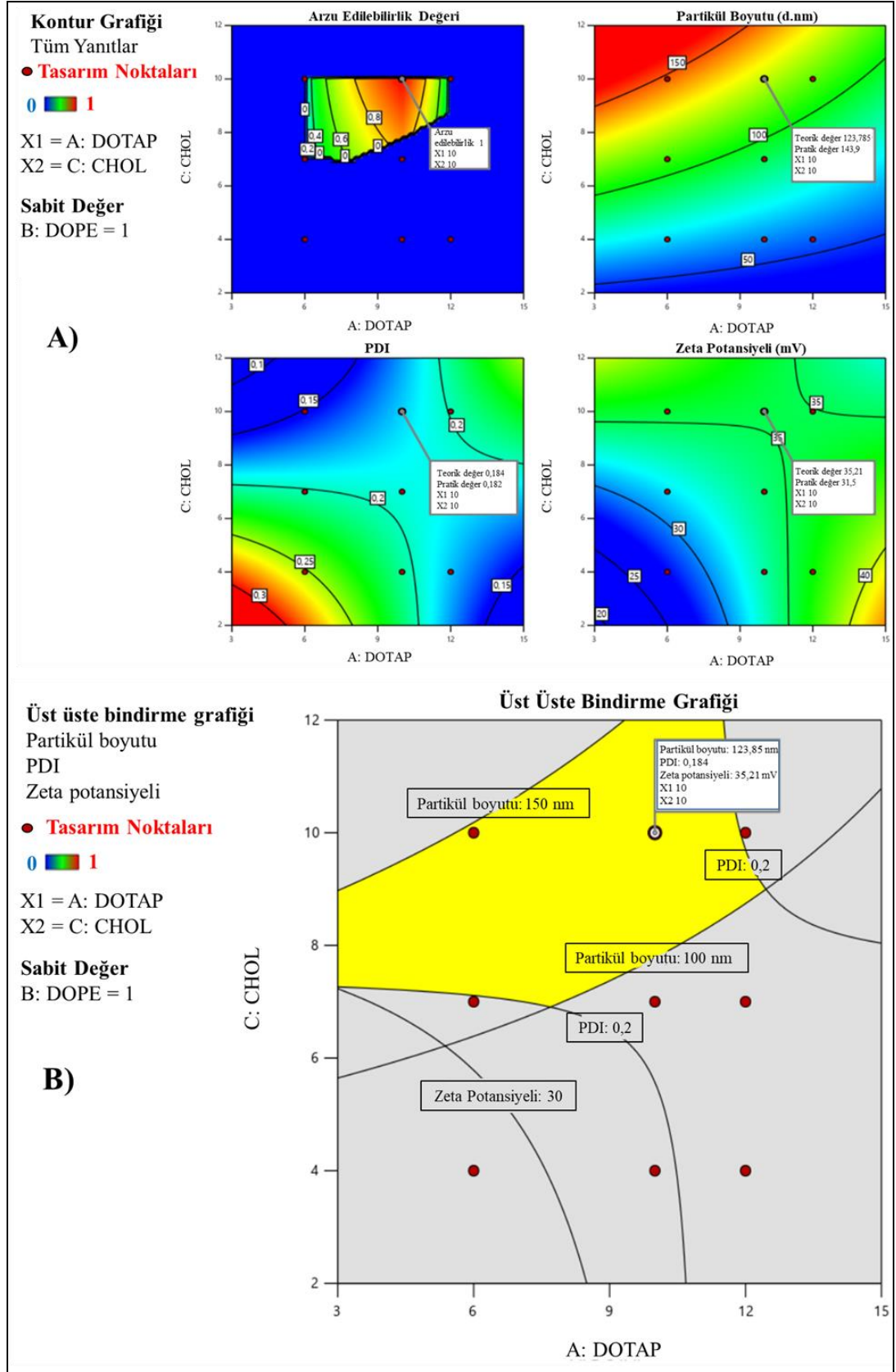
Şekil 4.3. 3^3 faktöriyel formülasyon tasarımında yer alan formülasyon değişkenlerinin **A) Partikül Boyutu**, **B) PDI** ve **C) Zeta Potansiyeli** üzerindeki etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği.

Şekil 4.3'te yer alan grafiklerde üç farklı parametre (Partikül Boyutu, PDI ve Zeta Potansiyeli) için 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri sunulmuştur. DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkileri gösterilmektedir. Grafikteki renk değişimleri ve yüzey eğilimleri, DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkilerini göstermektedir. Partikül Boyutu (A) grafiklerinde, DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının partikül boyutu üzerindeki etkileri, renk değişimleri ve yüzey eğilimleri ile açıkça gözlemlenmektedir. PDI (B) grafik setinde, bu bileşenlerin PDI üzerindeki etkileri yüzey grafiklerinde gözlenen eğilimler ve renk değişimleri ile gösterilmiştir. Zeta Potansiyeli (C) grafiklerinde ise, DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının zeta potansiyeli üzerindeki güçlü etkileri, renk değişimleri ve yüzey eğilimleri ile ortaya konmuştur. Tüm grafikler birlikte değerlendirildiğinde, DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının partikül

boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerinde etkileri olduğu görülmektedir. Grafikteki renk değişimleri ve yüzey eğilimleri, bu bileşenlerin her bir parametre üzerindeki etkisinin belirgin olduğunu göstermektedir.

Kan damarlarında dolaşan 100-150 nm çapındaki lipozomlar, ilacın hedeflenmesini uzun süre boyunca akciğer kapillerlerinde kalarak sağlarlar (95). PDI, partikül boyutu dağılımının heterojenliğini açıklamak için kullanılır. PDI'nin sayısal değeri, homojen bir partikül boyutundan yüksek derecede polidispers bir örneğe kadar 0,0 ile 1,0 arasında değişir. Lipozom formülasyonlarında, 0,3 ve altındaki PDI değeri kabul edilebilir olarak değerlendirilir ve homojen bir partikül boyutu dağılımını gösterir (95). Zeta potansiyeli (ζ) ile lipozom/lipopleks stabilitesi arasındaki ilişki, ilaç taşıma sistemlerinin etkinliğini belirlemede kritik bir faktördür. Yüksek ζ değeri, partiküller arasındaki elektrostatik itme kuvveti sağlayarak stabiliteye katkıda bulunabilir, ancak bu mutlak bir gereklilik değildir. Yüksek değerler, agregasyonu önleyen ve itici elektriksel kuvvetler nedeniyle yeniden dağıtılan yüksek zeta potansiyel değerine sahip partikülleri gösterirken, düşük zeta potansiyelinde agregasyon meydana gelebilir. $30 \text{ mV} \leq |\zeta| \leq 60 \text{ mV}$ değerleri stabil olarak kabul edilmektedir (253).

Şekil 4.4'te gösterilen grafikler, formülasyon değişkenlerinin lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin iyileştirilmesi için tasarım alanını ve yanıt yüzeylerini göstermektedir. Kontur grafiği (Şekil 4.4A) formülasyonu optimize etmek için tasarım alanını gösterirken, üst üste bindirme grafiği (Şekil 4.4B) tüm hedeflenen yanıt aralıklarını temsil etmektedir. Kontur çizimi genellikle iki değişken arasındaki ilişkiyi gösteren grafiksel bir gösterimdir ve bu durumda lipozomal formülasyonla ilgili farklı değişkenlerin değerlerinin dağılımını gösterir. Üst üste bindirme grafiği, tüm hedeflenen yanıt aralıklarını karşılayan formülasyon parametrelerini gösterir. Sarı bölge, belirlenen kriterlere uyan optimum formülasyon alanını temsil eder. Bu grafik, optimum formülasyonun belirlenmesinde kritik rol oynar ve optimum DOTAP ve CHOL konsantrasyonlarını net bir şekilde gösterir. Grafiklerdeki renk değişimleri ve yüzey eğilimleri, DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının her bir bileşenin her bir parametre üzerindeki etkisinin belirgin olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4. A) Kontur grafiği ve B) üst üste bindirme grafiği, lipozomal formülasyonun optimize edilmesi için tasarım alanını göstermektedir.

Bu tez kapsamında optimum LP'lerin geliştirilmesi için en yüksek arzu edilebilirlik değeri ile ilişkilendirilen değişken seviyeleri seçilmiştir. Takiben seçilen formülasyon değerleri ile mikroakışkanlaştırma yöntemiyle LP'ler üretilmiş ve elde edilen yanıtlar teorik değerlerle karşılaştırılmıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Optimize edilmiş LP formülasyonuna ait yanıtların teorik ve pratik ortalama değerleri ve arzu edilebilirlik değeri.

Formülasyon Değişkenleri		Konsantrasyonlar	
A (DOTAP)		10	
B (DOPE)		1	
C (CHOL)		10	
	Yanıtlar	Teorik Ortalama Değerler	Pratik Ortalama Değerler
	Y1 (Partikül Boyutu) (nm)	123,8	143,9 ± 5,4 *
	Y2 (PDI)	0,184	0,182 ± 0,024 *
	Y3 (Zeta Potansiyeli) (mV)	35	32 ± 1 *
Optimize edilmiş formülasyonun arzu edilebilirlik değeri		0,999 **	

* Değerler, $\bar{x} \pm SS$ (n=3) olarak sunulmuştur.

** Arzu edilebilirlik değeri 0 ile 1 arasında değişir ve 1'e yakın değerler, sonuçların istenen hedeflere yaklaştığını gösterir.

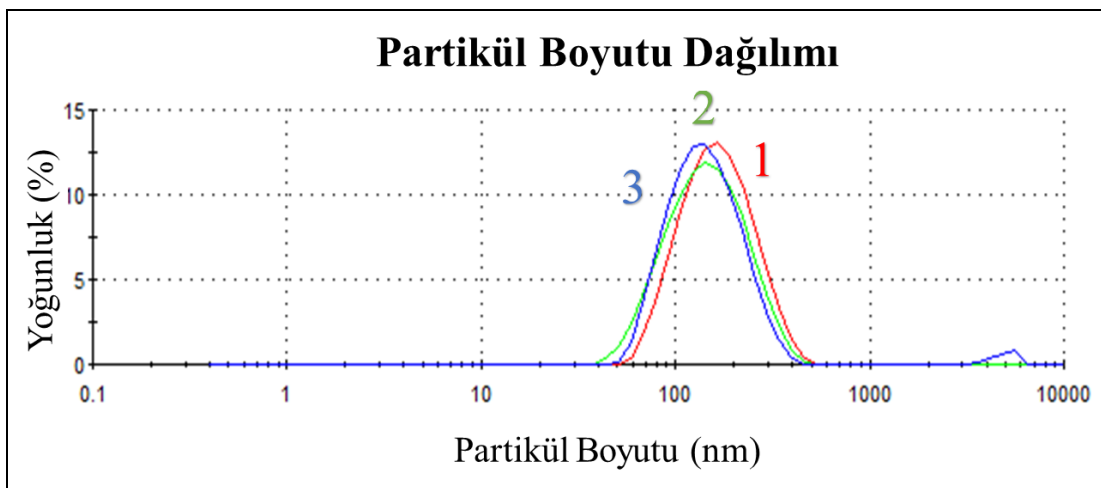
Tablo 4.3'te, optimize edilen formülasyonun yanıtlarına ait teorik ve pratik ortalama değerler karşılaştırılmaktadır. Değerler, genel olarak uyumludur ve modelin partikül boyutu üzerinde iyi bir tahmin yeteneğine sahip olduğunu gösterir. PDI için teorik ortalama değer 0,184, pratik ortalama değer ise 0,182'dir; bu küçük fark, öngörülen değer partikül dağılımındaki homojenliği doğruya yakın tahmin ettiğini göstermektedir ve her iki değer de kabul edilebilir bir homojenlik düzeyindedir. Zeta potansiyeli için teorik ortalama değer 35 mV, pratik ortalama değer ise 32 mV'dir; bu fark, öngörülen değer zeta potansiyelini biraz daha yüksek tahmin ettiğini gösterse de, her iki değer de iyi bir stabilite göstermektedir.

3^3 faktöriyel deneysel tasarım çalışmasının sonucunda, partikül boyutu ($100 < \text{partikül boyutu} < 150$ nm), PDI ($< 0,2$) ve zeta potansiyel değeri ($30 \text{ mV} \leq \zeta \leq 60 \text{ mV}$)

limitler dahilinde olan optimum lipozom formülasyonu ile, mikroakışkanlaştırma yöntemi kullanılarak $3000 \mu\text{L}\cdot\text{dk}^{-1}$ sabit TFR ve 1:5 FRR oranında ve farklı Nintedanib konsantrasyonlarında enkapsülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan Nintedanib içeren formülasyonların partikül boyutu ve dağılımı ölçümleri DLS yöntemiyle Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlara ait ortalama sonuçlar sırasıyla Tablo 4.5'te sunulmuştur. Partikül boyutu ve dağılımı analiz sonuçlarına ilişkin grafik Şekil 4.5'te sunulmuştur.

Tablo 4.5. Nintedanib içermeyen / içeren lipozom (LP, LP-NIN) formülasyonlarına ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli analiz sonuçları.

Formülasyon	DOTAP	DOPE	CHOL	DSPE- mPEG2000	Nintedanib Konsantrasyonu (μM)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
LP #1	10	1	10	1	-	$143,9 \pm 5,4$	$0,182 \pm 0,024$	32 ± 1
LP-NIN #1	10	1	10	1	0,1	$144,5 \pm 2,8$	$0,178 \pm 0,011$	30 ± 2
LP-NIN #2	10	1	10	1	0,2	$126,0 \pm 0,4$	$0,189 \pm 0,008$	49 ± 2
LP-NIN #3	10	1	10	1	0,3	$132,7 \pm 3,5$	$0,207 \pm 0,023$	30 ± 3



Şekil 4.5. Nintedanib içeren lipozom formülasyon denemelerine (LP-NIN #1, #2 ve #3) ait partikül boyutu dağılımı grafiği.

4.3. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.3.1. Lipoplekslerin Partikül Boyutu, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Tayini

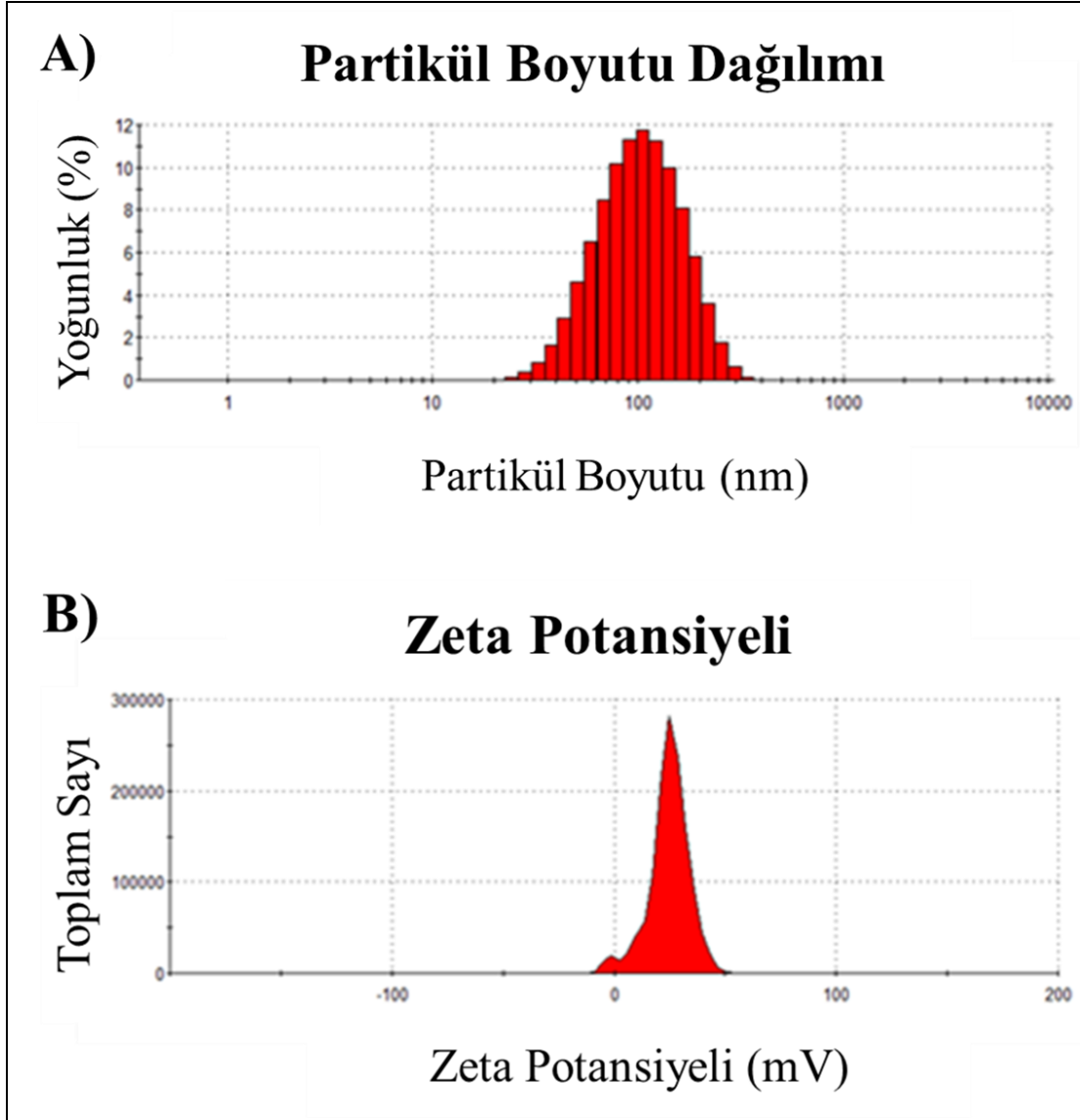
LP, LP-miR, LP-NIN ve LP-NIN-miR formülasyonlarına ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 4.6'da gösterilmektedir.

Tablo 4.6. LP, LP-NIN, LP-miR ve LP-NIN-miR formülasyonlarına ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri.

Formülasyon	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyeli (mV)
LP	143,9 ± 5,4	0,182 ± 0,024	32 ± 1
LP-NIN	126,0 ± 0,4	0,189 ± 0,008	49 ± 2
LP-miR	95,6 ± 0,9	0,198 ± 0,001	28 ± 1
LP-NIN-miR	87,3 ± 0,9	0,184 ± 0,003	24 ± 1

(n=3, $\bar{x} \pm SS$)

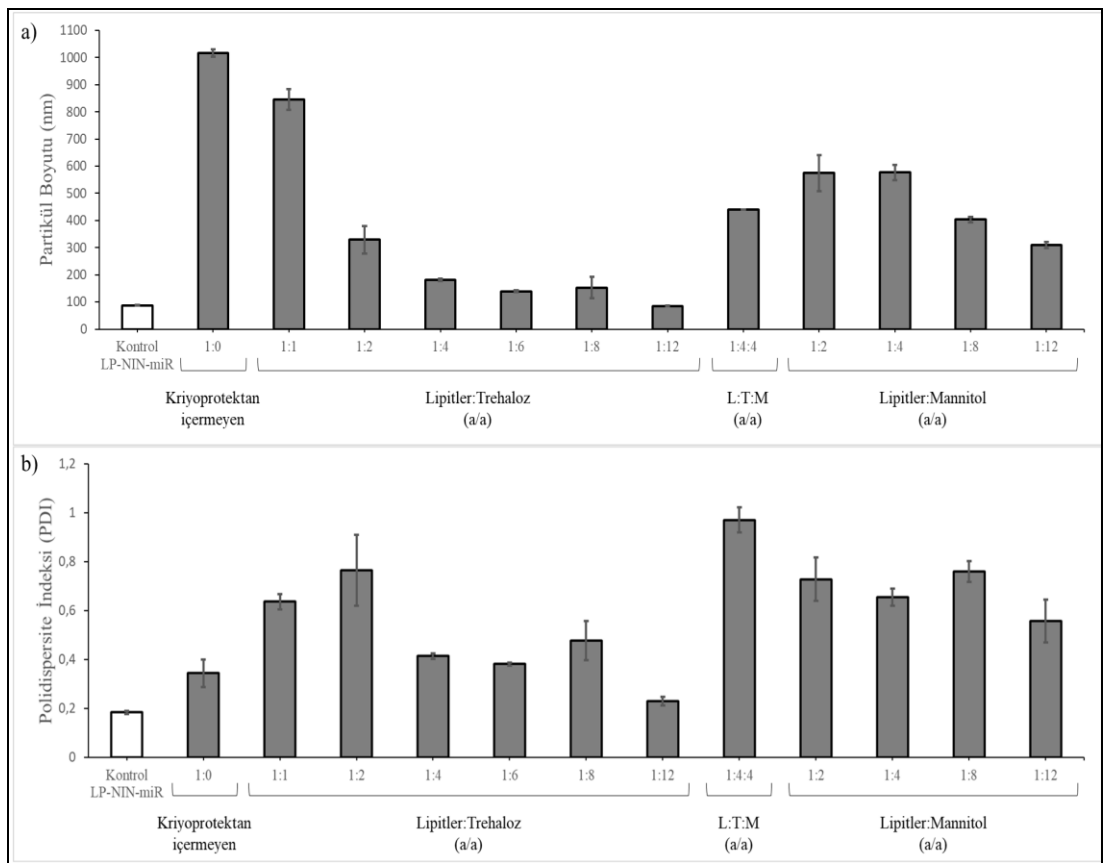
LP-NIN-miR formülasyonunun partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli sırasıyla 87,3 ± 0,9 nm, 0,184 ± 0,003 ve +24 ± 1 mV olarak elde edilmiştir (Şekil 4.6 A, B).



Şekil 4.6. 30:1 (a/a) lipid:miR-29b ağırlık oranında hazırlanan LP-NIN-miR formülasyonuna ait **A)** partikül boyutu dağılımı ve **B)** zeta potansiyeli grafikleri.

Lipozom/lipopleks formülasyonlarının uzun süreli stabilitesini sağlamak için liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yapılmıştır (277). LP-NIN-miR formülasyonunun liyofilizasyon çalışmaları için kriyoprotektan olarak literatürde en çok kullanılan trehaloz ve mannitol maddeleri seçilmiştir (278). Farklı lipid:kriyoprotektan ağırlık oranlarında kriyoprotektan eklenmiş liyofilize LP-NIN-miR formülasyonları 1xsiRNA tamponunda dağıtılarak partikül boyutu dağılımı açısından analiz edilmiştir. Şekil 4.7’de sunulduğu gibi, kontrol grubu olan liyofilize edilmemiş LP-NIN-miR formülasyonu, $87,3 \pm 0,9$ nm partikül boyutuna ve 0,2’den daha düşük PDI değerine sahiptir. Kriyoprotektan içermeyen liyofilize

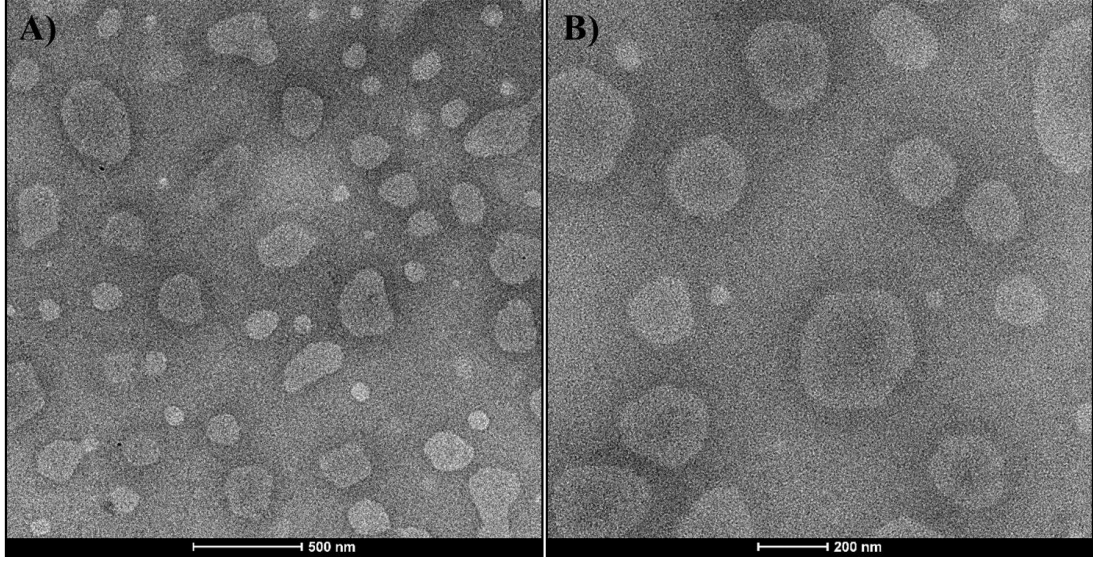
formülasyonlar, kontrol grubuna göre daha büyük ve heterojen partikül boyutu dağılımı göstermektedir. Zeta potansiyel açısından liyofilize edilmemiş LP-NIN-miR formülasyonu ile liyofilize edilmiş formülasyonlar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Liyofilize edilen formülasyonlarda, 1:12 (a/a) lipid:trehaloz oranı ile kontrol grubuna en yakın ve en küçük partikül boyutu ($84,8 \pm 0,9$ nm) ve PDI $< 0,3$ ile en homojen partikül dağılımı elde edilmiştir. Bu nedenle, düşük partikül boyutu düşük PDI değeri açısından optimum sonuçlar veren 1:12 (a/a) lipid:trehaloz oranı seçilmiştir.



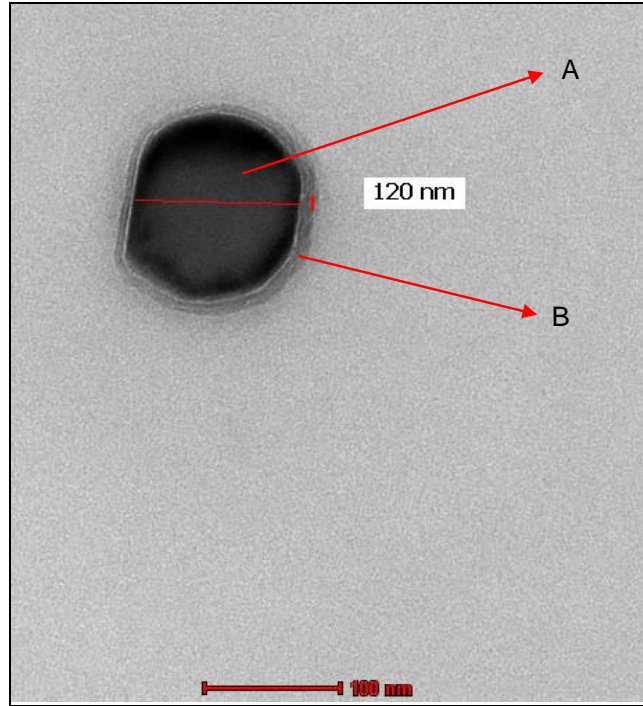
Şekil 4.7. Kriyoprotektanlar (trehaloz ve/veya mannitol) ile liyofilize edilmiş LP-NIN-miR formülasyonuna ait **a)** partikül boyutu ve **b)** polidispersite indeksi, lipid:kriyoprotektan ağırlık oranları 1:1 - 1:12 (lipid:trehaloz 1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 ve 1:12, a/a; lipid:mannitol 1:0, 1:2, 1:4, 1:8 ve 1:12, a/a; lipid:trehaloz:mannitol 1:4:4, a/a) (L: Lipitler, T: Trehaloz, M: Mannitol).

