

**İNTRATÜMÖRAL UYGULAMAYA YÖNELİK
NANOLİPOZOM FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF NANOLIPOSOME
FORMULATIONS FOR INTRATUMORAL
APPLICATIONS**

ÜMRAN YAMAN

DOÇ. DR. İPEK EROĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÜMRAN YAMAN'ın hazırladığı "İntratümöral Uygulamaya Yönelik Nanolipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ayşegül KARATAŞ

Başkan



Doç. Dr. İpek EROĞLU

Danışman



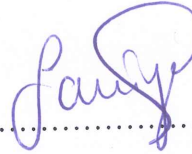
Doç. Dr. Eda Ayşe AKSOY

Üye




Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ

Üye



Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak / /..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Aileme...

ETİK


Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25 / 06 / 2019

ÜMRAN YAMAN



YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) 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 kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak 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 haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

25 / 06 / 2019

ÜMRAN YAMAN



ÖZET

İNTRATÜMÖRAL UYGULAMAYA YÖNELİK NANOLİPOZOM FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Ümran YAMAN

Yüksek Lisans, NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İpek EROĞLU

Haziran 2019, 85 sayfa

Malign melanom, deride melanin üretimini sağlayan melanosit hücrelerinden kaynaklanan ve ölüm oranı en yüksek cilt kanseri türü olarak bilinmektedir. Metastaz gerçekleştiğinde, cerrahi yöntemlerle müdahale, tedavi için tek başına yeterli olmamaktadır. Bir pirimidin analogu olan 5-Florourasil (5-FU), birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan sitotoksik bir ilaçtır. 5-FU, cerrahi yöntemlerin hasta için uygun olmadığı durumlarda, cilt kanserinin tedavisinde topikal formda uygulanmaktadır. Fakat deriden penetrasyonu yeterli olmadığı için, tedavi süresi sınırlı kalmakta ve epitel dokuya penetre olan ilaç konsantrasyonunun yetersiz olması sebebiyle, etkin tedavi sağlanamamaktadır. Günümüzde, kemoterapötik ajanların direkt istenen dokuda birikimini sağlamak, buna bağlı terapötik etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla, nanotaşıyıcı sistemler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sistemler arasında yer alan nanolipozomlar, biyolojik membranlara benzer yapıda olmaları nedeniyle biyouyumlu olup, yüksek penetrasyon kabiliyetine sahiptirler. Tez kapsamında, intravenöz uygulamaları takiben yarılanma ömrü kısa olan (6-20 dk), dokulara geniş dağılım gösteren ve dermatit, kardiyak toksisite, merkezi sinir sistemi hasarı gibi yan etkilere neden olan 5-FU etkin maddesinin, nanolipozom formülasyonları hazırlanmıştır. Kontrollü salım yapabilen bu formülasyonlar ile, hem terapötik etkinin artırılması hem de yan etkilerin azaltılması amaçlanmıştır.

Son yıllarda, malign melanom tedavisinde sadece ilaç uygulamalarının yetersiz kaldığı, ilaç/gen kombinasyonu içeren formülasyonların geliştirildiği gözlenmiştir. Tez kapsamında, ileri dönem gen uygulama çalışmalarına yönelik formülasyonlar tasarlamak için, 5-FU yüklü nanolipozomlara, yüzey kaplama/modifikasyon işlemleri yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle, anyonik ve katyonik lipitler ile yüzey yükü değiştirilmiş nanolipozom formülasyonları hazırlanmış, daha sonra polimer ile kaplanarak modifikasyon işlemi uygulanmıştır. Katyonik lipit olarak stearylamin (SA) ve anyonik lipit olarak disetilfosfat (DCP) kullanılarak nanolipozomlar hazırlanmış, Poli-L-lizin (PLL) ve Polietilenimin (PEI) kullanılarak polimerik kaplama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında öncelikle yöntem ve formülasyon optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla; 5-FU yüklü katyonik ve anyonik özellikteki nanolipozom formülasyonları ince film tabaka oluşturma yöntemi ile hazırlanmış ve farklı parametrelerin (sonikasyon süresi, lipit yapısı, pozitif/negatif lipit oranı, pH ve sürfaktan etkisi), formülasyon karakterizasyon parametreleri (partikül boyutu (PB), zeta potansiyeli (ZP), polidispersite indeksi (PDI) ve enkapsülasyon etkinliği (EE)) üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Ardından nanolipozomlar polimer ile kaplanmış ve fizyokimyasal özellikler tekrar değerlendirilmiştir. Formülasyonların, yüzey karakterizasyonu, moleküler yapıları ve termal özellik aydınlatması, sırasıyla SEM, FTIR ve TGA-DSC analizleri ile gerçekleştirilmiş, stabilite çalışmaları yürütülmüştür. Optimize edilen formülasyonlar ile *in-vitro* salım çalışmaları yapılmış, ardından A431 epidermal karsinom hücre hattı üzerinde etkileri incelenmiştir.

Optimum formülasyon olarak dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), DCP ve kolesterol (7:2:1 molar oran) ile hazırlanan, 5-FU yüklü nanolipozom (Lipo-FU) (%EE ~ 42) ve 5-FU yüklü PLL kaplı nanolipozom (PLL-Lipo-FU) (%EE ~ 88) seçilmiştir. *İn-vitro* salım deneyleri, Lipo-FU, PLL-Lipo-FU ve 5-FU çözeltisi kullanılarak, diyaliz membran yöntemi ile yapılmıştır. Çözelti formu ile kıyaslandığında, Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU formülasyonlarının her ikisiyle de sürekli salım profili elde edilmiştir. Bu formülasyonlar ile, sırasıyla 1. saatin sonunda %47.17 ve %20.84 oranda salım ($p < 0.05$) elde edilmiştir. Salım profillerine kinetik modeller uygulandığında, Lipo-FU

formülasyonunun birinci derece kinetik modele ($r^2=0.9675$), PLL-Lipo-FU formülasyonunun ise Higuchi kinetik modeline ($r^2=0.9918$) uyum sağladığı tespit edilmiştir. Son olarak, formülasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirilmiş ve etkin madde içermeyen formülasyonların (Lipo ve PLL-Lipo) hücreler için toksik olmadığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, nanolipozomlar ile uzun süreli etki elde edilerek, 5-FU'nun yarılanma ömrünün uzatıldığı, tekrarlayan dozlarda kullanımın önlenmesine bağlı olarak yan etkilerinin azaltıldığı ve hasta uyuncunun arttırılabildiği formülasyonlar geliştirilmiştir. PLL kaplı nanolipozom formülasyonunun, nano boyutu ve yüksek penetrasyon kabiliyeti nedeniyle, arttırılmış geçiş ve alıkonma (EPR) etkisi ile intratümöral uygulamayı takiben, vasküler bir tümör olan malign melanom tümörlerinde, lokal seviyede artmış bir terapötik cevap oluşturabileceği öngörülmüştür. Ayrıca formülasyon yüzeyinin nükleik asit bağlanmasına elverişli olması sebebiyle, kombine ilaç/gen terapi uygulamaları için aday nanolipozom modeli geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Malign melanom, nanolipozom, 5-Florourasil, poli-L-lizin, intratümöral enjeksiyon

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NANOLIPOSOME FORMULATIONS FOR INTRATUMORAL APPLICATIONS

Ümran YAMAN

Master of Science, Department of NANOTECHNOLOGY and NANOMEDICINE

Supervisor: Assoc. Prof. Ipek EROGLU

June 2019, 85 pages

Malignant melanoma is known to have the highest mortality rate due to melanocyte cells that produce melanin in the skin. When metastasis occurs, surgical intervention is not sufficient for treatment alone. 5-Fluorouracil (5-FU), a pyrimidine analogue, is a cytotoxic drug commonly used in the treatment of many types of cancer. 5-FU is applied in topical form in the treatment of skin cancer when surgical methods are not suitable for the patient. However, since the penetration through the skin is insufficient, the treatment time is limited and effective treatment cannot be provided due to insufficient concentration of the drug penetrating the epithelial tissue. Nowadays, nanotransmitter systems are frequently used in order to provide the accumulation of chemotherapeutic agents directly in the desired tissue, increase the therapeutic efficacy thereof and reduce the side effects. Nanoliposomes which are among these systems are biocompatible due to their similar structure to biological membranes and have high penetration ability. In this thesis, nanoliposome formulations of 5-FU active substance

which have short half-life (6-20 minutes), widely distributed to tissues and cause side effects such as dermatitis, cardiac toxicity and central nervous system damage following intravenous applications, have been prepared. With these controlled release formulations, it is aimed both to increase the therapeutic effect and to reduce the side effects.

In recent years, it has been observed that only drug applications are insufficient in the treatment of malignant melanoma and formulations containing drug/gene combinations have been developed. Within the scope of the thesis, 5-FU loaded nanoliposomes were subjected to surface coating/modification processes in order to design formulations for advanced gene application studies. For this purpose, firstly, nanoliposome formulations with surface charge modified with anionic and cationic lipids were prepared and then modified with polymer coating. Nanoliposomes were prepared using stearylamine (SA) as the cationic lipid and disethylphosphate (DCP) as the anionic lipid. Polymeric coating was carried out using Poly-L-lysine (PLL) and Polyethyleneimine (PEI).

Method and formulation optimization studies were carried out primarily within the scope of the thesis. For this purpose; 5-FU loaded cationic and anionic nanoliposome formulations were prepared by thin film layer method and different parameters (sonication time, lipid structure, positive/negative lipid ratio, pH and surfactant effect), formulation characterization parameters (particle size (PB), zeta potential (ZP), polydispersity index (PDI) and encapsulation efficiency (EE) were evaluated. The nanoliposomes were then coated with polymer and the physicochemical properties were re-evaluated. Surface characterization, molecular structure and thermal property illumination of the formulations were performed by SEM, FTIR and TGA-DSC analyzes, and stability studies were conducted. In-vitro release studies were performed with optimized formulations, followed by their effects on the A431 epidermal carcinoma cell line.

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), DCP and cholesterol (7: 2: 1 molar ratio), 5-FU loaded nanoliposome (Lipo-FU) (% EE ~ 42) and 5-FU loaded PLL coated nanoliposome (PLL- Lipo-FU) (EE ~ 88%). In-vitro release experiments were

performed by dialysis membrane method using Lipo-FU, PLL-Lipo-FU and 5-FU solution. Compared to the solution form, a sustained release profile was obtained with both the Lipo-FU and PLL-Lipo-FU formulations. With these formulations, 47.17% and 20.84% release ($p < 0.05$) were obtained at the end of the 1st hour, respectively. When kinetic models were applied to release profiles, it was found that Lipo-FU formulation was compatible with first order kinetic model ($R^2 = 0.9675$) and PLL-Lipo-FU formulation was compatible with Higuchi kinetic model ($R^2 = 0.9918$). Finally, the effects of the formulations on cell viability were evaluated and it was determined that the active ingredient-free formulations (Lipo and PLL-Lipo) were not toxic to cells.

As a result, long term effect was obtained with nanoliposomes, formulations were developed to prolong the half-life of 5-FU, reduce side effects due to prevention of repeated doses and increase patient compliance. It is envisaged that the PLL-coated nanoliposome formulation may produce an increased therapeutic response at the local level in malignant melanoma tumors, a vascular tumor, following intratumoral administration due to enhanced penetration and retention (EPR) effect due to its nano size and high penetration ability. Furthermore, since the formulation surface is suitable for nucleic acid binding, a candidate nanoliposome model has been developed for combined drug/gene therapy applications.

Keywords: Malignant melanoma, nanoliposome, 5-Fluorouracil, poly-L-lysine, intratumoral injection

TEŞEKKÜR

Tez süresince her zaman kıymetli bilgi ve tecrübeleri ile yardımcı olan, gösterdiği ilgi ve anlayışı ile her zaman desteğini hissettiğim, öğrencisi olduğum için her zaman iyi ki dediğim danışmanım Sayın Doç. Dr. İpek EROĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerinden yararlandığım, altyapı imkanları ile laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan Sayın Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a,

H.Ü. Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Laboratuvarı'ndaki tez çalışmalarında bana her zaman yardımcı olan sevgili Mirela ASLAN'a, hücre kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan Dr. Şükrü ÖZTÜRK'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma,

Laboratuvar imkanlarından yararlandığım Biyokimya Bölümü Laboratuvar'ından Arş. Gör. Dr. İpek BAYSAL'a,

Finansal olarak bu tezin tamamlanmasında desteği bulunan TÜBİTAK'a (216S603 nolu proje),

Hayatımın her evresinde tüm zorlukları aşmamda moral kaynağım, yaptığım her işte desteklerini hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Derinin Özellikleri	4
2.2. Cilt Kanseri	4
2.2.1. Kutanöz Malign Melanom	5
2.2.2. Histolojik Malign Melanom Tipleri	7
2.2.2.1. Yüzeysel Yayılan Melanom.....	8
2.2.2.2. Lentigo Malign Melanom.....	8
2.2.2.3. Nodüler malign Melanom.....	9
2.2.2.4. Akral Lentiginöz Melanom	10
2.2.2.5. Desmoplastik Melanom	11
2.3. 5-Florourasil	12
2.4. Nanoteknoloji ve İlaç Taşıma Sistemleri	13
2.4.1. Nanolipozomlar: Tanım ve Özellikleri.....	14
2.4.1.1. Nanolipozomların Fiziksel Özellikleri	15
2.4.1.2. Nanolipozomların Kimyasal Özellikleri.....	16
2.4.1.2.1. Fosfolipit Çeşitleri	17
2.4.2. Lipozomların Faz Değişimi	18
2.4.3. Lipozom Hazırlama Yöntemleri.....	18
2.4.3.1. Çok Tabakalı Lipozom(MLV) Oluşturma	19
2.4.3.2. Büyük Tek Tabakalı Lipozom(LUV) Oluşturma	19

2.4.3.3. Küçük Tek Tabakalı Lipozom(SUV) Oluşturma	19
2.4.4. Özel Karakterli Lipozomlar	20
2.4.4.1. Stealth Lipozomlar	20
2.4.4.2. Katyonik Lipozomlar	20
2.4.4.3. pH'a Duyarlı Lipozomlar	20
2.4.4.4. Hedeflenmiş Lipozomlar	21
2.4.4.5. Kaplı Lipozomlar	21
2.4.4.6. Sıcaklığa Duyarlı Lipozomlar	21
2.4.5. Nanolipozomların Avantajları ve Dezavantajları	21
2.4.6. Nanolipozomların Karakterizasyonu Parametrelerinin Önemi	22
2.4.6.1. Partikül Büyüklüğünün Etkisi	22
2.4.6.2. Lipozom Bileşenlerinin Etkisi	23
2.4.7. Lipozomlarda Stabilite	23
2.4.7.1. Kimyasal ve Fiziksel Stabilite	23
2.4.7.2. Stabilitenin Artırılması	24
2.4.7.2.1. Kolesterol Kullanımı	25
2.4.7.2.2. Yüze Polimer Kaplanması	25
2.4.7.3. Stabilite Kontrolü	25
2.4.7.3.1. Partikül Büyüklüğü, Zeta Potansiyeli ve PDI Ölçümü	26
2.4.8.. Faz Dönüşümünün Analizi	27
2.4.8.1. Fourier Transform Infrared Spektroskopi (FTIR)	27
2.4.8.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)	27
2.4.8.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	27
2.4.9. Yüze Karakterizasyonu	28
2.4.9.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	28
2.4.10. Nanolipozomlara Etkin madde Yükleme	28
2.4.10.1. Pasif Yükleme	28
2.4.10.2. Aktif Yükleme	28
2.4.11.Lipozomların Hücre Etki Mekanizmaları	29
2.4.12. Nanolipozomların Kullanım Alanları	29
2.4.12.1. Lipozomların Kanser Tedavisinde Kullanımı	29
2.4.12.2. Lipozomların Gen Terapisindeki Kullanımı	31
2.4.13. Nanolipozomlarda Hedefleme	32

2.4.13.1. Pasif Hedefleme	32
2.4.13.2. Aktif Hedefleme.....	33
2.4.14. Gen Transferi Uygulamaları İçin Yüzey Modifikasyonları	33
2.4.14.1. Disetilfosfat (DCP) Eklenmesi	33
2.4.14.2. Stearilamin (SA) Eklenmesi	33
2.4.14.3. Polietilenimin (PEI) Kaplanması	33
2.4.14.4. Poli-L-lizin (PLL) Kaplanması	34
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	35
3.2. Kullanılan Araç-Gereçler	36
3.3. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
3.3.1. FT-IR Spektrum Çalışmaları	38
3.3.2. UV Spektrum Çalışmaları	38
3.3.3. Termal Analiz Çalışmaları	38
3.3.4. Çözünürlük Çalışmaları.....	38
3.3.5. Lipit-Su Partisyon Katsayısının Hesaplanması	39
3.4. Analitik Yöntem Validasyonu.....	39
3.4.1. Özgünlük ve Seçicilik.....	40
3.4.2. Doğrusallık	40
3.4.3. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik	41
3.4.4. Kesinlik.....	41
3.4.5. Duyarlılık.....	41
3.4.5.1. Saptama Sınırı (LOD)	41
3.4.5.2. Miktar Tayin Sınırı (LOQ).....	41
3.4.5.3. Stabilitate	42
3.5. Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması	42
3.6. PLL Kaplı Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması	44
3.7. Formülasyon Karakterizasyon Çalışmaları	45
3.7.1. PB / ZP / PDI Analizi	45
3.7.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	46
3.7.3. Termogravimetrik Analiz	46
3.7.4. Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	47

3.7.5. Enkapsülasyon Etkinliği.....	47
3.8. Stabilite Çalışmaları.....	48
3.9. <i>İn-vitro</i> Salım Çalışmaları ve Kinetik Değerlendirmeler	48
3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	49
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	50
4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları	50
4.1.1. ATR-FTIR Spektrum Çalışmaları.....	50
4.1.2. UV Spektrum Çalışmaları	50
4.1.3. Termal Analiz Çalışmaları	51
4.1.4. Çözünürlük Çalışmaları.....	51
4.1.5. Lipit-su Partisyon Katsayısı Çalışmaları.....	52
4.2. Analitik Yöntem Validasyonu.....	52
4.2.1. Özgünlük ve Seçicilik	52
4.2.2. Doğrusallık	53
4.2.3. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik	53
4.2.4. Kesinlik	54
4.2.5. Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD ve LOQ)	55
4.2.6. Stabilite.....	55
4.3. Formülasyon Optimizasyon Çalışmaları.....	56
4.3.1. Sonikasyon Süresinin Etkisinin Değerlendirilmesi.....	56
4.3.2. Lipit Yapısının Etkisinin Değerlendirilmesi	56
4.3.3. Formülasyonlara Pozitif ve Negatif Lipit Eklenmesinin Etkisinin Değerlendirilmesi	57
4.3.4. pH'ın Etkin Madde Enkapsülasyonuna Etkisi.....	59
4.3.5. Sürfaktanların İlaç Enkapsülasyonuna Etkisi.....	59
4.3.6. Polimer Kaplamanın Nanolipozom Karakterizasyonuna Etkisi.....	60
4.4. Stabilite Çalışma Sonuçları	62
4.5. ATR-FTIR Analiz Sonuçları.....	64
4.6. TGA-DSC Analiz Sonuçları.....	65
4.7. SEM Analiz Sonuçları.....	66
4.8. <i>İn-vitro</i> Salım Çalışması Sonuçları	68
4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları.....	69
5. YORUM.....	72

6. KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ	84

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Derinin yapısı [1]	4
Şekil 2.2.	Epidermal melanin ünitesi[2]	6
Şekil 2.3.	Melanom bulguları örnekleri[3]	7
Şekil 2.4.	Bifazik yüzeysel yayılan malign melanomun invaziv evresi [4]	8
Şekil 2.5.	İnvaziv döneme yeni geçmekte olan lentigo malign melanomun erken evresi[4]	9
Şekil 2.6.	Mono fazik nodüler malign melanom [4]	10
Şekil 2.7.	Bifazik yüzeysel yayılan malign melanomun invaziv evresi [4]	10
Şekil 2.8.	Desmoplastik melanoma[5]	11
Şekil 2.9.	Malign melanom türleri ve genel olarak insidans oranları [6]	11
Şekil 2.10.	5-FU'nun Kimyasal Yapısı [7]	12
Şekil 2.11.	5-FU'nun etki mekanizması	13
Şekil 2.12.	Tek tabakalı lipozomun yapısı[8]	15
Şekil 2.13.	MLV, LUV ve SUV lipozomlar	16
Şekil 2.14.	PC'nin kimyasal yapısı[9]	17
Şekil 2.15.	Lipozomların EPR etkisi ile tümörlü dokularda birikmesi [10]	30
Şekil 2.16.	Lipozomların kullanıldığı terapötik alanlar ve FDA onaylı lipozomal ilaçlar [11]	31
Şekil 3.1.	İnce film tabaka oluşturma yöntemi	42
Şekil 3.2.	Malvern Zetasizer cihazı ve ZP ölçümünde kullanılan kuvvetler	46
Şekil 3.3.	<i>İn-vitro</i> salım deneyi düzeneği	49
Şekil 4.1.	5-FU'nun FTIR spektrumu	50
Şekil 4.2.	5-FU'nun UV spektrumu	51
Şekil 4.3.	5-FU'nun DSC ve TGA spektrumu	51
Şekil 4.4.	5-FU'ya ait HPLC grafiği	52
Şekil 4.5.	5-FU'nun HPLC yöntemine ait standart doğrusu (n=6)	53
Şekil 4.6.	5-FU, 5-FU ve DPPC fiziksel karışımı, DPPC, boş nanolipozom ve 5-FU yüklü nanolipozoma ait FTIR/ATR spektrumları	64