4.3.2. Lipoplekslerin Morfolojik Değerlendirilmesi

TEM görüntüleri, LP-NIN-miR'nin partikül boyutu dağılımını (Şekil 4.8 A, B) ve bilamellar bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.9).



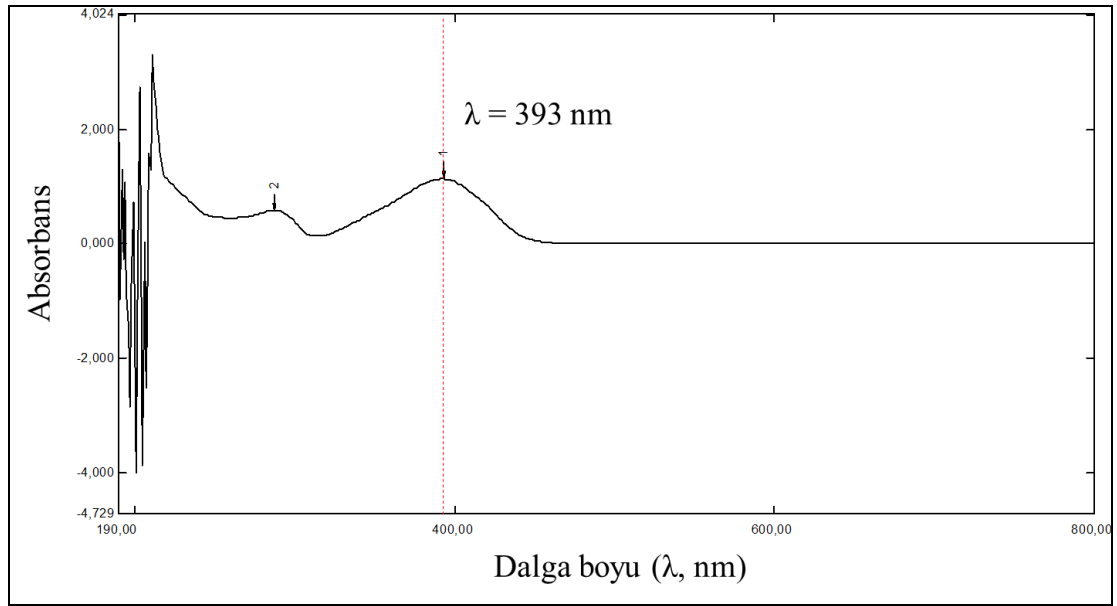
Şekil 4.8. LP-NIN-miR formülasyonuna ait TEM görüntüleri (ölçek: **A**) 500 nm ve **B**) 200 nm).



Şekil 4.9. LP-NIN-miR formülasyonuna ait TEM görüntüsü **A**) hidrofilik çekirdek, **B**) lipid çift tabakası. (Ölçek: 100 nm).

4.3.3. Nintedanib Miktar Tayini ve Analiz Yöntemi Validasyonu

Nintedanib'in miktar tayini için dalga boyu seçimi amacıyla hazırlanan Nintedanib standart çözeltisinin absorbans değerlerini içeren UV spektrumu Şekil 4.10'da gösterilmiştir. 190 nm ile 800 nm arasındaki dalga boylarında spektrum taraması yapılmış ve en yüksek absorbans gösteren dalga boyu (λ) 393 nm olarak belirlenmiştir. Nintedanib'in 393 nm dalga boyunda karakteristik bir maksimum absorpsiyon kapasitesine sahip olduğunu ve bu dalga boyunun Nintedanib analizlerinde güvenilir bir referans noktası olarak kullanılabileceğini göstermektedir (279).



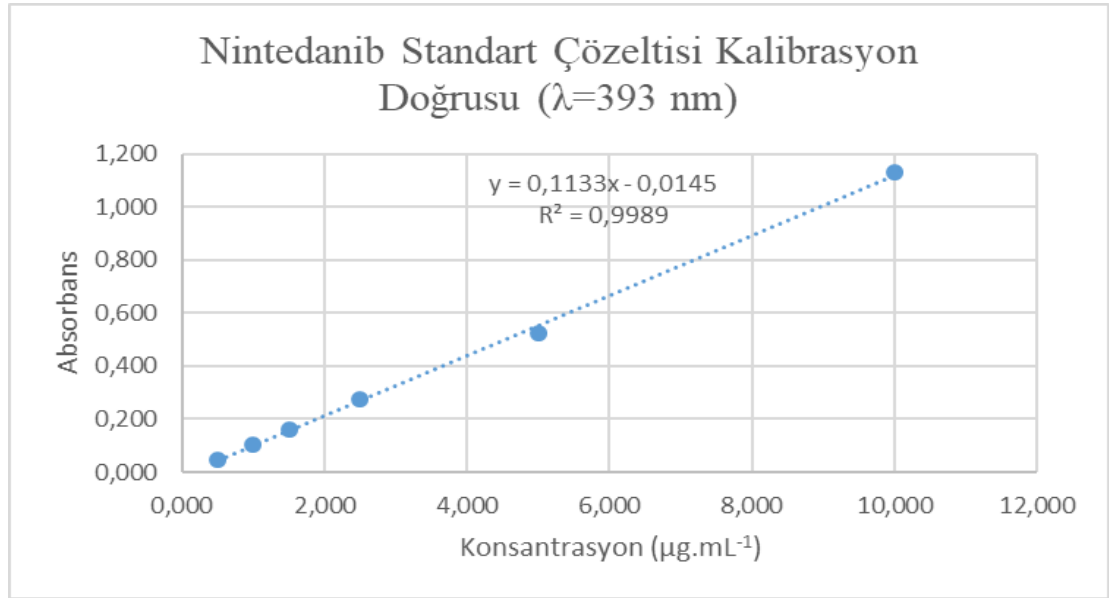
Şekil 4.10. LP-NIN-miR formülasyonuna ait Nintedanib UV spektrumu.

Doğrusallık (*Linearity*)

Nintedanib'in farklı konsantrasyonlardaki (0, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 5 ve 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) piklerine ait absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisi Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Kalibrasyon eğrisi, konsantrasyon ile absorbans arasındaki doğrusal ilişkiyi yansıtmaktadır. Eğri, $y=0,1133x-0,0145$ doğrusal denklemi ile ifade edilmiştir ve R^2 değeri 0.9989 olarak belirlenmiştir. Bu yüksek R^2 değeri, kalibrasyon eğrisinin

doğruluğunu ve güvenilirliğini göstermektedir, konsantrasyon ve absorbans arasında güçlü bir doğrusal ilişki vardır.

Kalibrasyon eğrisi, Nintedanib'in UV spektrofotometre analizlerinde konsantrasyonların belirlenmesi için kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda Nintedanib standart çözeltilerinin piklerine ait eğri altında kalan alanların belirlenmesi, Nintedanib'in doğru ve güvenilir bir şekilde miktar tayinini sağlamaktadır. Bu eğri, bilinmeyen numunelerin konsantrasyonlarını absorbans değerlerine göre hesaplamak için kullanılmıştır.



Şekil 4.11. Nintedanib'e ait UV spektrofotometre ($\lambda=393$ nm) kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

Doğruluk (Accuracy)

Nintedanib miktar tayininde kullanılan UV spektrofotometre analitik yönteminin doğruluğunu göstermek amacıyla, kalibrasyon sınırları içerisinde bulunan, 3 farklı konsantrasyonda ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) 3 seri Nintedanib çözeltisi hazırlanarak UV spektrofotometre analizi yapılmıştır. Ölçümle bulunan konsantrasyonlardan Nintedanib'in geri kazanımları hesaplanmıştır. Elde

edilen sonuçlar Tablo 4.7’de sunulmuş ve % BSS (VK) değerleri %2’nin altında bulunarak yöntemin doğruluğu gösterilmiştir (280,281).

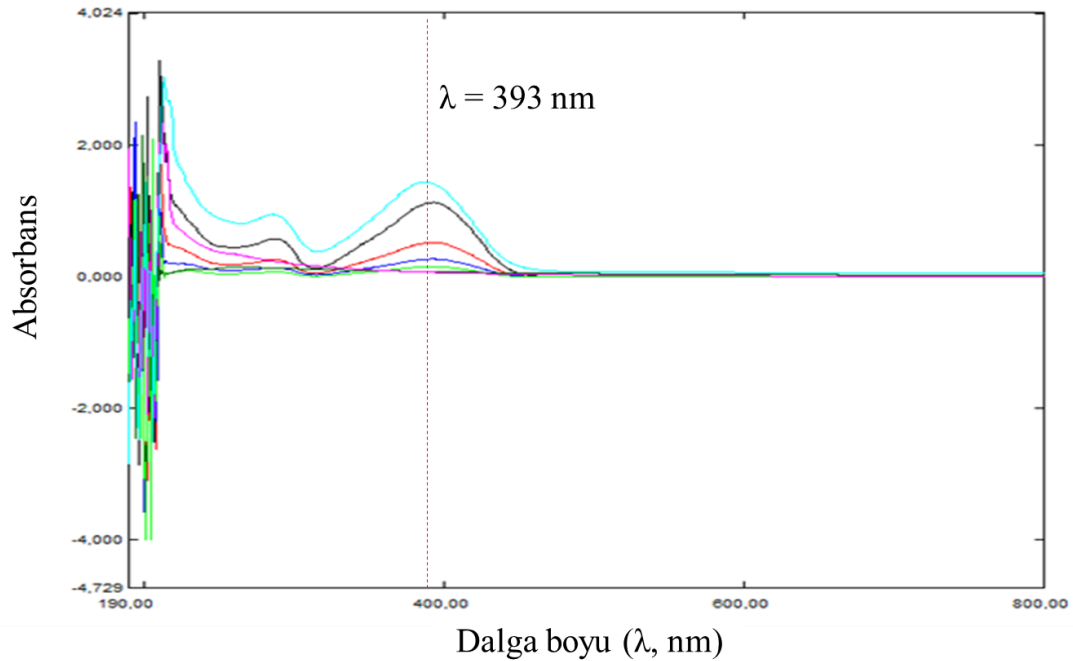
Tablo 4.7. Nintedanib’in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk, % geri kazanım ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Geri Kazanım (%)	Bağıl Standart Sapma (BSS) (Varyasyon Katsayısı, VK) (%)
1	1,01	$0,99 \pm 0,02$	$99,33 \pm 1,53$	1,54
	0,98			
	0,99			
2,5	2,47	$2,47 \pm 0,01$	$98,67 \pm 0,23$	0,23
	2,46			
	2,47			
5	5,03	$5,00 \pm 0,03$	$100,07 \pm 0,61$	0,61
	5,01			
	4,97			

Keskinlik (*Precision*)

Tekrar Edilebilirlik (*Repeatability*)

Nintedanib’in miktar tayini için dalga boyu seçimi amacıyla hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki Nintedanib standart çözeltilerinin absorbans değerlerini içeren UV spektrumu Şekil 4.12’de gösterilmiştir. 190 nm ile 800 nm arasındaki dalga boylarında absorbans değişimleri gösterilmekte olup, en yüksek absorbans tüm konsantrasyonlarda 393 nm’de gözlemlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda yapılan ölçümlerde, bu dalga boyunda en yüksek absorbansın görülmesi, Nintedanib’in tekrarlanabilir bir absorbans profiline sahip olduğunu doğrulamaktadır (279).



Şekil 4.12. Farklı konsantrasyondaki Nintedanib çözeltilerine ait UV spektrumu (Açık Mavi, Siyah, Kırmızı ve Yeşil Spektrumlar: Sadece Nintedanib içeren farklı konsantrasyondaki standart çözeltilerin spektrumlarını temsil eder. Koyu Mavi Spektrum: Nintedanib içeren lipozom formülasyonunun spektrumunu gösterir. Pembe Spektrum: Nintedanib içermeyen boş lipozomların spektrumunu gösterir.).

Nintedanib'in $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisinin 3 ayri kez ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve %VK değerleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.8'de sunulmuş ve %VK değeri %2'nin altında bulunarak yöntemin kesinliği (tekrar edilebilirliği) gösterilmiştir (281).

Tablo 4.8. Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait tekrar edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Varyasyon Katsayısı (VK) (%)
1	1,01 0,98 0,99	$0,99 \pm 0,02$	1,54

Tekrar Elde Edilebilirlik (*Reproducibility*)

Nintedanib'in $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisinin farklı bir analist tarafından 3 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen absorban değerlerinin kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve %VK değerleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.9'da sunulmuş ve %VK değeri %2'nin altında bulunarak yöntemin kesinliği (tekrar elde edilebilirliği) gösterilmiştir (281).

Tablo 4.9. Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait tekrar elde edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).

Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Varyasyon Katsayısı (VK) (%)
5	4,96 5,02 4,99	$4,99 \pm 0,03$	0,60

Günler Arası Tekrar Edilebilirlik

Nintedanib'in $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltisinin 3 farklı günde 3 ayrı kez ölçülmesi ile elde edilen absorban değerlerinin kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve %VK değerleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10'da sunulmuş ve %VK değeri %2'nin altında bulunarak yöntemin kesinliği (günler arası tekrar edilebilirliği) gösterilmiştir (281).

Tablo 4.10. Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).

Günler	Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Gün İçi Varyasyon Katsayısı (VK) (%)	Günler Arası Varyasyon Katsayısı (VK) (%)
1.Gün	5	5,03 5,01 4,97	5,00 ± 0,03	0,61	
2.Gün	5	4,96 5,02 4,99	4,99 ± 0,03	0,60	0,47
3.Gün	5	5,00 4,98 5,01	5,00 ± 0,02	0,31	

Gün İçi Tekrar Edilebilirlik

Nintedanib'in $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltilisinin aynı gün içinde 3 farklı zamanda (0., 4. ve 8. saat) ölçülmesi ile elde edilen absorbans değerlerinin kalibrasyon doğrusunda kullanılması ile hesaplanan konsantrasyonlar ve %VK değerleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.11'de sunulmuş ve %VK değeri %2'nin altında bulunarak yöntemin kesinliği gösterilmiştir (281).

Tablo 4.11. Nintedanib'in UV Spektrofotometre analitik yöntem validasyonuna ait gün içi tekrar edilebilirlik ve % bağıl standart sapma değerleri (n=3).

Günler	Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Pratik Ortalama Konsantrasyon ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Varyasyon Katsayısı (VK) (%)
0.saat	5	4,95		
4.saat	5	5,01	4,98 ± 0,03	0,60
8.saat	5	4,98		

Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de sunulan bulgulara göre varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur. Bu durum, Nintedanib çözeltilisinin gün içinde ve 3 gün boyunca bozunmadan stabil kaldığını göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda,

çalışmalarda taze hazırlanan LP-NIN formülasyonları kullanılmış ve miktar tayini / enkapsülasyon etkinliği analizleri 3 gün içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Duyarlılık

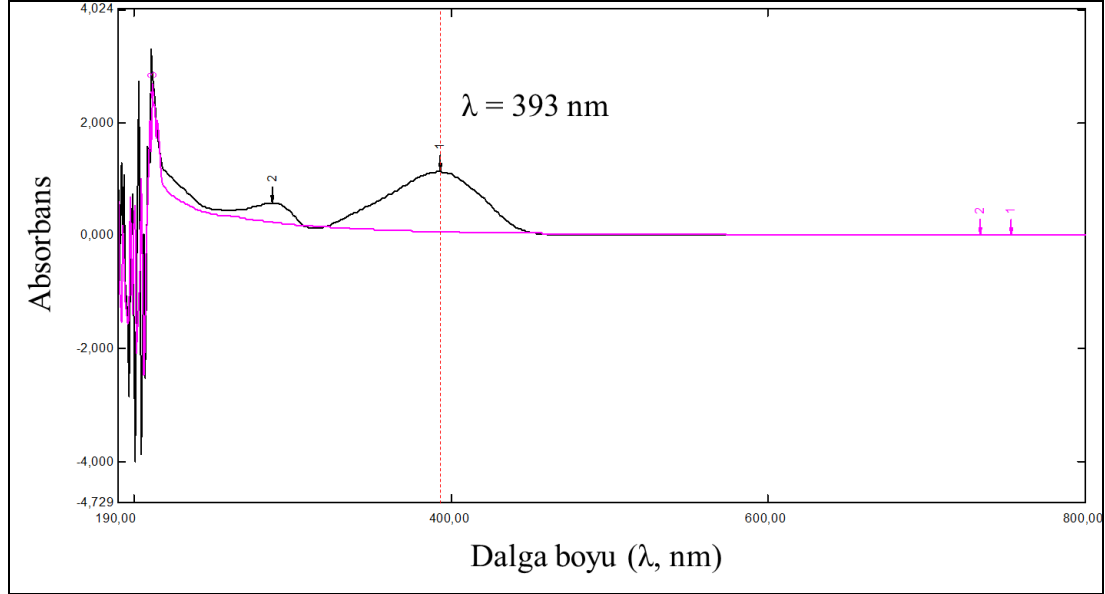
Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesi için saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) değerleri saptanmıştır. LOD, analitin tespit edilebileceği en düşük konsantrasyonu temsil eder. Bu durumda, sinyalin gürültüye oranı en az 3 olmalıdır, yani sinyal, arka plan gürültüsünden üç kat daha büyük olmalıdır. LOQ, analitin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak ölçülebileceği en düşük konsantrasyonu temsil eder. Bu durumda, sinyalin gürültüye oranı en az 10 olmalıdır, yani sinyal, arka plan gürültüsünden on kat daha büyük olmalıdır.

Bu alışmada, UV spektrofotometrik analiz yöntemi için LOD ve LOQ değerleri, kalibrasyon eğrisinden elde edilen verilere dayanarak hesaplanmıştır. Yöntemin duyarlılığı için LOD $0,422 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve LOQ $1,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. LOD ve LOQ değerleri, kalibrasyon eğrisinde yer alan en düşük konsantrasyon değerinden ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) daha düşük olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, seçilen analitik yöntemin çalışmanın amacına uygun bir duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Özgüllük (Seçicilik) (*Specifity*)

Nintedanib UV spektrumunda Nintedanib piki 393 nm dalga boyunda gözlemlenmektedir (şekil 4.13). Bu, Nintedanib'in 393 nm'de belirgin bir pik gösterdiğini ve diğer formülasyon bileşenleri olan DOTAP, DOPE, CHOL ve DSPE-mPEG 2000'in bu dalga boyunda herhangi bir girişim yapmadığını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, 393 nm dalga boyu Nintedanib'in analizi için spesifik bir dalga boyu olarak kullanılabilir. Nintedanib içeren formülasyon (koyu mavi spektrum), boş lipozomlardan (pembe spektrum) farklı olarak 393 nm'de belirgin bir pik göstermektedir, ve Nintedanib'in varlığını doğrulamaktadır. Bu bulgular, Nintedanib'in UV spektrofotometrik analizlerinde güvenilir bir şekilde tespit

edilebileceğini ve formülasyondaki diğer bileşenlerin analiz sonuçlarını etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.13. LP-NIN-miR (Nintedanib içeren) ve LP-miR (Nintedanib içermeyen) formülasyonlarına ait Nintedanib UV spektrumu (Siyah spektrum: Nintedanib içeren formülasyon, Pembe spektrum: Nintedanib içermeyen formülasyon).

4.3.4. Nintedanib Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Nintedanib'in enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla ultrasantrifüj yöntemi Bölüm 3.6.4'te belirtildiği şekilde uygulanmıştır. Bulgular Tablo 4.12'de sunulmuştur.

Tablo 4.12. LP-NIN ve LP-NIN-miR formülasyonlarına ait Nintedanib %EE değerleri (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Formülasyon	Teorik Nintedanib Konsantrasyonu (μM)	Nintedanib % EE
LP-NIN #1	0,1	%99,8 \pm %0,03
LP-NIN #2	0,2	%99,9 \pm %0,1
LP-NIN #3	0,3	%83,5 \pm %1,2
LP-NIN-miR	0,2	%99,8 \pm %0,08

LP-NIN #1 ve LP-NIN #2 formülasyonları, sırasıyla 0,1 μM ve 0,2 μM teorik Nintedanib konsantrasyonlarında hazırlanmış olup, her iki formülasyonda da %EE neredeyse %100 olarak bulunmuştur (sırasıyla $99,8 \pm 0,03$ ve $99,9 \pm 0,1$). Bu durum, Nintedanib'in bu konsantrasyonlarda lipozomlara yüksek oranda enkapsüle edilebildiğini göstermektedir. LP-NIN #3 formülasyonu ise 0,3 μM teorik Nintedanib konsantrasyonuna sahiptir ve $83,5 \pm 1,2$ enkapsülasyon etkinliği göstermektedir. Bu değer, Nintedanib konsantrasyonunun artmasıyla birlikte lipozomların Nintedanib'i kapsülleme kapasitesinin azaldığını ve daha yüksek konsantrasyonlarda bir doygunluğa ulaşıldığını göstermektedir.

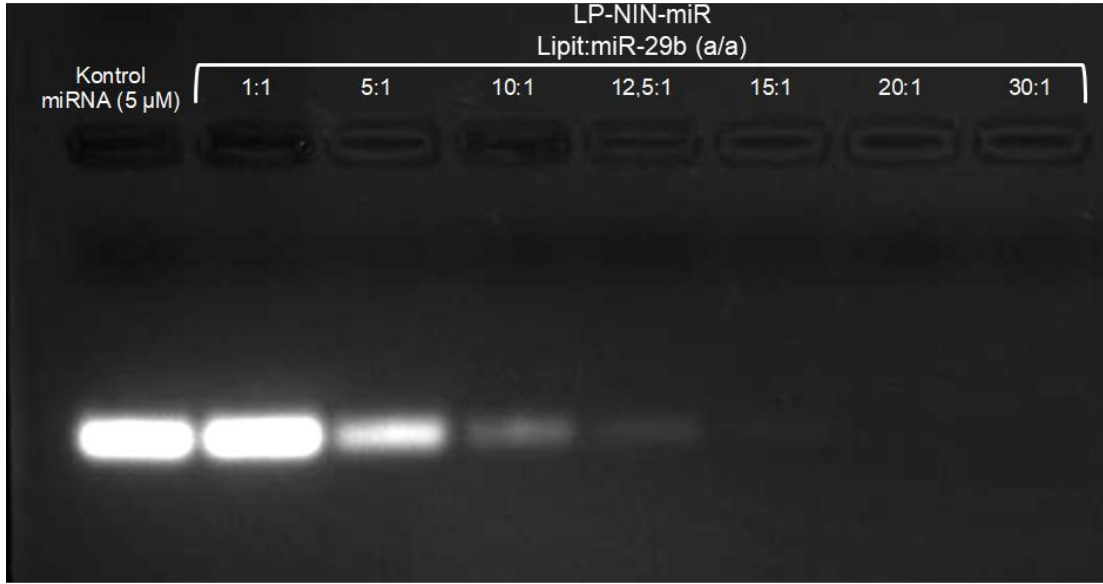
LP-NIN #2 formülasyonu, sonraki çalışmalar için optimum Nintedanib konsantrasyonu (0,2 μM) olarak seçilmiştir çünkü bu formülasyon, Nintedanib'in lipozomlara enkapsülasyonunda $99,9 \pm 0,1$ gibi oldukça yüksek bir %EE sağlamaktadır. LP-NIN #1 ve LP-NIN #2 formülasyonları, partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri açısından belirlenen limitler dahilinde uygun sonuçlar vermiştir. Ancak, LP-NIN #2 formülasyonu, Nintedanib'in daha yüksek bir miktarını enkapsüle edebilen lipozom formülasyonu olması nedeniyle tercih edilmiştir. Bu nedenle, LP-NIN-miR formülasyonu 0,2 μM Nintedanib konsantrasyonu kullanılarak hazırlanmıştır.

Nintedanib ve miR-29b içeren nihai LP-NIN-miR formülasyonu, 0,2 μM teorik Nintedanib konsantrasyonunda $99,8 \pm 0,08$ enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. Bu sonuç, Nintedanib'in miR-29b ile birlikte lipozomlara yüksek verimle enkapsüle edilebildiğini ve miR-29b'nin enkapsülasyon etkinliğini olumsuz etkilemediğini ortaya koymaktadır.

4.3.5. miR-29b Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Optimize edilmiş LP'ler ve LP-NIN'ler mikroakışkanlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. 1xsiRNA tamponunda (pH=7.4) bulunan miR-29b, katyonik lipozomlar ile negatif yüklü miR-29b arasında elektrostatik etkileşim yoluyla LP-miR veya LP-NIN-miR hazırlamak için farklı lipit:miR-29b a/a oranlarında (1:1, 5:1,

10:1, 12.5:1, 15:1, 20:1 ve 30:1) LP veya LP-NIN ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. miRNA %EE agaroz jel elektroforezi ve florometre yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Agaroz jel elektroforezi çalışmasının sonuçlarına göre (Şekil 4.14), lipit:miR-29b oranı 20:1 (a/a) ve daha yüksek olduğunda %100 miRNA yüklemesi elde edilmiştir.



Şekil 4.14. Farklı lipit:miR-29b molar oranlarında hazırlanan LP-NIN-miR formülasyonlarında miR-29b'nin enkapsülasyon etkinliğini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.

1:1 (a/a) oranında belirgin bir bant gözlemlenmekte olup, miRNA'nın büyük bir kısmının serbest olduğunu ve enkapsüle edilmediğini gösterir. 5:1 (a/a) oranında bant yoğunluğu azalmakta ve miRNA'nın bir kısmının enkapsüle edildiği anlaşılmaktadır. 10:1 (a/a) ve 12.5:1 (a/a) oranlarında bantlar zayıflayarak, miRNA'nın çoğunun enkapsüle edildiğini göstermektedir. 15:1 (a/a), 20:1 (a/a) ve 30:1 (a/a) oranlarında ise bantlar tamamen kaybolmuş olup, miRNA'nın tamamının enkapsüle edildiğini (%EE: %100) göstermektedir.

Kalitatif olarak elde edilen sonuçlar florometre yöntemi ile kantitatif olarak da analiz edilmiş (Tablo 4.13) ve sonuçlar agaroz jel elektroforezi sonuçlarını doğrulamıştır.

Tablo 4.13. Farklı lipit:miR-29b molar oranlarında hazırlanan LP-NIN-miR formülasyonlarına ait miRNA enkapsülasyon etkinliği tablosu.

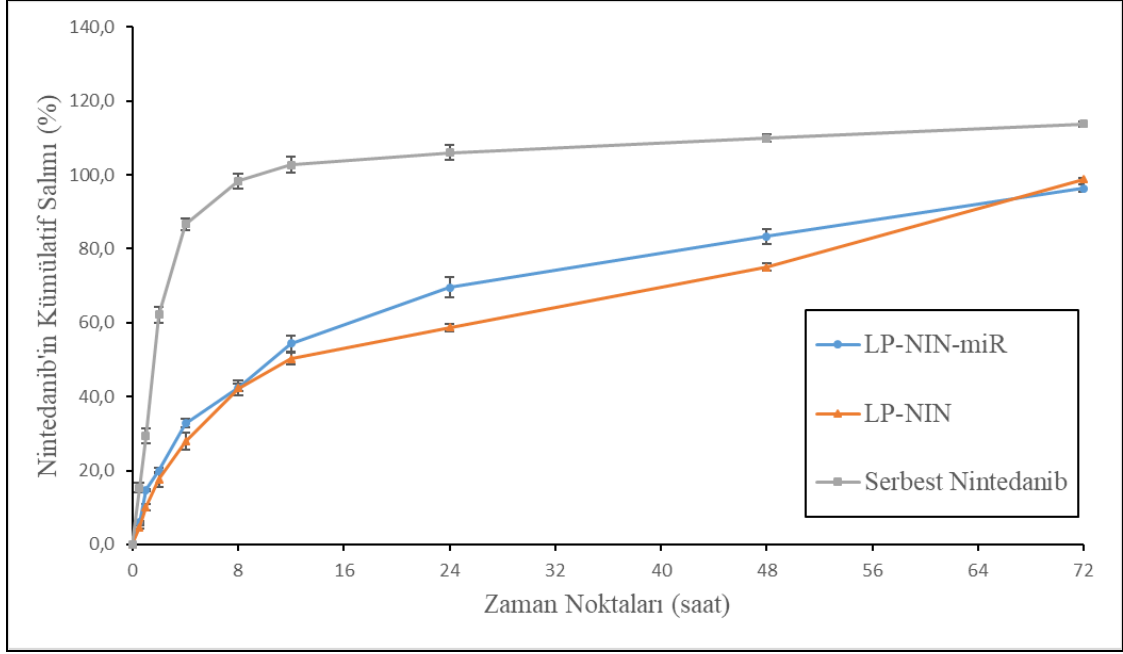
Formülasyon	DOTAP (μ M)	DOPE (μ M)	CHOL (μ M)	DSPE- mPEG2000 (μ M)	Nintedanib (μ M)	Lipit:miR- 29b (a/a)	miR-29b %EE
LP-NIN-miR	10	1	10	1	0,2	12,5:1	% 96,3 \pm %2,1
						15:1	% 98,3 \pm %0,7
						20:1	% 99,6 \pm %1,4
						30:1	% 99,7 \pm %1,2

(n=6, $\bar{x} \pm SS$)

Lipit:miR-29b ağırlık oranı 12,5:1'den 30:1'e (a/a) arttıkça %EE sırasıyla %96,3, %98,3, %99,6 ve %99,7 olarak artmıştır. Çalışmalar sonucunda, nihai LP-NIN-miR formülasyonunu elde etmek amacıyla en yüksek %EE (%100) sağlayan 30:1 (a/a) lipit:miR-29b ağırlık oranı seçilmiştir. Nihai LP-NIN-miR formülasyonunda miR-29b'nin %EE florometre yöntemi ile %99,7 \pm %1,2 olarak belirlenmiştir.

4.3.6. Lipoplekslerden *in vitro* Nintedanib ve miR-29b Salım Çalışmaları

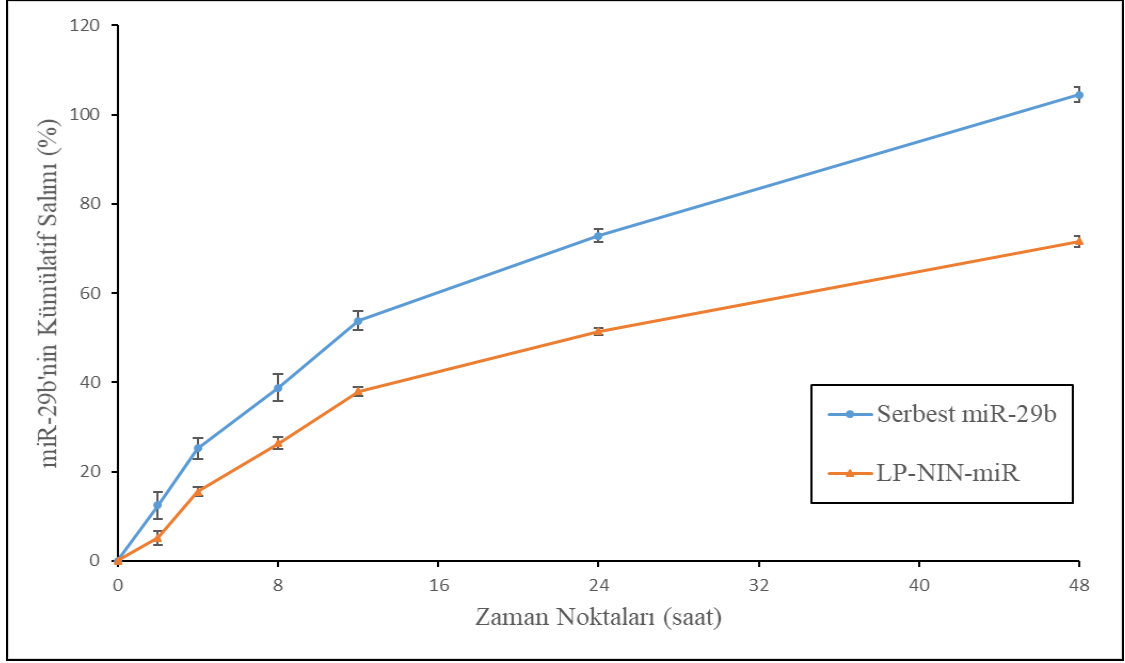
LP-NIN, LP-miR ve LP-NIN-miR formülasyonları ile diyaliz membran yöntemi kullanılarak *in vitro* salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da sunulan grafikler, Nintedanib ve miR-29b'nin serbest ve lipozomal formülasyonlardan kümülatif salım profillerini göstermektedir. İlk grafik (Şekil 4.12), serbest Nintedanib, LP-NIN ve LP-NIN-miR formülasyonlarından salınan Nintedanib'in zaman içindeki kümülatif salım profillerini karşılaştırmaktadır.



Şekil 4.15. Nintedanib'in kümülatif salım grafiği (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Serbest Nintedanib (gri çizgi), ilk 8 saat içinde hızlı bir şekilde salınarak, maksimum seviyeye (%98,3 ± %1,9) ulaşmaktadır. LP-NIN (turuncu çizgi) ve LP-NIN-miR (mavi çizgi) formülasyonlarından Nintedanib'in salımı ise daha yavaş ve kontrollü bir şekilde gerçekleşmektedir. LP-NIN-miR, LP-NIN'e göre biraz daha hızlı bir salım profili sergilemiştir. Her iki formülasyondan Nintedanib salımı 72 saat sonunda %90'ın üzerine çıkmaktadır (LP-NIN-miR için %96,4 ± %1,1; LP-NIN için %98,7 ± %0,4). Bu sonuçlar, lipozomal formülasyonların ani salım etkisi (*burst effect*) olmadan Nintedanib'in kontrollü ve uzatılmış salımını sağladığını göstermektedir.

İkinci grafik (Şekil 4.16), serbest miR-29b ve LP-NIN-miR formülasyonlarından salınan miR-29b'nin zaman içindeki kümülatif salım profillerini göstermektedir.



Şekil 4.16. miR-29b'nin salım grafiği (n=3, $\bar{x} \pm SS$).

Serbest miR-29b (mavi çizgi) hızlı bir şekilde salınırken (48 saat sonunda %104,4 \pm %1,7), LP-NIN-miR (turuncu çizgi) formülasyonundan miR-29b'nin salımı daha yavaş ve kontrollüdür (48 saat sonunda %71,6 \pm %1,2). Serbest miR-29b'nin ilk 8 saat içinde hızlı bir şekilde salındığı (%38,8 \pm %3,0), LP-NIN-miR'nin ise daha uzatılmış bir salım profili sergilediği (%26,4 \pm %1,3) görülmektedir. LP-NIN-miR formülasyonu, ani salım etkisi (*burst effect*) olmadan miR-29b'nin kontrollü ve uzatılmış salımını sağlamaktadır.

4.4. Stabilite Çalışmaları

Lipozom formülasyonlarının stabilitesini değerlendirmek amacıyla, etken madde içermeyen ön formülasyon denemeleri $5 \pm 3^\circ\text{C}$ buzdolabı saklama koşulunda ve 25°C oda koşulunda 24 ay boyunca bekletilmiştir. Partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyeli açısından stabilitesi değerlendirilmiş ve Tablo 4.14'de sunulmuştur.

Tablo 4.14. Ön Formülasyon denemelerine ait stabilite sonuçları.

Formülasyon	Saklama		Stabilite Sonuçları		
	Koşulu (°C)	Süre (Ay)	Partikül boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyeli (mV)
LP #1	5±3°C	Başlangıç	137,5 ± 1,1	0,181 ± 0,005	37 ± 4
		6. Ay	127,5 ± 1,0	0,205 ± 0,006	40 ± 1
		9. Ay	131,6 ± 1,2	0,294 ± 0,004	45 ± 2
		12. Ay	134,1 ± 1,8	0,225 ± 0,015	35 ± 2
		24. Ay	115,2 ± 1,7	0,243 ± 0,011	40 ± 5
	15-25°C	Başlangıç	137,5 ± 1,1	0,181 ± 0,005	37 ± 4
		6. Ay	95,9 ± 4,2	0,270 ± 0,025	34 ± 5
		9. Ay	105,3 ± 1,5	0,286 ± 0,013	36 ± 4
		12. Ay	94,3 ± 3,2	0,305 ± 0,022	39 ± 5
		24. Ay	82,2 ± 4,6	0,247 ± 0,027	41 ± 4
LP #2	5±3°C	Başlangıç	160,8 ± 1,9	0,170 ± 0,010	41 ± 3
		6. Ay	149,1 ± 2,2	0,188 ± 0,009	33 ± 2
		9. Ay	163,3 ± 1,7	0,243 ± 0,012	35 ± 1
		12. Ay	168,4 ± 1,9	0,238 ± 0,009	36 ± 2
		24. Ay	150,0 ± 2,3	0,196 ± 0,013	38 ± 3
	15-25°C	Başlangıç	160,8 ± 1,9	0,170 ± 0,010	41 ± 3
		6. Ay	114,9 ± 2,7	0,203 ± 0,014	33 ± 1
		9. Ay	116,1 ± 2,9	0,223 ± 0,021	40 ± 2
		12. Ay	122,6 ± 3,3	0,281 ± 0,016	33 ± 4
		24. Ay	99,1 ± 3,7	0,218 ± 0,023	35 ± 6
LP #3	5±3°C	Başlangıç	189,0 ± 0,4	0,178 ± 0,028	44 ± 1
		6. Ay	179,1 ± 0,8	0,207 ± 0,009	37 ± 1
		9. Ay	204,0 ± 1,8	0,301 ± 0,010	42 ± 1
		12. Ay	189,2 ± 1,2	0,287 ± 0,008	41 ± 2
		24. Ay	178,4 ± 1,5	0,189 ± 0,014	43 ± 2
	15-25°C	Başlangıç	189,0 ± 0,4	0,178 ± 0,028	44 ± 1
		6. Ay	158,3 ± 2,8	0,374 ± 0,017	44 ± 4
		9. Ay	156,0 ± 2,2	0,333 ± 0,015	49 ± 2
		12. Ay	141,8 ± 1,3	0,370 ± 0,023	45 ± 4
		24. Ay	113,8 ± 2,8	0,359 ± 0,018	43 ± 5

(n=3, $\bar{x} \pm SS$)

LP ve LP-NIN formülasyonlarının uzun dönem stabilitesi değerlendirilmiştir. Tablo 4.15'te ve Şekil 4.17'de sunulan stabilite sonuçları, üç farklı lipozom

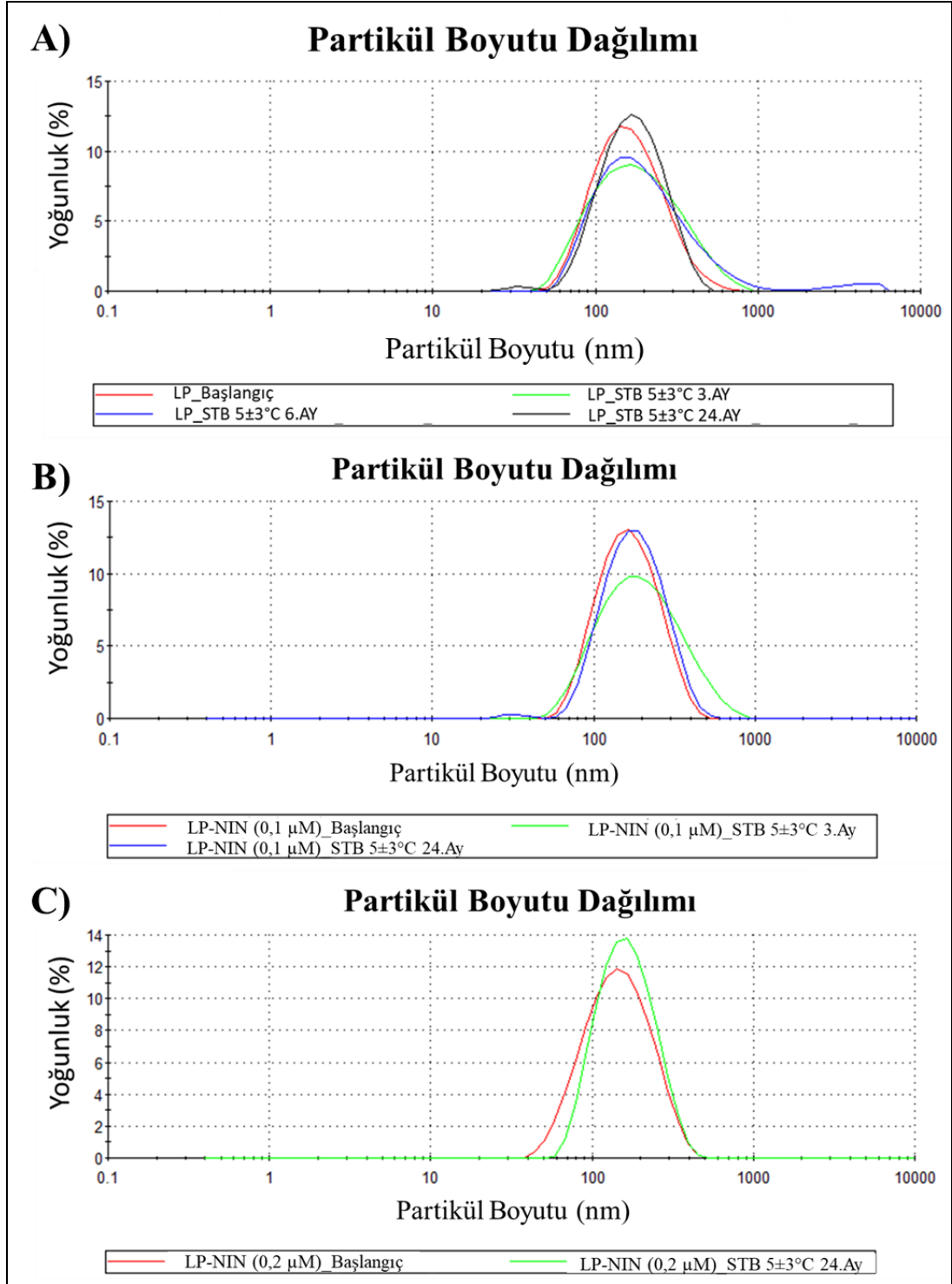
formülasyonunun (LP, LP-NIN (0,1 μ M Nintedanib) ve LP-NIN (0,2 μ M Nintedanib)) $5\pm 3^\circ\text{C}$ 'de 24 ay boyunca partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli açısından değerlendirilmesini içermektedir. Partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli başlangıç değerleri referans olarak alınmıştır. Sonuçlar, LP ve LP-NIN formülasyonlarının $5\pm 3^\circ\text{C}$ 'de 24 ay boyunca stabil kaldığını ve partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli açısından istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler göstermediğini ($p > 0,05$) ortaya koymaktadır. Bu durum, bu formülasyonların uzun süreli saklama koşullarında fizikokimyasal stabilitelelerini koruduklarını ve etken maddenin korunmasında başarılı olduklarını göstermektedir. Tüm formülasyonlarda stabilitenin korunması, lipozomların $5\pm 3^\circ\text{C}$ saklama koşulunda etkin bir şekilde saklanabileceğini ve formülasyonların terapötik etkinliklerini koruyabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.15. LP ve LP-NIN formülasyon denemelerine ait stabilite sonuçları.

Formülasyon	Saklama Koşulu ($^\circ\text{C}$)	Süre (Ay)	Stabilite Sonuçları		
			Partikül boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
LP	$5\pm 3^\circ\text{C}$	Başlangıç	$143,9 \pm 5,4$	$0,182 \pm 0,024$	32 ± 1
		3. Ay	$151,6 \pm 1,9$	$0,238 \pm 0,025$	30 ± 2
		6. Ay	$163,8 \pm 1,1$	$0,272 \pm 0,011$	30 ± 1
		24. Ay	$149,4 \pm 0,6$	$0,183 \pm 0,014$	32 ± 1
LP-NIN #1 (0,1 μ M Nintedanib)	$5\pm 3^\circ\text{C}$	Başlangıç	$144,5 \pm 2,8$	$0,178 \pm 0,011$	30 ± 2
		3. Ay	$166,0 \pm 1,5$	$0,228 \pm 0,009$	26 ± 2
		6. Ay	-(*)	-(*)	-(*)
		24. Ay	$155,2 \pm 0,7$	$0,185 \pm 0,021$	30 ± 0
LP-NIN #2 (0,2 μ M Nintedanib)	$5\pm 3^\circ\text{C}$	Başlangıç	$126,0 \pm 0,4$	$0,189 \pm 0,008$	49 ± 2
		3. Ay	-(*)	-(*)	-(*)
		6. Ay	-(*)	-(*)	-(*)
		24. Ay	$142,1 \pm 0,8$	$0,185 \pm 0,005$	40 ± 1

(n=3, $\bar{x} \pm \text{SS}$)

(*)Belirtilen zaman noktalarında stabilite numunelerinin analizleri yapılmamıştır.



Şekil 4.17. A) LP, B) LP-NIN (0,1 µM Nintedanib), C) LP-NIN (0,2 µM Nintedanib) formülasyonlarına ait partikül boyutu dağılımı stabilite sonuçları grafikleri.

Nintedanib ve miR-29b (lipit:miRNA molar oranı 30:1) içeren lipopleks formülasyonunun (LP-NIN-miR) stabilitesi, miR-29b içeriğini ve stabilitesini

koruyarak $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ saklama koşulunda bir aya kadar test edilmiştir ve sonuçlar Tablo 4.16'da sunulmuştur.

LP-NIN formülasyonu $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ay saklanmış ve Nintedanib sızma stabilitesi açısından değerlendirilmiştir. UV spektrofotometre ile Nintedanib miktar tayini analiz edilmiştir. $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 24 ay sonra, LP-NIN'den Nintedanib sızıntısı %10'dan az olmuş ve $8,7 \pm 0,01$ olarak belirlenmiştir, bu durum uzun dönem stabilite için anlamlı bir bozulma veya terapötik etkinin kaybı olmadan güçlü bir stabilite olduğunu göstermektedir ($p > 0,05$).

LP-NIN-miR formülasyonu $15-25^{\circ}\text{C}$, $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ve $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de 1 ay saklanmış ve miRNA sızma stabilitesi açısından agaroz jel elektroforez ve florometre yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.10 ve Şekil 4.18'de sunulmuştur.

Tablo 4.17'de sunulan veriler, LP-NIN-miR formülasyonunun miR-29b sızma stabilitesini 25°C , $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve -20°C saklama koşullarında 1 ay boyunca koruduğunu (miR-29b miktar tayini limit aralığı: %95-105) göstermektedir. Tüm saklama koşullarında enkapsülasyon etkinliğinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p > 0,05$), bu durum formülasyonun miR-29b'yi etkin bir şekilde enkapsüle ettiğini ve saklama süresi boyunca sızma göstermediğini ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, LP-NIN-miR formülasyonunun farklı saklama koşullarında miR-29b'yi etkin bir şekilde koruduğunu ve stabil kaldığını göstermektedir.

Liyofilize edilip RNaz içermeyen su ile disperse edilen LP-NIN-miR formülasyonunun başlangıçta partikül boyutu $84,8 \pm 0,9$ nm, PDI değeri $0,229 \pm 0,018$ ve zeta potansiyeli 47 ± 0 mV olarak ölçülmüştür. 14 gün $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklandıktan sonra, partikül boyutu $87,2 \pm 0,3$ nm, PDI değeri $0,200 \pm 0,011$ ve zeta potansiyeli 48 ± 3 mV olarak belirlenmiştir. Bu veriler, formülasyonun 14 gün boyunca partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli açısından stabil kaldığını göstermektedir ($p > 0,05$).

Tablo 4.16. LP-NIN-miR (lipit:miRNA molar oranı 30:1) formülasyon denemesine ait stabilite sonuçları.

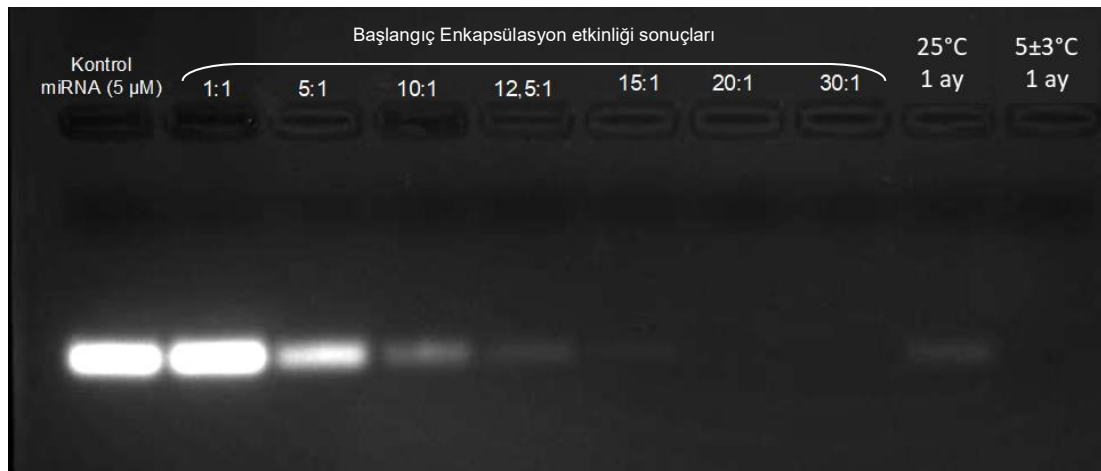
Formülasyon	Saklama Koşulu (°C)	Süre (Gün)	Stabilite Sonuçları		
			Partikül boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
LP -NIN-miR	5±3°C	Başlangıç	87,3 ± 0,8	0,184 ± 0,006	24 ± 2
		1. Gün	86,1 ± 0,7	0,192 ± 0,009	24 ± 0
		4. Gün	81,4 ± 0,3	0,212 ± 0,002	24 ± 1
		7. Gün	76,0 ± 0,3	0,260 ± 0,005	24 ± 3
		30. Gün	79,7 ± 0,5	0,260 ± 0,005	26 ± 2

(n=3, $\bar{x} \pm SS$)

Tablo 4.17. LP-NIN-miR formülasyonuna ait miR-29b sızma stabilitesi sonuçları.

Formülasyon	Saklama Koşulu (°C)	Süre (Ay)	Enkapsüle edilmiş miR-29b Miktar Tayini (%)
LP -NIN-miR	- 20°C ± 5°C	Başlangıç	% 99,7 ± 1,2
		1.ay	% 96,7 ± 7,5
	5±3°C	Başlangıç	% 99,7 ± 1,2
		1.ay	% 100,0 ± 3,1
	15-25°C	Başlangıç	% 99,7 ± 1,2
		1.ay	% 97,3 ± 5,1

(n=3, $\bar{x} \pm SS$)

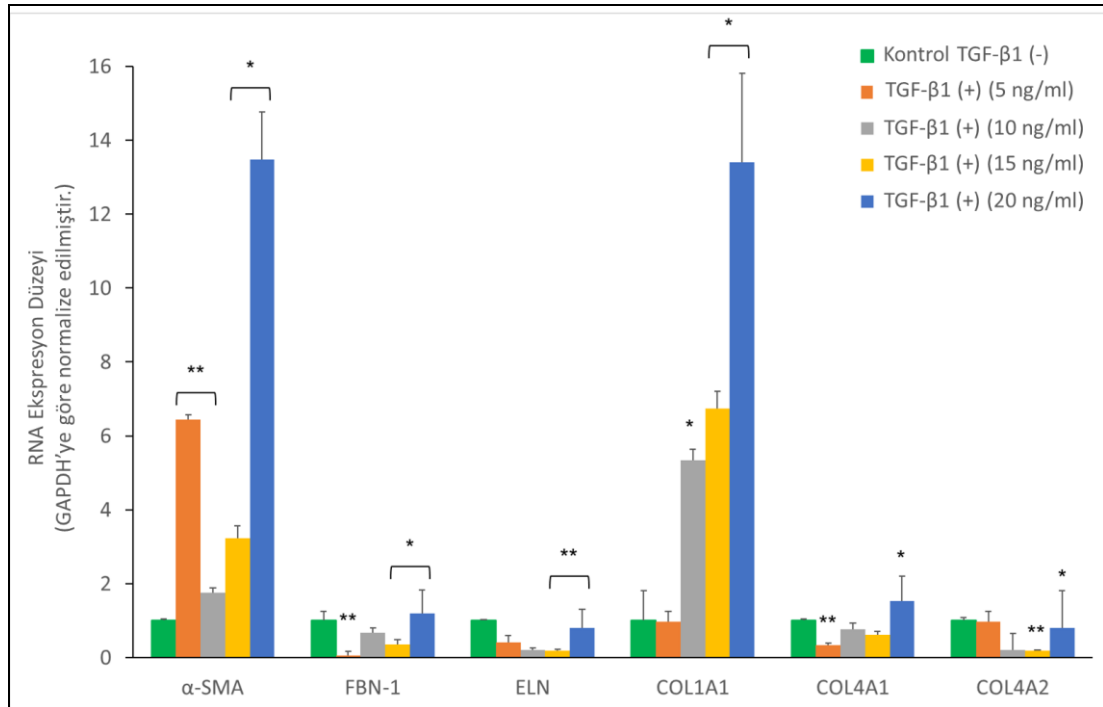


Şekil 4.18. LP-NIN-miR formülasyonuna ait miR-29b miktar tayini stabilite sonuçları.