Şekil 4.7.	5-FU, Boş NL, NL ve 5-FU + DPPC fiziksel karışıma ait DSC termogramları.....	65
Şekil 4.8.	5-FU, Boş NL, NL ve 5-FU + DPPC fiziksel karışıma ait TGA termogramları.....	66
Şekil 4.9.	Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU numunelerine ait SEM görüntüleri a)Lipo-FU, b)Boş Lipo, c)PLL-Lipo-FU, d)Boş PLL-Lipo formülasyonları.	67
Şekil 4.10.	Nanolipozom, PLL-kaplı nanolipozom ve kontrol grubuna ait 5-FU in-vitro salım profilleri (n = 6).	70
Şekil 4.11.	Boş Lipo formülasyonuna ait hücre canlılığı grafiği. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak t-test yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.....	70
Şekil 4.12.	Boş PLL-Lipo formülasyonuna ait hücre canlılığı grafiği. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak t-test yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.	70
Şekil 4.13.	PLL-Lipo-FU, serbest 5-FU çözeltisi ve Lipo-FU'ya ait canlılık sonuçları. İstatistiksel analiz yöntemi olarak 2-yönlü ANOVA yapıldı. Gruplar arasında fark olup olmadığının anlaşılması için Tukey's testi kullanıldı. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.....	71

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Lipit türevleri, nötr ortamda yükleri, Tc değerleri [12-14]	17
Çizelge 2.2. Faz I, II ve III aşamalarındaki lipozomal ilaçlar [11]	31
Çizelge 3.1. Nanolipozom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasal malzemelerin listesi	35
Çizelge 3.2. Nanolipozom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan cihazların listesi	36
Çizelge 3.3. 5-FU miktar tayini için kullanılan kromato grafik şartlar	40
Çizelge 3.4. Formülasyon optimizasyon çalışmaları için kullanılan parametreler	43
Çizelge 4.1. 5-FU analitik yöntemine ilişkin geri kazanım sonuçları (n = 3)	54
Çizelge 4.2. Tekrar edilebilirlik sonuçları	54
Çizelge 4.3. Tekrar elde edilebilirlik	55
Çizelge 4.4. Stabilite sonuçları	55
Çizelge 4.5. Sonikasyon süresinin PB,ZP ve PDI üzerindeki etkisi (*n=3).....	56
Çizelge 4.6. Lipit yapısının karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3).....	57
Çizelge 4.7. Lipit yükünün karakterizasyon parametrelerine etkisi (ilaç:lipit oranı 1:1, *n=3).....	58
Çizelge 4.8. Lipit yükünün karakterizasyon parametrelerine etkisi (ilaç:lipit oranı 1:2, *n=3).....	58
Çizelge 4.9. pH'ın karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3).....	59
Çizelge 4.10. Sürfaktanların karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3)	60
Çizelge 4.11. PVA'nın formülasyon karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3)	60
Çizelge 4.12. Farklı PEI oranlarının nanolipozom karakterizasyonuna etkisi (*n=3, **lipit miktarları verilmiştir, her formülasyonda PEI miktarı 2 mg/mL'dir.).....	60
Çizelge 4.13. PLL ve lipit miktarlarının, karakterizasyon üzerinde etkileri (*n=3, **lipit miktarları ve PLL:çözelti hacimce yüzde oranları verilmiştir.)	61
Çizelge 4.14. PLL miktarlarının nanolipozom karakterizasyonuna etkisi (*n=3, **PLL:çözelti hacimce yüzde oranları verilmiştir, formülasyondaki lipit miktarı 0.176 mg/mL'dir.)	62

Çizelge 4.15. Formülasyonlara ait stabilite çalışma sonuçları (+4°C).....	62
Çizelge 4.16. PLL-Lipo-FU ve Lipo-FU formülasyonunun stabilitesi.....	63
Çizelge 4.17. Formülasyonların <i>in-vitro</i> salım hızı kinetik verileri.....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

T_c	Camsı geçiş sıcaklığı
T_m	Faz değişim tepe sıcaklığı
T_0	Faz değişimi başlangıç sıcaklığı
ΔH	Entalpi
v/v	Hacimce yüzde
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
dk	Dakika
R^2	Determinasyon katsayısı
rpm	1 dakikadaki devir sayısı
rcf	Göreceli santrifüj kuvveti

Kısaltmalar

α -PC	α -Fosfotidilkolin
5-FU	5-Florourasil
ACN	Asetonitril
CH	Kolesterol
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit

DNA	Deoksiribonükleik asit
DCP	Disetilfosfat
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilkolin
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EAA	Eğri Altı Alan
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrometre
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
LUV	Büyük Tek Tabakalı Lipozomlar
MLV	Çok Tabakalı Lipozomlar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MM	Kutanöz Malign Melanom
PB	Partikül Büyüklüğü
PDI	Polidispersite İndeksi
PEI	Polietilenimin
PLL	Poli-L-lizin
RES	Retikülo Endotelyal Sistem
SA	Stearilamin
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SS	Standart Sapma
SUV	Küçük Tek Tabakalı Lipozomlar
TGA	Termogravimetrik Analiz
TS	Timidilat sentaz

VK	Varyasyon Katsayısı
ZP	Zeta Potansiyel

1. GİRİŞ

Kanser, ülkemiz ve tüm dünya ülkeleri için, en önemli hayati risk teşkil eden hastalıkların başında gelmektedir. Konvansiyonel kemoterapide etkin tedavi sağlamak için yüksek dozda kullanılan ilaçlar, kanserli dokuların yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermekte ve sonuç olarak ciddi yan etkiler gözlenmektedir. Ayrıca ilaca karşı gelişen direnç, tedavinin başarı oranını düşürmektedir. Cilt kanseri, deriden kaynaklanan kanser türü olup, tüm kanser vakalarının yaklaşık yarısını oluşturmaktadır. Malign melanom (melanositlerden kaynaklanan), en tehlikeli cilt kanseri olup, yayılma riski çok fazladır. Erken teşhis edildiğinde ya da henüz metastaz yapmadığında, cerrahi yöntemlerle yok edilebilmektedir. Ancak ileri evrede, anjiyogenez ile vaskülarizasyonun artması sonucunda tümör dokusu büyümekte ve bunu engellemeye yönelik konvansiyonel yaklaşımlar yetersiz kalmaktadır. Yeni nesil formülasyonlar ve ileri teknoloji tedaviler ile, tümör gelişiminin önlenmesi ve hastanın yaşam kalitesinin artırılarak yaşam süresinin uzatılması hedeflenmektedir.

21. yüzyılda, nanoteknolojik yöntemlerin gelişmesine paralel olarak nano boyutta ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir. Etkin maddenin enkapsülasyonu ve hedef bölgeye ilaç taşınması çalışmaları, küçük moleküler ilaçların yanı sıra proteinler, peptidler ve genler gibi makromoleküllerin nanopartiküler bir ilaç taşıma sistemi vasıtasıyla kontrollü salınmasına yönelik çalışılmaktadır. Nano boyutta malzemelerin yüzey fizikokimyası değişmekte ve aynı zamanda partikül boyutlarının çok küçük olması sebebiyle çözeltide Brownian hareketleri yapmaktadır. Atomik düzeyde yeniden yapılanma sırasında oluşan üst atomik tabakanın denge halindeki yapısı, kütledeki (bulk) atomik düzlemlerin karşılık gelen yapılarından farklı olur. Bu durum, özellikle, yüzeye özgü benzersiz özelliklerin ortaya çıkmasına (örneğin, elektronik yüzey durumlarına) neden olmaktadır. Bununla birlikte, nanopartiküller çözelti içerisinde, homojen dağılır ve zamandan bağımsız olarak fiziksel özelliklerini koruyarak, partikül boyutu büyük olan sistemlerden daha stabil olmaktadır. Tanecik boyutu kadar, yüzeyin elektriksel yük özellikleri de stabil bir nanopartiküler sistemin oluşturulmasında önemli bir parametre olmaktadır. Biyouyumlu, biyobozunur ve stabil nanotaşıyıcı sistemler, antikanser ilaçları ve gen gibi moleküllerin taşınmasında ilgi odağı haline gelmiştir. Özellikle de,

nanolipozomal ilaç sistemleri, yapılarında, hücre membranında bulunan lipitleri ihtiva etmelerinden dolayı toksik olmamaları ve amfilik yapıda olmaları sebebiyle hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların taşınımında kullanılabilmektedirler. Bu açıdan nanolipozomlar; biyolojik membranlara benzer yapıları ile hücre penetrasyonunu artırma ve ilacı istenen bölgeye hedefleme gibi özellikleri nedeniyle, etkili ilaç taşıyıcı sistemler olarak dikkat çekmektedirler. Nanolipozomların yüzeyinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak ilacın tümörlü bölgede daha çok birikmesi, enkapsülasyon etkinliklerinin artırılması sağlanabilmektedir. Bu formülasyonlar ile, daha düşük dozlarla hem etkin tedavi sağlanabilmekte hem de ilaca bağlı yan etkiler azaltılabilmektedir.

Nanolipozomlar aynı zamanda gen ile kombine olarak hazırlanabilmekte, böylelikle gen ve etkin madde içeren kombine nanolipozomal ilaç sistemleri oluşturulabilmektedir. Yüze adsorbe olacak negatif yüklü nükleik asitlerin yüzeye tutunabilmeleri için , nanolipozomu oluşturan lipitler katyonik olarak seçilebilmekte ya da anyonik nanolipozom yüzeyi katyonik ve hidrofilik bir polimer ile kaplanabilmektedir. Polimer kaplı nanolipozomlar ve katyonik nanolipozomlar, viral olmayan gen transfeksiyon sistemlerine model oluşturmaktadır. Katyonik lipitlerin toksik etkileri bilindiği için, anyonik lipit üzerine yapılan polimer kaplamaları özellikle dikkat çekmiştir. Polimer kaplamaları, aynı zamanda negatif hücre membranı ile daha kolay füzyon yapabilmekte ve endozomal kaçışta daha başarılı olmaktadır, böylece hücre penetrasyonunu artmakta ve etkin madde endozomal veya lizozomal kaçışta başarılı olup, içeriğini sitoplazmaya bırakılabilmektedir veya gen transfeksiyonunda etkili olabilmektedir.

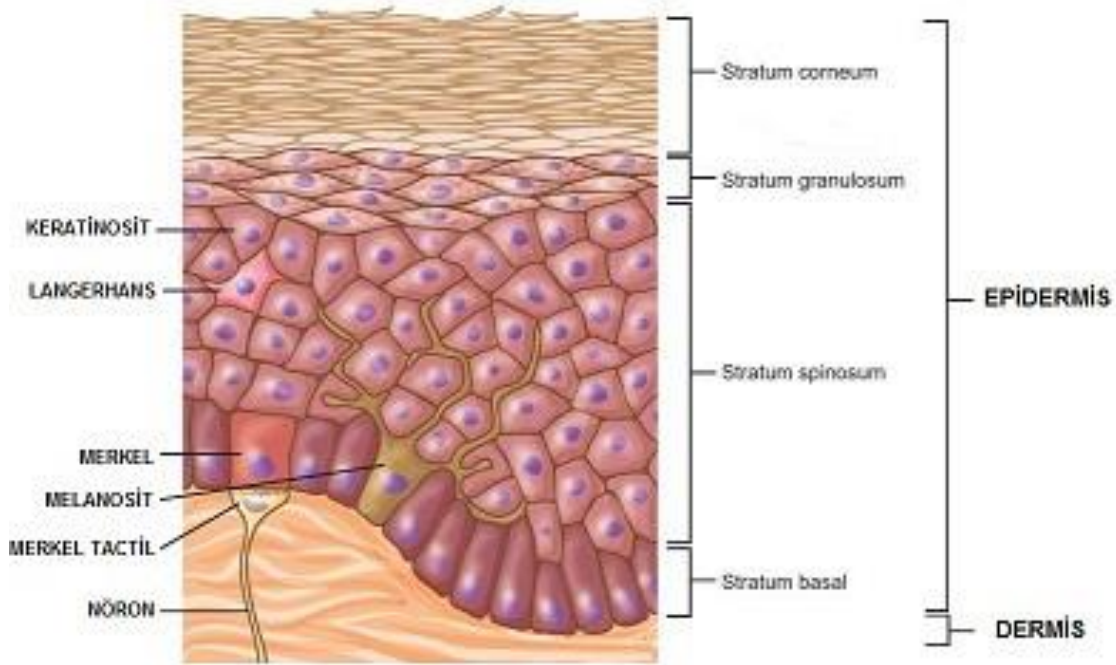
Son yıllarda, kemoterapötik ajanların tümör içine (intratümöral) enjeksiyonu (lokal enjeksiyon) ile, ilacın doğrudan tümör bölgesinde lokalizasyonunun sağlandığı ve yüksek konsantrasyonda ilaç ile tedavi etkinliğinin artırıldığı gözlenmiştir. Ayrıca, sadece hedef bölgede sağlanan ilaç salımı ile, ilacın diğer dokularda dağılımının azalarak yan etki gösterme olasılığının azaldığı görülmüştür. Bu bilgiler ışığında tez çalışması kapsamında; intratümöral uygulamaya yönelik, ilaç taşıyan nanolipozom formülasyonları ile polimer kaplı ilaç taşıyıcı nanolipozomlar hazırlanmış, oluşturulan nano ilaç taşıyıcı sistemlerin önemli karakterizasyon parametreleri olan ZP , PB, PDI

ve EE üzerine, formülasyon ve üretim parametrelerinin etkisi değerlendirilmiş, analitik yöntemlerle etkin madde miktar tayini çalışmaları yapılmış, salım profilleri belirlenmiş ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. PLL-Lipo-FU, Lipo-FU ve serbest 5-FU grupları karşılaştırılarak 5-FU'nun PLL kaplı veya anyonik nanolipozomal sistemlerle ve serbest olarak sitotoksik etkileri, A431 epidermoid karsinom hücre hattı üzerinde karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Böylece, mevcut tedavilerin dezavantajlarını ortadan kaldırmaya yönelik, etkin ve güvenilir bir tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Genel Özellikleri

Deri, insan vücudunu dış ortamdaki ayıran organdır. Vücudu ultraviyole ışınlar, toksik bileşenlere ve enfeksiyonlara karşı korumaktadır. Epidermis, cildin en dış tabakasıdır. Keratinositler, dendritik melanositler, Merkel ve Langerhans hücreleri, epidermiste bulunan hücre çeşitleridir (Şekil 2.1.). Epidermisin altında bulunan dermis, dermal dendritik hücreleri, mast hücreleri ve T-hücreleri ile birlikte bağ dokusunu içermektedir[15, 16].



Şekil 2.1. Derinin yapısı [1]

2.2. Cilt Kanseri

Hem malign melanom (MM), hem de non-melanom cilt kanseri (NMSC), beyaz ırkta en sık görülen malignitedir. Hem MM hem de NMSC'nin görülme sıklığı gittikçe artmaktadır, 50 yaş ve üzeri erişkinlerde MM'de yıllık % 0,6 artış görülmüştür[17]. 2016 yılında tahmini yeni melanom vakası sayısı 76.380'dir, bu da tüm yeni kanser vakalarının % 4.5'ini oluşturmaktadır[18].

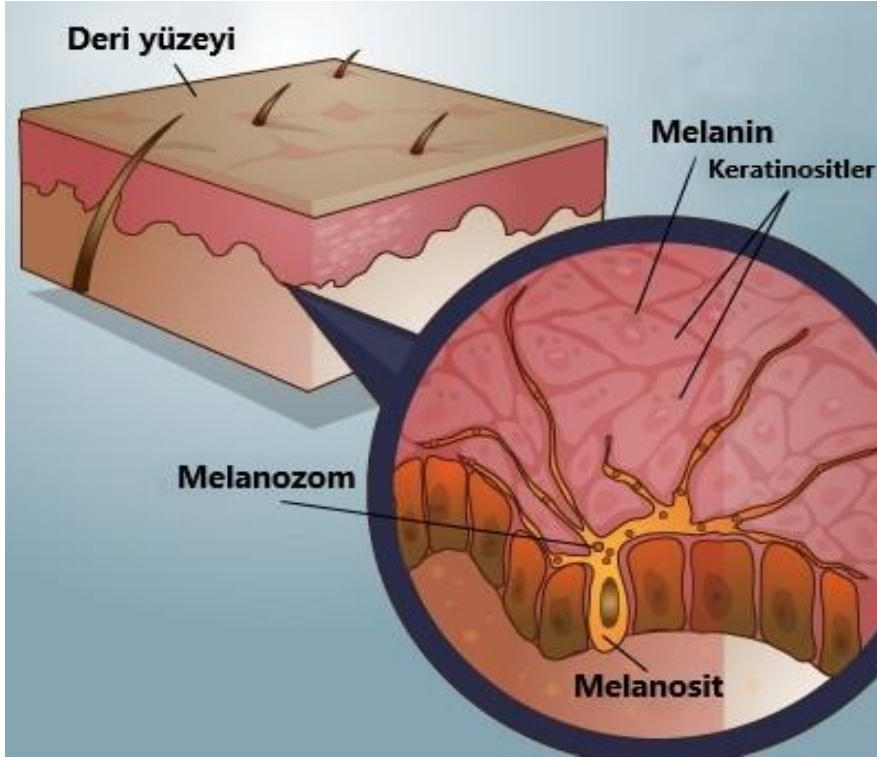
Melanom insidansındaki artışa rağmen melanoma bağlı ölüm oranlarında orantılı bir artış görülmemiştir. MM görülme sıklığının, muayene ve biyopsi sayısı ile paralel olarak artmış olabileceği düşünülse de, melanom insidanslarının salgın gibi hızla artmakta olduğu yönünde de araştırmalar mevcuttur. Non-melanom cilt kanseri ise, Bowen hastalığı, bazal hücreli karsinom (BCC) ve skuamöz hücreli karsinomu (SCC) türlerini içermektedir. Beyaz ırkta, NMSC görülme riski, MM'ye göre 18-20 kat daha fazladır[19-21].

Cilt kanserinin oluşmasında birçok faktör etkilidir. Bunlar arasında, NMSC görülmesinin yaşlılarda daha çok olmasının yanı sıra, yaştan bağımsız olarak UV ışınına maruz kalmak da yer almaktadır. Yapılan bir araştırmaya göre [22], 40 yaş altındaki kadınlarda, 1973-2009 yılları arasında, BCC insidansı UV ışınına maruziyetle orantılı olarak % 6.3 artmıştır. Benzer şekilde, BCC ve SCC görülme riskinin, genç yaşta (<25) solaryum kullanımı ile önemli bir şekilde arttığı da bilinmektedir[23]. Ancak, açık tenli olmak, ultraviyole ışınlarına maruziyet gibi çevresel faktörler, genetik faktörler (CDKN2A geninde mutasyon), daha önceden bulunan melanositik nevüslerin sayısı, displastik nevüs varlığı ve melanomun daha önceden geçirilmiş olması önemli risk faktörleri arasındadır.

2.2.1. Kutanöz Malign Melanom (MM)

Malign melanom, derideki melaninin üretiminden sorumlu “melanosit” adı verilen hücrelerden malign transformasyonu sonucu ortaya çıkan malign (kötü huylu) bir kanser türüdür, kutanöz malign melanom olarak da adlandırılmaktadır. Melanositler, nöral krestteki multipotent hücrelerden farklılaşma ve olgunlaşma sürecinde, temel olarak deri ve kıl folikülü olmak üzere vücudun çeşitli bölgelerine göçmekte ve yerleşmektedirler (Şekil 2.2.). Göz, kulak, beyin, kalp, akciğerler ve adipoz doku bu bölgelerden bazılarıdır. Bununla beraber, melanositler bağışıklık sistemi fonksiyonları için önemlidir; görme, işitme ve denge unsurlarında, uyku ve solunum ritminin oluşması gibi yaşamsal faaliyetlerde de rol oynadıkları düşünülmektedir.