4.5. Hücre Kültürü ve *In Vitro* İPF Modeli Oluşturulması

Hücre kültürü ve *in vitro* İPF modeli oluşturma çalışmasında, NIH/3T3 hücrelerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda TGF-β1 (5, 10, 15, ve 20

ng.mL⁻¹) uygulanarak fibrozis indüklenmiştir. Bu işlem sonrasında, α -SMA, FBN-1, ELN, COL1A1, COL4A1 ve COL4A2 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, GAPDH gen ekspresyonu kullanılarak normalize edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.19'da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. *In vitro* idiyopatik pulmoner fibrozis modelinin RT-PCR ile karakterizasyonu (Kontrol TGF- β 1 (-) elde edilen GAPDH sonuçları, normalizasyon faktörleri olarak kullanılmıştır (n=3, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, iki yönlü Student t testi).

RT-PCR sonuçlarına göre, α -SMA ve COL1A1 genlerinde TGF- β 1 konsantrasyonu arttıkça anlamlı bir şekilde gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle 20 ng.mL⁻¹ TGF- β 1 konsantrasyonunda α -SMA ve COL1A1 ekspresyonları en yüksek seviyede tespit edilmiştir ($p < 0,05$). ELN gen ekspresyonunda da benzer bir artış gözlenmiş olup, en yüksek konsantrasyonda anlamlı bir yukarı regülasyon olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). FBN-1 ve COL4A2 gen ekspresyonlarında da TGF- β 1 uygulamasıyla birlikte artış görülmüş olup, bu genlerdeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). COL4A1 geninde ise TGF- β 1 uygulaması ile belirgin bir artış gözlenmemiştir.

Bu sonuçlar, TGF- β 1'in NIH/3T3 hücrelerinde fibrotik belirteç genlerin ekspresyonunu artırdığını ve böylece İPF'yi *in vitro* olarak başarılı bir şekilde simüle ettiğini göstermektedir. α -SMA, COL1A1 ve ELN gibi fibrotik belirteçlerdeki bu artışlar, *in vitro* İPF modelinin etkinliğini doğrulamakta ve LP-NIN-miR'in İPF'ye karşı etkinliğini test etmek için sağlam bir temel oluşturmaktadır.

4.6. *In Vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

Şekil 4.20'de çoğaltılan NIH-3T3 fare pulmoner fibroblast hücreleri görülmektedir. Mikroskop altında çekilen bu görüntüde, hücrelerin morfolojik özellikleri ve kültür ortamındaki dağılımları net bir şekilde gözlemlenmiştir.



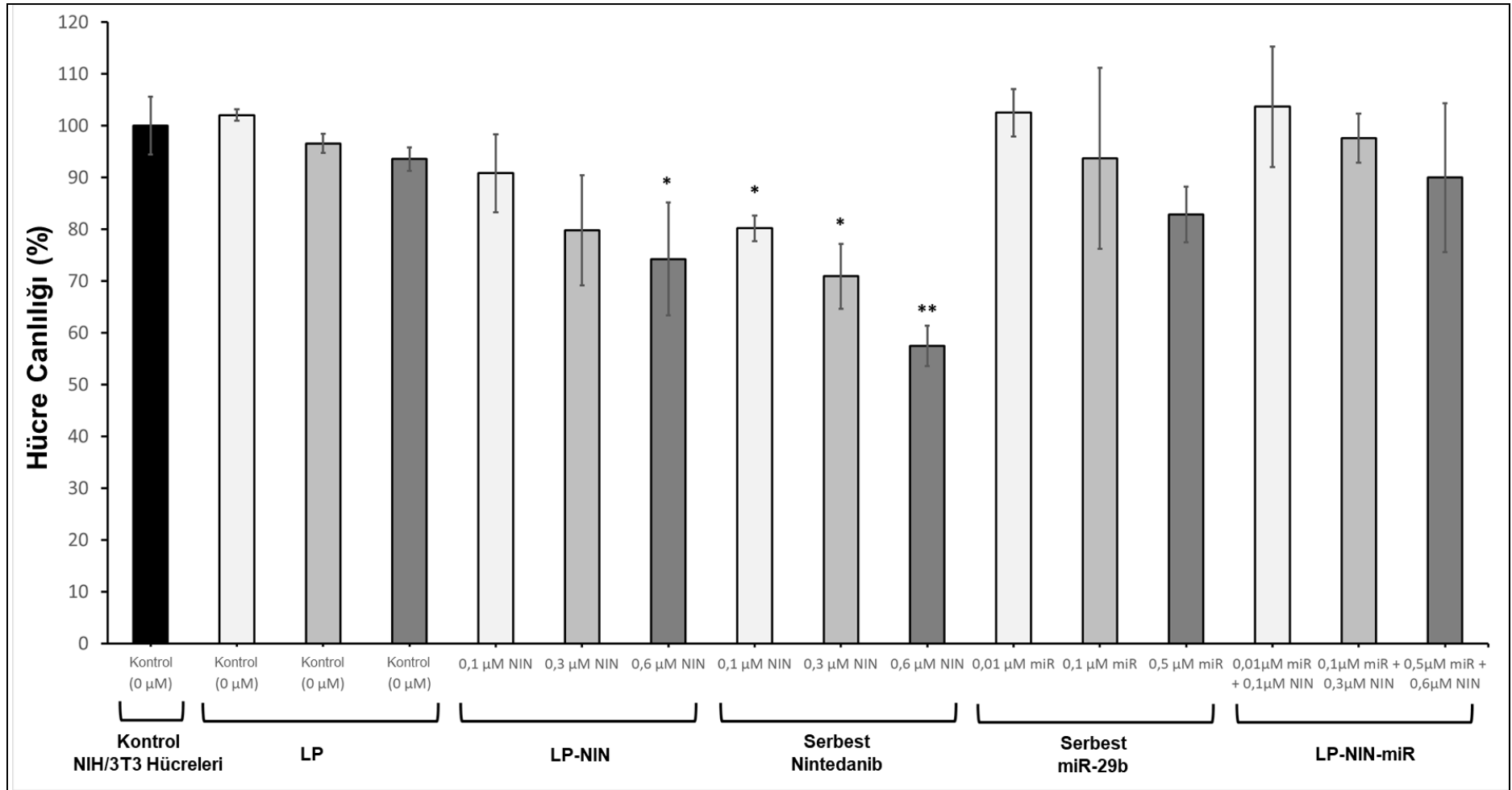
Şekil 4.20. NIH-3T3 fare pulmoner fibroblast hücrelerine ait mikroskop görüntüsü.

NIH-3T3 hücreleri, fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip olup, tipik olarak uzun ve ince uzantılarla karakterizedir. Görüntüde, hücrelerin birbirleriyle temas halinde olduğu ve ağ benzeri bir yapı oluşturduğu fark edilmektedir. Bu tür hücresel düzenlemeler, fibroblastların bağ dokusu oluşturma ve onarma işlevleriyle

uyumludur. Hücrelerin sağlıklı ve aktif proliferasyon gösterdiği, hücre kültürünün başarılı bir şekilde sürdürüldüğünü ve deneyler için uygun bir hücre hattı elde edildiğini göstermektedir (282).

Lipozom/lipopleks formülasyonlarının toksisitesi, NIH/3T3 hücreleri üzerinde LP, LP-NIN, Serbest Nintedanib, Serbest miR-29b ve LP-NIN-miR'in miR-29b (0 - 0,5 μ M) ve Nintedanib (0 - 0,6 μ M) konsantrasyonları kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı 24 saat sonra XTT yöntemi ile ölçülmüştür. Şekil 4.21, NIH/3T3 hücrelerinin farklı formülasyonlara ve konsantrasyonlara maruz kaldıktan sonraki canlılık yüzdelere göstermektedir. Kontrol grubuna kıyasla, LP, Serbest miR-29b ve LP-NIN-miR gruplarında hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($n=3$, $p > 0,05$). Bu durum, bu formülasyonların hücreler üzerinde toksik bir etki oluşturmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, Nintedanib içeren gruplarda belirgin bir hücre canlılığı azalması gözlenmiştir. LP-NIN formülasyonunda, Nintedanib konsantrasyonu 0,6 μ M olduğunda hücre canlılığı önemli ölçüde azalmıştır ($n=3$, $p < 0,05$). Serbest Nintedanib grubunda ise, Nintedanib konsantrasyonları 0,01 μ M ($n=3$, $p < 0,05$), 0,3 μ M ($n=3$, $p < 0,05$) ve 0,6 μ M ($n=3$, $p < 0,01$) olduğunda hücre canlılığı anlamlı derecede azalmıştır. Bu sonuçlar, serbest Nintedanib'in hücreler üzerinde daha belirgin bir toksik etki yarattığını, lipozomal formülasyonun ise toksik etkisini azalttığını göstermektedir.

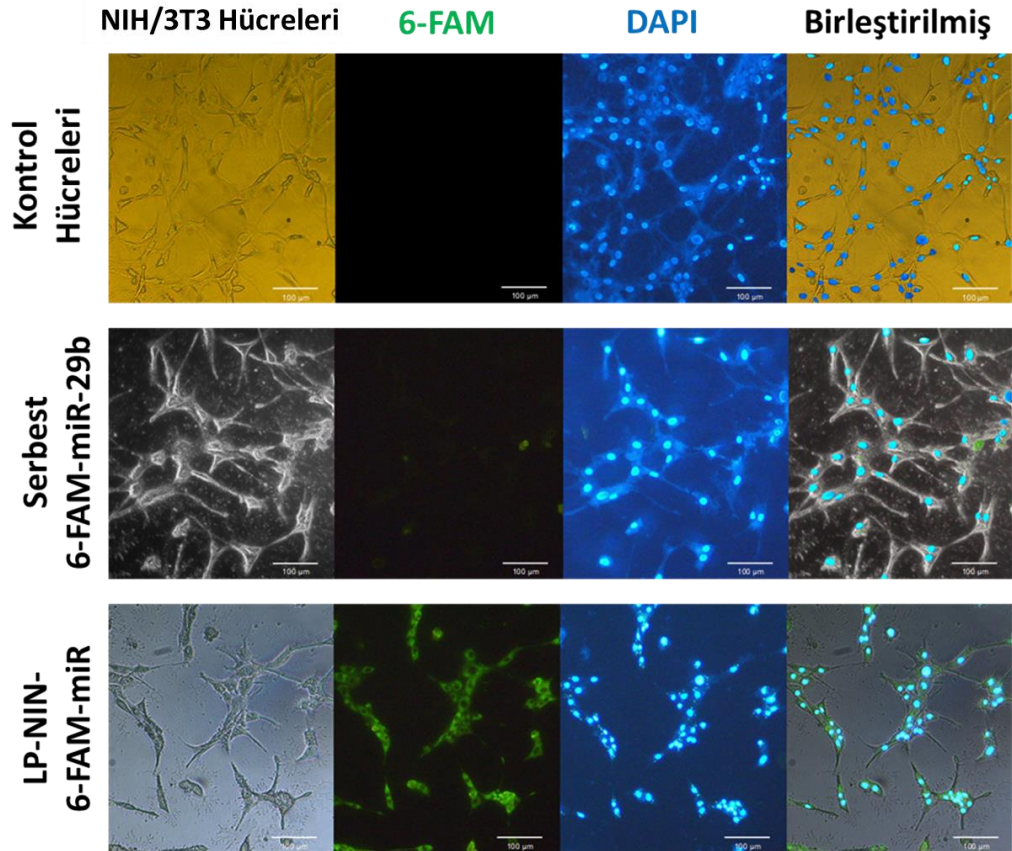
Serbest miR-29b uygulanan hücrelerde, miR-29b'nin konsantrasyonu 0,5 μ M'ye kadar çıkarıldığında hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($n=3$, $p > 0,05$). Bu sonuç, serbest miR-29b'nin hücreler üzerinde toksik bir etkisi olmadığını göstermektedir. LP-NIN-miR formülasyonuna maruz kalan hücrelerde de benzer bir durum gözlenmiştir. miR-29b'nin LP-NIN içindeki konsantrasyonu 0,5 μ M'ye kadar çıkarıldığında hücre canlılığında anlamlı bir azalma olmamıştır ($n=3$, $p > 0,05$). Bu durum, LP-NIN-miR formülasyonunun da hücreler üzerinde toksik bir etkisi olmadığını ve güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. *In vitro* terapötik etkinlik çalışmaları için, miR-29b'nin 0,2 μ M ve Nintedanib'in 0,6 μ M konsantrasyonları seçilmiştir. Bu konsantrasyonlar, hücre canlılığını fazla etkilemeden yeterli terapötik etkiyi sağlamak amacıyla belirlenmiştir.



Şekil 4.21. NIH/3T3 hücrelerinin canlılığı grafiği (n=3, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, iki yönlü Student t testi).

4.7. Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları

Hücresel alımı değerlendirmek için 6-FAM ile işaretlenmiş serbest miR-29b ve LP-NIN-miR formülasyonları NIH/3T3 hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 4.22, NIH/3T3 hücrelerine miR-29b'nin LP-NIN-miR aracılığıyla hücre içine alımının floresans mikroskopi yöntemiyle değerlendirilmesini göstermektedir. Kontrol hücrelerinde herhangi bir floresan sinyali gözlenmezken, serbest 6-FAM-miR-29b ile işlenen hücrelerde zayıf veya hiç floresan sinyali görülmemiştir. Buna karşılık, LP-NIN-6-FAM-miR ile işlenen hücrelerde belirgin bir 6-FAM floresan sinyali gözlenmiştir, bu da LP-NIN'nin miR-29b'yi etkin bir şekilde hücre içine transfekte ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, LP-NIN taşıyıcı sistemlerinin, miR-29b gibi genetik materyallerin hücre içine iletilmesinde potansiyel olarak daha etkili olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.22. *In vitro* NIH/3T3 hücrelerinde miR-29b'nin LP-NIN-miR aracılığıyla hücre içine alımının değerlendirilmesi (6-FAM: 6-Karboksifloressein, DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol).

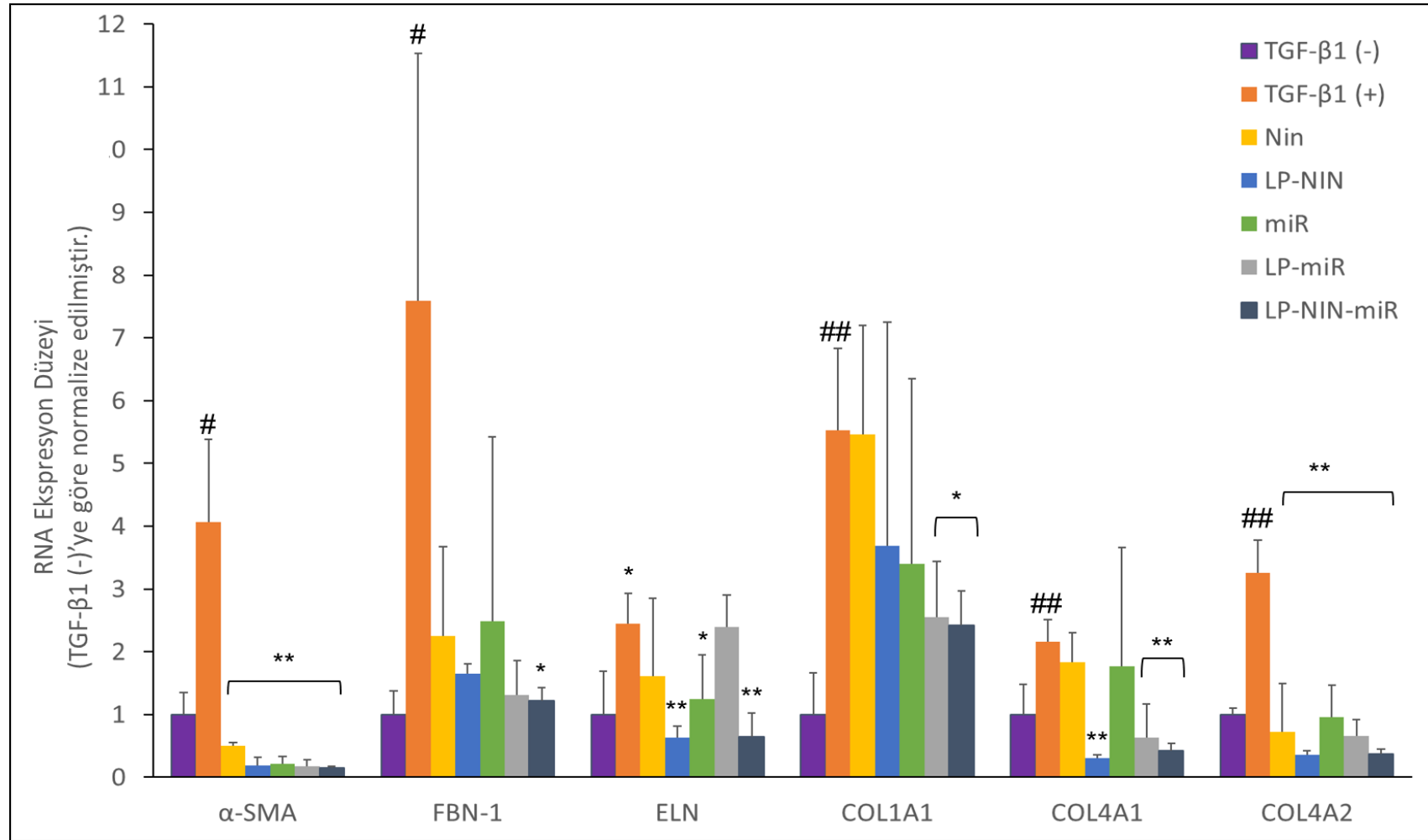
4.8. *In Vitro* Terapötik Etkinliğin Belirlenmesi

NIH/3T3 hücreleri 96 saat boyunca 20 ng.mL^{-1} TGF- β 1 ile muamele edilmiş ve ardından $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ miR-29b ve $0,6 \text{ }\mu\text{M}$ Nintedanib içeren serbest Nintedanib, serbest miR-29b, LP-miR, LP-NIN ve LP-NIN-miR ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. RT-PCR ve ELISA analizleri, LP-NIN ve LP-miR'nin fibrotik belirteçleri mRNA ve protein düzeylerinde serbest formlardan daha etkili bir şekilde düşürdüğünü göstermiştir. Bu durum lipozomal sistemin terapötik etkinliği artırdığı görülmüştür.

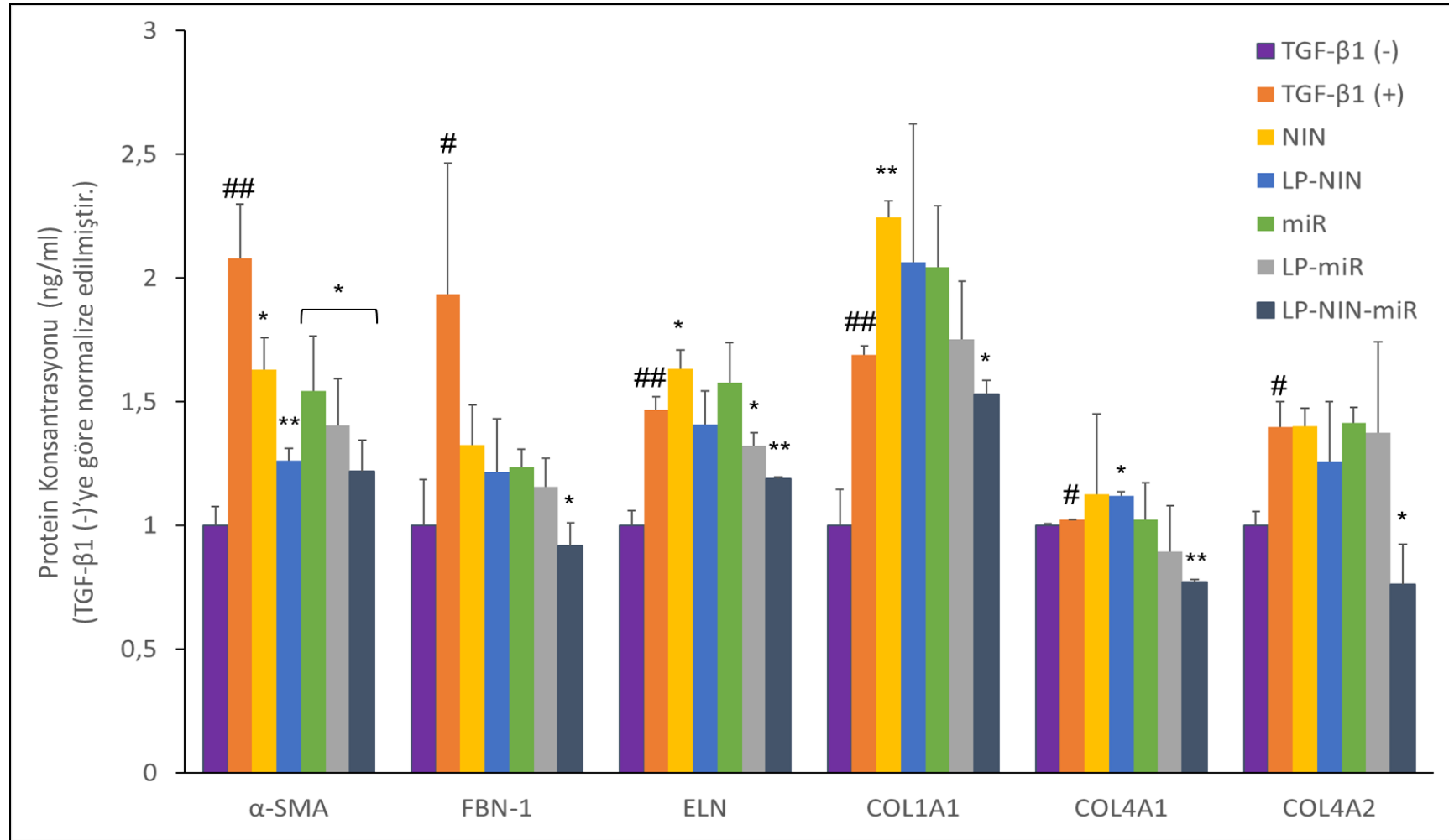
LP-NIN-miR tedavisi, hedeflenen belirteçlerin (α -SMA, FBN-1, ELN, COL1A1, COL4A1 ve COL4A2) mRNA düzeylerini tüm kontrol gruplarına kıyasla belirgin şekilde azaltmış ve İPF tedavi potansiyelinin arttığını göstermiştir (Şekil 4.23).

RT-PCR analizi ile tedavi edilen hücreler ile model hücreler arasında fibrotik belirteçlerin ekspresyon seviyelerinde önemli farklılıklar gözlenmiş (α -SMA ve COL4A2 için $p < 0,01$), ELISA analizi ile de LP-NIN-miR'nin protein seviyelerini de önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (α -SMA, FBN-1, COL1A1 ve COL4A2 için $p < 0,05$; ELN ve COL4A1 için $p < 0,01$).

Bu bulgular, Nintedanib ve miR-29b'nin lipopleksler aracılığıyla başarılı bir şekilde hücrelerin içerisine taşındığını ve bunların birlikte taşınmasıyla İPF tedavisinde elde edilen aditif anti-fibrotik etkileri vurgulamaktadır (Şekil 4.24).



Şekil 4.23. LP-NIN-miR'in *in vitro* İPF modelinde terapötik etkilerinin RT-PCR ile değerlendirilmesi (n=3) (*: TGF-β1 (+) ile karşılaştırılmıştır., *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$) (#: TGF-β1 (-) ile karşılaştırılmıştır., #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$).



Şekil 4.24. LP-NIN-miR'in *in vitro* İPF modelinde terapötik etkilerinin ELISA ile değerlendirilmesi (n=3) (*: TGF-β1 (+) ile karşılaştırılmıştır., *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$) (#: TGF-β1 (-) ile karşılaştırılmıştır., #: $p < 0,05$, ##: $p < 0,01$).

5. TARTIŞMA

5.1. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları

Nintedanib ve miR-29b taşıyıcılı lipit yapıları bir ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu (lipozom/lipopleks) hazırlanabilmesi için DOTAP, DOPE, CHOL ve DSPE-mPEG2000 lipitleri seçilmiştir. Ön formülasyon çalışmalarında MHF yönteminin kullanımı, lipozomların homojenliğini ve stabilitesini artırmada etkili olmuştur. Ayrıntılı ön formülasyon çalışmaları, organik (etanol) ve sulu fazlar arasındaki optimum FRR belirlenmesinde önemli bir rol oynamıştır. Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, FRR 1:5 olarak belirlenmesi literatürde yer alan mikroakışkanlaştırma yoluyla lipozom üretimi ile ilgili diğer yayınlarla uyumludur (275; 283-288). Bu oran, partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik partikül özelliklerinin dengelenmesinde kilit bir rol oynamıştır. Bu oranın seçimi ve üretim yöntemi, Nintedanib içeren lipozomal formülasyonların kalitesini ve homojenliğini artırarak, farmasötik formülasyon alanına önemli bir katkı sağlamıştır (169).

5.2. Tasarımla Kalite Yaklaşımı ile Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

QbD yaklaşımı, nihai ürünün güvenliği ve etkinliği göz önünde bulundurularak QTPP ve CQA tanımlanarak gerçekleştirilmiştir. QTPP'lerin ve CQA'ların tanımlanması, literatürdeki diğer lipozom formülasyon çalışmalarıyla uyumlu olmakla birlikte, Nintedanib yüklü lipozomlara özgü yenilikçi yönler de sunmaktadır (289-291). ANOVA sonuçlarına göre partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi parametrelerin formülasyon üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkileri olduğu belirlenmiştir ($p < 0.0001$). Bu sonuçlar, formülasyon değişkenlerinin lipozomların fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve QbD yaklaşımının formülasyon optimizasyonunda etkili bir araç olduğunu göstermektedir (290).