Melanositler, kanser oluştuktan sonra melanin üretmeye devam edebilir, bu da ciltte koyu lekelenmelere neden olmaktadır. Melanin üretilmediği durumlarda ise, pembe, sarımsı kahverengi hatta beyaz olarak izler oluşmaktadır.



Şekil 2.2. Epidermal melanin ünitesi

Malign melanom klinikte A, B, C, D, E harfleri ile teşhis edilir. Başlıca melanom bulguları şunlardır (Şekil 2.3.):

- **Asimetri (A)** - Nevüsün ortasından çizgi çekildiğinde, iki tarafın birbirinden farklı olmasıdır.
- **Sınır Düzensizliği (B)** - Melanomun sınırı çoğunlukla pürüzlü ve bulanıktır.
- **Renk (C)** – Benign nevüsler tek bir renkte bulunurken, melanom birden fazla rengi içinde barındırabilir.

- **Büyüklik (D)** – Benign nevüslerin boyutu değişmezken melanom büyümeye devam etmektedir. Çapları genellikle, 6 mm'den büyük olmaktadır.
- **Çap artışı (E)** - Lezyonların büyümesi durumu.



Şekil 2.3. Melanom bulguları örnekleri[3]

2.2.2. Histolojik Melanom Tipleri

Malign melanomlar Clark ve Breslow'un oküler mikrometreyle yaptıkları sınıflandırmaya göre ince tümörler (tümör kalınlığı 0.75 mm'den az olanlar) ve kalın tümörler (tümör kalınlığı 0.76-1.5 mm, 1.5-3.0 mm ve 3.0 mm'den fazla olanlar) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Malign melanomların morfolojileri ise; yüzeğe yayılan melanom, lentigo malina, nodüler melanom, akral lentiginöz melanom ve desmoplastik melanomdur (Şekil 2.9.).

2.2.2.1. Yüzeysel Yayılan Melanom

En sıklıkla görülen melanom tipidir, genellikle düz ve düzensiz şekilli olup, renkleri değişken olabilmektedir. Siyah veya kahverenginin farklı tonlarını içerebilir, yaştan bağımsız olarak oluşabilmektedir. Yatay olarak yayılmaktadırlar. Tüm melanom cilt kanseri tiplerinin yaklaşık olarak %70'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Bifazik yüzeysel yayılan malign melanomun invaziv evresi [4]

2.2.2.2. Lentigo Malign Melanom

Yaşlanma ile birlikte ortaya çıkmaktadır, büyük, düz ve kahverengi tonlarında lezyonlar olarak görülmektedir. Dikey olarak yayılmaktadırlar. Tüm melanom cilt kanseri tiplerinin %10-15'ini oluşturmaktadır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. İnvaziv döneme yeni geçmekte olan lentigo malign melanomun erken evresi

2.2.2.3. Nodüler Malign Melanom

Siyah, koyu mavi veya kırmızımsı mavi renge lezyonları bulunmaktadır, renksiz lezyonları da bulunmaktadır. Nodüler melanom cilde yapışık yumru şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu tür yumrulara polip olarak adlandırılmakta ve daha önce leke veya lezyonun görülmediği yerlerde de oluşabilmektedirler. Tüm melanom cilt kanseri tiplerinin %15-20'ini oluşturmaktadır. Nodüler melanom genellikle siyah renktedir fakat mavi, gri, beyaz, kahverengi, koyu cilt rengi, kırmızı veya ciltle aynı renkte olabilmektedirler. Nodüler melanom, bir kök veya sap gibi bir çıkıntıyla mantar görünümü verebilir (Şekil 2.6.). Yüzeyi pürüzsüz, pürüzlü veya kabuklu olabilir. Kanayabilmekte ve çoğunlukla sert bir dokudan oluşmaktadır. Nodüler melanoma vücudun herhangi bir yerinde rastlanabilmektedir, ancak en sık göğüs, sırt, bacaklar ve yüzde ortaya çıkmaktadırlar.



Şekil 2.6. Monofazik nodüler malign melanom [4]

2.2.2.4. Akral Lentijinöz Melanom

Malign melanom türleri arasında insidans oranının en az olduğu tiptir. Tipik olarak, avuç içinde, ayak tabanında, parmak ve ayak tırnaklarının altında ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.7.). Yatay olarak yayılmaktadırlar. Tüm melanom cilt kanseri tiplerinin %5'ten az bir oranını oluşturmaktadır[24].



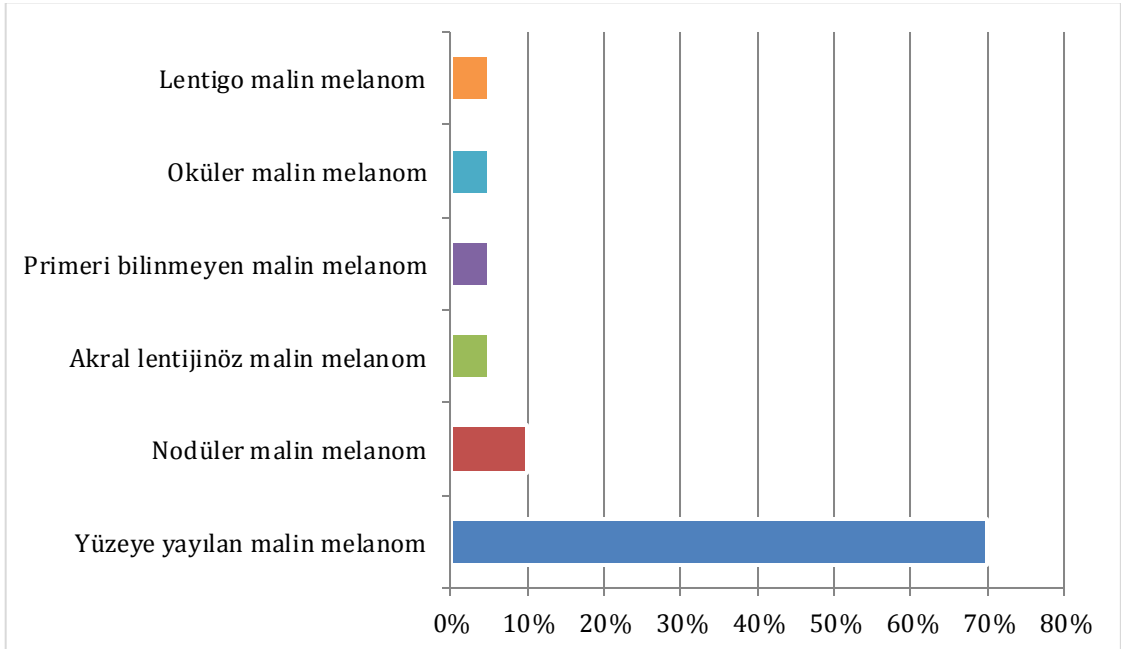
Şekil 2.7. Bifazik akral lentijinöz malign melanomun invaziv evresi [4]

2.2.2.5. Desmoplastik Melanom

Teşhisi zor, bölgesel olarak agresif bir melanom tipidir. Yaşlı kişilerde daha çok görülür ve lezyonlar genellikle üst ekstremitelerde ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.8.). Lezyonların yaklaşık yarısı amelanotiktir. Melanom insidanslarının %1.7'sini oluşturmaktadır[25].



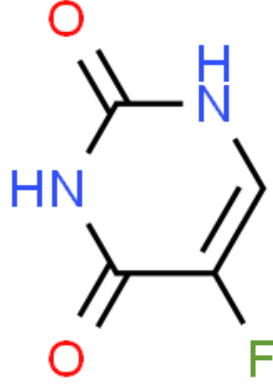
Şekil 2.8. Desmoplastik melanoma[5]



Şekil 2.9. Malign melanom türleri ve genel olarak insidans oranları [6]

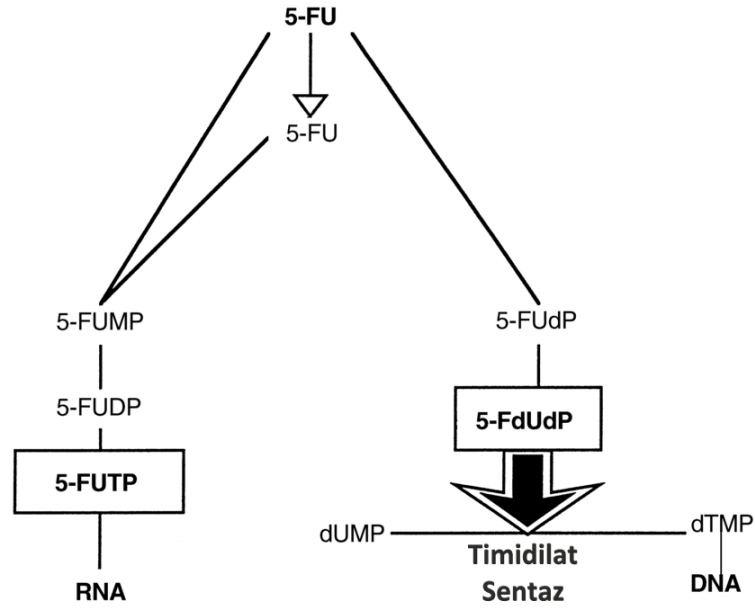
2.3. 5-Florourasil

5-FU (5-Floro-2,4-dihidroksipirimidin), intravenöz ve topikal uygulama ile farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılan kanser önleyici bir antineoplastik ajandır (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. 5-FU'nun Kimyasal Yapısı [7]

Anjiyojenezin, moleküler mekanizmasının anlaşılması ile, bu mekanizmada rol oynayan efektör molekülleri veya reseptörleri hedefleyerek endotelial büyüme faktörü (VEGF) sinyal kaskadını inhibe edilmesine yönelik çeşitli ilaçlar geliştirilmiştir. 5-FU, pirimidin analogu antineoplastik bir ajandır. Literatürde ve klinikte melanom kaynaklı cilt kanserlerinin tedavisinde kullanılmıştır. Molekül formülü $C_4H_3FN_2O_2$ ve molekül ağırlığı 130.08 g/mol'dür. 5-FU, tümör hücrelerinin apoptozunu indükleyebilen bir anti-metabolittir. 5-FU, DNA sentezinin inhibisyonu sonucu dengesiz hücre büyümesi ve hücre ölümüne sebep olur.



Şekil 2.11. 5-FU'nun etki mekanizması

Timidilat sentaz (TS), DNA sentezinin temel enzimidir. Aktif 5-FU metabolitleri, enzimle kompleks oluşturarak timin sentezini, dolaylı olarak da DNA sentezini inhibe ederler (Şekil 2.11.). Vücuttaki 5-FU'nun %80'inden fazlası ise DPYD geni ile etkisiz hale getirilmektedir. DPYD geni DPD'yi kodlayarak, 5-FU'yu parçalayan ve pirimidin katabolik yolunda sınırlayıcı bir enzim olan dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD)'in sentezlenmesini sağlar.

2.4. Nanoteknoloji ve İlaç Taşıma Sistemleri

Son yıllarda, nanoteknolojinin farklı alanlara uygulanabilmesi, geliştirilen araçlarla mümkün hale gelmiştir. Nanoteknolojinin kullanımı, tıp ve farmakolojiyi önemli ölçüde etkilemiştir. Nanomalzemelerin hücre altı seviyede görüntülenebilmesi ve ilaçların hedefe yönelik tasarlanabilmesi ile önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

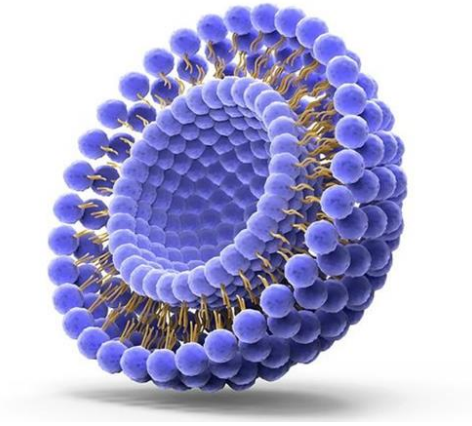
Nanoteknoloji, bulk malzemelerin, mühendislik yaklaşımları kullanılarak moleküler veya atomik seviyelerde çalışılması olarak tanımlanmaktadır. Bu alan genel olarak, nanoaygıtlar veya nanoyapılar kullanılarak moleküler seviyede biyolojik sistemlerin aydınlatılmasını, hastalıkların varsa önlenmesini ve tedavisini kapsamaktadır. Yığın(bulk) malzeme, malzeme boyutundan bağımsız olarak sabit fiziksel özelliklere sahiptir, ancak nano ölçekte bu genellikle böyle olmaz.

İlaç taşıyıcı sistemler olarak, nanomalzemelerin kullanılması yeni ve etkili ilaç formülasyonlarının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Spesifik ilaç taşıyıcı sistemler, hedefe yönelik, biyouyumlu ve biyobozunur olarak tasarlanabilmektedir. Etkin maddelerin güvenliğini ve etkinliğini, etkin maddeyi enkapsüle ederek dokuların ve organların etkilenmemesini sağlamaktadırlar. İstenmeyen yan etkileri azaltmak, belirlenen süre içerisinde, etkili bir tedavi sağlamak ve bu sayede biyoyararlanımı artırmak ilaç taşıyıcı sistemlerle oluşturulan formülasyonların geliştirilmesinin temel amacıdır. Lipozomlar, polimer veya metal nanopartikül-etkin madde konjugatları, miseller ve dendrimerler, formülasyonlarda kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerden bazılarıdır.

2.4.1. Nanolipozomların Tanım ve Özellikleri

Nanolipozomlar ilk olarak İngiliz hematolog Dr. Alec D. Bangham tarafından 1961'de Cambridge'de bulunan Babraham Enstitüsü'nde (yayın tarihi 1964) keşfedilmiştir. Keşifleri Bangham ve R. W. Horne'un enstitüye alınan elektron mikroskobu sayesinde, fosfolipitlere negatif yüklü boya yüklemeleriyle olmuştur.

Nanolipozomlar son yıllarda oldukça dikkat çeken yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlerdir, boyutları 10 - 1000 nm arasında değişmektedir. Nanolipozomların temel yapılarını fosfolipitler oluşturmaktadır ve kendiliğinden oluşan, lipit moleküllerden meydana gelen, disperse edildiklerinde sulu fazda ilacı hapseden, Şekil 2.12.'de gösterildiği üzere lipit çift tabakadan oluşmuş kolloidal partiküllerdir[26].



Şekil 2.12. Tek tabakalı lipozomun yapısı[8]

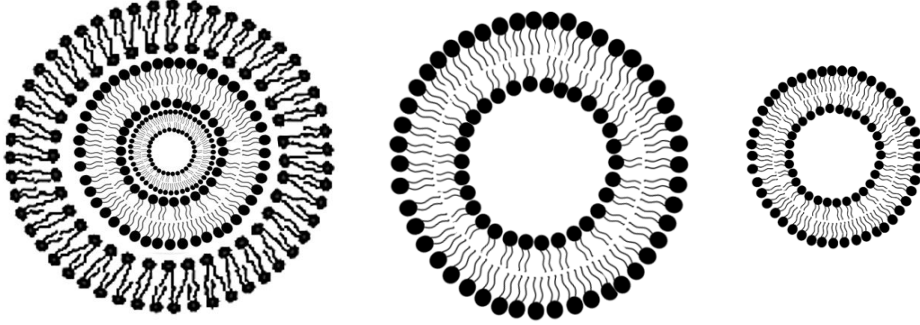
2.4.1.1. Nanolipozomların Fiziksel Özellikleri

Nanolipozomlar, fosfolipitlerin geçiş sıcaklıklarının (T_c) üstündeki bir sıcaklıkta jel halindeyken hidrate edilmesiyle oluşan veziküllerdir. Geçiş sıcaklığı (T_c), bir lipozomu oluşturan lipit diziliminin jel (katı) formdan, kristal (sıvı) forma geçişi ile olmaktadır. Faz değişimi sıcaklığı üzerinde, lipozomlar şeklini korumaktadırlar, fakat lipit molekülleri sıvı haldedir. Fosfolipitlerin zincir uzunluğu, bu zincirlerin gliserol iskeletine bağlanmalarının faz değişimi sıcaklığına olan etkisi bilinmektedir [27]. Yüksek lipit konsantrasyonunda lipitler sıvı kristaller oluşturmakta, daha düşük konsantrasyonlarda ise fosfolipit tabakasını oluşturan lipitlerin hidrofilik fazdan uzaklaşabilmek için sıkışık bir dizilim oluşturmaktadır[28].

Fosfolipitler, yapılarında hem lipofilik hem de hidrofilik yapılar olduğu için amfiliktirler. Sulu çözeltilerde fosfolipitlerin baş kısımlarının, bir çift tabaka oluşturduğu düşünülürse, hidrofilik baş kısımları bu çift tabakanın en dış ve en iç bölümlerinde kalmaktadır, yağ asitlerinden oluşan kuyruklar da tabakanın iç kısmını oluşturmaktadır.

Nanolipozomlar, büyüklüklerine ve katman sayılarına göre üç temel gruba ayrılırlar. Çok katmanlı veziküller(MLV'ler), birbirlerinden sulu ortamla ayrılmış birden fazla fosfolipit tabakasından oluşmaktadır. Bu lipozomların çapı genellikle birkaç yüz ile binlerce nanometre arasında değişmektedir. Öte yandan, hem küçük tek katmanlı

veziküller (SUV'lar) hem de büyük tek katmanlı veziküller (LUV'lar), sulu alanı çevreleyen tek bir çift katmandan oluşmaktadır. SUV'lar 100 nm'den küçüktür, LUV'lar ise 100 nm'den büyük yapılardır (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. MLV, LUV ve SUV lipozomlar

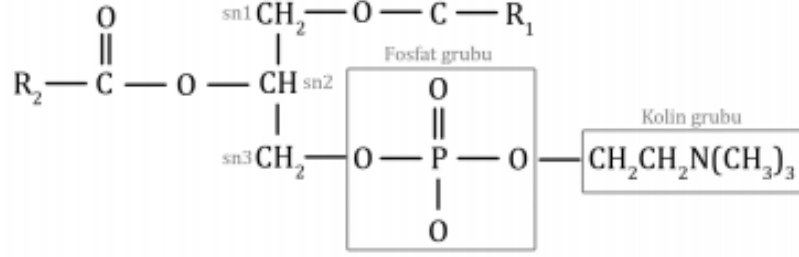
Nanolipozomların iç kısmı, hidrate edildiği ortamla aynı özellikleri taşıdığından, burada hidrofilik etkin maddeler enkapsüle edilebilmektedir; katmanların arasını ise organik çözücüde çözünen lipit, stabilite artırıcı vb. özellikte maddeler oluşturduğu için, burada hidrofobik veya lipofilik etkin maddeler enkapsüle olabilmektedir. Bu sayede, dış ve iç tarafa bakan iki polar uçun oluşturduğu apolar fosfolipit tabakanın içerisinde hapsolmuş ilaç, sulu fazla temas halinde olmamakta, etkin madde özelliğini koruyabilmektedir. Aynı şekilde, sulu fazda çözünen etken madde de, polar uçlar sayesinde hidrofobik faz ile etkileşime girmemektedir[29].

2.4.1.2. Nanolipozomların Kimyasal Özellikleri

Nanolipozomlar çoğunlukla fosfolipitlerden meydana gelmektedir. Fosfolipitler arasında fosfotidilkolin, fosfotidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidilgliserol, fosfatidik asit yer alır. Genellikle lipozomlar, fosfolipitler (doğal, sentetik, yarı sentetik kaynaklı) yanında, yük vericiler (pozitif, negatif) ve kolesterol gibi kimyasal bileşenlerden oluşmuşlardır

Fosfolipidler, sfingolipidler ya da gliserofosfolipidler olarak sınıflandırılırlar [30, 31]. Fosfolipitlerden en çok kullanılanı fosfotidilkolindir(PC) ve bu lipit lesitin olarak da bilinmektedir (Şekil 2.14.). Fosfotidilkolinin pH=7'de net yükü 0'dır[32]. Ayrıca,

PC'nin merkezi sinir sisteminde dikkat ve uyarılma, periferik sinir sisteminde kasların kontrolü gibi önemli görevleri bulunan asetilkolinin prekürsörüdür [33].