3³ faktöriyel deney tasarımı ile farklı molar oranlarda lipitler kullanılarak lipozom formülasyonları optimize edilmiştir. MHF yöntemi ile mikrofluidizasyon teknolojisi kullanılarak lipozomlar üretilmiştir. Bu yöntem, diğer çalışmalarda kullanılan üretim tekniklerinden önemli ölçüde farklıdır ve homojen lipozom partikülleri üretme yeteneğine sahiptir (292-298). Bu homojenlik, tutarlı terapötik etkinlik ve artırılmış ilaç taşıma verimliliği açısından kritik bir faktördür.

Bu çalışmada amaç, QbD yaklaşımı ile farklı formülasyon değişkenleri arasındaki etkileşimleri ayrıntılı matematiksel modellerle genişleterek bu anlayışı ileriye taşımaktır. Formülasyon optimizasyonu için tasarım alanının kullanımının, kontur ve üst üste bindirme grafikleriyle gösterilmesi stratejisi, literatürde uzun süredir çeşitli formülasyonlar için kullanılmaktadır (289,292,299-302). Bu yaklaşım, Nintedanib içeren lipozomlar için daha önce uygulanmamış olup, çalışmamızı özellikle anlamlı kılmaktadır. Varyans analizi sonuçları, formülasyon değişkenlerinin partikül boyutu dağılımı, PDI ve zeta potansiyeli üzerinde anlamlı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu etkiler, eşitlikler ve 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri ile sunulmuştur. Partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkiler incelendiğinde, DOTAP ve CHOL konsantrasyonlarının arttıkça partikül boyutunun arttığı, DOPE konsantrasyonu arttıkça ise partikül boyutunun azaldığı görülmektedir. Ayrıca, bu bileşenlerin etkileşim terimlerinin de partikül boyutu üzerinde önemli ama bireysel etkilerden daha küçük etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Lipid konsantrasyonları ile partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli arasındaki pozitif korelasyonlar mevcut çalışmalarla uyumludur (303,304). PDI üzerindeki etkiler incelendiğinde, DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının arttıkça PDI'nin azaldığı ve partiküllerin homojenliğinin arttığı görülmektedir. Ayrıca, etkileşim terimlerinin de PDI üzerinde küçük ama göz ardı edilemeyecek etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Zeta potansiyeli üzerindeki etkiler incelendiğinde ise, DOTAP, DOPE ve CHOL konsantrasyonlarının arttıkça zeta potansiyeli ve partiküllerin stabilitesinin arttığı belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında, tasarım alanının oluşturulması ve optimum formülasyon değerlerinin belirlenmesi, üretilen lipozomların belirlenen yanıt aralıklarına uymasını

sağlamak için kritik adımlar olmuştur. Özellikle, partikül boyutlarının 100-150 nm arasında değişmesi ve PDI değerinin 0,3'ün altında olması, partikül boyutunun homojenliğini göstermektedir. Bu boyut aralığı, lipozomların kan damarlarında etkin bir şekilde dolaşmasını ve akciğer kapillerlerinde optimum sürede kalmasını sağlamak açısından önemlidir. Aynı şekilde, çalışmamızda elde edilen zeta potansiyeli değerleri, stabilitenin sağlanması için belirlenen aralıklarla uyumludur, bu durum tutarlı terapötik etkinin sağlanması için gereklidir. Bu bulgular, akciğer hastalıklarının tedavisi için geliştirilen intravenöz lipozom formülasyonlarına ilişkin literatürdeki standartlarla uyumludur (305-307). DOTAP:DOPE:CHOL:DSPE-mPEG2000 lipitlerinin 10:1:10:1 molar oranlarında kullanıldığı formülasyon optimum olarak belirlenmiştir. Optimum lipozom formülasyonu ile Nintedanib ve miR-29b enkapsülasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.3. Lipopleks Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Lipopleks formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yöntemler, partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik parametrelerin optimize edilmesine yardımcı olmuştur. Bu tez kapsamında kullanılan karakterizasyon yöntemleri, TEM, DLS, UV spektroskopisi, agaroz jel elektroforezi ve florometri gibi, diğer lipozom formülasyon araştırmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır (248,308-311). Bu yöntemler, lipozomların çift tabakalı yapısını ve homojen partikül boyutu dağılımını doğrulamıştır.

5.3.1. Lipoplekslerin Partikül Boyutu, Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Tayini

LP formülasyonu, büyük partikül boyutuna ($143,9 \pm 5,4$ nm) ve düşük PDI değerine ($0,182 \pm 0,024$) sahip olup, stabil bir yapı gösterir. LP-NIN formülasyonu ise daha küçük partikül boyutuna ($126,0 \pm 0,4$ nm) ve oldukça yüksek bir zeta potansiyele (49 ± 2 mV) sahiptir. LP-miR formülasyonu, en küçük partikül boyutuna ($95,6 \pm 0,9$ nm) sahiptir ve yeterli stabilite sağlar (28 ± 1 mV). Son olarak, LP-NIN-miR formülasyonu için elde edilen $87,3 \pm 0,9$ nm'lik partikül boyutu, lipozomların

biyolojik bariyerleri aşabilmesi ve hücresele düzeyde etkili olabilmesi için uygun bir boyutta olduğunu göstermektedir. PDI değerinin $0,184 \pm 0,003$ olması, formülasyonun dar bir partikül boyutu dağılımına sahip olduğunu ve homojenite açısından oldukça iyi bir profil sergilediğini ortaya koymaktadır. Zeta potansiyeli değeri ise $+24 \pm 1$ mV olarak belirlenmiş olup, bu değer lipozomların yüksek stabiliteye sahip olduğunu ve elektrostatik olarak kararlı bir yapı oluşturduğunu göstermektedir. Bu pozitif zeta potansiyeli, lipozomların biyolojik ortamlarda uzun süre kararlı kalmasına ve hedef hücrelerle etkileşime girme potansiyeline sahip olmasına katkı sağlamaktadır (312).

Lipozom/lipopleks formülasyonlarının uzun süreli stabilitesini sağlamak için liyofilizasyon (dondurarak kurutma) yapılabilir (277). Liyofilizasyon, su içeriğini uzaklaştırarak partiküllerin bozulmasını önler ve böylece raf ömrünü uzatır. Kriyoprotektanlar ise liyofilizasyon sürecinde kullanılan koruyucu maddelerdir. Kriyoprotektanlar (örneğin, trehaloz ve mannitol), lipozom/lipopleks partiküllerinin donma ve kurutma sırasında yapısal bütünlüğünü korur, partikül boyutunun ve homojenliğin korunmasına yardımcı olur. Bu durum, yeniden disperse edildiklerinde formülasyonların etkinliğini ve biyoyararlanımını sürdürmesini sağlar (313).

LP-NIN-miR formülasyonunun liyofilizasyon çalışmaları için literatürde en çok kullanılan kriyoprotektanlar olarak trehaloz ve mannitol seçilmiştir (278). Farklı lipid:kriyoprotektan ağırlık oranlarında hazırlanan liyofilize LP-NIN-miR formülasyonları, 1xsiRNA tamponunda dağıtılarak partikül boyutu dağılımı analiz edilmiştir. Şekil 4.14'te gösterildiği üzere, kontrol grubu olan liyofilize edilmemiş LP-NIN-miR formülasyonu, $87,3 \pm 0,9$ nm partikül boyutuna ve 0,2'den daha düşük PDI değerine sahiptir. Kriyoprotektan içermeyen liyofilize formülasyonlar, kontrol grubuna kıyasla daha büyük ve heterojen partikül boyutu dağılımı göstermiştir. Zeta potansiyeli açısından, liyofilize edilmemiş LP-NIN-miR formülasyonu ile liyofilize edilmiş formülasyonlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Liyofilize edilen formülasyonlarda, 1:12 (a/a) lipid:trehaloz oranı ile kontrol grubuna en yakın ve en küçük partikül boyutu ($84,8 \pm 0,9$ nm) ve $PDI < 0,3$ ile en homojen partikül

dağılımı elde edilmiştir. Bu nedenle, partikül boyutu ve PDI açısından optimum sonuçlar veren 1:12 (a/a) lipid:trehaloz oranı tercih edilmiştir.

Bu veriler, trehalozun liyofilizasyon sürecinde kriyoprotektan olarak etkili olduğunu ve LP-NIN-miR formülasyonlarının partikül boyutu ve homojenliğini koruduğunu göstermektedir. Kriyoprotektan içermeyen formülasyonlar daha büyük ve heterojen partikül dağılımı sergilerken, trehaloz kullanımı partikül stabilitesini artırmıştır. Zeta potansiyelinde önemli bir değişiklik olmaması, formülasyonların elektrostatik stabilitesinin korunduğunu ve uzun süreli saklama koşullarında fizikokimyasal özelliklerini muhafaza ettiğini göstermektedir. Bu bulgular, 1:12 (a/a) lipid:trehaloz oranının LP-NIN-miR formülasyonlarının stabilitesini optimize etmek için en uygun oran olduğunu ortaya koymaktadır.

5.3.2. Lipoplekslerin Morfolojik Değerlendirilmesi

TEM görüntüleri, LP-NIN-miR formülasyonunun partikül boyutunun dağılımını ve yapısal özelliklerini net bir şekilde ortaya koymuştur. Şekil 4.10'da görüldüğü üzere, LP-NIN-miR partikülleri homojen bir dağılım sergilemektedir ve farklı ölçeklerde (500 nm ve 200 nm) yapılan incelemelerde partiküllerin boyutlarının birbirine yakın olduğu ve DLS yöntemi ile ölçülen partikül boyutu ($87,3 \pm 0,9$ nm) değeri ile benzer olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 4.11'de sunulan TEM görüntüsü, LP-NIN-miR partiküllerinin bilamellar (çift tabakalı) bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu çift tabakalı yapı, lipozomların etkin bir ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılmasını sağlayan temel bir özellik olup, miR-29b'nin kapsüllendiği hidrofilik çekirdeği koruyan lipid çift tabakasını içermektedir. Bu yapı, lipozomların stabilitesini artırmakta ve enkapsüle edilen maddelerin kontrollü salımını sağlamaktadır (314).

5.3.3. Nintedanib Miktar Tayini ve Analiz Yöntemi Validasyonu

Nintedanib'in UV spektrofotometrik analiz yöntemi ile yapılan miktar tayini ve analiz yöntemi validasyonu sonuçları, yöntemin doğruluğunu, kesinliğini ve

güvenilirliğini açıkça ortaya koymaktadır. Çalışmada belirlenen dalga boyu olan 393 nm, Nintedanib için spesifik bir dalga boyu olarak tespit edilmiştir. Bu dalga boyunda Nintedanib'in en yüksek absorbands değerine sahip olduğu gözlemlenmiş ve bu durum, Nintedanib'in UV spektrofotometrik analizlerinde güvenilir bir referans noktası olarak kullanılabilceğini göstermektedir (279).

Kalibrasyon eğrisinden elde edilen $y = 0,1133x - 0,0145$ doğrusal denklemi ve 0,9989 gibi yüksek bir R^2 değeri, Nintedanib'in konsantrasyonu ile absorbands arasında güçlü bir doğrusal ilişki olduğunu doğrulamaktadır. Çeşitli konsantrasyonlardaki Nintedanib çözeltileri ile yapılan analizlerde, % geri kazanım değerlerinin %98,67 ile %100,07 arasında değişmesi ve % BSS değerlerinin %2'nin altında kalması, yöntemin doğruluğunu kanıtlamaktadır. Bu veriler, yöntemle yapılan miktar tayinlerinin doğru ve güvenilir olduğunu göstermektedir.

Tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik çalışmaları, yöntemin yüksek kesinlik sağladığını göstermektedir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerle yapılan analizlerde, %VK değerlerinin %2'nin altında kalması, yöntemin hem aynı gün içinde hem de farklı günlerde yapılan analizlerde tutarlı sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle, Nintedanib'in $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonunda hazırlanan çözeltilerin farklı analistler ve farklı günlerde yapılan analizlerinde elde edilen sonuçların benzer olması, yöntemin tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

LOD ($0,422 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve LOQ ($1,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$) değerlerinin, kalibrasyon eğrisindeki en düşük konsantrasyon değerinden ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) daha düşük olması, yöntemin yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir. Bu değerler, Nintedanib'in çok düşük konsantrasyonlarda bile güvenilir bir şekilde tespit edilebileceğini ve miktar tayininin yapılabileceğini kanıtlamaktadır.

Nintedanib'in 393 nm dalga boyunda gösterdiği belirgin pik, bu dalga boyunun Nintedanib için spesifik olduğunu ve diğer formülasyon bileşenlerinin (DOTAP, DOPE, CHOL, DSPE-mPEG 2000) bu dalga boyunda herhangi bir girişim

yapmadığını ortaya koymaktadır. Bu bulgu, Nintedanib'in UV spektrofotometrik analizlerinde güvenilir bir şekilde tespit edilebileceğini ve formülasyondaki diğer bileşenlerin analiz sonuçlarını etkilemediğini göstermektedir.

Sonuç olarak, Nintedanib'in UV spektrofotometrik analiz yöntemi ile yapılan bu validasyon çalışmaları, yöntemin doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve özgüllük açısından yüksek performans sergilediğini ortaya koymaktadır. Bu veriler, yöntemin Nintedanib'in miktar tayini için uygun ve güvenilir bir seçenek olduğunu doğrulamaktadır.

5.3.4. Nintedanib Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Nintedanib'in lipozom içinde enkapsülasyon etkinliğini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar, Nintedanib'in belirli konsantrasyonlarda yüksek verimle enkapsüle edilebildiğini ortaya koymaktadır. Özellikle LP-NIN #1 ve LP-NIN #2 formülasyonları, sırasıyla 0,1 μM ve 0,2 μM teorik Nintedanib konsantrasyonlarında hazırlanmış olup, her iki formülasyonda da %EE yaklaşık %100 olarak bulunmuştur (sırasıyla $99,8 \pm 0,03$ ve $99,9 \pm 0,1$). Bu durum, Nintedanib'in bu konsantrasyonlarda lipozomlara oldukça yüksek bir etkinlikle enkapsüle edilebildiğini göstermektedir.

Bununla birlikte, LP-NIN #3 formülasyonu, 0,3 μM teorik Nintedanib konsantrasyonunda $83,5 \pm 1,2$ gibi daha düşük bir %EE değeri sergilemiştir. Bu düşüş, lipozomların belirli bir konsantrasyonun üzerinde Nintedanib'i kapsülleme kapasitesinin azaldığını ve yüksek konsantrasyonlarda bir doygunluk noktasına ulaşıldığını göstermektedir. Bu bulgu, Nintedanib'in lipozomlara etkin bir şekilde enkapsüle edilmesi için optimum konsantrasyonun seçilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Sonraki çalışmalar için LP-NIN #2 formülasyonu, optimum Nintedanib konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu formülasyon, $99,9 \pm 0,1$ gibi yüksek bir %EE sunarken, aynı zamanda partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel gibi

fizikokimyasal parametreler açısından da belirlenen limitler dahilinde uygun sonuçlar vermiştir. LP-NIN #2 formülasyonu, Nintedanib'in daha yüksek bir miktarını enkapsüle edebilme kapasitesi nedeniyle tercih edilmiştir. Bu nedenle, Nintedanib ve miR-29b içeren LP-NIN-miR formülasyonu, 0,2 μ M Nintedanib konsantrasyonu kullanılarak hazırlanmıştır.

Nihai LP-NIN-miR formülasyonu, 0,2 μ M teorik Nintedanib konsantrasyonunda $99,8 \pm 0,08$ enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. Bu sonuç, Nintedanib'in miR-29b ile birlikte lipozomlara yüksek verimle enkapsüle edilebildiğini ve miR-29b'nin Nintedanib'in enkapsülasyon etkinliği üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır. Bu %EE değeri, literatürde yer alan diğer Nintedanib içeren lipozomal formülasyon çalışmalarından daha yüksektir (292,293). Bu bulgular, lipozomların Nintedanib ve miR-29b gibi terapötik maddelerin etkin bir şekilde taşınmasında ve korunmasında etkin bir taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

5.3.5. miR-29b Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Florometre ve agaroz jel elektroforez yöntemleri ile miR-29b'nin lipozomal taşıyıcı sistemlerde başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini ve serbest formlarına kıyasla kontrollü salım sağladığını göstermiştir. Agaroz jel elektroforez analizinde miR-29b'nin enkapsülasyon etkinliği %100 olarak gözlenmiştir. Bu sonuç, literatürde yer alan diğer miR-29b içeren lipozomal formülasyon çalışmalarından daha yüksektir (315). Bu yüksek enkapsülasyon verimliliği, terapötik maddelerin büyük bir kısmının lipozomlar içinde kapsüllenmesini sağlayarak ilaç taşıma sistemimizin etkinliğini artırmaktadır.

5.3.6. Lipoplekslerden *in vitro* Nintedanib ve miR-29b Salım Çalışmaları

Nintedanib ve/veya miR-29b içeren lipozom/lipopleks formülasyonları ile diyaliz membran yöntemi kullanılarak *in vitro* salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen lipozom/lipopleks formülasyonunun, hiç ani salım etkisi (*burst effect*)

olmadan Nintedanib etken maddesinin ve miR-29b'nin 72 saat boyunca kontrollü salımını sağladığı gözlenmiştir. Bu bulgular, lipozomal taşıyıcı sistemlerin ilaç ve gen taşıma kapasitesini artırarak terapötik etkinliklerini optimize ettiğini göstermektedir (316).

5.4. Stabilite Çalışmaları

Lipozom ve lipopleks formülasyonlarının farklı saklama koşullarında ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve 25°C) stabilite değerlendirmiş ve partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli açısından anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir. Bu, formülasyonların uzun süreli saklama koşullarında fizikokimyasal stabilitelerini koruduğunu göstermektedir. Stabilite çalışmalarının sonuçları, lipozomların uzun süreli saklama koşullarında terapötik etkinliklerini koruyabileceğini ve güvenli bir şekilde kullanılabilirliğini doğrulamaktadır. Diğer çalışmalar (292-294,296,297), sınırlı saklama süreleri için Nintedanib yüklü lipozomal formülasyonların benzer stabilite profillerini göstermiştir. Ancak, genişletilmiş stabilite değerlendirmemiz, uzun süreli farmasötik uygulamalar için olağanüstü bir dayanıklılık göstermektedir. Bu bulgu, farmasötik ürünlerin geliştirilmesinde önemli bir faktör olan uzun raf ömrü ve tutarlı terapötik etkinlik potansiyelini vurgulamaktadır (317).

Liyofilize edilip RNaz içermeyen su ile disperse edilen LP-NIN-miR formülasyonunun başlangıçta partikül boyutu $84,8 \pm 0,9$ nm, PDI değeri $0,229 \pm 0,018$ ve zeta potansiyeli 47 ± 0 mV olarak ölçülmüştür. 14 gün $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklandıktan sonra, partikül boyutu $87,2 \pm 0,3$ nm, PDI değeri $0,200 \pm 0,011$ ve zeta potansiyeli 48 ± 3 mV olarak belirlenmiştir. Bu veriler, formülasyonun 14 gün boyunca partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli açısından stabil kaldığını göstermektedir ($p > 0,05$).

Bu sonuçlar, liyofilizasyon işleminin ve kullanılan kriyoprotektanların, lipozom/lipopleks partiküllerinin uzun süreli stabilitesini korumada etkili olduğunu doğrulamaktadır. Partikül boyutunda gözlemlenen minimal artış ve PDI değerindeki hafif düşüş, partiküllerin homojenliğini ve yapısal bütünlüğünü koruduğunu

göstermektedir. Ayrıca, zeta potansiyelindeki değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı olmaması, partiküllerin koloidal stabilitesinin korunduğunu ve uzun süreli depolama koşullarında bile etkinliğini sürdürebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, LP-NIN-miR formülasyonlarının farmasötik uygulamalar için güvenilir ve etkili bir taşıyıcı sistem olduğunu ortaya koymaktadır.

5.5. Hücre Kültürü ve *In Vitro* İPF Modeli Oluşturulması

Hücre kültürü ve *in vitro* İPF modeli oluşturma çalışmasında, NIH/3T3 hücrelerine 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda TGF- β 1 (5, 10, 15, ve 20 ng.mL⁻¹) uygulanarak fibrozis indüklenmiştir. Bu süreç sonunda α -SMA, FBN-1, ELN, COL1A1, COL4A1 ve COL4A2 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. RT-PCR sonuçları, α -SMA ve COL1A1 genlerinde TGF- β 1 konsantrasyonu arttıkça gen ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığını göstermektedir ($p < 0,05$). Özellikle 20 ng.mL⁻¹ TGF- β 1 konsantrasyonunda α -SMA ve COL1A1 ekspresyonları en yüksek seviyeye ulaşmıştır ($p < 0,05$). Bu durum, TGF- β 1'in güçlü bir fibrotik indükleyici olduğunu doğrulamaktadır. 20 ng.mL⁻¹ TGF- β 1 kullanımı, hücrelerin maksimum fibrotik yanıtı göstermesini sağlamak amacıyla tercih edilmiştir.

ELN gen ekspresyonunda da benzer bir artış gözlemlenmiş olup, en yüksek TGF- β 1 konsantrasyonunda anlamlı bir yukarı regülasyon tespit edilmiştir ($p < 0,01$). FBN-1 ve COL4A2 gen ekspresyonlarında da TGF- β 1 uygulamasıyla birlikte artış gözlemlenmiş ve bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). COL4A1 geninde ise TGF- β 1 uygulaması ile belirgin bir artış gözlenmemiştir, bu durum TGF- β 1'in bu gen üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceğini düşündürmektedir.

Bu sonuçlar, TGF- β 1'in NIH/3T3 hücrelerinde fibrotik belirteç genlerin ekspresyonunu artırarak, *in vitro* İPF modelinin etkin bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. α -SMA, COL1A1 ve ELN gibi kritik fibrotik belirteçlerdeki artışlar, *in vitro* modelin fibrozis sürecini doğru bir şekilde yansıttığını doğrulamaktadır. Bu sonuçlar, TGF- β 1'in NIH/3T3 hücrelerinde fibrozisi indüklediğini ve İPF'yi *in vitro*

olarak başarılı bir şekilde simüle ettiğini göstermektedir. Bu model, LP-NIN-miR'in İPF'ye karşı etkinliğini test etmek için sağlam bir temel oluşturmaktadır (318).

5.6. *In Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

In vitro sitotoksosite çalışmasında, NIH/3T3 fare pulmoner fibroblast hücrelerinin çeşitli lipozom/lipopleks formülasyonlarına ve serbest terapötik maddelere maruz bırakılarak canlılık oranlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Hücreler, LP, LP-NIN, serbest Nintedanib, serbest miR-29b ve LP-NIN-miR gibi farklı formülasyonlar ve bu formülasyonların değişen konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Canlılık oranları, XTT yöntemi kullanılarak 24 saat sonunda ölçülmüştür.

Sonuçlara göre, LP, serbest miR-29b ve LP-NIN-miR gruplarında kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($n=3$, $p > 0,05$). Bu sonuçlar, bu formülasyonların hücreler üzerinde toksik bir etki yaratmadığını ve hücre canlılığını etkilemediğini göstermektedir. Buna karşılık, Nintedanib içeren gruplarda belirgin bir hücre canlılığı azalması gözlenmiştir. LP-NIN formülasyonunda, Nintedanib konsantrasyonu $0,6 \mu\text{M}$ olduğunda hücre canlılığı önemli ölçüde azalırken ($n=3$, $p < 0,05$), serbest Nintedanib grubunda $0,01 \mu\text{M}$ ($n=3$, $p < 0,05$), $0,3 \mu\text{M}$ ($n=3$, $p < 0,05$) ve $0,6 \mu\text{M}$ ($n=3$, $p < 0,01$) konsantrasyonlarında hücre canlılığında anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir. Bu bulgular, serbest Nintedanib'in hücreler üzerinde daha belirgin bir toksik etki yarattığını, lipozomal formülasyonun ise bu toksik etkiyi azalttığını göstermektedir.

Ayrıca, serbest miR-29b ve LP-NIN-miR formülasyonları ile inkübe edilen hücrelerde, miR-29b'nin konsantrasyonu $0,5 \mu\text{M}$ 'ye kadar çıkarıldığında hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir ($n=3$, $p > 0,05$). Bu, miR-29b'nin serbest formda ve lipozomal formülasyon içinde hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Bu veriler, LP ve LP-NIN-miR formülasyonlarının hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığını ve güvenli bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Serbest Nintedanib'in hücre canlılığını belirgin şekilde azaltması, serbest formdaki ilacın toksik etkisini gösterirken, lipozomal formülasyonun bu etkiyi azaltması, lipozomların terapötik ajanların güvenliğini ve etkinliğini artırmada önemli bir rol oynadığını göstermektedir (83,293).

Bu çalışma, lipozom/lipopleks sistemlerinin ilaç taşıma ve gen tedavisi uygulamalarında potansiyelini ortaya koymaktadır. Lipozomlar, ilacın kontrollü salınımını sağlayarak ve hücelere olan toksik etkilerini azaltarak, terapötik etkinliği optimize etmiştir. *In vitro* terapötik etkinlik çalışmaları için miR-29b'nin 0,2 μ M ve Nintedanib'in 0,6 μ M konsantrasyonlarının seçilmesi, hücre canlılığını fazla etkilemeden yeterli terapötik etki sağlama hedefini desteklemektedir.

5.7. Hücresel Alım (Transfeksiyon) Çalışmaları

Hücresel alımı değerlendirmek amacıyla 6-FAM ile işaretlenmiş serbest miR-29b ve LP-NIN-miR formülasyonları NIH/3T3 hücrelerine uygulanmıştır. Şekil 4.22, NIH/3T3 hücrelerine miR-29b'nin LP-NIN-miR aracılığıyla hücre içine alınımının floresans mikroskopi yöntemiyle değerlendirilmesini göstermektedir. Kontrol hücrelerinde herhangi bir floresan sinyali gözlenmezken, serbest 6-FAM-miR-29b ile işlenen hücrelerde zayıf veya hiç floresan sinyali görülmemiştir. Buna karşılık, LP-NIN-6-FAM-miR ile işlenen hücrelerde belirgin bir 6-FAM floresan sinyali gözlenmiştir. Bu, LP-NIN-miR'in miR-29b'yi etkin bir şekilde hücre içine transfekte ettiğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, LP-NIN-miR taşıyıcı sistemlerinin genetik materyallerin hücre içine iletilmesinde serbest formdan daha etkili olduğunu doğrulamaktadır. Serbest 6-FAM-miR-29b'nin düşük veya hiç floresan sinyali vermemesi, serbest formun hücre içine alım etkinliğinin düşük olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, LP-NIN-6-FAM-miR ile işlenen hücrelerde güçlü bir floresan sinyali gözlenmesi, lipozomal formülasyonun miR-29b'nin hücre içine taşınmasında üstün olduğunu kanıtlamaktadır.