Şekil 2.14. PC'nin kimyasal yapısı

2.4.1.2.1. Fosfolipit Çeşitleri

En çok tercih edilen lipitler, pH=7'deki net yükleri ve katı halden sıvı forma geçiş sıcaklıkları (T_c) Çizelge 2.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1. Lipit türevleri, nötr ortamda yükleri, T_c değerleri [12-14]

Lipit Adı	Kısaltması	Net Yükü	T _c Değeri
Distearoilfosfatidilkolin	(DSPC)	0	58
Dipalmitoilfosfatidilkolin	(DPPC)	0	41
Dimiristoilfosfatidilkolin	(DMPC)	0	23
Dilaurilfosfatidilkolin	(DLPC)	0	0
Dimristoilfosfatidiletanolamin	(DMPE)	0	48
Yumurta Fosfatidilkolini	Egg PC	0	-5'den -15'e
Soya Fosfatidilkolini	Soy PC	0	-20'den -30'a

Fosfolipitler, geniş bir pH aralığında negatif yüklü olmaktadır, pozitif veya nötr lipozomlar elde etmek için fosfatidiletanolamin gibi pozitif yüklü lipitler kullanılmalıdır

veya negatif yüklü lipitler tercih edilip, elektrostatik depozisyon ile pozitif yüklü bir polimer kaplaması yapılmalıdır.

Bu polimerlere örnek olarak, tez kapsamında da nanolipozomları kaplamada kullanılan PEI ve PLL polimerleri verilebilir. Sentetik fosfolipitlerden DPPC yüksek geçiş sıcaklığına sahip olduğu için stabilitesini yüksek sıcaklıklarda daha çok koruyabilir, bu açıdan PC'ye göre daha avantajlıdır ve daha çok tercih edilmektedir[14, 34].

2.4.2. Lipozomların Faz Değişimi

Lipozomal formülasyonların hazırlanmasında, lipitlerin geçiş sıcaklıkları (T_c) kullanılmaktadır. Bu sıcaklığın üstünde veya altında çalışmak, enkapsülasyon verimini ve stabiliteyi etkilemektedir. Faz değişimi sıcaklığa, lipidi oluşturan bileşenlere ve kullanılan yardımcı maddelere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir[28].

Bir diğer faktör de, yardımcı madde ilavesidir. Aynı cins lipitten oluşan lipozomların keskin bir faz değişimi sıcaklığı bulunmaktayken, stabilite artırıcı maddelerin veya başka tür lipitlerin varlığında T_c sıcaklığı değişebilmektedir. Kolesterolün, lipozomların faz geçişini zorlaştırdığı bilinmektedir; T_c değerinin altında, jel faza geçişi, T_c değerinin üstünde ise kristal faza geçişi zorlaştırmaktadır. Burada kolesterolün konsantrasyonu önemlidir; %9 oranında kullanıldığında polariteyi artırmakta, %13 oranında kullanıldığında ise polariteyi azaltmaktadır[28]. Lipozomun stabilitesi bu faz değişiminden etkilenmektedir, polaritenin artırılması ise hidrofilik etkin maddelerin enkapsüle edilebilmesi için avantajlıdır.

2.4.3. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

Nanolipozomlar film oluşturma, ekstrüzyon, ters faz buharlaştırma, emülsiyon oluşturma, enjeksiyon, süperkritik çözelti ve diyaliz yöntemi gibi pek çok yöntemle hazırlanabilmektedir. Sonikasyon yöntemi ile büyük çok tabakalı veziküller (MLV) büyük tek tabakalı (LUV) veya küçük tek tabakalı (SUV) veziküllere küçültülebilirler. Literatür incelemeleri sonucunda, kanser tedavisine yönelik hazırlanan lipozomal formülasyonların genellikle film oluşturma ve sonikasyon yöntemi ile hazırlanmış

oldukları ve bu yöntem ile yaklaşık 100-200 nm boyutuna sahip oldukları tespit edilmiştir.

2.4.3.1. Çok Tabakalı Lipozom (MLV) Oluşturma

Çok tabakalı lipozomlar, Bangham tarafından ortaya atılan ince film lipit kurutma ve ardından hidrasyonu metodu ile oluşturulabilir. İnce lipit tabakası, lipitlerin organik bir çözücüde çözülüp, çözücünün rotavaporda belirli bir basınç altında uçurulması ile elde edilmektedir. Elde edilen lipit tabaka, sulu faz ile vorteks veya elle karıştırma ile hidrate edilerek MLV'leri oluşturmaktadır.

Bunun sonucunda, düşük enerji ile yüksek enkapsülasyon verimine sahip lipozomlar oluşturulmaktadır. MLV'ler depolama stabilitesi açısından avantajlıdır[9].

2.4.3.2. Büyük Tek Tabakalı Lipozom (LUV) Oluşturma

Çok tabakalı lipozomların membran ekstrüzyonundan geçirilmesi ile, ultrasonikasyon ve yüksek basınç homojenizasyonu yapılması ile elde edilebilmektedirler. MLV'ler gibi düşük enerji ile yüksek enkapsülasyon verimine sahip lipozomlar oluşturulabilmektedir. Ayrıca yapılan bir çalışmadan LUV'ların SUV'lara göre depolama stabilitesinin daha çok olduğu, daha geniş bir sıcaklık aralığında faz dönüşümünü tamamladıkları belirtilmektedir.

2.4.3.3. Küçük Tek Tabakalı Lipozom (SUV) Oluşturma

MLV'lerin ve LUV'ların membran ekstrüzyonu, uç sonikatör veya ultrasonik banyo, diyaliz, yüksek basınç homojenizasyonu ile boyutlarının küçültülmesi sonucu oluşmaktadır. Tez kapsamında oluşturulan lipozomlar çoğunlukla bu gruba girmektedir. Küçük tek tabakalı lipozomlar yüksek homojeniteye sahiptir, böylelikle polidispersite indeksi 0'a daha yakındır, berrak bir çözelti oluşturmaktadırlar. Düşük enkapsülasyon verimine rağmen, birçok uygulamada etkin madde enkapsülasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

2.4.4. Özel Karakterli Lipozomlar

Lipozomlar, farklı yöntemler ile MLV, LUV ve SUV olarak ve farklı kompozisyonlarda oluşturulabilir ve bu durumda *in-vivo* ortamdaki davranışları tamamen yapılarına bağlı olmaktadır.

2.4.4.1. Stealth Lipozomlar

Lipozomların, istenen bölgede uzun süre kalması, ve böylece belirlenen salım kinetiğinde ilacın salınması istendiğinde, yüzeylerine PEG zincirleri eklenmektedir. PEG polimerinin zincir uzunluğu ve konsantrasyonu değiştirilerek, lipozomun hedef bölgeye ulaşması sağlanabilmektedir. Bunun yanı sıra, gangliosit GM1 eklenmiş lipozomlar da sirkülasyonda uzun süre kalarak, kan-beyin engelini aşabilmiştir[35, 36].

2.4.4.2. Katyonik Lipozomlar

Stealth lipozomların tersine, pozitif yüklerinden dolayı, negatif yüklü hücre membranına kolaylıkla bağlanabilmektedir. Aynı zamanda, RNA ve oligonükleotidler gibi genetik materyallerin sitozole taşınması için non-viral gen vektörleri olarak kullanılmaktadırlar. Hücre membranı ile füzyona uğrayarak birleşip, içeriğindeki etkin maddeyi sitozole bırakılmaktadırlar. Daha fazla miktarda etkin madde taşınımı için pH duyarlı hazırlanabilmektedirler.

2.4.4.3. pH'a Duyarlı Lipozomlar

Bu tip lipozomların düşük pH'da, stabilitesi bozulmakta ve ihtiva ettikleri etkin maddeyi salmaktadırlar. pH asidik iken, hücre membranı ile kolayca füzyona uğrayabildikleri için, hücre içine etkin maddenin taşınması uygulamaları için tercih edilmektedirler. Hücre içinde lizozomal degradasyona uğramaması için stealth özellikte yapılabilmektedirler.

2.4.4.4. Hedeflenmiş Lipozomlar

Lipozomların belli bir hücreye ya da dokuya hedeflendirilmesi, monoklonal antikorların veya bağlanma için uygun olan bir proteinin, kovalent bağlarla lipozomun dış yüzeyine bağlanması ile olmaktadır. PEI gibi pozitif yüke sahip bir bileşiğin yapıya eklenmesi ile PEI'nin amin grupları ile proteinler arasında kovalent bağ oluşacak ve dolayısı ile proteinler yapıya kolayca eklenebileceklerdir.

2.4.4.5. Kaplı Lipozomlar

Lipozomların yüzeyleri, belli bir bölgeye hedeflendirme ve stabilite artırma gibi amaçlarla kaplanabilmektedir. Kaplama materyali olarak, biyouyumlu ve biyodegradasyon şartları canlı vücuduna uygun polimerler sıklıkla tercih edilmektedir. En çok kullanılan polimerler arasında, dekstran, mannan, kitosan, PLL ve PEI örnek verilebilir.

2.4.4.6. Sıcaklığa Duyarlı Lipozomlar

Lipozomların faz değiştirme sıcaklığından yararlanılarak oluşturulmaktadır. Lipit membran, faz değiştirme sıcaklığında esnek olduğu için, içeriğini ortama bırakmaktadır. Ortam sıcaklığının, faz değiştirme sıcaklığına eşit veya yüksek olması ile sıcaklığa duyarlı lipozomlar hazırlanabilmekte, ortam sıcaklığı ile birlikte etkin maddenin hızlı bir şekilde salınması sağlanabilmektedir.

2.3.5. Nanolipozomların Avantajları ve Dezavantajları

Nanolipozomların avantajları arasında;

- Enkapsüle haldeki ilacın etkinliğini ve terapötik indeksini artırmaları,
- Enkapsüle ettikleri ilacın stabilitesini artırmaları,
- Sistemik veya sistemik olmayan uygulamalar için uygun; biyouyumlu, tamamen biyobozunur, toksik olmayan, esnek ve immünojenik olmayan sistemler olmaları,

- Enkapsüle ettikleri ajanın toksisitesini düşürmeleri,
- Hedeflendirilecekleri dokuya özgü ligantlar ile aktif hedeflendirme için uygun olmaları bulunmaktadır.

Nanolipozomların dezavantajları ise;

- Üretim maliyetlerinin yüksek olması,
- Enkapsüle ettikleri ilacın ya da molekülün, lipozomal tabakadan sızıntı yapma ve/veya lipozomların agregasyon yapma ihtimalinin bulunması,
- Nanolipozomu oluşturan fosfolipit tabakasının, oksidasyon ve hidroliz gibi kimyasal reaksiyonlara uğrama ihtimali,
- Boyutlarından dolayı yarılanma ömürlerinin kısa olması,
- Çözünürlüklerinin düşük olmasıdır[37].

2.3.6. Nanolipozom Karakterizasyon Parametrelerinin Önemi

2.3.6.1. Partikül Büyüklüğünün Etkisi

Opsonizasyon oranı ve enjekte edilen lipozomların retikuloendotelial sistem (RES) ile kan dolaşımından atılması, lipozomun bileşenlerine ve boyutuna bağlıdır. RES'in, bağışıklık sisteminin bir parçası olarak temel işlevi yabancı maddeleri vücuttan uzaklaştırmaktır. RES, esas olarak karaciğer, akciğer ve dalaktaki Kupffer hücrelerinde bulunan kan monositleri ve makrofajlar gibi hücrelerden oluşur. Damar içi enjeksiyondan kısa bir süre sonra, nanolipozomlar opsonin adı verilen serum proteinleri ile kaplanır. Lipozomlar opsonize olduklarında, RES hücreleri tarafından hızla fagosite olurlar ve enjekte edilen lipozomlar, büyük oranda karaciğer ve dalakta birikmektedirler.

Büyük lipozomlar (> 200 nm) hızla opsonizasyona uğrar ve kısa sürede kan dolaşımından atılır ve yüksek oranda dalakta birikirler. Opsonizasyon lipozom boyutuyla orantılıdır. Küçük lipozomlar nispeten daha büyük bir yüzey alanına sahiptir ve membran yüzeyinde opsonin yoğunluğu daha düşük olacaktır, bu da makrofajlar tarafından daha az oranda tutulmaları demektir[38].

70 - 200 nm boyutunda olan lipozomların, RES'den kaçma olasılığı daha yüksektir, bu sebeple, dolaşımında daha uzun süre kalacaklar ve böylece hedefe ulaşma ihtimalleri de artacaktır. Karaciğerin kılcal duvarlarından ekstravazasyon (çevre dokuya sızma) yapabilmeleri nedeniyle, küçük lipozomlar (çap <70 nm) daha kısa süre dolaşımında kalırlar. Kan kapillerinin yapısı ve şekli organ ve dokulara göre değişiklik göstermektedir. Sağlıklı dokuların kılcal damarları, tümörlerin kılcal damarlarından yapısal olarak farklılık göstermektedir ve bu kılcal damarların organlara ve dokulara kan temini birbirinden farklıdır[39].

2.3.6.2. Lipozom Bileşenlerinin Etkisi

Lipozom katmanındaki lipidik organizasyon; geçirgenlik, membran esnekliği, yüzey yükü ve proteinlerin bağlanması gibi özellikler üzerinde etkilidir ve RES tarafından tutulmada en az lipozomun boyutu kadar önemlidir[40].

Esnek olmayan nötr lipozomlar, dolaşımında daha uzun süre kalabilmekte ve yüklü sistemlere kıyasla ilacı daha uzun süre tutabilmektedirler. Esnek olmamaları ve nispeten daha rijid membranlı olmaları sebebiyle de opsonin proteinleri yüzeye daha zor bağlanmaktadır. Lipozom formülasyonlarına kolesterol eklenmesi, fosfolipitlerin membrandaki organizasyonunu daha düzenli yapmakta ve daha sert bir katman oluşturmaktadır, bu da stabiliteyi artırır; ilaç sızıntısını önler. Ayrıca, opsoninlerin lipozomlar üzerine bağlanmasını azaltarak ve lipozomların *in vivo* ortamda stabilitesini artırabilir ve RES tarafından tutulmasını engelleyebilir[41]. Bazı plazma proteinlerinin lipozomlara afinitesi lipozom belirli bir yüke sahipse artmaktadır. Özellikle katyonik sistemler, sistemik dolaşımdaki bileşenlerle hızlı bir şekilde etkileşime girmekte ve bu nedenle *in vivo* olarak daha kısa bir yarı ömre sahip olmaktadır[42]. Fosfatidilserin (PS), fosfatidik asit (PA) ve fosfatidilgliserol (PG) gibi negatif yüklü lipidler içeren anyonik lipozomların makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde tutulduğu ve böylece kısa sürede dolaşımdan atıldığı da bilinmektedir[38, 43].

2.4.7. Lipozomlarda Stabilite

2.4.7.1. Kimyasal ve Fiziksel Stabilite

Lipozomların metal yüzeyle etkileşmesi sonucu oksidasyon gerçekleşir. Doymamış yağ asitlerinden oluşan lipitler, doymuş yağ asitlerinden oluşan lipitlere kıyasla daha dayanaksızdır; geçiş metallere (demir vb.) daha kolay etkilenmektedir[44, 45]. Kimyasal stabiliteyi artırmak için yüzeye katyonik polimer kaplanabilmekte, bu sayede artı yüklü geçiş metallere ile polimerdeki katyonlar birbirini itecek ve geçiş metallere lipozom yüzeyine ulaşamayacaktır.

Tez kapsamında da, kimyasal stabilitenin artırılması amacıyla katyonik polimerler tercih edilmiştir.

T_c geçiş sıcaklığının üstüne çıkılması veya partiküllerin agrege olması durumunda, lipozomun yapısı bozulmakta ve böylece etkin madde partikülden açığa çıkmaktadır[9]. Ortamın sıcaklığının, pH'ın, partikül büyüklüğünün, zeta potansiyelin ve lipit çeşidinin ilaç taşıyıcı sistemin bileşenlerine ve etkin maddeye göre optimum seçilmesi fiziksel stabilite için esastır.

2.4.7.2. Stabilitenin Artırılması

Lipozomlar, dolaşımdayken, kanda bulunan plazma proteinleri ile etkileşip Retikuloendotelial sistem tarafından atılmaktadır. RES sisteminde bulunan organlar, hedef organ olmadıkça bu durum dezavantaj yaratmaktadır. Bunların üstesinden gelmek için lipozom yüzeyinde çeşitli modifikasyonlar yapılmaktadır[46].

Bunun yanısıra, lipozomun yüzeyi de hedefleme çalışmaları için uygundur; çeşitli ligandlar ve polimerler ile modifikasyona elverişlidir.

Lipozomal ilaç taşıma sistemlerinin kullanımının, lipozomların yapısındaki bileşenler, insan hücre zarlarının bileşenlerinden oluştuğu için birçok yararı bulunmaktadır. Lipozomlar, kan dolaşımında, lipozomal olmayan bir ilaca kıyasla uzun bir süre dolaşımda kalabilir, bu da uygulanan tedavinin uzun süreli ve böylece daha etkili olmasını sağlamaktadır. Lipozomların bir diğer özelliği, kanser hücrelerini hedeflemeye ve kanserli bölgede birikebilmeleridir, böylece ilacın istenilen bölgede kendiliğinden ulaştırılmasını sağlamaktadır.

Sağlıklı bir insanın kan damarlarındaki endotel duvarı, sıkı kavşaklar ile birbirine endotel hücreleri ile kaplıdır, bu da kandaki herhangi bir büyük partikülün damardan sızmasını önlemektedir. Tümör damarlarında ise, endotel hücreleri arasındaki açıklık sızıntıya sebep olacak ölçüde daha fazladır, bu nedenle, belirli boyutlardaki (<400 nm) lipozomlar, kan dolaşımından tümörlü bölgelere kolaylıkla girebilir.

2.4.7.2.1. Kolesterol Kullanımı

Kolesterol molekülleri hidrokarbon zincirlerinin jel yapıdayken bir araya gelmesini engellemektedir. Faz dönüşüm sıcaklığının üstünde kolesterol, kristal lipit moleküllerini daha az sıvı bir hale getirmiş, geçirgenlik azalmıştır. Sert sterol moleküllerinin hidrokarbon zincirlerinin hareketini engellemektedir[9].

Faz değişimine etkileri sebebiyle, kolesterol içeren fosfotidilkolin formülasyonları, kolesterolsüz formülasyonlara kıyasla, farklı sıcaklıklarda içeriklerini koruyabilmişlerdir [29].

2.4.7.2.2. Yüze Polimer Kaplaması

Elektrostatik depozisyon metodu ile zıt yüklü lipitler ile polimerler etkileşebilmekte, polimerler yüze katmanlar şeklinde kaplanabilmektedir. En çok kullanılan lipozomların geniş pH aralığında negatif yüklü olması sebebiyle, pozitif yüklü bir polimer yüze kaplanmasında kullanılabilir. Kitosan, poli-L-lizin, polietilenimin kullanılan polimerlerden bazılarıdır. Bu tür kaplamalar, lipozomlardan ilaç sızıntısını engellemekte, stabiliteyi artırmaktadır[9]. Ayrıca polimer kaplanması, kimyasal bozunmaya karşı da olumlu etkiler göstermekte[45], lipaz enziminin lipozomla etkileşimini belirli süre içerisinde engelleyerek, lipozomun daha uzun süre dolaşımda kalmasını sağlamaktadır[47].

2.4.7.3. Stabilite Kontrolü

Partikül büyüklüğündeki değişim ve yüzey yüklerinin incelenmesi ile stabilite kontrolleri yapılabilmektedir. Belirli bir partikül boyutundan daha büyük olan nanolipozomlar, polidispersite indeksine bağlı olarak, agregere olmaya eğilimlidir. Ayrıca çalışmalarımızdan da elde ettiğimiz sonuçlara göre zeta potansiyeli 0'a yakın olan partiküller de fiziksel stabilitesinin koruyamamakta, maksimum 1 hafta içerisinde agregere olmaktadır. Bu sebeple tez kapsamında, zeta potansiyeline, polidispersite indeksine ve partikül büyüklüğüne önem verilmiştir. -30 mV ve +30 mV'dan, sırasıyla düşük ve yüksek olan nanolipozomlar, 0'a yakın PDI değerleri ile stabilitesini koruyabilmişlerdir. Partikül büyüklüğü 300 nm'den küçük nanolipozomların da, partikül büyüklüğündeki değişim 300 nm'den büyük olanlara kıyasla daha yavaş gerçekleşmiştir.