LP-NIN-miR taşıyıcı sistemlerinin etkinliği, miR-29b gibi genetik materyallerin hücre içine başarılı bir şekilde iletilmesiyle terapötik uygulamalarda büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, LP-NIN-miR'in gen terapisi ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilirliğini destekleyen önemli veriler sunmaktadır. Ayrıca, floresans mikroskopi ile elde edilen bu sonuçlar, LP-NIN-miR sistemlerinin gen taşıma etkinliğini artırarak terapötik etkinliklerini optimize edebileceğini göstermektedir.

5.8. *In Vitro* Terapötik Etkinliğin Belirlenmesi

İPF tedavisinde geliştirilen lipopleks formülasyonunun terapötik etkinliği, İPF modellemesinde yaygın olarak kullanılan NIH/3T3 fare fibroblast hücreleri (319-323) ile yapılan *in vitro* İPF model çalışmaları ile gösterilmiştir. NIH/3T3 hücreleri 96 saat boyunca 20 ng.mL^{-1} TGF- β 1 ile muamele edilerek fibrotik bir model oluşturulmuş ve ardından $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ miR-29b ve $0,6 \text{ }\mu\text{M}$ Nintedanib içeren serbest Nintedanib, serbest miR-29b, LP-miR, LP-NIN ve LP-NIN-miR ile 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. RT-PCR ve ELISA analizleri, LP-NIN ve LP-miR'nin fibrotik belirteçleri mRNA ve protein düzeylerinde serbest formlardan daha etkili bir şekilde düşürdüğünü göstermiştir. Bu durum, lipozomal sistemin terapötik etkinliğini artırdığını ortaya koymaktadır.

LP-NIN-miR tedavisi, hedeflenen belirteçlerin (α -SMA, FBN-1, ELN, COL1A1, COL4A1 ve COL4A2) (320,324,325) mRNA düzeylerini tüm kontrol gruplarına kıyasla belirgin şekilde azaltmış ve İPF tedavi potansiyelinin arttığını göstermiştir. RT-PCR analizine göre, tedavi edilen hücreler ile model hücreler arasında fibrotik belirteçlerin ekspresyon seviyelerinde önemli farklılıklar gözlenmiştir. Özellikle α -SMA ve COL4A2 için $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. ELISA analizinde de LP-NIN-miR'in protein seviyelerini önemli ölçüde azalttığı görülmüştür; α -SMA, FBN-1, COL1A1 ve COL4A2 için $p < 0,05$, ELN ve COL4A1 için $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı azalmalar gözlenmiştir.

Bu bulgular, Nintedanib ve miR-29b'nin lipopleksler aracılığıyla başarılı bir şekilde hücrelerin içerisine taşındığını ve birlikte taşınmasıyla İPF tedavisinde aditif anti-fibrotik etkiler elde edildiğini vurgulamaktadır. LP-NIN ve LP-miR'in, gen ve ilaç taşıma kapasiteleri ile terapötik etkinliklerini artırarak hücre içi fibrotik süreçleri inhibe etmede önemli rol oynadığı görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, İPF tedavisinde yenilikçi bir yaklaşım olarak Nintedanib ve miR-29b'nin birlikte kullanıldığı lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, karakterizasyonu ve etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, QbD yaklaşımı kullanılarak lipozom formülasyonları optimize edilmiştir.

Ön formülasyon çalışmaları, partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özelliklerinin belirlenmesinde önemli rol oynamıştır. ANOVA sonuçlarına göre, formülasyon değişkenlerinin bu parametreler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkileri olduğu belirlenmiştir. Mikroakışkanlaştırma teknolojisi kullanılarak hazırlanan lipozomların partikül boyutlarının 100-150 nm aralığında ve PDI değerlerinin 0,3'ün altında olduğu tespit edilmiştir. Bu boyut aralığı, lipozomların kan damarlarında etkili bir şekilde dolaşabilmesi ve akciğer kapillerlerinde optimum süre boyunca kalabilmesi için kritik öneme sahiptir. Elde edilen zeta potansiyeli değerleri, lipozomların stabilitesinin yüksek olduğunu ve terapötik etkinliğin tutarlı bir şekilde sağlanabileceğini göstermektedir.

Çalışmada kullanılan TEM ve DLS gibi karakterizasyon yöntemleri, lipozomların bilamellar yapısını ve homojen partikül boyutu dağılımını doğrulamıştır. UV spektroskopisi, agaroz jel elektroforez ve florometre yöntemleri ile yapılan enkapsülasyon etkinliği ölçümleri, Nintedanib ve miR-29b için yüksek enkapsülasyon verimliliği göstermiştir. Bu sonuçlar, geliştirilen lipozomların ilaç taşıma kapasitesinin yüksek olduğunu ve tedavi edici maddelerin etkin bir şekilde taşınabildiğini göstermektedir.

Stabilite çalışmaları, lipozomların uzun süreli saklama koşullarında stabil kaldığını ve kontrollü ilaç salınım profilleri sergilediğini ortaya koymuştur. Bu, farmasötik uygulamalarda uzun raf ömrü ve sürekli terapötik etkinlik için gereklidir.

İn vitro İPF modeli kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmaları, LP-NIN-miR formülasyonunun fibrotik belirteçleri mRNA ve protein düzeyinde anlamlı derecede düşürdüğünü göstermiştir. Sitotoksikite ve hücresel alım çalışmaları, miR-29b'nin biyoyumluluğunu ve etkin taşınımını doğrulamıştır. LP-NIN-miR ile tedavi edilen hücrelerde gözlemlenen aditif anti-fibrotik etkiler, Nintedanib ve miR-29b'nin birlikte kullanımının İPF tedavisinde bireysel maddelere göre üstün terapötik faydalar sunduğunu göstermektedir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda önerilebilecek çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

- İn vitro çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçlar, geliştirilen lipozomal formülasyonların klinik denemelerde test edilmesini gerektirmektedir. Klinik araştırmalar, formülasyonun insan hastalar üzerindeki etkinliğini ve güvenliğini belirlemek için kritik öneme sahiptir.
- miR-29b'nin yanı sıra diğer miRNA'ların da İPF tedavisindeki potansiyel etkinlikleri araştırılmalıdır. Farklı miRNA'ların kombinasyonları, hastalığın tedavisinde daha etkili sonuçlar verebilir.
- Farklı lipit kombinasyonları ve enkapsülasyon yöntemleri kullanılarak formülasyonların optimizasyonu ve varyasyonları incelenmelidir. Bu, tedaviye spesifik ihtiyaçlara göre uyarlanmış esnek ve etkin taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine olanak tanıyabilir.
- Formülasyonların uzun vadeli stabilite çalışmalarının geniş kapsamlı olarak yapılması, raf ömrünün ve etkinliğin korunması açısından önemlidir.
- Oral, inhalasyon veya transdermal gibi farklı dozaj formlarının geliştirilmesi, Nintedanib ve miR-29b'nin uygulanabilirliğini artırabilir ve hastaların tedaviye uyumunu kolaylaştırabilir.
- Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilerek lipozomların spesifik akciğer dokularına yönlendirilmesi sağlanabilir. Bu, ilaçların etkinliğini artırırken yan etkileri minimize edebilir.

Bu öneriler doğrultusunda yapılacak çalışmalar, İPF tedavisinde daha etkili ve güvenilir terapötik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu tez, İPF gibi zor tedavi edilen hastalıklar için yenilikçi yaklaşımların araştırılması ve uygulanması açısından önemli bir adım teşkil etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Tomos I. P, Tzouveleakis A, Aidinis V, Manali E.D, Bouros E, ve ark. Extracellular matrix remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis. It is the “bed” that counts and not “the sleepers.” *Expert Rev. Respir. Med.* 2017;11(4):299–309. doi:10.1080/17476348.2017.1300533
2. Chanda D, Otoupalova E, Smith S. R, Volckaert T, De Langhe S. P, Thannickal V. J. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis. *Mol. Asp. Med.* 2018; doi:10.1016/j.mam.2018.08.004
3. Hewlett J. C, Kropski J. A, Blackwell T. S. Idiopathic pulmonary fibrosis: Epithelial-mesenchymal interactions and emerging therapeutic targets. *Matrix Biol.* 2018; doi:10.1016/j.matbio.2018.03.021
4. Correale M, Totaro A, Lacedonia D, Montrone D, Di Biase M, Pia Barbaro Foschino, M, ve ark. Novelty in treatment of pulmonary fibrosis: pulmonary hypertension drugs and others. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2013; 11(3):169-178.
5. Ma H, Liu S, Li S, Xia Y. Targeting growth factor and cytokine pathways to treat idiopathic pulmonary fibrosis. *Front. pharmacol.*, 2022;13, 918771. doi:10.3389/fphar.2022.918771
6. Li H, Zhao X, Shan H, Liang H. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis: involvement in pathogenesis and potential use in diagnosis and therapeutics. *Acta Pharm. Sin. B.* 2016;6(6):531–539. doi:10.1016/j.apsb.2016.06.010
7. Cushing L, Kuang P, Lü J. The role of miR-29 in pulmonary fibrosis. *Biochemistry and Cell Biology*, 2015;93(2):109–118. doi: 10.1139/bcb-2014-0095
8. Guiot J, Henket M, Remacle C, Cambier M, Struman I, Winandy M. ve ark. Systematic review of overlapping microRNA patterns in COVID-19 and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.* 2023;24:112. <https://doi.org/10.1186/s12931-023-02413-6>
9. George P.M, Wells A.U, Jenkins R.G. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. *Lancet Respir Med*, 2020;8:807–815. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30225-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30225-3)
10. Takehara K, Koga Y, Hachisu Y, ve ark Differential Discontinuation Profiles between Pirfenidone and Nintedanib in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cells.* 2022;11(1):143. doi: <https://doi.org/10.3390/cells11010143>
11. Zheng Q, Cox I.A, Campbell JA, ve ark. Mortality and survival in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and meta-analysis. *ERJ Open Res.* 2022;8(1):00591-2021. doi: <https://doi.org/10.1183/23120541.00591-2021>
12. Kataoka K, Oda K, Takizawa H, ve ark. Cohort study to evaluate prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis patients introduced to oxygen

- therapy. *Sci Rep.* 2023;13(1):13664. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40508-8>
13. Wollin L, Wex E, Pautsch A, Schnapp G, Hostettler K. E, Stowasser S. ve ark. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2015;45(5):1434–1445. doi:10.1183/09031936.00174914
 14. Confalonieri P, Volpe MC, Jacob J, ve ark. Regeneration or Repair? The Role of Alveolar Epithelial Cells in the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). *Cells* 2022;11(13):2095. <https://doi.org/10.3390/cells11132095>
 15. Patrucco F, Solidoro P, Gavelli F, ve ark. Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Post-COVID-19 Lung Fibrosis: Links and Risks. *Microorganisms* 2023;11(4):895. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040895>
 16. Bonella F, Stowasser S, Wollin. L. Idiopathic pulmonary fibrosis: current treatment options and critical appraisal of nintedanib. *Drug Des Devel Ther.* 2015;6407-6419, doi: 10.2147/dddt.s76648
 17. Morrow LE, Hilleman D, Malesker MA. Management of patients with fibrosing interstitial lung diseases. *AJHP.* 2022;79(3):129–139. doi: <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxab375>
 18. Guo H, Sun J, Zhang S, ve ark. Progress in understanding and treating idiopathic pulmonary fibrosis: recent insights and emerging therapies. *Front. Pharmacol.* 2023;14:1205948. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1205948>
 19. Karampitsakos T, Juan-Guardela B.M, Tzouveleakis A, Herazo-Maya J.D. Precision medicine advances in idiopathic pulmonary fibrosis. *eBioMedicine*, 2023;95: 104766. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104766>
 20. Amati F, Stainer A, Polelli V, ve ark. Efficacy of Pirfenidone and Nintedanib in Interstitial Lung Diseases Other than Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(9):7849. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms24097849>
 21. Li R, Jia Y., Kong X, ve ark. Novel drug delivery systems and disease models for pulmonary fibrosis. *JCR.* 2022;348:95-114. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.05.039>
 22. Yan L, Su Y, Hsia I, ve ark. Delivery of anti-microRNA-21 by lung-targeted liposomes for pulmonary fibrosis treatment. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2023;32:36-47. doi: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.02.031>
 23. Pandit K. V, Milosevic J, & Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl. Res.* 2011;157(4):191–199. doi:10.1016/j.trsl.2011.01.012
 24. Liu B, Jiang T, Hu X, Liu Z, Zhao L, Liu H. ve ark. Downregulation of microRNA 30a in bronchoalveolar lavage fluid from idiopathic pulmonary fibrosis patients. *Mol. Med. Rep.* 2018; doi:10.3892/mmr.2018.9565
 25. Lacedonia D, Scioscia G, Soccio P, Conese M, Catucci L, Palladino G. ve ark. Downregulation of exosomal let-7d and miR-16 in idiopathic pulmonary

- fibrosis. *BMC Pulmonary Medicine*, 2021;21(1). doi:10.1186/s12890-021-01550-2
26. Yang G, Yang L, Wang W, Wang J, Wang J, Xu Z. Discovery and validation of extracellular/circulating microRNAs during idiopathic pulmonary fibrosis disease progression. *Gene*, 2015;562(1):138–144. doi:10.1016/j.gene.2015.02.065
 27. Oak S. R, Murray L, Herath A, Sleeman M, Anderson I, Joshi A. D. ve ark. A Micro RNA Processing Defect in Rapidly Progressing Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE*, 2011;6(6), e21253. doi:10.1371/journal.pone.0021253
 28. Pandit K. V, Corcoran D, Yousef H, Yarlagaadda M, Tzouvelekis A, Gibson K. F. ve ark. Inhibition and Role of let-7d in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010;182(2):220–229. doi:10.1164/rccm.200911-1698oc
 29. Li P, Li J, Chen T, Wang H, Chu H, Chang J, ve ark. Expression analysis of serum microRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Int. J. Mol. Med.* 2014;33(6):1554–1562. doi:10.3892/ijmm.2014.1712
 30. Rajasekaran S, Rajaguru P, Sudhakar Gandhi, P. S. MicroRNAs as potential targets for progressive pulmonary fibrosis. *Front. pharmacol.* 2015;6. doi:10.3389/fphar.2015.00254
 31. Takagi K, Yamakuchi M, Hashiguchi T, Inoue H. The Role of miRNAs in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Interstitial Lung Dis.* 2019;2:5-22. doi:10.5772/intechopen.82771
 32. Liang H, Gu Y, Li T, Zhang Y, Huangfu L, Hu M. ve ark. Integrated analyses identify the involvement of microRNA-26a in epithelial–mesenchymal transition during idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Death & Disease*, 2014;5(5):e1238–e1238. doi:10.1038/cddis.2014.207
 33. Miao C, Xiong Y, Zhang G, & Chang J. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis, new research progress and their pathophysiological implication. *Exp. Lung Res.* 2018;44(3):178–190. doi:10.1080/01902148.2018.1455927
 34. Mora A, Rojas M, Pardo A, ve ark. Emerging therapies for idiopathic pulmonary fibrosis, a progressive age- related disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(11):755-772. doi: <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.170>
 35. Pandit K, Milosevic J. MicroRNA regulatory networks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem. Cell Biol.* 2015;93(2):129–137. doi: <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0101>
 36. Adamali H, Maher T. Current and novel drug therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Drug Des Devel Ther.* 2012;6:261–272. doi: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S29928>
 37. Yamada Y, Takanashi M, Sudo K, ve ark. Novel form of miR-29b suppresses bleomycin- induced pulmonary fibrosis. *Plos One* 2017;12(2):e0171957. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171957>

38. Xiao J, Meng X, Huang X, ve ark. miR-29 Inhibits Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Mol. Ther.* 2012;20(6):1251–1260. doi: <https://doi.org/10.1038/mt.2012.36>
39. Cushing L, Kuang P, Qian J, ve ark. miR-29 Is a Major Regulator of Genes Associated with Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45(2):287–294. doi: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0323OC>
40. Inchingolo R, Condoluci C, Smargiassi A, Mastrobattista A, Boccabella C, Comes A. ve ark. Are newly launched pharmacotherapies efficacious in treating idiopathic pulmonary fibrosis? Or is there still more work to be done?. *Expert Opin Pharmacother.* 2017;18(15):1583–1594. doi:10.1080/14656566.2017.1383382
41. Wang F, Zhang L, Bai X, Cao X, Jiao X, Huang Y. ve ark. Stimuli-Responsive Nanocarrier for Co-delivery of MiR-31 and Doksorubisin To Suppress High MtEF4 Cancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018;10, 22767–22775.
42. Gong C, Tian J, Wang Z, Gao Y, Wu X, Ding X. ve ark. Functional exosome-mediated co-delivery of doksorubisin and hydrophobically modified microRNA 159 for triple-negative breast cancer therapy. *J Nanobiotechnol*, 2019;17:93.
43. Yin P, Pongkulapa T, Cho H, Han J, Pasquale N, Rabie H. ve ark. Overcoming Chemoresistance in Cancer via Combined MicroRNA Therapeutics with Anticancer Drugs Using Multifunctional Magnetic Core–Shell Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2018;10, 26954–26963.
44. Lei L, Liu Z, Yuan P, Jin R, Wang X, Jiang T. ve ark. Injectable colloidal hydrogel with mesoporous silica nanoparticles for sustained co-release of microRNA-222 and aspirin to achieve innervated bone regeneration in rat mandibular defects. *J. Mater. Chem. B*, 2019;7, 2722.
45. Huang S, Liu Y, Xu X, Ji M, Li Y, Song C. ve ark. Triple therapy of hepatocellular carcinoma with microRNA-122 and doksorubisin co-loaded functionalized gold nanocages. *J. Mater. Chem. B*, 2018;6, 2217.
46. Uz M, Kalaga M, Pothuraju R, Ju J, Junker W, Batra S. ve ark. Dual delivery nanoscale device for miR-345 and gemcitabine co-delivery to treat pancreatic cancer. *JCR.* 2019;294, 237–246.
47. Küçüktürkmen B, Bozkır A. Development and characterization of cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of pemetrexed and miR-21 antisense oligonucleotide to glioblastoma cells. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2018;44(2):306–315.
48. Liu H, Mei J, Xu Y, Tang L, Chen D, Zhu Y, ve ark. Improving the oral absorption of nintedanib by a self-microemulsion drug delivery system: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine.* 2019;8739–8751. <https://doi.org/10.2147/IJN.S224044>

49. Sankar P. R, Sailu A. B, Eswarudu M. M, Satya M. N, Sreeja P, Roja P, ve ark. Analytical methods for determination of different members of FDA approved tyrosine kinase inhibitors like Dasatinib, Lapatinib, Imatinib, Sorafenib, Nintedanib, Sunitinib and Pazopanib: a review. *J. Pharm. Sci.* 2021;13(6):313-318.
50. Wind S, Schmid U, Freiwald M. ve ark. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Nintedanib. *Clin Pharmacokinet.* 2019;58:1131–1147. <https://doi.org/10.1007/s40262-019-00766-0>
51. Schmid U, Liesenfeld K.-H, Fleur A, Dallinger, C, & Freiwald M. Population pharmacokinetics of nintedanib, an inhibitor of tyrosine kinases, in patients with non-small cell lung cancer or idiopathic pulmonary fibrosis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;81(1):89–101.
52. Schmid U, Doege C, Dallinger C, Freiwald M. Population pharmacokinetics of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther.* 2018;48:136–143. doi:10.1016/j.pupt.2017.11.004
53. Dallinger C, Trommeshauser D, Marzin K, Liesener A, Kaiser R, & Stopfer P. Pharmacokinetic Properties of Nintedanib in Healthy Volunteers and Patients With Advanced Cancer. *J. Clin. Pharmacol.* 2016;56(11):1387–1394. doi:10.1002/jcph.752
54. McCormack P. Nintedanib: First Global Approval. *Drugs* 2015;75:129–139. doi: <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0335-0>
55. Richeldi L, du Bois R. M, Raghu G, Azuma A, Brown K. K, Costabel U. ve ark. Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *NEJM.* 2014;370(22):2071–2082. doi:10.1056/nejmoa1402584
56. Serra López-Matencio JM, Gómez M, Vicente-Rabaneda EF, ve ark. Pharmacological Interactions of Nintedanib and Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Times of COVID-19 Pandemic. *Pharmaceuticals.* 2021;14(8):819. doi: <https://doi.org/10.3390/ph14080819>
57. Delma KL, Lechanteur A, Evrard B, ve ark. Sterilization methods of liposomes: Drawbacks of conventional methods and perspectives. *Int. J. Pharm.* 2021;597:120271. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120271>
58. Ackermann M, Kim Y, Wagner W, Schuppan D, Valenzuela C, Mentzer S. ve ark. Effects of nintedanib on the microvascular architecture in a lung fibrosis model. *Angiogenesis,* 2017;20:359–372.
59. Hostettler K, Zhong J, Papakonstantinou E, Karakiulakis G, Tamm M, Seidel P. ve ark. Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research,* 2014;15:157.
60. Knuppel L, Ishikawa Y, Aichler M, Heinzelmann K, Hatz R, Behr J, ve ark. A Novel Antifibrotic Mechanism of Nintedanib and Pirfenidone: Inhibition of Collagen Fibril Assembly. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;57(1):77–90.
61. Lamb Y. N. Nintedanib: A Review in Fibrotic Interstitial Lung Diseases. *Drugs,* 2021;81(5), 575–586. doi:10.1007/s40265-021-01487-0

62. Campani V, De Rosa G, Misso G, Zarone M.R, Grimaldi A. Lipid Nanoparticles to Deliver miRNA in Cancer. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2016;17:728-736.
63. İnan M, Kozacı L. D. MikroRNA'ların Sinyal Yolaklarına Etkileri ve İlişkili Hastalıklar. *JIAM*.2020;1(1):21-37. <https://doi.org/10.29329/jiam.2020.299.3>
64. Gaur A, Jewell D. A, Liang Y, Ridzon D, Moore J. H, Chen C. ve ark. Characterization of MicroRNA Expression Levels and Their Biological Correlates in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Research*. 2007;67(6):2456–2468. doi:10.1158/0008-5472.can-06-2698
65. Cesur-Ergün B, Demir-Dora D. Gene therapy in cancer. *The Journal of Gene Medicine*. 2023;25(11):e3550. <https://doi.org/10.1002/jgm.3550>
66. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart R. A. Progress in microRNA delivery. *JCR*. 2013;172(3):962–974. doi:10.1016/j.jconrel.2013.09.015
67. Krützfeldt J. Strategies to use microRNAs as therapeutic targets. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2016;30(5):551–561. doi:10.1016/j.beem.2016.07.004
68. Bader A. G, Brown D, Winkler M. The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Research*. 2010;70(18):7027–7030. doi:10.1158/0008-5472.can-10-2010
69. Zeeshan F. Targeting micro-ribonucleic acid (miRNA) in cancer using advanced drug delivery systems. In *Advanced Drug Delivery Systems in the Management of Cancer 2021*; (pp. 461-466). Academic Press. Doi:10.1016/b978-0-323-85503-7.00004-3
70. Moraes F.C, Pichon C, Letourneur D, Chaubet F. miRNA Delivery by Nanosystems: State of the Art and Perspectives. *Pharmaceutics* 2021;13, 1901. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111901>
71. Mollarasouli F, Badilli U, Bakirhan N. K, Ozkan S. A, Ozkan Y. Advanced DNA nanomachines: Strategies and bioapplications. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2021;61, 102290. doi:10.1016/j.jddst.2020.102290
72. Grasedieck S, Schöler N, Bommer M, Niess J. H, Tumani, H, Rouhi, A. ve ark. Impact of serum storage conditions on microRNA stability. *Leukemia*, 2012; 6(11), 2414–2416. doi:10.1038/leu.2012.106
73. Yang N. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. *Int. J. Pharm. Investig*. 2015;5(4), 179. 10.4103/2230-973X.167646
74. Bai Z, Wei J, Yu C, Han X, Zhang C, Qin X. ve ark. Non-viral nanocarriers for intracellular delivery of microRNA therapeutics. *J. Mater. Chem. B*. 2019; doi:10.1039/c8tb02946f
75. Labatut A. E, & Mattheolabakis G. Non-viral based miR delivery and recent developments. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;128:82–90. doi:10.1016/j.ejpb.2018.04.018

76. Wang H, Jiang Y, Peng H, Chen Y, Zhu P, Huang Y. Recent progress in microRNA delivery for cancer therapy by non-viral synthetic vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;81:142–160. doi:10.1016/j.addr.2014.10.031
77. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim Y. Y. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 2010;1803(11):1231–1243. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.06.013
78. Yan B, Guo Q, Fu F. J, Wang Z, Yin Z, Wei Y. B. ve ark. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *OncoTargets and therapy*, 2015;539-548. 10.2147/OTT.S75899
79. Doench J. G. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development*, 2004;18(5), 504–511. doi:10.1101/gad.1184404
80. Hwang H.-W, Wentzel E. A, Mendell J. T. A Hexanucleotide Element Directs MicroRNA Nuclear Import. *Science*, 2007;315(5808), 97–100. doi:10.1126/science.1136235
81. Muthia M, Park I.-K, & Cho C.-S. Nanoparticle-mediated delivery of therapeutic genes: focus on miRNA therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv.* 2013;10(9):1259–1273. doi:10.1517/17425247.2013.798640
82. Campani V, De Rosa G, Misso G, R Zarone M, Grimaldi A. Lipid nanoparticles to deliver miRNA in cancer. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2016;17(8):741-749. 10.2174/138920101708160517234941
83. Wu Y, Crawford M, Mao Y, Lee R. J, Davis I. C, Elton T. S. ve ark. Therapeutic Delivery of MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2013;2, e84. doi:10.1038/mtna.2013.14
84. Kumari D, & Medhi B. Drug and Gene Delivery Carriers: Biodegradable and Biocompatible. *IJPSN.* 2023;16(5):6943-6944. <https://doi.org/10.37285/ijpsn.2023.16.5.1>
85. Saudagar N. R, Boraste S. S, Shinkar D. M, Pingale P. L, Amrutkar S. V. Gene-Specific Drug Delivery System: An Art of War. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia.* 2022;19(2):459-471. 10.13005/bbra/3000
86. Butt M.H, Zaman M, Ahmad A, Khan R, Mallhi T.H, Hasan M.M, ve ark. Appraisal for the Potential of Viral and Nonviral Vectors in Gene Therapy: A Review. *Genes* 2022;13, 1370. <https://doi.org/10.3390/genes13081370>
87. Wang W, Li W, Ma N, Steinhoff G. Non-Viral Gene Delivery Methods. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2013;14(1):46–60. doi:10.2174/1389201011314010008
88. Guimarães D, Cavaco-Paul A, Nogueira, E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *Int. J. Pharm.* 2021;601, 120571. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120571
89. Nordling-David M. M, Golomb G. Gene Delivery by Liposomes. *Isr. J. Chem.* 2013;. doi:10.1002/ijch.201300055

90. Hashida M, Kawakami S, & Yamashita F. Lipid Carrier Systems for Targeted Drug and Gene Delivery. *Chem. Pharm. Bull.* 2005;53(8):871–880. doi:10.1248/cpb.53.871
91. Kumar P, Huo P, Liu B. Formulation Strategies for Folate-Targeted Liposomes and Their Biomedical Applications. *Pharmaceutics.* 2019;2;11(8). pii: E381.
92. Barba AA, Bochicchio S, Dalmoro A, Lamberti G. Lipid Delivery Systems for Nucleic-Acid-Based-Drugs: From Production to Clinical Applications. *Pharmaceutics.* 2019 24;11(8).
93. Li M, Du C, Guo N, Teng Y, Meng X, Sun H, ve ark. Composition design and medical application of liposomes. *Eur J Med Chem.* 2019;15(164):640-653.
94. Darley E, Singh JKD, Surace NA, Wickham SFJ, Baker MAB. The Fusion of Lipid and DNA Nanotechnology. *Genes.* 2019; 3;10(12). pii: E1001.
95. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, ve ark. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 2018;18;10(2).
96. Fatima MT, Islam Z, Ahmad E, Barreto GE, Md Ashraf G. Ionic gradient liposomes: Recent advances in the stable entrapment and prolonged released of localanesthetics and anticancer drugs. *Biomed Pharmacother.* 2018;107:34-43.
97. Maherani B, Arab-Tehrany E, R. Mozafari M, Gaiani C, Linder M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience,* 2011;7(3), 436–452. doi:10.2174/157341311795542453.
98. Yoshimoto M, Okamoto M, Ujihashi K, Okita T. Selective oxidation of d-amino acids catalyzed by oligolamellar liposomes intercalated with d-amino acid oxidase. *Langmuir.* 2014;30(21):6180-6186. <https://doi.org/10.1021/la500786m>.
99. Pande S. Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. *Artif. cells nanomed. biotechnol.* 2023;51(1):428-440. <https://doi.org/10.1080/21691401.2023.2247036>.
100. Alavi M, Karimi N, Safaei M. Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. *Adv. Pharm. Bull.* 2017;7(1):3–9. doi:10.15171/apb.2017.002.
101. Lopez-Berestein G. Liposomes as carriers of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31(5):675–678. doi:10.1128/aac.31.5.675.
102. Has C, Sunthar P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. *J Liposome Res.* 2019 Sep 27;1-30.

103. He K, Tang M. Safety of novel liposomal drugs for cancer treatment: Advances and prospects. *Chem Biol Interact.* 2018 Nov 1;295:13-19.
104. Scheideler M, Vidakovic I, Prassl R. Lipid nanocarriers for microRNA delivery. *Chem Phys Lipids.* 2020 Jan;226:104837.
105. Shende P, Ture N, Gaud R. S, Trotta F. Lipid-and polymer-based plexes as therapeutic carriers for bioactive molecules. *Int. J. Pharm.* 2019;558:250-260. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.085>
106. Tseu G.Y.W, Kamaruzaman K.A. A Review of Different Types of Liposomes and Their Advancements as a Form of Gene Therapy Treatment for Breast Cancer. *Molecules* 2023;28, 1498. <https://doi.org/10.3390/molecules28031498>.
107. Choosakoonkriang S, Wiethoff C. M, Anchordoquy T. J, Koe G. S, Smith, J. G, Middaugh C. R. Infrared spectroscopic characterization of the interaction of cationic lipids with plasmid DNA. *J. Biol. Chem.* 2001;276(11):8037-8043. DOI: 10.1074/jbc.M010592200
108. Chieng Z. H, Mohyaldinn M. E, Hassan A. M, Bruining H. Experimental investigation and performance evaluation of modified viscoelastic surfactant (VES) as a new thickening fracturing fluid. *Polymers*, 2020;12(7), 1470. <https://doi.org/10.3390/polym12071470>
109. Nakanishi M, Inoh Y, Furuno T. New transfection agents based on liposomes containing biosurfactant MEL-A. *Pharmaceutics*, 2013;5(3):411-420. [10.3390/pharmaceutics5030411](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5030411)
110. Li L, He Z. Y, Wei X. W, Gao G. P, Wei Y. Q. Challenges in CRISPR/CAS9 delivery: potential roles of nonviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 2015;26(7):452-462. [10.1089/hum.2015.069](https://doi.org/10.1089/hum.2015.069)
111. Nardo D, Henson D, Springer J. E, Venditto V. J. Modulating the immune response with liposomal delivery. In *Nanomaterials for Clinical Applications* 2020;(pp. 159-211). Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-12-816705-2.00006-0
112. Labas R, Beilvert F, Barteaux B, David, S, Chèvre R, Pitard B. Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis. *Genetica*, 2009;138(2):153–168. [doi:10.1007/s10709-009-9405-8](https://doi.org/10.1007/s10709-009-9405-8)
113. Kapoor M, Burgess D.J, Patil S.D. Physicochemical characterization techniques for lipid based delivery systems for siRNA. *Int. J. Pharm.* 2012;427:35– 57.
114. Filipczak N, Pan J, Yalamarty SSK, Torchilin VP. Recent advancements in liposome technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2020;156:4–22.
115. Shende P, Turea N, Gauda RS, Trotta F. Lipid- and polymer-based plexes as therapeutic carriers for bioactive molecules. *Int. J. Pharm.* 2019;558:250–260.
116. Ciani L, Ristori S, Salvati E, Martelli F, Tata A. M, Cavedo E. Cholesterol content in rafts and neuropathological changes in Alzheimer's disease. *J. lipid res.* 2004;45(6):104-110.

117. Xiong F, Mi Z, Gu N, Mao Y, Qiu D, Zhang Y. Preparation and evaluation of pH-sensitive liposomes encapsulating doxorubicin for reversal of multidrug resistance. *J. Liposome Res.* 2011;21(4):333-340.
118. Kim H. J, Takemoto H, Yi Y, Zheng M, Maeda Y, Chaya H, et al. Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano*, 2015;9(1):105-116.
119. Arduin A, Gaffney P. R, & Ces O. Regulation of PLC β 2 by the electrostatic and mechanical properties of lipid bilayers. *Scientific reports*, 2015;5(1), 12628. DOI: 10.1038/srep12628.
120. Peng L, Minbo H, Fang C, Xi L, Chaocan Z. The interaction between cholesterol and human serum albumin. *Protein Pept. Lett.* 2008;15(4):360-364. 10.2174/092986608784246542.
121. Ostroumova O. S, Efimova S. S, Mikhailova E. V, & Schagina L. V. The interaction of dipole modifiers with amphotericin-ergosterol complexes. Effects of phospholipid and sphingolipid membrane composition. *Eur. biophys. j.* 2014;43:207-215. DOI 10.1007/s00249-014-0946-0
122. Tikhonov A. M, Asadchikov V. E, Volkov Y. O. On the formation of a macroscopically flat phospholipid membrane on a hydrosol substrate. *JETP letters*, 2015;102:478-482. 10.1134/S0021364015190157.
123. Zhang L, Hao C, Feng Y, Gao F, Lu X, Li J, Sun R. Analysis of the induction of the myelin basic protein binding to the plasma membrane phospholipid monolayer. *Chinese Physics B*, 2016;25(9), 090507. doi:10.1088/1674-1056/25/9/090507
124. Popplewell L. J, Abu-Dayya A, Khanna T, Flinterman M, Khalique N. A, Raju, L, et al. Novel cationic carotenoid lipids as delivery vectors of antisense oligonucleotides for exon skipping in Duchenne muscular dystrophy. *Molecules*, 2012;17(2):1138-1148. 10.3390/molecules17021138.
125. Lila A. S. A, Ishida T. Liposomal delivery systems: design optimization and current applications. *Biol. Pharm. Bull.* 2017;40(1):1-10. 10.1248/bpb.b16-00624.
126. Zhang Y, Huang L. Liposomal delivery system. *Nanoparticles for Biomedical Applications*, 2020;145-152. 10.1016/b978-0-12-816662-8.00010-2
127. Wakaskar R. R. Cancer Therapy with Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics*, 2017;08(01). doi:10.4172/2153-0645.100e158
128. Batist G, Barton J, Chaikin P, Swenson C, Welles L. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2002;3(12):1739-1751. doi:10.1517/14656566.3.12.1739.
129. Allen T. M, Martin F. J. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Seminars in Oncology*, 2004;31, 5-15. doi:10.1053/j.seminoncol.2004.08.

130. Abdellatif A. A, Alsowinea A. F. Approved and marketed nanoparticles for disease targeting and applications in COVID-19. *Nanotechnology Reviews*, 2021;10(1), 1941-1977. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2021-0115>.
131. Chang H. I, Yeh M. K. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. *Int J Nanomedicine*. 2012;49-60. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26766>
132. Doxil Reçete Bilgileri FDA, 2007. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/050718s029lbl.pdf (Son erişim: 08.08.2024).
133. Giodini L, Re F. L, Campagnol D, Marangon E, Posocco B, Dreussi E, ve ark. Nanocarriers in cancer clinical practice: a pharmacokinetic issue. *NBM*. 2017;13(2):583–599. doi:10.1016/j.nano.2016.07.012
134. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*, 2017;9(2), 12. doi:10.3390/pharmaceutics9020012
135. Liu P, Chen G, Zhang J. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*. 2022;27(4):1372. <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>
136. Alphandéry E, Grand-Dewyse P, Lefèvre R, Mandawala C, Durand-Dubief M. Cancer therapy using nanoformulated substances: scientific, regulatory and financial aspects. *Expert Rev. Anticancer Ther*. 2015;15(10):1233–1255. doi:10.1586/14737140.2015.1086647
137. Laura Immordino M, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):297–315. <https://doi.org/10.2147/DIIN.1.S633>
138. Dawidczyk C. M, Kim C, Park J. H, Russell L. M, Lee K. H, Pomper M. G, ve ark. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *JCR*. 2014;187:133–144. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.036
139. Vyxeos Reçete Bilgileri FDA, Jazz Pharmaceuticals, 2017. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209401s000lbl.pdf (Son erişim: 08.08.2024).
140. Mayer L. D, Tardi P, Louie A. C. CPX-351: a nanoscale liposomal co-formulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties. *Int J Nanomedicine*, 2019;3819-3830. <https://doi.org/10.2147/IJN.S139450>
141. Palchetti S, Digiacoimo L, Pozzi D, Zenezini Chiozzi R, Capriotti A. L, Lagana A, ve ark. Effect of glucose on liposome–plasma protein interactions: relevance for the physiological response of clinically approved liposomal formulations. *Advanced Biosystems*, 2019;3(2), 1800221. DOI: 10.1002/adbi.201800221.

142. Apte A, Koren E, Koshkaryev A, & Torchilin V. P. Doxorubicin in TAT peptide- modified multifunctional immunoliposomes demonstrates increased activity against both drug- sensitive and drug-resistant ovarian cancer models. *Cancer Biology & Therapy*, 2013;15(1), 69–80. doi:10.4161/cbt.26609.
143. Murry D. J, Blaney S. M. Clinical pharmacology of encapsulated sustained-release cytarabine. *Annals of Pharmacotherapy*, 2000;34(10), 1173-1178. <https://doi.org/10.1345/aph.19347>
144. Rex J. H, Stevens D. A. Drugs active against fungi, pneumocystis, and microsporidia. In Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases 2015;(pp. 479-494). WB Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00039-4>
145. Li Z, Perkins W, Cipolla D. Robustness of aerosol delivery of amikacin liposome inhalation suspension using the eFlow® Technology. *Eur J Pharm Biopharm*. 2021;166:10-18. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.05.021>
146. Definity FDA NDA 21-064/s024, 2020. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/021064Orig1s024.pdf (Son erişim: 08.08.2024)
147. DEPODUR - morphine sulfate injection, lipid complex Pacira Pharmaceuticals Inc. NDA 21-671/S-020, 2008. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/021671s020lbl.pdf (Son erişim: 08.08.2024)
148. Shingrix Reçete Bilgileri FDA, GSK, 2023. <https://www.fda.gov/media/108597/download> (Son erişim: 08.08.2024)
149. Diprivan Reçete Bilgileri FDA, Fresenius Kabi, 2022. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/019627s069lbl.pdf (Son erişim: 08.08.2024)
150. Nilsson N, Nezvalova-Henriksen K, & Tho I. Emulsion stability of different intravenous propofol formulations in simulated co-administration with remifentanil hydrochloride. *Pharm. Technol. Hosp. Pharm*. 2019;4(2):77-87. <https://doi.org/10.1515/pthp-2019-0014>
151. Simoni R. F, Miziara L. E. D. P. G, Esteves L. O, D'Castro J. G. R, Morales Jr, C. A, Sandrin C. E. E,ve ark. Pharmacodynamic evaluation and physical/chemical analysis of two formulations of propofol used in target-controlled infusion. *Rev Bras Anesthesiol*. 2013;63:66-72. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942013000100005>
152. Exparel Reçete Bilgileri FDA, Pacira Pharmaceuticals, Inc, 2018. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/022496s9lbl.pdf (Son erişim: 08.08.2024)
153. Li R, Liang H, Li J, Shao Z, Yang D, Bao J,ve ark. Paclitaxel liposome (lipusu) based chemotherapy combined with immunotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a multicenter, retrospective real-world study. *BMC cancer*, 2024;24(1), 107. doi:10.1186/s12885-024-11860-3.

154. Zhou H, Yan J, Chen W, Yang J, Liu M, Zhang Y, ve ark. Population pharmacokinetics and exposure–safety relationship of paclitaxel liposome in patients with non-small cell lung cancer. *Frontiers in oncology*, 2021;10, 1731. doi:10.3389/fonc.2020.01731.
155. Onpattro Reçete Bilgileri FDA, Alnylam Pharmaceuticals, 2018. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210922s0001bl.pdf (Son erişim: 08.08.2024)
156. Onpattro EMA Assessment report 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/onpattro-epar-public-assessment-report_en.pdf (Son erişim: 08.08.2024).
157. Comirnaty Reçete Bilgileri FDA, Biontech, 2023. <https://www.fda.gov/media/151707/download> (Son erişim: 08.08.2024)
158. Szebeni J, Kiss B, Bozó T, Turjema K, Levi-Kalisman, Y, Barenholz Y, & Kellermayer M. Insights into the Structure of Comirnaty Covid-19 Vaccine: A Theory on Soft, Partially Bilayer-Covered Nanoparticles with Hydrogen Bond-Stabilized mRNA–Lipid Complexes. *ACS nano*, 2023;17(14):13147–13157. doi:10.1021/acsnano.2c11904
159. Moderna Reçete Bilgileri FDA, Moderna, 2022. <https://www.fda.gov/media/144637/download> (Son erişim: 08.08.2024)
160. Zhang L, More K. R, Ojha A, Jackson C. B, Quinlan B. D, Li H, ve ark. Effect of mRNA-LNP components of two globally-marketed COVID-19 vaccines on efficacy and stability. *NPJ Vaccines*, 2023;8(1), 156. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00751-6>
161. Spikevax Reçete Bilgileri FDA, Moderna, 2024. <https://www.fda.gov/media/155675/download> (Son erişim: 08.08.2024)
162. Mehta M, Bui TA, Yang X, Aksoy Y, Goldys EM, Deng W. Lipid-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery: An Overview of the Production Techniques and Difficulties Encountered in Their Industrial Development. *ACS Materials Au*. 2023;3(6):600–619 doi: 10.1021/acsmaterialsau.3c00032
163. Karpe S, Gupta K, Vyas G, Rana P, Khan F, & Kumar R. Virosome: A vector in vaccine delivery. In *BIO Web of Conferences*. EDP Sciences. 2024;86:01020. doi:10.1051/bioconf/20248601020.
164. Herzog C, Hartmann K, Künzi V, Kürsteiner O, Mischler R, Lazar H ve ark. Eleven years of Inflexal® V—a virosomal adjuvanted influenza vaccine. *Vaccine*, 2009;27(33):4381–4387. doi:10.1016/j.vaccine.2009.05.029
165. Koynova R, Tenchov B. Recent Progress in Liposome Production, Relevance to Drug Delivery and Nanomedicine. *RECENT PAT NANOTECH*. 2015;9(2):86–93. doi:10.2174/187221050902150819151721
166. Meure L. A, Foster N. R, Dehghani F. Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review. *AAPS PharmSciTech*, 2008;9(3):798–809. doi:10.1208/s12249-008-9097-x
167. Lombardo D, Kiselev M. A. Methods of liposomes preparation: formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine

- application. *Pharmaceutics*. 2022;14(3),543.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>
168. Pattni B, Chupin V, Torchilin V. New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*, 2015;115:10938–10966.
169. Forbes N, Hussain M. T, Briuglia M. L, Edwards D. P, Horst J. H, Szita N, ve ark. Rapid and scale-independent microfluidic manufacture of liposomes entrapping protein incorporating in-line purification and at-line size monitoring. *Int. J. Pharm.*, 2019;556:68–81.
170. Maeki M, Kimura N, Sato Y, Harashima H, & Tokeshi M. Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2018;128: 84–100.
171. Jahn A, Vreeland WN, DeVoe DL, Locascio LE, Gaitan, M. Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir*. 2007;23(11):6289-6293. doi:10.1021/LA070051A
172. Majekodunmi S. O. Review of current trends in enhancing bioavailability of poorly water soluble drugs by liposomal interventions. *J. Pharm*, 2016;6(8-1):30-39.
173. Lin M, Wang R, Qi X.-R. Quality Evaluation of Drug-Loaded Liposomes. *Liposome-Based Drug Delivery Systems*, 2018;1–17. doi:10.1007/978-3-662-49231-4_25-1
174. Jyothi V. G. S, Bulusu R, Rao B. V. K, Pranothi M, Band S, Bolla P. K, Kommineni N. Stability characterization for pharmaceutical liposome product development with focus on regulatory considerations: An update. *Int. J. Pharm.*, 2022;624, 122022. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122022>
175. Jiang W, Lionberger R, Yu L. X. In vitro and in vivo characterizations of PEGylated liposomal doksorubisin. *Bioanalysis*, 2011;3(3), 333–344. doi:10.4155/bio.10.204
176. Jain A. K, Thareja S. In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artif. cells nanomed. biotechnol*. 2019;47(1):524-539. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1561457>
177. Kapoor B, Gupta R, Gulati M, Singh S. K, Khursheed R, Gupta M. The Why, Where, Who, How, and What of the vesicular delivery systems. *Adv. Colloid Interface Sci*. 2019;271, 101985. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.07.006>
178. Mohamed M, Abu Lila A. S, Shimizu T, Alaaeldin E, Hussein A, Sarhan H. A, ve ark. PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci. Technol. Adv. Mater*. 2019;20(1):710-724. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1627174>
179. Trucillo P, Campardelli R, Reverchon E. Liposomes: From bangham to supercritical fluids. *Processes*, 2020;8(9), 1022. <https://doi.org/10.3390/pr8091022>

180. Bibi S, Kaur R, Henriksen-Lacey M, McNeil S. E, Wilkhu J, Lattmann E, ve ark. Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *Int. J. Pharm.*, 2011;417(1-2):138–150. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.021
181. Su C, Liu Y, He Y, Gu J. Analytical methods for investigating in vivo fate of nanoliposomes: A review. *J. Pharm. Anal.* 2018;8(4):219-225. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2018.07.002>
182. Duke S.D, Brown, R.E, Layendecker E.B. Calibration of spherical particles by light scattering using photon correlation spectroscopy. *Part. Sci. Technol.*, 1989;7(3):223–228. doi:10.1080/02726358908906540
183. Kato H. Laser Scattering Spectroscopy: Rayleigh Scattering and Dynamic Light Scattering. In *Handbook of Laser Technology and Applications 2021*; (pp. 197-205). CRC Press.
184. Brittain H. G. Particle-size distribution IV: Determination by laser-light scattering. *Pharmaceutical technology* 2003;27(10):102-114.
185. Zanetti-Ramos B. G, Fritzen-Garcia M. B, Creczynski-Pasa T. B, Oliveira C. S. D, Pasa A. A, Soldi V, ve ark. Characterization of Polymeric Particles with Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering, and Atomic Force Microscopy. *Part. Sci. Technol.*, 2010;28(5):472–484. doi:10.1080/02726351.2010.504133
186. Mittal V, Matsko N. B. Microscopic analysis of the surface functionalization of polymer particles and subsequent grafting of polymer chains from the surface. *J. Electron Microsc. Tech.* 2012; 61(6):367–380. doi:10.1093/jmicro/dfs053"
187. Mavrocordatos D, Pron W, Boller, M. Analysis of environmental particles by atomic force microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Water Sci Technol.* 2004;50(12):9–18. doi:10.2166/wst.2004.0690
188. Filippov S. K, Khusnutdinov R, Murmiliuk A, Inam W, Zakharova L. Y, Zhang H, ve ark. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. *Materials Horizons*, 2023;10(12):5354- 5370. DOI: 10.1039/D3MH00717K
189. Krpetić Ž, Davidso A. M, Volk, M, Lév R, Brust, M, Cooper D. L. High-Resolution Sizing of Monolayer-Protected Gold Clusters by Differential Centrifugal Sedimentation. *ACS Nano*, 2013;7(10):8881–8890. doi:10.1021/nn403350v
190. Machtle W. Centrifugation in Particle Size Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2006. doi:10.1002/9780470027318.a1502
191. Mehn D, Iavicoli P, Cabaleiro N, Borgos S. E, Caputo F, Geiss O, ve ark. Analytical ultracentrifugation for analysis of doksorubisin loaded liposomes. *Int. J. Pharm.*, 2017;523(1):320–326. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.03.046
192. Chan M. Y, Dowling Q. M, Sivananthan S. J, Kramer, R. M. Particle Sizing of Nanoparticle Adjuvant Formulations by Dynamic Light Scattering (DLS)

- and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). *Vaccine Adjuvants*, 2016;239–252. doi:10.1007/978-1-4939-6445-1_17
193. Wright M. Nanoparticle Tracking Analysis for the Multiparameter Characterization and Counting of Nanoparticle Suspensions. *NBM*, 2012;511–524. doi:10.1007/978-1-61779-953-2_41
194. Qazi S. J. S, Rennie A. R, Cockcroft J. K, Vickers M. Use of wide-angle X-ray diffraction to measure shape and size of dispersed colloidal particles. *J. Colloid Interface Sci.*, 2009;338(1):105–110. doi:10.1016/j.jcis.2009.06.006
195. Ingham B. X-ray scattering characterisation of nanoparticles. *Crystallography Reviews*. 2015;21(4):229–303. doi:10.1080/0889311x.2015.1024114
196. Jenkins R. X-Ray Techniques: Overview. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 2006. doi:10.1002/9780470027318.a6801
197. Lykouras M, Fertaki S, Orkoula M, Kontoyannis C. Sample Preparation of Posaconazole Oral Suspensions for Identification of the Crystal Form of the Active Pharmaceutical Ingredient. *Molecules*, 2020;25(24),6032. doi:10.3390/molecules25246032
198. Blanchet C. E, Svergun D. I. Small-Angle X-Ray Scattering on Biological Macromolecules and Nanocomposites in Solution. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2013;64(1):37–54. doi:10.1146/annurev-physchem-040412-110132
199. Li T, Senesi A. J, Lee B. Small Angle X-ray Scattering for Nanoparticle Research. *Chemical Reviews*, 2016;116(18):11128–11180. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00690
200. Granger J, Dodds J. Two Different Configurations of Flow Field-Flow Fractionation for Size Analysis of Colloids. *Sep. Sci. Technol.* 1992;27(13):1691–1709. doi:10.1080/01496399208019441
201. Hee Song J, Kim W, Woon Lee D. Comparison of Retention Behavior of Various Polystyrene Latex Particles and Gold Colloids on Different Channel Walls in Flow Field-Flow Fractionation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2003;26(18):3003–3035. doi:10.1081/jlc-120025416
202. Thielking H, Roessner D, Kulicke W.-M. Online Coupling of Flow Field-Flow Fractionation and Multiangle Laser Light Scattering for the Characterization of Polystyrene Particles. *Analytical Chemistry*, 1995;67(18):3229–3233. doi:10.1021/ac00114a020
203. Lyklema J, Rovillard S, De Coninck J. Electrokinetics: The Properties of the Stagnant Layer Unraveled. *Langmuir*, 1998;14(20):5659–5663. doi:10.1021/la980399t
204. Feng Y, Kilker S. R, Lee Y. Surface charge (zeta-potential) of nanoencapsulated food ingredients. *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients*, 2020;213–241. doi:10.1016/b978-0-12-815667-4.00007-9
205. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. *JCR*, 2016;235:337–351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017

206. Uskoković V. Dynamic Light Scattering Based Microelectrophoresis: Main Prospects and Limitations. *J. Dispers. Sci. Technol.* 2012;33(12):1762–1786. doi:10.1080/01932691.2011.625523
207. O'Brien R. W, Cannon D. W, Rowlands W. N. Electroacoustic Determination of Particle Size and Zeta Potential. *J. Colloid Interface Sci.*, 1995;173(2):406–418. doi:10.1006/jcis.1995.1341
208. Mohammadi-Jam S, Waters K. E, Greenwood R. W. A review of zeta potential measurements using electroacoustics. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2022;309, 102778. doi:10.1016/j.cis.2022.102778
209. Dukhin A. S, Parlia S. Measuring zeta potential of protein nano-particles using electroacoustics. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2014;12:257–263. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.048
210. Tekrony A, Cramb D. Determination of the mobility of amine- and carboxy-terminated fluospheres and quantum dots by capillary electrophoresis. *Can. J. Chem.* 2016;94(4):430–435. doi:10.1139/cjc-2015-0349
211. González-Peña R. J, Sánchez-Muñoz O. L, Martínez-Celorio R. A, Cibrián R. M, Salvador-Palmer R, Salgado J. ζ -potential determination using a ZetaMeter-Dynamic Speckle assembly. *Speckle 2012: V International Conference on Speckle Metrology.* doi:10.1117/12.977785
212. Savchenko E, Velichko E. New techniques for measuring zeta-potential of colloidal system. *Optical and Nano-Technologies for Biology and Medicine* 2019;11065:432-438. doi:10.1117/12.2523345.
213. Cirera S, Busk P. K. Quantification of miRNAs by a Simple and Specific qPCR Method. *Methods Mol. Biol.* 2014;73–81. doi:10.1007/978-1-4939-1062-5_7
214. Lu D. P, Read R. L, Humphreys D. T, Battah F. M, Martin D. I, Rasko J. E. PCR-based expression analysis and identification of microRNAs. *Journal of RNA and Genomics research*, 2005;1(1), 44.
215. Wang X. A PCR-based platform for microRNA expression profiling studies. *RNA*, 2009;15(4):716– 723. doi:10.1261/rna.1460509
216. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton E. F, Hellens R. P. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 2007;3(1), 12. doi:10.1186/1746-4811-3-12
217. Kang K, Zhang X, Liu H, Wang Z, Zhong J, Huang Z, et al. A Novel Real-Time PCR Assay of microRNAs Using S- Poly(T), a Specific Oligo(dT) Reverse Transcription Primer with Excellent Sensitivity and Specificity. *PLoS ONE*, 2012;7(11), e48536. doi:10.1371/journal.pone.0048536
218. Balcells I, Cirera S, Busk P. K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnology*, 2011;11(1), 70. doi:10.1186/1472-6750-11-70
219. Chan K. K, Liu Z, Xie Z, Chiu M, Wang H, Chen P, et al. A Novel Ultrasensitive Hybridization-Based ELISA Method for 2-Methoxyphosphorothiolate MicroRNAs and Its In vitro and In vivo