2.4.7.3.1. Partikül Büyüklüğü, Zeta Potansiyeli ve PDI Ölçümü

Partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi ölçümleri, zeta potansiyel analizleri, genellikle lazer ışık saçılımı yöntemi ile yapılmakta ve bu amaçla çalışmalarda, genellikle Malvern marka Zeta-Sizer NanoS cihazı kullanılmaktadır. Polidispersite indeksi ölçümleri formülasyonun homojenitesi, zeta potansiyel ölçümleri ise formülasyonun stabilitesi hakkında bilgi vermektedir.

Malvern Zeta-Sizer NanoS sisteminde 633 nm dalgaboyundaki 4 mW helyum/neon lazer bulunmaktadır ve örnekleri 1738 algılama açısında non-invaziv backscatter teknolojisi ile ölçmektedir(Şekil 3.2.). Sonuçlar, polidispersite indeksi (PDI) ile birlikte lipozom süspansiyonunun ortalama çapı (zeta ortalama partikül büyüklüğü) olarak elde edilmektedir. Bu indeks, tamamen monodispers bir sistem için 0.0, tamamen polidispers olan partiküller için 1.0 olmaktadır. Parçacık büyüklüğü dağılımı, büyüklük dağılımının genişliğinin bir ölçüsü olan PDI kullanılarak tanımlanmaktadır[48].

Lazer ışık saçılımı metodu ile, nanolipozomların ışık yayma miktarından yararlanılarak partikül çapı belirlenebilmekte ve bu amaçla özel kuvvetler kullanılmaktadır (Şekil 3.2.) [9]. Hassas bir yöntemdir, partikül büyüklüğü belirleme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır[44].

2.4.8. Faz Dönüşümünün Analizi

Lipozomların fiziksel stabilitesini etkilediği için faz dönüşümünün analizinin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla genellikle Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) yöntemleri kullanılmaktadır.

2.4.8.1 Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Fourier Transform Infrared Spektroskopisi'nde (FTIR), IR ışığının hücresel bileşenlerince soğurulması ile, moleküllere özgü titreşim sonucu, sinyaller oluşmaktadır. Sinyallerin şiddetinde, band genişliğinde ve frekans değerlerinde oluşan değişiklikler, sistemin moleküler yapısı hakkında bilgi vermektedir. Tez kapsamında, nanolipozom formülasyonlarında kullanılan lipitler ile katkı maddeleri veya polimerler arası etkileşimleri anlamak amacıyla kullanılmıştır.

2.4.8.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Örneklerin kütledeki değişim, atmosferdeki değişime, sıcaklığa veya zamana bağlı olarak belirlenebilmektedir. Burada DSC'de olduğu gibi ısı değil, örneğin kütlesi ölçülmektedir. Örneklerin kütledeki değişim, kimyasal veya fiziksel bağların kopması sebebiyle olmaktadır. TGA sonuçları, örnek boyutundan, örneğin analiz sırasında hareket etmesinden, polidispersite indeksinden, gaz akış hızından, termal iletkenlikten, ısıtma hızından ve atmosfer ortamından etkilenebilmektedir.

2.4.8.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Bu yöntem, ısı analizi için kullanılan termal analitik bir yöntemdir; örnek ısıtıldığında, soğutulduğunda veya sabit sıcaklıkta tutulduğunda soğurulan ya da salınan enerji miktarı ölçülmektedir. Böylelikle faz değişimlerinin endotermik ya da ekzotermik olduğu tepelik veya çukurlar halinde görülebilir, DSC eğrilerinden T_0 (faz değişimi başlangıç sıcaklığı), T_m (faz değişim tepe sıcaklığı), dönüşümün yarı noktasının genişliği, ΔH (entalpi) değerleri elde edilmektedir.

pH değerlerinin de T_m faz değişim tepe sıcaklığını değiştirdiği bilinmektedir, bununla birlikte, sistemdeki kontaminasyonlar da DSC metodu ile gözlenebilmektedir.

2.4.9. Yüzey Karakterizasyonu

2.4.9.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Formülasyonların morfolojik değerlendirilmeleri genellikle taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak yapılmakta ve lipozomların morfolojik şekilleri değerlendirilmektedir.

2.4.10. Nanolipozomlara Etkin madde Yüklenmesi

Etkin madde, lipozomlara iki farklı şekilde yüklenebilmektedir. Bunlardan birincisi lipozom oluşturulurken etkin madde yüklenmesi, bir diğer adıyla pasif yükleme; ikincisi ise lipozomlar oluşturulduktan sonra etkin madde yüklenmesi, diğer adıyla aktif yükleme şeklindedir.

2.4.10.1. Pasif Yükleme

Lipozom hazırlanırken, lipitlerin çözüldüğü organik fazda, hidrofobik ilaçların da lipitlerle beraber çözdürülmesi, hidrofilik ilaçların da sulu fazla çözüldürülmesi ile yapıya etkin madde eklenebilmektedir. Hidrofobik ilaçların yapıya yüklenme oranları, ilaç-lipit etkileşimlerine bağlı olmaktadır. Eđer ilaç, lipozom membranında iyi çözünebiliyorsa tutulma ihtimali yüksektir.

Lipozom formülasyonunda hidrofilik veya hidrofobik etkin madde ya da her iki tip etkin madde aynı lipozomun yapısında bulunabilmektedir.

2.4.10.2 Aktif Yükleme

Aktif yüklemeye uzaktan yükleme veya kademeli pH'da yükleme de denmektedir. Sadece hidrofilik ilaçların yüklenmesinde kullanılabilir[49]. Lipozom membranının iç ve dış taraftaki pH farkından yararlanılarak etkin madde yüklenebilmektedir. Boş lipozomlar ile belli bir pH ve sıcaklıkta çözünmüş halde bulunan etkin maddenin, aynı çözeltide bekletilmesi ile gerçekleştirilir. Tutulmamış etkin maddeler diyaliz yöntemi, jel filtrasyon, ultrasantrifüj veya iyon değiştirici reçineler ile uzaklaştırılmaktadır[50, 51].

2.4.11. Lipozomların Hücre Etki Mekanizmaları

Lipozomlar hücreye adsorbsiyon, endositoz, lipid değişimi veya füzyon ile entegre olabilirler. Adsorbsiyon, lipozomun hücre yüzeyine tutunup, etkin maddeyi hücrelerarası sıvıya aktarması sonucu, etkin maddenin hücreye girişi ile olmaktadır. Lipozomlar, hücre membranı ile birleşerek fagositoz ile hücre içine alınabilmektedir. Ayrıca, hücre membranındaki lipidlerden oluştukları için, membran ile lipozom yapısındaki lipidler yer değiştirebilmektedir. Son olarak, hücre ile lipozomun dış kısmı birleşerek füzyon yolu ile hücreye etki edebilmektedirler[52-54].

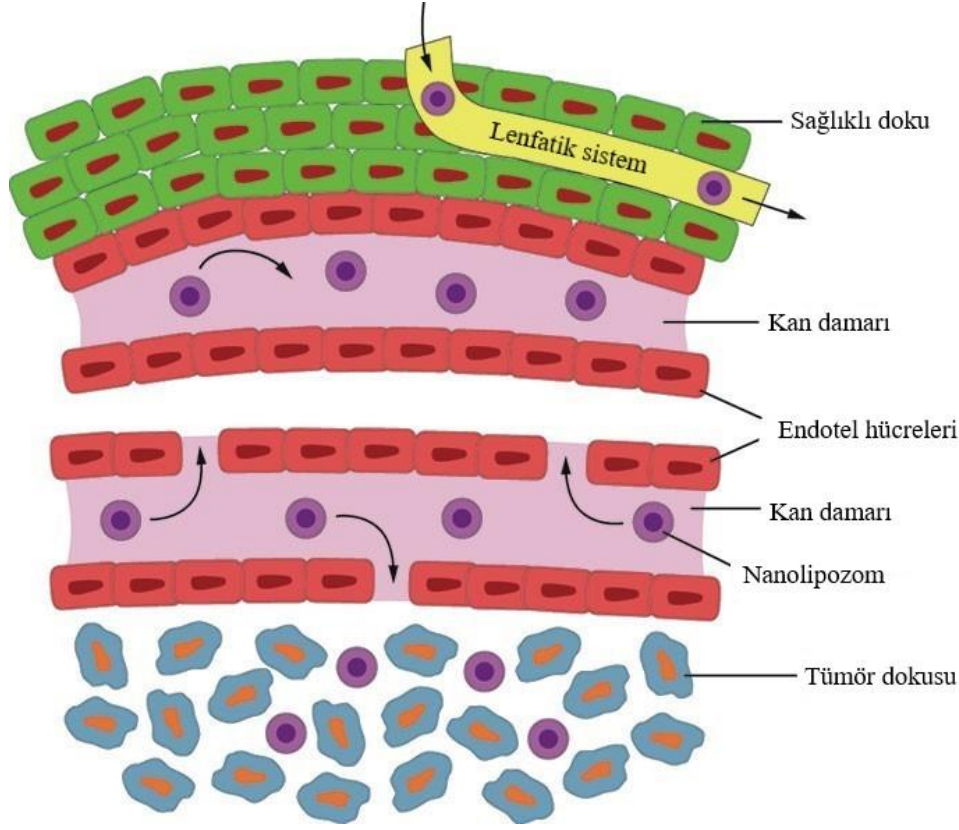
2.4.12. Nanolipozomların Kullanım Alanları

2.4.12.1. Lipozomların Kanser Tedavisinde Kullanımı

Lipozomlar, birçok avantajlı özelliğe sahip olduğu için kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ana içerik olarak lipidlerden oluşmaları nedeniyle vücutta toksik olmama ve parçalanabilirlik gibi belirgin avantajları bulunmaktadır. Lipozomlar aynı zamanda hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları enkapsüle edebilme ve kontrollü bir salım yapabilme özelliklerine sahiptir[43]. Lipozomların ilaç enkapsülasyonu, kalp, böbrekler ve bağırsak gibi organlara ilacın asgari düzeyde etkisinin olması nedeniyle ilacın toksisitesini de azaltmıştır.

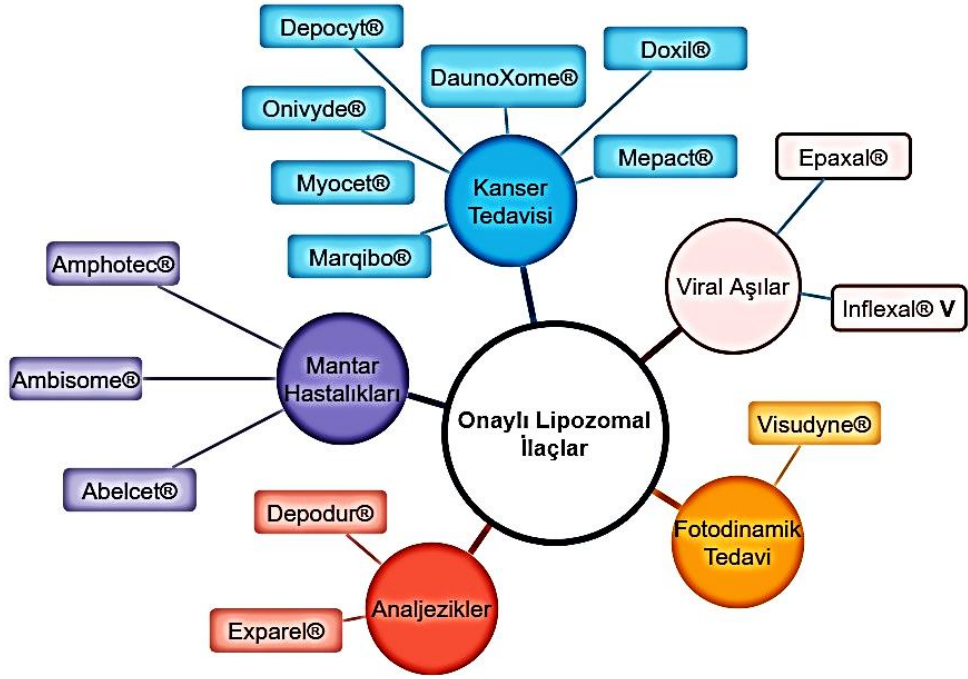
Enkapsüle edilen ilaçların kan dolaşımında degrade olmasının engellenmesinin yanı sıra, geçirgenlik ve tutma etkisi olarak bilinen EPR etkisi nedeniyle pasif hedefleme ile tümörlerde birikebilmektedirler. EPR etkisi, tümörlerde vasküler yapı ile sağlıklı dokular arasındaki farklardan kaynaklanmaktadır (Şekil 2.15.). Anjiyogenez nedeniyle,

hüresel paketlenme daha azdır ve hücreler arasında büyük boşluklar sebebiyle de kan damarları daha sızdırıcı özelliktedir. Ayrıca, lipozomlar veya diğer nanoparçacıklar gibi maddelerin dokulardan uzaklaştırılmasından sorumlu olan lenfatik sistem normal dokuya kıyasla tümörlü dokularda daha az miktarda ifade edilmektedir[55]. EPR etkisi ile, küçük boyuttaki lipozomlar (<70 nm) tümörler içindeki damarlardan girip ve pasif hedefleme etkisiyle orada birikebilir[39].



Şekil 2.15. Lipozomların EPR etkisi ile tümörlü dokularda birikmesi [10].

Kanser tedavisine yönelik olarak klinik kullanıma girmiş (Ambisome, Doxil, DaunoXome, Lipo-dox, vs.) (Şekil 2.16.) veya halen faz çalışmaları devam eden pekçok lipozom formülasyonu (Çizelge 2.2.) (EndoTAG-1, LEP-ETU, Atragen, ThermoDox, Lipoplatin, vs.) bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda ise, kanser tedavisine yönelik tek başına gen taşıyan veya antikanserojen madde içeren nanotaşıyıcı sistemler olarak, polimerik veya lipidik nanopartiküller, lipozomlar, niozomlar, karbon nanotüpler, miseller ve dendrimerler yer almaktadır[56-60].



Şekil 2.16. Lipozomların kullanıldığı terapötik alanlar ve FDA onaylı lipozomal ilaçlar [11]

Çizelge 2.2. Faz I, II ve III aşamalarındaki lipozomal ilaçlar [11]

Faz I	Faz II	Faz III
<ul style="list-style-type: none"> •LEM-ETU (Mitoksantron lipozomları) •Grb-2 (Antisens protein lipozomları) •INX-0125 (Lipozomal vinorelbin) •INX-0076 (Lipozomal topotekan) •LiPlaCis (Cisplatin lipozomları) •SGT-53 (p-53 lipozomları) 	<ul style="list-style-type: none"> •Aroplatin (Platinum analog lipozomları) •S-ANNA (Annamycin lipozomları) •SPI-077 (Cisplatin lipozomları) •OSI-211 (Lurtotecan lipozomları) •S-CKD602 (CKD602 lipozomları) •LEP-ETU (Paklitaksel lipozomları) 	<ul style="list-style-type: none"> •Arikace (Amikasin lipozomları) •Stimuvax (Tecemotide lipozomları) •T4N5 (T4 endonükleaz V lipozomları) •Liprostin (PGE-1 lipozomları) •Thermodox (Doksorubisin lipozomları) •Lipoplatin (Cisplatin lipozomları)

2.4.12.2. Lipozomların Gen Terapisinde Kullanımı

Lipidik veziküllerin morfolojileri, bileşimleri, birçok terapötik biyomolekülü hapsedebilme ve koruyabilme yetenekleri, immünojenik cevap vermeme, düşük maliyetleri ve diferansiyel salım özellikleri, lipozomları ilaç veya gen taşımak için ideal

taşıyıcılar yapmaktadır[61-63]. Lipozomlar sıklıkla gen tedavisi amaçlı olarak kullanılmış, RNA veya DNA gibi moleküllerin taşınması amacıyla lipopleksler oluşturulmuştur. Bu tür lipopleksleri oluşturmak için kullanılan lipitler katyonik, anyonik, nötr veya bunların karışımı olabilmektedir. Katyonik lipitler baş kısmında(polar) bulunan bir veya daha fazla amin grubundan dolayı pozitif bir yük kazanmaktadırlar. Pozitif yüklü aminlerin varlığı, DNA'da bulunan anyonlarla bağ yapmayı mümkün kılmaktadır. DNA veya RNA molekülleri katyonik lipozomun yüzeyine elektrostatik ve Van der Waals bağları ile bağlanmaktadır. DNA'nın polianyonik doğası nedeniyle, katyonik (veya nötr) lipitler sıklıkla gen transferinde kullanılırken anyonik lipozomların kullanımı bu alanda sınırlıdır. Genlerin lipozomlara yüklenmesi sürecinde, lipozomların şekli değişerek, farklı yapılarda olabilmektedirler[62-67]. Her yapı, kullanılan lipitlerin özelliklerine dayanarak enerjetik olarak en uygun konformasyonda oluşturulur.

2.4.13. Nanolipozomlarda Hedefleme

2.4.13.1. Pasif Hedefleme

Tümörlü dokulara nanolipozomları pasif hedeflendirmenin temeli, esas olarak endotel hücreleri arasındaki gözenek büyüklüklerine dayanmaktadır. Normal kılcal damarlardaki endotel hücrelerinin arasındaki boşluklara kıyasla, tümör mikrovaskülatüründeki endotel hücreleri daha aralıklı olmaktadır, bu sebeple ekstravazasyon mümkün olup, nanolipozomlar tümör dokularına ulaşmaktadır. Tümör mikroçevresinde vasküler endotelyal büyüme faktörlerinin (VEGF) anormal miktardaki artışı bu bölgede anjiyogenezin ve kılcal damar geçirgenliğinin artmasına sebep olmaktadır. Boyutları 400 nanometreye kadar olan nanopartiküllerin, bu açıklıklardan ulaşması ve birikimi, EPR(geçirgenlik ve tutma etkisi) etkisi olarak bilinmektedir. Birikmiş olan nanolipozomlar, etkin maddeyi bu açıklıklardan tümörlü dokuya ulaştırıp, kanser hücrelerinin apoptoza uğramasını sağlamaktadır[68].

2.4.13.2. Aktif Hedefleme

İlaç taşıma sistemleri vücudun spesifik bir bölgesine birçok şekilde aktif olarak hedeflendirilebilmektedir. Kanser bölgelerinin aktif hedeflenmesi için, kanser hücreleri tarafından eksprese edilen spesifik antijenlere bağlanması amacıyla çeşitli ligandlar partikül yüzeyine bağlanmaktadır. Retiküloendotelyal sistem tarafından immünolipozomların tutulması, aktif hedeflemede temel zorluklardan biridir. Yüze yin PEG veya çeşitli polimerle kaplanması ile RES sistemi tarafından tutulmadan nanolipozomlar, hedefe başarıyla ulaştırılabilmektedir. PEGilasyon işleminin herhangi bir antijen-antikör bağlanmasını engellemediği de gösterilmiştir.

Aktif hedeflendirmeyi etkileyen faktörler, ligant yoğunluğu, nanopartikül büyüklüğü ve şekli, yüzey ve ligant yüküdür.

2.4.14. Gen Transferi Uygulamaları İçin Yapılan Yüzey Modifikasyonları

2.4.14.1 Disetilfosfat (DCP) Eklenmesi

Disetilfosfat, setil alkol ve fosforik asit diesterlerinin kompleks bir karışımıdır. Membran modellerinin üretiminde kullanılan negatif yüklü bir lipittir. Tez kapsamında yüzeye negatif yük vermesi amaçlı kullanılmıştır.

2.4.14.2. Stearilamin (SA) Eklenmesi

Stearilamin (SA) nanolipozomlar da dahil olmak üzere birçok ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan katyonik bir lipittir. Zeta potansiyelini artırarak formülasyonun stabilitesini artırmak veya korumak amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, elektrostatik etkileşimler sonucunda yüzeye negatif yüklü polimer veya ligandların bağlanabilmesini mümkün kılmaktadır.

2.4.14.3. Polietilenimin (PEI) Kaplanması

Katyonik lipozomlarda DNA'nın lizozomlarda degrades olmasından dolayı DNA transfeksiyon verimlerinin düşük olması ve toksik etki göstermelerinden dolayı polietilenimin gibi polikasyonlar kullanılmaktadır. PEI kaplı nanopartiküller, fizyolojik koşullarda PEI'nin içerdiği amino gruplarının %15'inde bulunan azot grupları pDNA ile

etkileşmektedir. Bu yüzden, kalan amin grupları, düşük pH aralıklarında, endozom ve/veya lizozomun asidik pH'ında(4 ile 6 arası), proton sünger etkisi gösterebilmektedir. Proton yakalama özelliğinden dolayı, hücre, endozom veya lizozom içine proton pompalanmaya zorlanmaktadır. Endozoma veya lizozoma giren H⁺ iyonları ile beraber klorür iyonları ve su molekülleri de girmektedir. Şişen endozom, içeriğini sitoloze bırakmaktadır [69-72]. Bu sayede sitozoldeki PEI kaplı nanopartiküller etkinlik gösterebilmektedir.

2.4.14.4. Poli-L-lizin (PLL) Kaplanması

Poli-amino asitler hücre ve proteinlerin katı yüzeylere bağlanmasını kolaylaştırır. Hücre kültürlerinde normal bağlanma, büyüme ve birçok hücre türünün gelişimi bağlanma faktörlerine ve hücre dışı matris bileşenlerine bağlıdır. Bazı hücreler bu bileşenleri sentezleyebilse de, bazıları serumsuz kültürlerde yetiştirildiğinde ek bir kaynak gerektirir. Hücrelerin bağlanmasını, yayılmasını, büyümesini, morfolojisini, farklılaşmasını ve hareketliliğini kolaylaştırmaya yardımcı olmaktadır.

Histokimyasal uygulamalarda, hücrelerin bağlanmasını desteklemek için hem D- hem de L-lizin polimerleri kullanılır. PLL'nin protein bağlanmasını artırdığı da bilinmektedir[73]. PLL, ayrıca, poliaminoasitler içerisinde, nükleik asit transferi için ilk kullanılan doğal polimerdir[74]. PEI'nin aksine hücre içine alımının daha fazladır, bunun yanı sıra PLL çok fazla proton barındırmadığından endozomal kaçışta daha başarılıdır fakat bu özelliklerinden dolayı gen transferinde çok etkili değildir[75].

Tez kapsamında yüzey yükleri değiştirilerek farklı nanolipozom formülasyonları hazırlanmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çizelge 3.1. Nanolipozom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasal malzemelerin listesi

Kimyasal Madde	Marka ve Menşei	Kullanım Amacı
5-FU	Sigma Aldrich (ABD)	Lipozom formülasyonunda kullanılan etkin madde
A431 insan epidermoid karsinom hücreleri	American Tipi Kültür Koleksiyonu (ABD)	<i>İn-vitro</i> hücre çalışmalarında kullanılan hücre hattı
Dimetilsülfoksit	Merck (Almanya)	Toksisite deneyleri
Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC)	Lipoid (İsviçre)	Formülasyonda kullanılan temel lipit
Disetilfosfat (DCP)	Sigma Aldrich (ABD)	Formülasyon bileşeni
Diyaliz membran	Sigma Aldrich (ABD)	<i>İn-vitro</i> salım çalışmalarında kullanılan membran
Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı	Lonza(İsviçre)	<i>İn-vitro</i> hücre çalışmalarında kullanılan besi ortamı
Fosfat tampon tuz tableti (pH=7.4)	Sigma Aldrich (ABD)	PBS çözeltisi
Kloroform	Merck (Almanya)	Çözücü madde
Kolesterol	Sigma Aldrich (ABD)	Formülasyon stabilitesi için kullanılan bileşen
Phospholipon 90 G	Lipoid GmbH (Almanya)	Formülasyonda kullanılan lipit
Poli-L-lizin (PLL) M _w =70.000-150.000	Sigma Aldrich (ABD)	Lipozomun yüzeyini kaplamada kullanılan polimer

Polietilenimin(PEI) M_w=25 kDa	Sigma Aldrich (ABD)	Lipozomun yüzeyini kaplamada kullanılan polimer
Polivinilalkol (PVA)	Merck (Almanya)	Sümfaktan
Soya Fosfotidilkolin (Lipoid S100)	Lipoid GmbH (Almanya)	Formülasyonda kullanılan lipit
Stearilamin (SA)	Sigma Aldrich (ABD)	Formülasyon bileşeni
Tween 20	Merck (Almanya)	Sümfaktan
Tween 80	Merck (Almanya)	Sümfaktan

3.2. Kullanılan Araç-Gereçler

Çizelge 3.2. Nanolipozom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan cihazların listesi

Kullanılan Cihaz	Marka v	Kullanım Amacı
Çalkalayıcı su banyosu	Memmert	<i>İn-vitro</i> salım çalışmaları
FT-IR	Thermo Fisher, Nicolet is50	Nanolipozomların moleküler bağlanmalarının incelenmesi
Hassas terazi	Mettler Toledo PB 303-S	Bileşenlerin tartımı
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-4 LSC	FTIR ve TGA örneklerinin analizi için liyofilize formülasyonların hazırlanması
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3003	Yağ banyosunda PLL kaplı nanolipozomların oluşturulması
Manyetik Karıştırıcı	ThermoScientific	Formülasyonda MLV'lerin ve PEI kaplı nanolipozomların oluşturulması

Partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel ölçüm cihazı	Malvern (İngiltere)	Zetasizer	Formülasyon optimizasyonu ve karakterizasyon çalışmaları
pH-metre	Inolab WTW		Etkin madde çözücü ortamı hazırlama ve tampon çözelti hazırlama
Rotary Evaporatör	Buchi R-114		MLV'lerin oluşturulması
Santrifüj	Eppendorf 5430 R	Centrifuge	Etkin madde miktar tayini ve hücre çalışmaları için pellet ayırma
Sonikatör	BandelinSonoplus 2070	HD	MLV'lerden nanolipozomların oluşturulması
Taramalı Elektron Mikroskopu	QUANTA 400F Emission SEM	Field	Formülasyonların yüzey karakterizasyonunun incelenmesi
TGA, DSC	TA Instruments, Q600 SDT (Simültane DSC/DTA/TGA)		Nanolipozomların termal ve polimorfik özelliklerinin incelenmesi
Ultra Saf Su Cihazı	MP MiniPure		Çözücü hazırlama

3.3. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Etkin madde olarak 5-FU ile çalışılmıştır. Bu amaçla, etkin maddenin FTIR, UV ve DSC spektrumları, erime derecesi, çözünürlük ve lipit-su partiyon katsayısı tayinleri yapılmıştır.

3.3.1 FT-IR Spektrum Çalışmaları

Etkin maddenin FT-IR spektrometresinde 400-4000 cm^{-1} dalga sayıları arasında IR spektrumları çekilmiştir.

3.3.2. UV Spektrum Çalışmaları

Tez kapsamında difüzyon ortamı olarak fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH= 7.4) kullanılması planlandığı için, etkin maddenin bu ortamda UV spektrumu (UV-2600-Vis spektrofotometre) alınmıştır.

3.3.3. Termal Analiz Çalışmaları

Termal analiz çalışmaları için, 5-FU alüminyum örnek kabında yaklaşık 10 mg kadar tartılmış ve kapak basınç yardımıyla kapatılmıştır. Referans olarak alüminyum boş plaklar kullanılarak, 10°C/dk sıcaklık artışı, 50 mL/dk azot akış hızı ve 20-300°C sıcaklık aralığında DSC/TGA spektrumu çekilmiştir (Perkin Elmer DSC-8000).

3.3.4. Çözünürlük Çalışmaları

Tez kapsamında difüzyon ortamı olarak tuzlu fosfat tamponu (PBS) (pH:7.4) kullanılması planlandığı için, 5-FU'nun bu ortamdaki çözünürlük çalışması yapılmıştır. Saf etkin maddenin çözünürlüğü difüzyon ortamında incelenmiştir. Bu amaçla kapaklı bir erlen içinde bulunan çözünme ortamına çözünebileceğinden fazla miktarda etkin madde konularak 37°C de bir manyetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırılarak bekletilmiş, sıvı fazdan 0.45 μm 'lik filtre ile süzülerek alınan numunelerde etkin madde miktarı tayin edilmiştir.

3.3.5. Lipit-Su Partisyon Katsayısının Hesaplanması

Etkin maddenin lipit-su partisyon katsayısını (log P) tayin etmek için yağ fazı olarak oktanol, su fazı olarak da pH 7.4 PBS kullanılmıştır. Dağılım katsayısını tayin amacı ile 5-FU'nun pH 7.4 fosfat tamponu içinde 0.1 M konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış, hazırlanan bu stoktan belirli hacimde örnek alınarak, başlangıçta sulu fazda bulunan etkin madde miktarı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile hesaplanmıştır. Daha sonra, bu stok çözeltisinden 10'ar ml alınarak 10 ml n-oktanol ile birlikte ağzı kapaklı erlenlere konulmuştur. İçinde n-oktanol ve stok çözeltisinin bulunduğu bu kapaklı erlenler $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda manyetik karıştırıcı (50 devir/dk) ile etkin maddenin yağ fazına geçişi tamamlanincaya kadar, yani sulu fazda ilaç konsantrasyonu sabit kalıncaya kadar karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda karışım 15 dakika santrifüj edilerek iki faz ayrılmış ve sulu fazdaki etkin madde miktarı hesaplanmıştır. Log P değeri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Log P} = \text{Log} [(M_b - M_s)/M_s]$$

M_b = Başlangıçtaki 5-FU miktarı

M_s = Partisyon sonrası sonraki 5-FU miktarı

3.4. Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon çalışmaları, Avrupa Farmakopesi (EP), Birleşik Devletler Farmakopesi (USP), Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) talimatlarına uygun olacak şekilde [76-78], etkin maddenin miktarının tayininde kullanılan yöntemin güvenilir olup olmadığını göstermek için yapılmaktadır. Validasyonun parametreleri arasında doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), özgünlük, stabilite (stability), teşhis sınırı ve tayin sınırı başlıkları yer almaktadır.

Tez kapsamında, etkin madde olan 5-FU'nun miktar tayini çalışmaları için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmış ve validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Kromatografik şartlar Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. 5-FU miktar tayini için kullanılan kromatografik şartlar

Cihaz	HPLC (Dionex-Ultimate 3000)
Kolon	Hypersil ODS (C18), 4.6 x 150 mm
Dedeksiyon	UV, 265 nm
Akış Hızı	0.8 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Analiz Süresi	8 dk
Hareketli Faz	6.805 g/L KH ₂ PO ₄
Kolon Basıncı	~48 bar
Alınma Zamanı (RT)	~5 dk

3.4.1.Özgünlük ve Seçicilik

DeneySEL çalışmalardaki analiz yönteminin, ortamda etkin madde dışındaki maddeler varlığında sadece çalışılan bileşiği saptayabilmesidir. Bunun için seyreltme çözeltisi, standart çözelti, lipid çözeltisi, in-vitro salım ortamı olan pH 7.4 PBS (potasyum dihidrojen fosfat tuzu tamponu) hazırlanarak viallere aktarılmış ve analiz yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

3.4.2. Doğrusallık

Doğrusallık; analiz edilen etkin maddenin konsantrasyonu ile ölçülen analitik cevabın doğru orantılı olarak arttığının ispatı için yapılmaktadır. Bu sebeple, etkin maddenin ultra saf su içindeki (NaOH çözeltisi ile bazik hale getirilmiş (pH=9) ana stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL) 7 farklı seri oluşturulmuştur. Elde edilen konsantrasyonlara karşılık gelen pikler ile kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

3.4.3. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Doğruluk, valide edilen analitik yöntem ile yapılan deneyden elde edilen verilerin gerçek sonuçlarla olan benzerlik derecesidir. Elde edilen sonuçlar % eğri kazanım cinsinden ifade edilmektedir. Analizi yapılacak olan maddenin, analizin yapıldığı ortamdan hangi oranlarda geri elde edilebildiğini göstermektedir.

Kalibrasyon doğrusundan seçilen üç farklı etkin madde konsantrasyonu, deney için doğruluğun ispatı için yapılmıştır. Buna göre, düşük (2 µg/mL), orta (10 µg/mL) ve yüksek (50 µg/mL) konsantrasyonlardan 3 adet örnek hazırlanmış olup, aynı gün içerisinde ölçümler yapılarak ortalama bağıl hata değerleri hesaplanmıştır.

3.4.4. Kesinlik

Kesinlik, kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsüdür [79]. Parametreleri standart sapma ve varyasyon katsayısı (standart sapma) olarak belirtilir. Bu sebeple, kesinlik, bu hataların dağılımına göre belirlenir ve istatistiki olarak yeterli sayıda veri olması durumunda standart sapmaya göre hesaplanmaktadır. Tez kapsamında, tekrarlanabilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) parametreleri herbir konsantrasyon için ayrı ayrı hesaplanmıştır[79].

3.4.5. Duyarlılık

3.4.5.1. Saptama Sınırı (LOD)

Saptama sınırı, miktar tayini yapılan maddenin saptanabileceği en düşük konsantrasyondur. Bu değerdeki konsantrasyonda sinyal/gürültü oranı 3:1'dir.

3.4.5.2. Miktar Tayin Sınırı (LOQ)

Miktar tayin sınırı, valide edilen analitik yöntem koşullarında, miktar tayini yapılan maddenin kesinliğinin ve doğruluğunun kabul edilebilir seviyede olduğu konsantrasyondur. Bu konsantrasyonda elde edilen sinyal/gürültü oranı 10/1'dir [8, 80]. Bu sebeple, LOQ çözeltisinden bir adet hazırlanmış, vialle aktarıldıktan sonra ardışık altı

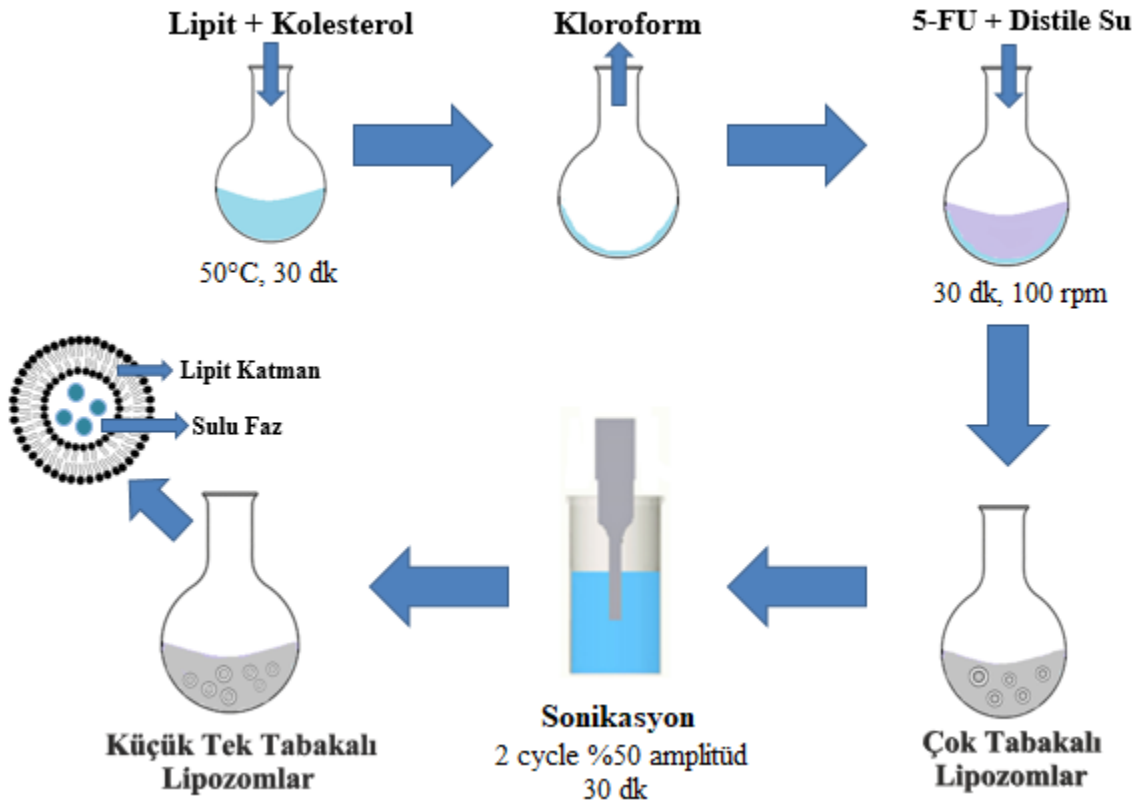
enjeksiyon yapılmıştır, ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen 5-FU pik alanları %VK değeri ≤ 10 olması gerekmektedir.

3.4.5.3. Stabilité

5-FU'nun deney yapılırken stabilitesini koruduğunun gösterilmesi amacıyla 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri, viallerde 24 saat bekletilerek analiz edilmiştir. %VK değerlerinin %2'den küçük olması, etkin madde stabilitesinin sürdürülebilirliğini göstermektedir.

3.5. Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Naanolipozom formülasyonları 4 farklı lipit (Lipoid- α -fosfotidilkolin, Lipoid S100, Fosfolipon 90G, DPPC) kullanılarak, ince film tabaka oluşturma yöntemi (Şekil 3.1.) ile hazırlanmıştır.



Şekil 3.1. İnce film tabaka oluşturma yöntemi

Öncelikle lipit ve kolesterol (stabilite arttırıcı) bir balon içerisinde kloroformda (25 mL) çözündürüldü. Organik çözücü, rotavaporda (40°C, 100 rpm) uçurularak balonun alt kısmında ince bir lipit tabakası oluşması sağlandı. Ardından, lipit film üzerine sulu faz eklendikten sonra, sonikatör yardımıyla (%50 power, 2 cycle) rehidrate edilerek nanolipozomlar hazırlandı.

Formülasyon optimizasyon çalışmaları kapsamında, farklı parametrelerin (sonikasyon süresi, fosfolipitin yapısı, çözücü maddenin pH değeri, sürfaktan kullanımı, negatif veya pozitif lipidin yapıya eklenmesi), formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkileri belirlendi (Çizelge 3.4.). Bunlar arasından ideal karakterizasyon ve enkapsülasyon etkinliği gösteren nanolipozomlar ile polimer kaplı nanolipozom formülasyonları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Formülasyon optimizasyon çalışmaları için kullanılan parametreler

Fosfolipit yapısı	Sonikasyon süresi	Çözücü pH değeri	Sürfaktan	Negatif lipit	Pozitif lipit	Polimer Türü
Lipoid- α -fosfotidilkolin	5	7	Tween 80	DCP	SA	PLL
Lipoid S100	15	7	Tween 20			PEI
Fosfolipon 90G	25	7	PVA			
DPPC	30	9				

İlacın en fazla çözündüğü pH aralığı 8 ile 10 arasında olduğu için, ilacın çözülmediği ortamın pH değeri, ultra saf su, ilaç suya eklendikten sonra NaOH çözeltisi ile bazık yapıldı. Bazık ortamda DPPC’de negatif yüklü bir lipit özelliği göstereceğinden, Stearilamin ile agregasyon oluşturmaması açısından sadece seçilen formülasyonla olan çalışmalarda etkin maddenin çözelti pH’ı değiştirildi. SA ve DCP kullanılan

formülasyonda molar oran 7:2:1 olarak seçilirken, sadece kolesterolün olduğu formülasyonda mol oranı 9:1 olarak belirlendi.

3.6. PLL Kaplı Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Hazırlanan nanolipozomların yüzey modifikasyonları yapılarak polimer kaplı nanolipozom formülasyonları elde edildi. Bu amaçla, hidrofilik PLL ve PEI polimerleri ile yüzey kaplaması yapıldı.

PLL kaplı nanolipozomların oluşturulmasında, DPPC, DCP ve kolesterolden (7:2:1) oluşan Lipo-FU anyonik nanolipozomlar kullanıldı. PLL çözeltisi 1:10 oranında distile su ile seyreltikten sonra, 1 mL alınarak, üç farklı konsantrasyondaki nanolipozom çözeltisi (0.176, 0.2, 1 mg/mL) ile karıştırıldı[130] (*PLL1-PLL2-PLL3 kodlu formülasyonlar*). 100 mL'lik cam balon içerisine PLL çözeltisi ile nanolipozom çözeltisi eklenerek 58°C, 250 rpm'de 30 dk boyunca yağ banyosu içerisinde karıştırıldı. Daha sonra, PLL çözeltisinden 2 mL alınarak, aynı konsantrasyondaki nanolipozomlar ile (0.176 mg/mL, 0.2 mg/mL, 1 mg/mL) karıştırıldı (*PLL4, PLL5 ve PLL6 kodlu formülasyonlar*).

Formülasyon karakterizasyonu çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre optimum nanolipozom konsantrasyonu 0.176 mg/mL olarak belirlendi ve artan hacimdeki PLL çözeltisi (1, 2, 3 ve 4 mL) ile kaplama çalışmaları yürütüldü (*PL1, PL2, PL3 ve PL4 kodlu formülasyonlar*).

PEI kaplı nanolipozomların oluşturulması için ise, artan nanolipozom konsantrasyonları (0.176 mg/mL, 0.2 mg/mL, 1 mg/mL), 2 mg/mL PEI (25 kDa) ile oda sıcaklığında 1 saat 200 rpm'de karıştırılarak hazırlandı (*PEI1, PEI2 ve PEI3 kodlu formülasyonlar*).