- Application. *The AAPS Journal*, 2010;12(4):556–568. doi:10.1208/s12248-010-9214-0
220. Lorenz J. PCR/qPCR. *The International Encyclopedia of Biological Anthropology*, 2018;1–2. doi:10.1002/9781118584538.ieba0368
10.1002/9781118584538.ieba036
221. Delidow B. C, Lynch J. P, Peluso J. J, White, B. A. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocols. *PCR Protocols*, 1993;1–30. doi:10.1385/0-89603-244-2:1
222. Joshi M, Deshpande J. D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* 2011;2(1). doi:10.7439/ijbr.v2i1.83
223. Valones M. A. A, Guimarães R. L, Brandão L. A. C, Souza P. R. E. de, Carvalho A. de A. T, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz. J. Microbiol.* 2009;40(1), 1–11. doi:10.1590/s1517-83822009000100001
224. Deepak S.A, Kottapalli K.R, Rakwal R, Oros G, Rangappa K.S, Iwahashi H, ve ark. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*, 2007;8(4):234–251. doi:10.2174/138920207781386960
225. Garibyan L, Avashia N. Polymerase Chain Reaction. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):1–4. doi:10.1038/jid.2013.1
226. Lorenz T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp*, 2012;(63). doi:10.3791/3998
227. Gaastra W. Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELBA). *Proteins*, 1984;349–356. doi:10.1385/0-89603-062-8:349
228. Ekremoğlu M, Altınkaynak C. Elisa sisteminde protein-inorganik hibrit konjugatın kullanılabilirliği. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 2020;9(2), 226-238. <https://doi.org/10.18036/estubtdc.604509>
229. Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. In: Matson, R.S. (eds) *ELISA. Methods Mol. Biol.* 2023;2612. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2903-1_1
230. Khan M, Shah S. H, Salman M, Abdullah M, Hayat F, Akbar S. Enzyme-linked immunosorbent assay versus chemiluminescent immunoassay: A general overview. *Glob. j. med. pharm. biomed. update.* 2023;18. doi:10.25259/GJMPBU_77_2022.
231. Hornbeck P, Winston S.E, Fuller S.A. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA). *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. doi:10.1002/0471142727.mb1102s15
232. Stejskal D, Hlozankova M, Sigutova R, Andelova K, Svagera Z, Svestak M. Comparison of a new immunoassay and PCR-based method for quantification of microRNAs in whole blood. A pilot methodical study. *Biomed Pap Med*

- Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2019;163(1):39-44. doi: 10.5507/bp.2018.080
233. Amri J, Molaee N, Baazm M, Karami H. Targeting epidermal growth factor receptor by MiRNA-145 inhibits cell growth and sensitizes NSCLC cells to Erlotinib. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 2019;20(9), 2781. doi:10.31557/APJCP.2019.20.9.2781.
234. Ibrahim A. F, Weirauch U, Thomas M, Grünweller A, Hartmann R. K, Aigner A. MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. *Cancer research*, 2011;71(15):5214-5224. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4645
235. Havel P. UC Davis-ELISA Protocol. MMPC Live Protocols. 2019. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.yibfuan>
236. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br. J. Hosp. Med.* 2016;77(7):C98–C101. doi:10.12968/hmed.2016.77.7.c98
237. Dehalu V, Weigel S, Rebe S, Grombe R, Löbenberg R, Delahaut P. Production and characterization of antibodies against crosslinked gelatin nanoparticles and first steps toward developing an ELISA screening kit. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012;403(10):2851–2857. doi:10.1007/s00216-012-5793-1
238. <https://www.ufluidic.com/product/sm3-300um-z300-serpentine-mixing-microfluidics-chip> (Son erişim: 07.2020).
239. Küpeli Akkol E, Güngör Ak A, Karataş A. Preparation and optimization of berberine phospholipid complexes using QbD approach and in vivo evaluation for anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity. *J. Pharm. Res.* 2022;26(2):370-382. <http://dx.doi.org/10.29228/jrp.135>
240. Grangeia HB, Silva C, Simões SP, ve ark. Quality by Design in Pharmaceutical Manufacturing: a systematic review of current status, challenges and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2019;147:19-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.007>
241. Namjoshi S, Dabbaghi M, Roberts M. S, Grice J. E, Mohammed Y. Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products. *Pharmaceutics*, 2020;12(3),287. doi:10.3390/pharmaceutics12030287
242. Mogal V, Dusane J, Borase P, Thakare P, Kshirsagar S. A review on quality by design. *Pharm Biol Eval*, 2016;3, 313-9.
243. Gage G. P, Rudrapal M, Jadhav A. G, Borse L. B, Bendale A. R. Review on quality by design (QbD). *Asian J Pharm Educ Res*, 2020;9(2), 37. <https://doi.org/10.38164/ajper/9.2.2020.37-49>
244. Patil H. D, Patil C. B, Patil V. V, Patil P. S. An overview on quality by design. *AJPSci.* 2023;12(1):49-55. doi:10.52711/2231-5659.2023.00009.
245. Khan A, Naquvi K. J, Haider M. F, Khan M. A. Quality by design-newer technique for pharmaceutical product development. *Intelligent Pharmacy.* 2023;2(1):122-129. doi:10.1016/j.ipha.2023.10.004

246. Patil A. S, Pethe A. M. Quality by Design (QbD): A new concept for development of quality pharmaceuticals. *Int. J. Pharm. Qual. Assur.* 2013;4(2):13-19. <https://doi.org/10.25258/IJPQA.4.2.1>
247. ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development, EMA/CHMP/ICH/167068/2004.
248. Sylvester B, Porfire A, Achim M, ve ark. A step forward towards the development of stable freeze-dried liposomes: a quality by design approach (QbD). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2018;44(3):385-397. doi: <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1395457>
249. Politis NS, Colombo P, Colombo G, ve ark. Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2017;43(6):889–901. doi: <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1291672>
250. Erdoğan N, Esendağlı G, Nielsen T. T, Şen M, Öner L, Bilensoy E. Design and optimization of novel paclitaxel-loaded folate-conjugated amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 2016;509(1-2):375-390. <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.040>
251. Dabbas S, Kaushik R. R, Dandamudi S, Kuesters G. M, Campbell R. B. Importance of the Liposomal Cationic Lipid Content and Type in Tumor Vascular Targeting: Physicochemical Characterization and In Vitro Studies Using Human Primary and Transformed Endothelial Cells. *Endothelium*, 2008;15(4):189–201. doi:10.1080/10623320802228583
252. Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, Tamaki K, Ozaki K. I, Onishi H. Effect of cationic lipid type in PEGylated liposomes on siRNA delivery following the intravenous injection of siRNA lipoplexes. *World Acad. Sci. J.* 2019;1(2):74-85. doi:10.3892/wasj.2019.8.
253. Németh Z, Csóka I, Semnani Jazani R, ve ark. Quality by Design-Driven Zeta Potential Optimisation Study of Liposomes with Charge Imparting Membrane Additives. *Pharmaceutics* 2022;14(9):1798. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091798>
254. Korucu Aktas P, Baysal I, Yabanoglu-Ciftci S, ve ark. Development and In Vitro Evaluation of Crizotinib- Loaded Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles Using Box–Behnken Design in Non-small Cell Lung Cancer. *AAPS PharmSciTech.* 2023;24(7):178. <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02634-4>
255. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, ve ark. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front. Pharmacol.* 2015;6:286. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
256. Xu X, Costa AP, Khan MA, ve ark. Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *Int. J. Pharm.* 2012;434(1-2):349–359. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.002>
257. Qi L, Xiaosi L, Chao Z, ve ark. Strategies to Obtain Encapsulation and Controlled Release of Small Hydrophilic Molecules. *Front. bioeng. biotechnol.* 2020;8:437. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00437>

258. Yan Y, Li XQ, Duan JL, ve ark. Nanosized functional miRNA liposomes and application in the treatment of TNBC by silencing Slug gene. *Int J Nanomedicine* 2019;14:3645-3667. <https://doi.org/10.2147/IJN.S207837>
259. Lujan H, Griffin WC, Taube JH, ve ark. Synthesis and characterization of nanometer-sized liposomes for encapsulation and microRNA transfer to breast cancer cells. *Int J Nanomedicine* 2019;14:5159-5173. <https://doi.org/10.2147/IJN.S203330>
260. He K, Huang X, Shan R, ve ark. Intra-articular Injection of Lornoxicam and MicroRNA-140 Co-loaded Cationic Liposomes Enhanced the Therapeutic Treatment of Experimental Osteoarthritis. *AAPS PharmSciTech*. 2022;23(1):9. <https://doi.org/10.1208/s12249-021-02149-w>
261. Boafo GF, Magar KT, Ekpo MD, ve ark. The Role of Cryoprotective Agents in Liposome Stabilization and Preservation. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(20):12487. <https://doi.org/10.3390/ijms232012487>
262. Nagendra G, Srinivasa B. P, Ravi, S. P. Development And Validation of UV Spectrophotometric Method for the Determination of Nintedanib in Pharmaceutical Dosage Form. *IJBPAS*. 2023;12(4): 1488-1497. <https://doi.org/10.31032/IJBPAS/2023/12.4.7014>
263. Oppe T. P, Menegola J, Schapoval E. E. S. Development and validation of UV spectrophotometry and liquid chromatography methods for determination of cefpirome in raw material and pharmaceutical dosage. *DOAJ*. 2019;3(1):42-50. <https://doi.org/10.22456/2527-2616.93809>
264. Han L, Zhan H, Sun X, Zhang Z.-R, Deng L. A Density-Changing Centrifugation Method for Efficient Separation of Free Drugs from Drug-Loaded Particulate Delivery Systems. *The AAPS Journal*, 2019;21(3). doi:10.1208/s12248-019-0306-1
265. Englinger B, Kallus S, Senkiv J, Heilos D, Gabler L, Schoonhoven S, ve ark. Intrinsic fluorescence of the clinically approved multikinase inhibitor nintedanib reveals lysosomal sequestration as resistance mechanism in FGFR-driven lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2017;36:122.
266. Huu V. A, Luo J, Zhu J, Zhu J, Patel,S, Boone A, ve ark. Light-responsive nanoparticle depot to control release of a small molecule angiogenesis inhibitor in the posterior segment of the eye. *JCR*, 2015;200:71–77.
267. Tabatabaei S. N, Derbali R. M, Yang C, Superstein R, Hamel P, Chain J. L, ve ark. Co-delivery of miR-181a and melphalan by lipid nanoparticles for treatment of seeded retinoblastoma. *JCR*, 2019;298:177–185.
268. Tao J, Ding W, Che X, ve ark. Optimization of a cationic liposome-based gene delivery system for the application of miR-145 in anticancer therapeutics. *Int. J. Mol. Med.* 2016;37(5):1345-1354. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2530>
269. Patel P, Patel M. Enhanced oral bioavailability of nintedanib esylate with nanostructured lipid carriers by lymphatic targeting: In vitro, cell line and in

- vivo evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2021;159:105715. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105715>
270. Montgomery R. L, Yu G, Latimer P. A, Stack C, Robinson K, Dalby C. M, ve ark. MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO Molecular Medicine*, 2014;6(10):1347-1356.
271. Yabanoglu-Ciftci S, Baysal I, Erikci A, ve ark. Transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3) loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: Efficacy in preventing cardiac fibrosis induced by TGF- β 1. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2018;48:223–234. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.09.021>
272. Kondo T, Wada K, Kawashima M, Sato Y, Yamauchi M. High-Sensitivity Antitumor Drug Sensitivity Testing. *Oncology*, 1994;51(6):535–539. doi:10.1159/000227399
273. Gencer A, Baysal I, Nemutlu E, ve ark. Efficacy of siRNA-loaded nanoparticles in the treatment of K-RAS mutant lung cancer in vitro. *J. Microencapsul.*2022;39(3):261-275. <https://doi.org/10.1080/02652048.2022.2061058>
274. Luna C, Li G, Qiu J, Epstein D. L, Gonzalez P. Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress. *Molecular Vision*, 2009;15:2488-2497.
275. Kastner E, Kaur R, Lowry D, Moghaddam B, Wilkinson A, Perrie Y. High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *Int. J. Pharm.*, 2014;477(1-2):361-368. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.10.030
276. Gencer A, Duraloglu C, Ozbay S, ve ark. Recent Advances in Treatment of Lung Cancer: Nanoparticle- based Drug and siRNA Delivery Systems. *Curr. Drug Deliv.* 2021;18(2):103-120. <https://doi.org/10.2174/1567201817999200730211718>
277. Chen C, Han D, Cai C, Tang X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *JCR*, 2010;142(3), 299-311. [10.1016/j.jconrel.2009.10.024](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024)
278. Amis T. M, Renukuntla J, Bolla P. K, Clark B. A. Selection of cryoprotectant in lyophilization of progesterone-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutics*, 2020;12(9), 892. [10.3390/pharmaceutics12090892](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090892)
279. Velagacherla V, Nayak Y, Bhaskar K. V, Nayak U. Y. A stability indicating method development and validation of a rapid and sensitive RP-HPLC method for Nintedanib and its application in quantification of nanostructured lipid carriers. *F1000Research*, 2023;12, 1389. [10.12688/f1000research.138786.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.138786.1)
280. Güngör Ak A, Karataş A. Fitozom formülasyonundan berberin miktar tayini için HPLC yönteminin geliştirilmesi ve analitik validasyonu. *Eurasian J. Bio. Chem. Sci.* 2020;3(2):154-159. <https://doi.org/10.46239/ejbs.734561>

281. Ravisankar P, Niharika A, Anusha H, Himaja V, Basha S. A. A simple validated UV spectrophotometric method for quantitative analysis of Levetiracetam in pharmaceutical dosage form. *Indian J. Pharm. Res. and Biotechnology*. 2015;3(5):380.
282. Rahimi A. M, Cai M, Hoyer-Fender S. Heterogeneity of the NIH3T3 fibroblast cell line. *Cells*. 2022;11(17):2677. doi:10.3390/cells11172677
283. Kastner E, Verma V, Lowry D, ve ark. Microfluidic-controlled manufacture of liposomes for the solubilisation of a poorly water soluble drug. *Int. J. Pharm.* 2015;485(1-2):122-130. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.02.063>
284. Yanar F, Mosayyebi A, Nastruzzi C, ve ark. Continuous-flow production of liposomes with a millireactor under varying fluidic conditions. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1001. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111001>
285. Jaradat E, Weaver E, Meziane A, ve ark. Synthesis and Characterization of Paclitaxel-Loaded PEGylated Liposomes by the Microfluidics Method. *Mol. Pharmaceutics*. 2023;20(12):6184-6196. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00596>
286. Hamano N, Böttger R, Lee SE, ve ark. Robust microfluidic technology and new lipid composition for fabrication of curcumin-loaded liposomes: effect on the anticancer activity and safety of cisplatin. *Mol. Pharmaceutics*. 2019;16(9):3957-3967. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00583>
287. Vogelaar A, Marcotte S, Cheng J, ve ark. Use of microfluidics to prepare lipid-based nanocarriers. *Pharmaceutics*. 2023;15(4):1053. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041053>
288. Tiboni M, Tiboni M, Pierro A, ve ark. Microfluidics for nanomedicines manufacturing: An affordable and low- cost 3D printing approach. *Int. J. Pharm.* 2021;599:120464. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120464>
289. Liu H, Rivnay B, Avery K, ve ark. Optimization of the manufacturing process of a complex amphotericin B liposomal formulation using quality by design approach. *Int J Pharm.* 2020;30;585:119473. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119473>
290. Németh Z, Pallagi E, Dobó DG, ve ark. An updated risk assessment as part of the QbD-based liposome design and development. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):1071. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071071>
291. Dobó DG, Németh Z, Sipos B, ve ark. Pharmaceutical Development and Design of Thermosensitive Liposomes Based on the QbD Approach. *Molecules*. 2022;27:1536. <https://doi.org/10.3390/molecules27051536>
292. Kala SG, Chinni S. Bioavailability enhancement of vitamin E TPGS liposomes of nintedanib esylate: formulation optimization, cytotoxicity and pharmacokinetic studies. *Drug Deliv Transl Res.* 2022;12(11):2856-2864. <https://doi.org/10.1007/s13346-022-01148-z>

293. Kallus S, Englinger B, Senkiv J, ve ark. Nanoformulations of anticancer FGFR inhibitors with improved therapeutic index. *Nanomedicine: NBM*. 2018;14(8):2632-2643. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.08.001>
294. Sun L, Fan M, Huang D, ve ark. Clodronate-loaded liposomal and fibroblast-derived exosomal hybrid system for enhanced drug delivery to pulmonary fibrosis. *Biomaterials*. 2021;271:120761. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120761>
295. Ji K, Fan M, Huang D, ve ark. Clodronate-nintedanib-loaded exosome–liposome hybridization enhances the liver fibrosis therapy by inhibiting Kupffer cell activity. *Biomaterials Science*. 2022;10(3):702-713. doi:<https://doi.org/10.1039/D1BM01663F>
296. Fu Y, Saraswat A, Wei Z, ve ark. Development of Dual ARV-825 and Nintedanib-Loaded PEGylated Nano- Liposomes for Synergistic Efficacy in Vemurafnib Resistant Melanoma. *Pharmaceutics*. 2021;13:1005. doi:<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071005>
297. Ferguson LT, Ma X, Myerson JW, ve ark. Mechanisms by Which Liposomes Improve Inhaled Drug Delivery for Alveolar Diseases. *Adv. NanoBiomed Res*. 2023;3:2200106. <https://doi.org/10.1002/anbr.202200106>
298. Han MM, He XY, Tang L, ve ark. Nanoengineered mesenchymal stem cell therapy for pulmonary fibrosis in young and aged mice. *Sci. Adv*. 2023;9(29):5358. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg5358>
299. Chishti N, Jagwani S, Dhamecha D, ve ark. Preparation, optimization, and in vivo evaluation of nanoparticle- based formulation for pulmonary delivery of anticancer drug. *Medicina*. 2019;55(6):294. <https://doi.org/10.3390/medicina55060294>
300. Sedighi M, Sieber S, Rahimi F, ve ark. Rapid optimization of liposome characteristics using a combined microfluidics and design-of-experiment approach. *Drug Deliv. Transl. Res*. 2019;9:404-413. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0587-4>
301. Rose F, Wern JE, Ingvarsson PT, ve ark. Engineering of a novel adjuvant based on lipid-polymer hybrid nanoparticles: A quality-by-design approach. *JCR*. 2015;210:48-57. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.05.004>
302. Tefas LR, Sylvester B, Tomuta I, ve ark. Development of antiproliferative long-circulating liposomes co- encapsulating doksorubisin and curcumin, through the use of a quality-by-design approach. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:1605-1621. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S129008>
303. Shaker S, Gardouh AR, Ghorab MM. Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method. *RPS*. 2017;12(5):346-352. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.213979>
304. Edwards K, Baeumner A. Analysis of liposomes. *Talanta*. 2006;68(5):1432–1441. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.031>
305. Raviv SA, Alyan M, Egorov E, ve ark. Lung targeted liposomes for treating ARDS. *JCR*. 2022;346:421-433. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.028>

306. Dhand C, Prabhakaran MP, Beuerman RW, ve ark. Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery. *RSC advances*. 2014;4(62):32673-32689. <https://doi.org/10.1039/C4RA02861A>
307. Bakker-Woudenberg IA, Lokerse AF, Ten Kate MT, ve ark. Enhanced localization of liposomes with prolonged blood circulation time in infected lung tissue. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1138(4):318-326. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(92\)90010-K](https://doi.org/10.1016/0925-4439(92)90010-K)
308. Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, ve ark. Preparation, characterization and applications of liposomes: state of the art. *J. Colloid Sci*. 2012;1(2):147-168. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2012.1020>
309. Large DE, Abdelmessih RG, Fink EA, ve ark. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021;176:113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>
310. Fan Y, Marioli M, Zhang K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *JPBA*. 2021;192:113642. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>
311. Miere F, Fritea L, Cavalu S, ve ark. Formulation, Characterization, and Advantages of Using Liposomes in Multiple Therapies. *Pharmacophore*. 2020;11(3-2020):1-12.
312. Li Y, Wan J, Gao, Y, Zhu J, Wientjes M. G, Au J. L. S. Relationships between liposome properties, cell membrane binding, intracellular processing, and intracellular bioavailability. *The AAPS journal*, 2011;13, 585-597. <https://doi.org/10.1208/s12248-011-9298-1>
313. Ghanbarzadeh S, Valizadeh H, Zakeri-Milani P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 2013;3(1), 25. doi:10.5681/apb.2013.005
314. Minocha N, Kumar V. Nanostructure system: Liposome–A bioactive carrier in drug delivery systems. *Materials Today: Proceedings*. 2022;69:614-619. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.09.494>
315. Huang X, Schwind S, Yu B, ve ark. Targeted delivery of microRNA-29b by transferrin-conjugated anionic lipopolyplex nanoparticles: a novel therapeutic strategy in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res*. 2013;19(9):2355-2367. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3191>
316. Remaut K, Sanders N. N, De Geest B. G, Braeckmans K, Demeester J, De Smedt S. C. Nucleic acid delivery: Where material sciences and bio-sciences meet. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2007;58(3-5):117–161. doi:10.1016/j.mser.2007.06.001
317. Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept. *International Scholarly Research Notices*, 2012;738432. doi:10.5402/2012/738432

318. Wei P, Xie Y, Abel P. W, Huang Y, Ma Q, Li L, ve ark. Transforming growth factor (TGF)- β 1-induced miR-133a inhibits myofibroblast differentiation and pulmonary fibrosis. *Cell death & disease*, 2019;10(9), 670. doi:10.1038/s41419-019-1873-x
319. Sheng H, Zhao S, Hu H. Antifibrotic mechanism of Piceatannol in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Front. pharmacol.* 2022;13:771031. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.771031>
320. Miao Y, Wang Y, Bi Z, ve ark. Antifibrotic mechanism of avitinib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *BMC Pulmonary Medicine*. 2023;23(1):94. <https://doi.org/10.1186/s12890-023-02385-9>
321. Ritzenthaler JD, Zhang M, Torres-Gonzalez E, ve ark. The Integrin Inhibitor Cilengitide and Bleomycin- Induced Pulmonary Fibrosis. *Lung*. 2020;198:947-955. <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00400-y>
322. Li C, Lu Y, Du S, ve ark. Dioscin exerts protective effects against crystalline silica-induced pulmonary fibrosis in mice. *Theranostics*. 2017;7(17):4255. <https://doi.org/10.7150/thno.20270>
323. Ruan H, Luan J, Gao S, ve ark. Fedratinib Attenuates Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis via the JAK2/STAT3 and TGF- β 1 Signaling Pathway. *Molecules*. 2021;26:4491. <https://doi.org/10.3390/molecules26154491>
324. Liu H, Wu X, Gan C, ve ark. A novel multikinase inhibitor SKLB-YTH-60 ameliorates inflammation and fibrosis in bleomycin-induced lung fibrosis mouse models. *Cell Prolif.* 2021;54(7):e13081. <https://doi.org/10.1111/cpr.13081>
325. Cutolo M, Gotelli E, Montagna P, ve ark. Nintedanib downregulates the transition of cultured systemic sclerosis fibrocytes into myofibroblasts and their pro-fibrotic activity. *Arthritis Res Ther.* 2021;23:1-11. <https://doi.org/10.1186/s13075-023-03117-4>

8. EKLER

EK-1: Turnitin dijital makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ceren DURALOĞLU
Ödev başlığı: 2023-2024 Bahar Dönemi - Savunma Sonrası Kabul Edilen Tez
Gönderi Başlığı: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) Tedavisinde Kullanılmak Ü...
Dosya adı: Ceren_Duraloglu_Doktora_Tezi_Turnitin_İdiyopatik_Pulmoner...
Dosya boyutu: 21.91M
Sayfa sayısı: 156
Kelime sayısı: 31,496
Karakter sayısı: 222,167
Gönderim Tarihi: 16-Ağu-2024 12:23ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2432614841

Y.Ü.
BÜYÜKÇEKİRÇİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İDİYO PATİK PULMONER FİBROZİS (İPF) TEDAVİSİNDE
KULLANILMAK ÜZERE NİNTEDANİB VE m6E-296-YÜKLÜ
LİPOPEKS FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE TEDAVİ ETKİNLİKLERİNİN
İPF HÜCRE KÜLTÜRÜ MODELİNDE DEĞERLENDİRİLMESİ

Doç. Dr. Ceren DURALOĞLU

Farmasötik Tıbbi Bilim Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2024

EK-2: Turnitin orijinallik raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nintedanib ve miR-29b Yüklü Lipopleks Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Karakterize Edilmesi ve Tedavi Etkinliklerinin İPF Hücre Kültürü Modelinde Değerlendirilmesi

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Ceren DURALOĞLU

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 156

İdiyopatik Pulmoner Fibrozis (İPF) Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nintedanib ve miR-29b Yüklü Lipopleks Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Karakterize Edilmesi ve Tedavi Etkinliklerinin İPF Hücre Kültü

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 9	% 5	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	avesis.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	discovery.researcher.life İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
8	www.ankemdernegi.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1

EK-3: Tezden üretilen yayınlar

1. Duraloglu C, Baysal I, Yabanoglu-Ciftci S, Arica B. Nintedanib and miR-29b Co-Loaded Lipoplexes in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: formulation, characterization, and *in vitro* evaluation. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2024; 1–16. <https://doi.org/10.1080/03639045.2024.2387166>
2. Gencer A, Duraloglu C, Ozbay S, Ciftci TT, Yabanoglu-Ciftci S, Arica B. Recent Advances in Treatment of Lung Cancer: Nanoparticle-Based Drug and siRNA Delivery Systems. Curr Drug Deliv. 2021; 18(2):103-120. <https://doi.org/10.2174/1567201817999200730211718>

9. ÖZGEÇMİŞ