3.7. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan nanolipozom ve polimer kaplı formülasyonlarının karakterizasyonları, PB, PDI ve ZP parametreleri ile değerlendirilmiştir. İdeal özelliklere sahip (yüksek enkapsülasyon etkinliği) formülasyonlar, SEM görüntüleri alınarak morfolojik açıdan değerlendirilmiştir. FT-IR analizleri ile molekül bağ yapıları, TGA-DSC analizleri ile de termodinamik özellikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

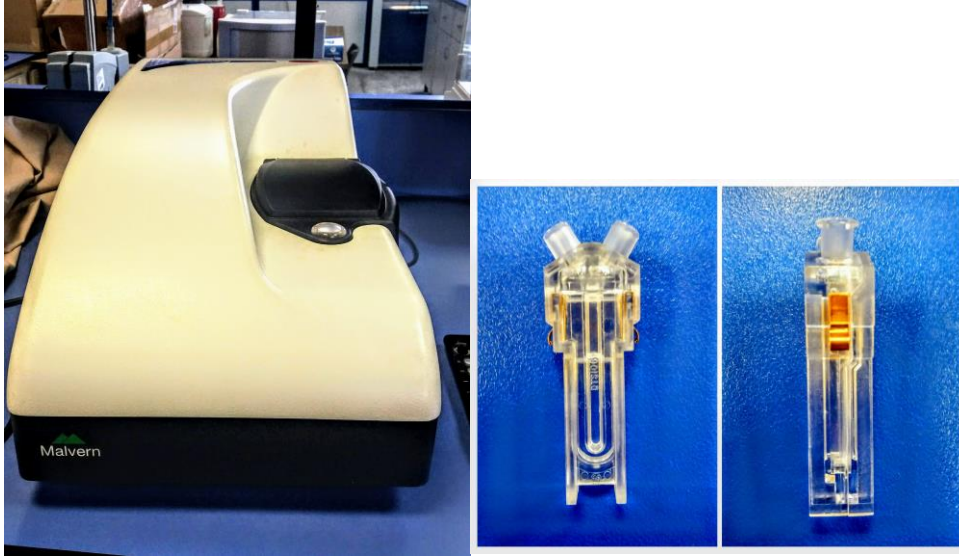
3.7.1. PB / ZP / PDI Analizi

PB ve dağılımı analizleri nano formülasyonların karakterizasyonu için en temel parametreler olup, formülasyon içindeki partiküllerin dinamik ışık saçılımı yöntemiyle ölçülmesiyle bulunur.

ZP ölçümü de, partikülü çevreleyen yükün ölçülmesi esasına dayanmaktadır ve stabilite hakkında fikir vermektedir. Bu değer pozitif veya negatif 30 mV değerinde olması ile sistemin stabil olduğu varsayılmaktadır.

PDI ölçümü ise, partikül boyut dağılımı ve homojenitesini belirleyen bir parametre olup, genellikle lipozom formülasyonları için 0.5'ten küçük olması beklenir.

Formülasyonların, PB ve dağılımı ile ZP analizleri, lazer ışık saçılımı yöntemi ile DTS1060C kodlu özel zeta hücre kuvvetleri kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, bölümümüzde bulunan Malvern marka Zeta-SizerNanoS cihazı ve zeta kuvvetleri kullanılmış (Şekil 3.2.), ölçümler 25°C'de, geri saçılan elektronların dedektöre geliş açısı 173° olacak şekilde ayarlanarak 3 ardışık tekrar ile yapılmıştır.



Şekil 3.2. Malvern Zetasizer Cihazı ve ZP ölçümünde kullanılan küvetler

3.7.2. Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Etkin madde ve nanolipozom formülasyonları arasındaki moleküler bağlanmaları değerlendirmek için; 5-FU, kullanılan lipit (DPPC), 5-FU + DPPC fiziksel karışımı, boş nanolipozomlar ve 5-FU yüklü nanolipozomlar ile ATR-FTIR analizleri yapılmıştır.

Boş nanolipozom ve Lipo-FU formülasyonu 0.370 mbar vakum ortamında, -55°C 'de 72 saat boyunca çözelti fazı uçurularak liyofilize edildikten sonra ölçüme alınmıştır. Spektrumlar $4000\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte ve her bir örnek için 16 tarama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7.3. Termogravimetrik Analiz

Hazırlanan formülasyonların termal ve polimorfik özelliklerinin incelenmesi için TGA yapılmıştır. Nanolipozom formülasyonlarının yüksek oranda su içermesi TGA analizi için uygun olmadığından boş ve etkin madde yüklenmiş formülasyonlar analiz öncesinde liyofilize edilmiştir. Etkin madde-lipit etkileşimini (fiziksel karışımlar) ve etkin maddenin nanolipozomal yapılar içerisindeki polimorfizmini daha net şekilde inceleyebilmek ve daha kesin sonuçlar alabilmek adına TGA analizlerinden elde edilen

verilerin birinci türevleri alınarak Derivatif Termalgravimetri (DTG) termogramları çizilmiştir.

Bu amaçla, 1 mg 5-FU tartılmıştır. TGA fırın sıcaklığı 25°C'den 500°C'ye 10°C/dk hızla arttırılacak şekilde ayarlanmıştır. Formülasyonlar için ise, 5 mg liyofilize edilmiş örnekler tartılmış, aynı sıcaklık skalasında analiz edilmiştir. Analizler için 20 mL/dk hızında ve 1.5 bar basınçta N₂ gazı numunelerin üzerinden geçirilmiştir.

3.7.4. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Nanolipozom ve PLL kaplı nanolipozomların morfolojilerinin ve dağılımlarının araştırılması için Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy, SEM) çalışmaları, yüksek vakum ortamında hızlandırma gerilimi 5 kV olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar alüminyum plakalara damlatılmıştır, daha sonra kurumaları için 3 saat oda sıcaklığında bekletilip, altın-paladyum alaşımı ile ~2 nm kalınlıkta püskürtme yöntemiyle kaplanarak analiz yapılmıştır.

3.7.5. Enkapsülasyon Etkinliği

İlaç enkapsülasyon etkinliğini belirlemek amacıyla, santrifüj/ultrasantrifüj yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla, nanolipozomlar 1 mL'lik ependorf tüplere alınarak 20000 g dönme hızında +4°C'de 1 saat santrifüj edilmiş, süpernatant faz ayrıştırılarak, etkin madde miktar tayini için HPLC cihazında analize alınmıştır. PLL kaplı nanolipozomların ilaç miktarları düşük olduğundan 5 mL'lik ultrasantrifüj tüplerine alınarak ultrasantrifüj cihazında 40000 g ve +4°C'de 1 saat santrifüj edilmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği, pratik olarak bulunan etkin madde miktarının, teorik olarak yüklenen etkin maddeye yüzde oranının hesaplanması ile belirlenmiştir.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Yüklenmemiş etkin madde}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}} \times 100$$

3.8. Stabilitte Çalışmaları

Hazırlanan nanolipozom ve PLL kaplı nanolipozom formülasyonlarının karakterizasyonlarında tayin edilen parametrelerdeki değişimler göz önüne alınarak, +4°C ve 25°C sıcaklıkta 3 ay süre (1. gün, 1. hafta, 1. ay ve 3. ay) ile bekletilen formülasyonların stabiliteleeri incelenmiştir.

3.9. *In-vitro* Salım Çalışmaları ve Kinetik Değerlendirmeler

Etkin madde salım profili ve kinetiğinin belirlenmesi için, diyaliz membran yöntemi ile salım çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla 14.000 Da moleköl ağırlığındaki diyaliz membranlar kullanılmıştır. Bu amaçla, reseptör faz olarak 10 mL PBS (pH=7.4) kullanılmıştır. Daha önceden kesilen ve 30 dakika reseptör faz içinde ıslatılan membranlar, 1 mL donör ve 10 mL reseptör faz yerleştirildikten sonra 37°C sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızındaki su banyosuna yerleştirilmiştir. 24 saat boyunca reseptör fazdan belirli zaman aralıklarında (30 dk, 1h, 2, 3, 4, 6, 8 ve 24 saat) örnek (1 mL) alınarak, hemen aynı hacimdeki taze reseptör faz ilave edilmiştir. HPLC ile belirlenen % salınan 5-FU miktarları zamana karşı grafiğe geçirilerek, kümülatif salım grafiği çizilmiştir. Tüm salım sonuçları; 0. derece, 1. derece, Higuchi ve Hixon-Crowell kinetik modellere uygunluk açısından değerlendirilmiştir. Tüm deneyler 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır (n=3). Salım çalışmaları; kombine formülasyonların yanısıra karşılaştırma yapılabilmesi bakımından boş ve sadece ilaç taşıyan nanolipozomlar ile de yapılmıştır.



Şekil 3.3. *In-vitro* salım deneyi düzeneği

3.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

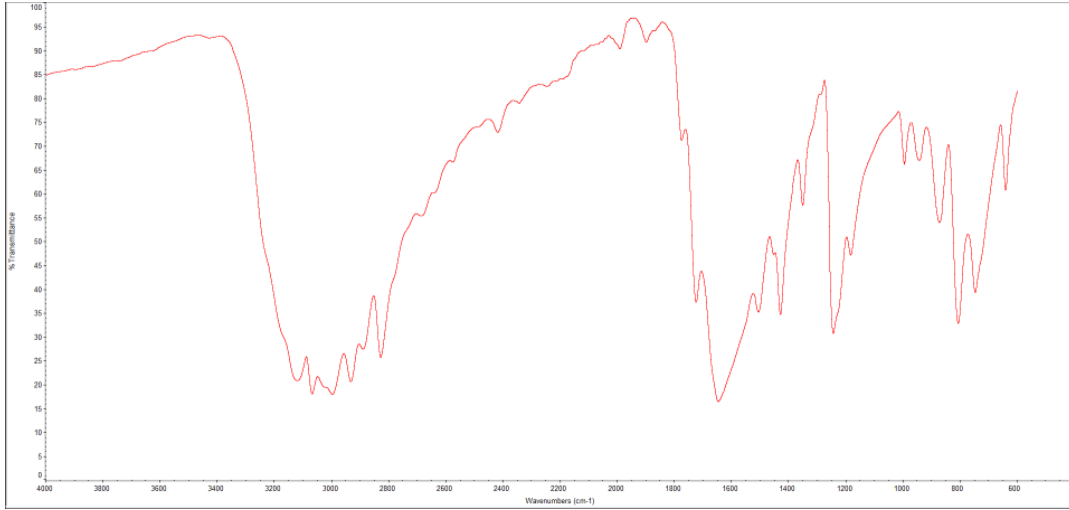
Nanolipozom PLL kaplı nanolipozom formülasyonlarının biyoyumluluklarının değerlendirilmesi için 96 kuyucuklu hücre kültür kabında 24 saat kültüre edilen insan epidermoid karsinoma hücreleri (A431, ATCC, ABD) artan konsantrasyonlarda (0-300 μ M) formülasyonlara maruz bırakılmıştır. 24 ve 72 saat sonra % hücre canlılığını belirlemek için MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) testi uygulanmıştır. Bu amaçla hücrelerin 24 ve 72 saat inkübasyonlarından sonra kuyucuklara 100 μ L hücre kültür ortamı ve PBS içinde hazırlanmış 5 mg/mL derişimindeki 25 μ L MTT çözeltisi eklenerek 4 saat inkübatörde kültür edilmişlerdir. Daha sonra hücrelerin oluşturduğu formazan kristallerini açığa çıkarmak ve hücre zarlarını parçalamak amacıyla kuyucuklara dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir. 30 dk boyunca karanlık ortamda tutulan hücrelerin absorbansları 570 nm'de mikropilaka okuyucuda okunmuştur. Kontrol grubu hücrelerin verdiği absorbans %100 kabul edilip, % hücre canlılığı hesaplanmıştır. Sitotoksikite deneyi 6 tekrarlı yapılmış olup, ortalama değerleri alınmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

4.1.1. FT-IR Spektrum Çalışmaları

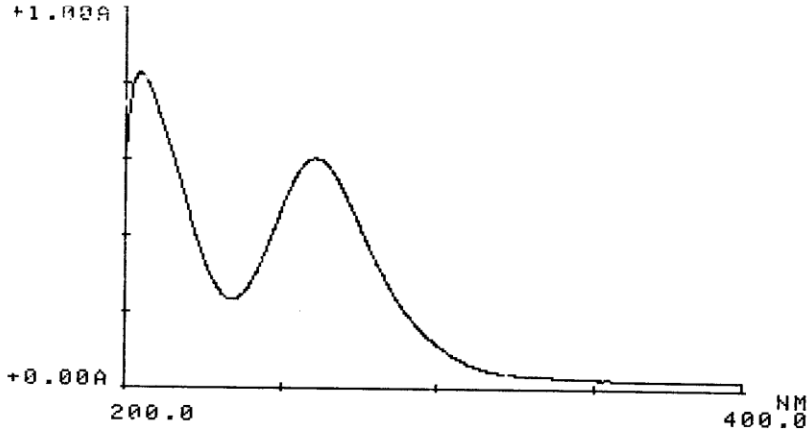
5-FU'nun FTIR spektrumu, 4000-400 cm^{-1} dalga boyları arasında alınmış ve Şekil 4.1.'de sunulmuştur. 5-FU'nun kimyasal yapısında bulunan C=O grubuna ait 1665 cm^{-1} 'de, C-H grubuna ait 2920 cm^{-1} 'de ve C-F grubuna ait 1275 cm^{-1} 'de karakteristik bantlar gözlenmiştir. Bu değerler, literatürlerde verilmiş IR bantları ile uyumlu bulunmuştur[81, 82].



Şekil 4.1. 5-FU'nun FTIR spektrumu

4.1.2. UV Spektrum Çalışmaları

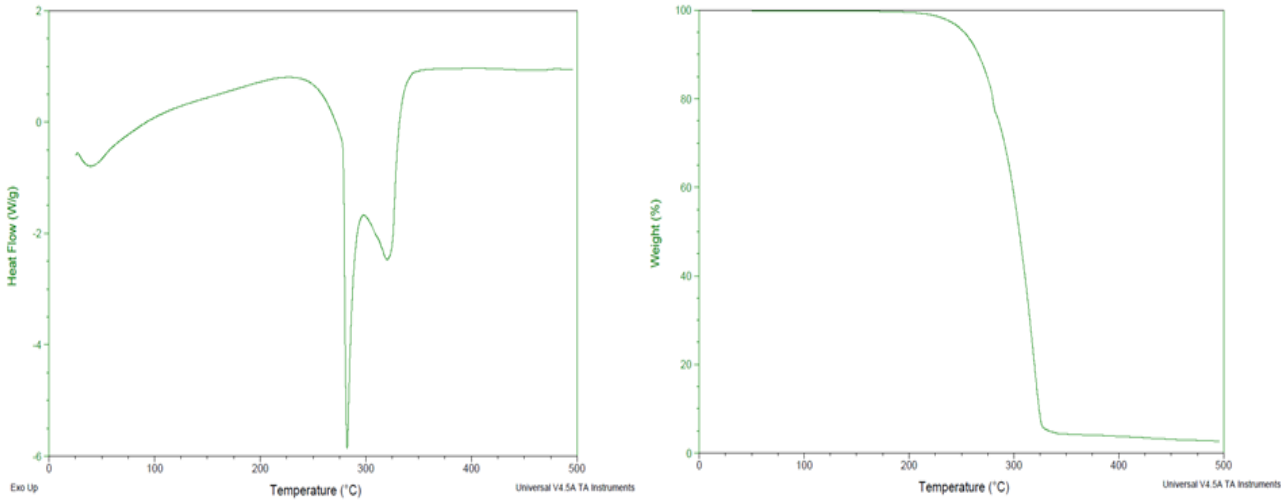
5-FU, 265 nm dalga boyunda pik göstermiş olup (Şekil 4.2.), maksimum dalga boyu olarak saptanan bu değer, literatürler ile uyumlu bulunmuştur[81, 83].



Şekil 4.2. 5-FU'nun UV spektrumu

4.1.3. Termal Analiz Çalışmaları

Termal analiz çalışmaları sonucunda, Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi erime derecesi 286°C olarak bulunmuştur. Bu değer literatürler ile uyumludur [81, 82].



Şekil 4.3. 5-FU'nun DSC ve TGA spektrumu

4.1.4. Çözünürlük Çalışmaları

Etkin maddenin çözünürlüğü PBS ortamında incelenmiş ve denge oluşumunda ölçülen değer kullanılarak etkin maddenin çözünürlüğü 12.75 ± 0.340 mg/mL olarak

hesaplanmıştır (İleriki dönem salım çalışmalarında sink koşullarını sağlamak için bu değer göz önüne alınacaktır)[82, 84].

4.1.5. Lipit-su Partisyon Katsayısı Çalışmaları

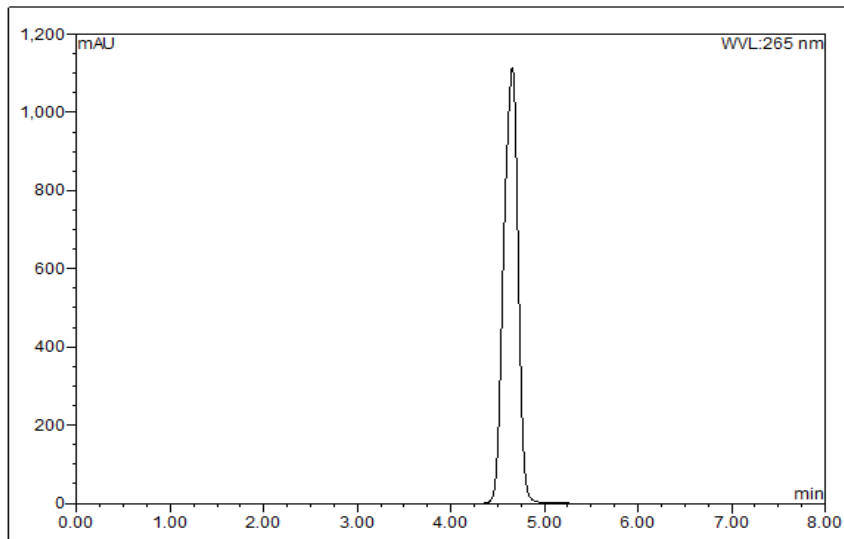
5-FU'nun lipit-su partisyon katsayısı 0.285 (Log P=-0.55) olarak hesaplanmış ve bu değer literatürler ile uyumlu bulunmuştur [82].

4.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Etkin maddenin miktarının tayininde kullanılan yöntemin güvenilir olup olmadığını göstermek için yapılan validasyonun sonuçları çizelgeler şeklinde verilmektedir.

4.2.1.Özgünlük ve Seçicilik

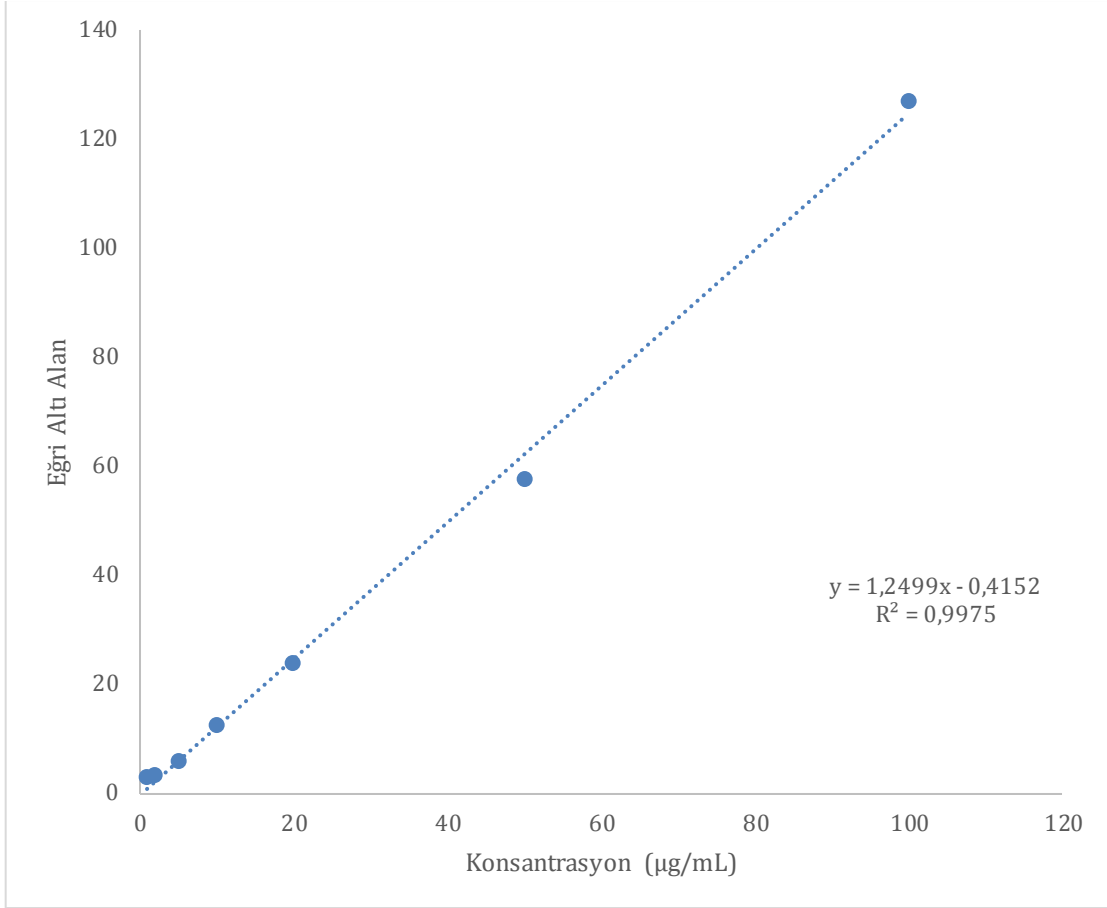
Elde edilen kromatogramda 5-FU pikiyle girişim yapan herhangi bir pik gözlenmemiş ve yöntemin 5-FU analizi için belirlenen kromatografik şartlarda özgün olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.4.). Bu pik, UV spektrofotometrede 265 nm'de okunmuş olup, yaklaşık olarak 4.8 dk'da çıkmaktadır.



Şekil 4.4. 5-FU'ya ait HPLC piki

4.2.2. Doğrusallık

Çizelge 4.1.'de belirtilen konsantrasyonlara karşılık gelen pikler ile Şekil 4.5.'deki kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve yöntemin doğrusal olduğu sonucun bulunmuştur ($R^2=0.9975$).



Şekil 4.5. 5-FU'nun HPLC yöntemine ait standart doğrusu (n=6)

4.2.3. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Yapılan doğruluk analizleri sonucunda her bir konsantrasyon düzeyi için elde edilen yüzde geri kazanım sonuçlarının %98.0-102.0 aralığında bulunmuş olup, elde edilen sonuçlar doğrultusunda analitik yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.1. 5-FU analitik yöntemine ilişkin geri kazanım sonuçları (n = 3)

No	1. Konsantrasyon (2 µg/mL)			2. Konsantrasyon (10 µg/mL)			3. Konsantrasyon (50 µg/mL)		
	EAA	Bulunan C (µg/mL)	Geri Elde (%)	EAA	Bulunan C (µg/mL)	Geri Elde (%)	EAA	Bulunan C (µg/mL)	Geri Elde (%)
1	2.114	2.023	101.17	12.30	10.173	101.73	62.78	50.560	101.12
2	2.093	2.006	100.33	12.08	9.997	99.97	61.67	49.672	99.34
3	2.078	1.995	99.74	12.28	10.157	101.57	62.19	50.088	100.18
Ort	2.095	2.008	100.413	12.220	10.109	101.090	62.213	50.107	100.213
SS	0.018	0.014	0.718	0.121	0.097	0.973	0.555	0.444	0.890

4.2.4. Kesinlik

Tekrar edilebilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) sonuçları Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'de verilmiş olup. her bir konsantrasyon düzeyi için elde edilen sonuçlar (%VK) %2.0'den küçük bulunmuştur[79].

Çizelge 4.2. Tekrar edilebilirlik sonuçları

Örnek No	EAA	Konsantrasyon(µg/mL)
1	12.30	10.173
2	12.28	10.157
3	12.33	10.196
ORT	12.303	10.176
SS	0.025	0.020
%VK	0.203	0.197

Çizelge 4.3. Tekrar elde edilebilirlik

Örnek No	EAA	Konsantrasyon($\mu\text{g/mL}$)
1	12.30	10.173
2	12.08	9.997
3	12.28	10.157
ORT	12.220	10.109
SS	0.121	0.097
%VK	0.990	0.959

4.2.5. Teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ)

Teşhis sınırı (LOD) 0.261 $\mu\text{g/mL}$, tayin sınırı (LOQ) 0.792 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir [8, 80].

4.2.6. Stabilite

Çizelge 4.4.'de anlatıldığı şekilde yapılan stabilite çalışması sonucunda, 24 saat boyunca belirli aralıklarla alınan örneklerin alan değerinde değişme olmamıştır.

Çizelge 4.4. Stabilite sonuçları

Zaman(saat)	EAA	Konsantrasyon (10 $\mu\text{g/mL}$)
0.5	12.17	10.068
1	12.23	10.117
3	12.08	9.997
6	12.07	9.989
12	12.33	10.196
24	12.34	10.205

4.3. Formülasyon Optimizasyon Çalışmaları

Formülasyon optimizasyon çalışmaları kapsamında. farklı parametrelerin (sonikasyon süresi, fosfolipitin yapısı, çözücü maddenin pH değeri, sürfaktan kullanımı, negatif veya pozitif lipidin yapıya eklenmesi), formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Bunlar arasından ideal karakterizasyon ve enkapsülasyon etkinliği gösteren nanolipozomlar ile, polimer kaplama çalışmalarına geçilmiştir.

4.3.1. Sonikasyon Süresinin Etkisinin Değerlendirilmesi

Nanolipozom formülasyonlarının hazırlanması sırasında sonikasyon süresinin (5 dk, 15 dk, 25 dk, 30 dk) formülasyon karakterizasyon parametreleri (PB, PDI, ZP) üzerine etkisini değerlendirilmiş (Şekil 4.6.) ve Lipoid S100 ile hazırlanan nanolipozomlarda sonikasyon süresinin artışına bağlı olarak, PB, ZP ve PDI değerlerinde anlamlı değişiklikler olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Sonikasyon süresi 30 dk olarak ayarlandığında, ideal formülasyonların hazırlanabildiği görülmüştür (en düşük PB ve PDI, en yüksek ZP) (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Sonikasyon süresinin PB, ZP ve PDI üzerindeki etkisi (*n=3)

Lipoid S100	PB(nm) (ort. \pm SS*)	ZP(mV) (ort. \pm SS*)	PDI (ort. \pm SS*)
5 dk	1300 \pm 126.5	1.2 \pm 0.462	0.907 \pm 0.052
15 dk	645.3 \pm 65.1	4.7 \pm 0.282	0.623 \pm 0.073
25 dk	244.9 \pm 5.19	9.43 \pm 0.279	0.435 \pm 0.027
30 dk	142.9 \pm 4.10	10.4 \pm 0.450	0.402 \pm 0.029

4.3.2. Lipit Yapısının Etkisinin Değerlendirilmesi

Çizelge 4.6.'da görüldüğü üzere en yüksek ZP değeri (34.7 \pm 0.462 mV) DPPC ile hazırlanan nanolipozomlarda görülmüş olup, PB ve PDI değerleri de sırasıyla

112.5±0.520 nm ve 0.233±0.012 olarak bulunmuştur. Homojen ve istenen boyutta olduğu için ve en yüksek enkapsülasyon bu formülasyonla sağlandığı için (EE=%15.8±3.96) çalışmalarına bu formülasyon ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.6. Lipit yapısının karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3)

Formülasyon (Lipit:CH – 9:1)	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	EE(%) (ort. ±SS*)
Lipoid S100:CH	247.6±13.100	9.14±0.270	0.423±0.068	8.7±2.110
Fosfolipon 90G:CH	111.0±0.802	5.83±0.434	0.298±0.003	11.8±3.760
α-Fosfotidilkolin:CH	159.9±4.149	-6.80±0.075	0.440±0.017	8.3±1.890
DPPC:CH	112.5±0.520	34.7±0.462	0.233±0.012	15.8±3.960

4.3.3. Formülasyonlara Pozitif ve Negatif Lipit Eklenmesinin Etkisinin Değerlendirilmesi

Nanolipozom formülasyonlarına katyonik ve anyonik özellik kazandırmak için. DPPC ile farklı yüklere sahip lipitler (SA veya DCP) karışım halinde kullanılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır (Çizelge 4.7.). SA ile hazırlanan formülasyonlarda beklendiği gibi yüksek pozitif (79.1±1.20 mV), DCP ile hazırlananlarda ise yüksek negatif (-21.4±0.781) ZP değeri elde edilmiştir.

Çizelge 4.7. Lipit yükünün karakterizasyon parametrelerine etkisi (ilaç:lipit oranı 1:1, *n=3)

Formülasyon	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	pH	EE(%) (ort. ±SS*)
DPPC:CH 9:1	112.5±0.520	34.7±0.462	0.233±0.012	7	8±2.410
DPPC:SA:CH 7:2:1	118.3±0.378	79.1±1.200	0.212±0.018	7	10±3.110
DPPC:DCP:CH 7:2:1	139.7±26.140	-21.4±0.781	0.299±0.058	7	17±3.960

Ayrıca ilaç:lipit oranı da değiştirilerek formülasyonların karakterizasyon çalışmaları tekrarlanmış, 1:1 mol orandan 1:2 mol orana arttırılması ile, %EE değerlerinin arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. Lipit yükünün karakterizasyon parametrelerine etkisi (ilaç:lipit oranı 1:2, *n=3)

Formülasyon	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	pH	EE(%) (ort. ±SS*)
DPPC:CH 9:1	148.5±1.589	21.5±0.321	0.479±0.079	7	19±4.100
DPPC:SA:CH 7:2:1	134.6±1.137	88.2±5.200	0.200±0.009	7	11±3.850
DPPC:DCP:CH 7:2:1	5096±629.700	1.67±0.050	0.641±0.192	7	21±4.230

4.3.4. pH'm Etkin madde Enkapsülasyonuna Etkisi

İlaç çözeltisinin pH'ı 7 ve 9 olarak değiştirilmiş ve karakterizasyon parametrelerine etkisi Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. pH'm karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3)

Formülasyon	PB(nm)	ZP(mV)	PDI	pH	EE(%)
	(ort. ±SS*)	(ort. ±SS*)	(ort. ±SS*)		(ort. ±SS*)
DPPC:CH	571.0±93.700	-9.26±1.810	0.931±1.810	9	29.5±10.100
9:1					
DPPC:SA:CH	121.1±0.416	69.4±1.110	0.209±0.003	7	24±1.090
7:2:1					
DPPC:DCP:CH	85.30±0.596	-51.1±2.000	0.252±0.008	9	45±9.610
7:2:1					

En fazla enkapsülasyon etkinliği DPPC:DCP:CH formülasyonunda görülmesine rağmen DCP negatif yüklü bir lipit olduğu için, nötr koşullarda çoğunlukla pozitif olan DPPC lipidi ile etkileşimi sonucu agregasyon oluşmuştur. Enkapsülasyon etkinliğinin en fazla olduğu formülasyon, aynı zamanda yüzeyin pozitif yüklü bir polimer ile kaplandığı gen terapisi çalışmaları için ideal olduğu için, ilaç:lipit oranının 1:2 olarak optimize edildiği DPPC:DCP:CH formülasyonu üzerinde çalışılmıştır.

4.3.5. Sürfaktanların İlaç Enkapsülasyonuna Etkisi

Etkin madde enkapsülasyonu artırmak için, farklı sürfaktanlar ile (Tween 80, Tween 20, PVA) DPPC:DCP:CH formülasyonu ile çalışmalar tekrarlandı[85] (Çizelge 4.10). Şekil 4.7. ve Çizelge 4.11.'de gösterildiği üzere PVA kullanılarak hazırlanan nanolipozomlar ile en yüksek enkapsülasyon değeri elde edildi.

Çizelge 4.10. Sürfaktanların karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3)

Formülasyon	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	pH	EE(%) (ort. ±SS*)
DPPC:DCP:CH:Tween 80 (6:2:1:1)	39.96±0.225	-41.1±0.950	0.432±0.007	9	20.77±4.250
DPPC:DCP:CH:Tween 20 (6:2:1:1)	42.13±0.072	-41.7±1.400	0.258±0.002	9	23.89±2.700
DPPC:DCP:CH:PVA (6:2:1:1)	88.18±1.097	-11.3±0.416	0.196±0.005	9	81.2±5.090

Çizelge 4.11. PVA'nın formülasyon karakterizasyon parametrelerine etkisi (*n=3)

Formülasyon Kodu	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	pH	EE(%) (ort. ±SS*)
DPPC:DCP:CH (7:2:1)	80.98±0.369	-53.7±1.220	0.240±0.003	9	35.3±1.100
DPPC:DCP:CH:PVA (6:2:1:1)	88.18±1.097	-11.3±0.416	0.196±0.005	7	81.2±5.090

4.3.6. Polimer Kaplamanın Nanolipozom Karakterizasyonuna Etkisi

Çizelge 4.12. Farklı PEI oranlarının nanolipozom karakterizasyonuna etkisi

(*n=3,**lipit miktarları verilmiştir,her formülasyonda PEI miktarı 2 mg/mL'dir.)

Formülasyon Kodu**	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	EE(%) (ort. ±SS*)
DPPC:DCP:CH (7:2:1:1)	75.09±0.500	0.242±0.004	-54.8±1.760	34.1±5.710
PEI1 (0.176 mg/mL)	237.7±4.838	19.4±0.200	0.190±0.019	12.8±1.750

PEI2				
(0.200 mg/mL)	1912±293.700	17.0±1.000	0.984±0.027	11.2±0.810

PEI3				
(1 mg/mL)	1237±869.600	15.1±0.252	0.503±0.053	10.18±2.190

Çizelge 4.13. PLL ve lipit miktarlarının. karakterizasyon üzerinde etkileri (*n=3, **lipit miktarları ve PLL:çözelti (v/v) yüzde oranları verilmiştir.)

Formülasyon Kodu**	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	EE(%) (ort. ±SS*)
DPPC:DCP:CH	75.09±0.500	0.242±0.004	-54.8±1.760	34.1±5.710
(7:2:1)				
PLL1	105.8±0.635	-33.4±2.700	0.231±0.013	20.1±1.050
(0.176 mg/mL 1:10 v/v)				
PLL2	92.06±1.157	-43.1±5.28	0.254±0.004	11.2±0.710
(0.200 mg/mL 1:10 v/v)				
PLL3(1:10 v/v)	83.26±0.550	-47.3±0.008	0.259±0.008	10.12±1.090
(1 mg/mL 1:10 v/v)				
PLL4	2231±158.200	29.9±1.100	0.160±0.138	30.13±1.620
(0.176 mg/mL 1:10 v/v)				
PLL5(2:10 v/v)	82.73±1.259	34.9±1.930	0.213±0.008	82.2±6.950
(0.200 mg/mL 1:10 v/v)				
PLL6(2:10 v/v)	97.19±7.223	20.3±0.057	0.287±0.067	83.17±1.130
(1 mg/mL 1:10 v/v)				

Çizelge 4.14. PLL miktarlarının nanolipozom karakterizasyonuna etkisi (*n=3, ** PLL:çözelti hacimce yüzde oranları verilmiştir, formülasyondaki lipit miktarı 0.176 mg/mL'dir.)

Formülasyon Kodu**	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)	EE(%) (ort. ±SS*)
DPPC-DCP-CH (7:2:1)	81.57±1.448	-53.9±0.872	0.257±0.008	42.1±11.450
PL1(1:10 v/v)	125±1.834	23.4±0.493	0.207±0.024	76.0±7.810
PL2(2:10 v/v)	107.1±1.442	27.1±1.300	0.205±0.006	79.2±6.950
PL3(3:10 v/v)	137.9±0.986	41.4±1.060	0.333±0.019	88.2±7.850
PL4(4:10 v/v)*	111.0±1.901	43.3±2.150	0.221±0.002	87.1±6.920

4.4. Stabilité Çalışma Sonuçları

Formülasyonların karakterizasyonlarında tayin edilen parametrelerdeki değişimler göz önüne alınarak, +4°C'de 3 ay süre (1. gün. 1. hafta. 1. ay ve 3. ay) ile bekletilen formülasyonların stabiliteleri incelenmiş olup, karakterizasyon parametrelerindeki değişim Çizelge 4.15. ve Çizelge 4.16.'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. Formülasyonlara ait stabilite çalışma sonuçları (+4°C,*n=3)

Formülasyon	Zaman	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)
Lipoid S100:CH (9:1)	1. gün	247.6±13.100	9.14±0.270	0.423±0.068
	1. hafta	292.1±18.920	11.8±0.153	0.467±0.048
	1. ay	304.2±30.800	10.3±0.446	0.667±0.152
	3. ay	442.7±46.100	4.20±0.124	0.703±0.350

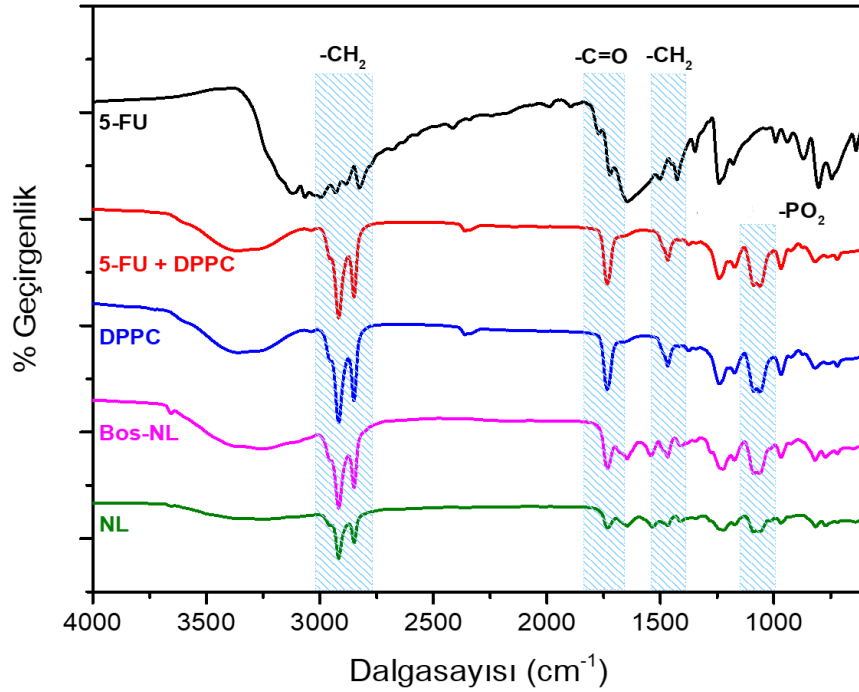
Fosfolipon 90G:CH (9:1)	1. gün	111.0±0.802	5.83±0.434	0.298±0.003
	1. hafta	112.2±0.945	6.65±0.281	0.368±0.012
	1. ay	113.4±1.560	6.90±0.426	0.343±0.027
	3. ay	202.6±2.055	6.81±0.147	0.410±0.032
α-Fosfotidilkolin CH (9:1)	1. gün	159.9±4.149	-6.80±0.075	0.440±0.017
	1. hafta	240.5±2.055	-3.59±0.062	0.451±0.390
	1. ay	418.0±0.027	-1.77±0.147	0.458±0.027
	3. ay	730.6±4.059	-1.03±0.205	0.658±0.027
DPPC:CH (9:1)	1. gün	112.5±0.520	34.7±0.462	0.233±0.012
	1. hafta	193.6±1.419	34.5±0.436	0.331±0.001
	1. ay	209.6±16.630	28.9±0.600	0.334±0.039
	3. ay	303.6±20.540	20.1±0.520	0.405±0.062

Çizelge 4.16. PLL-Lipo-FU ve Lipo-FU formülasyonunun stabilitesi (*n=3)

Formülasyon	Zaman	PB(nm) (ort. ±SS*)	ZP(mV) (ort. ±SS*)	PDI (ort. ±SS*)
PLL-Lipo-FU	1. gün	137.9±0.986	41.4±1.060	0.333±0.019
	1. hafta	188.2±0.762	30.4±3.920	0.359±0.008
	1. ay	487.1±6.491	21.4±2.890	0.408±0.049
Lipo-FU	1. gün	85.30±0.595	-51.1±2.000	0.252±0.008
	1. hafta	95.80±0.871	-41.6±3.020	0.339±0.034
	1. ay	120.9±2.691	-32.1±2.970	0.423±0.067

4.5. ATR-FTIR Analiz Sonuçları

Nanolipozom formülasyonunda yer alan lipidik bileşenlerin ve 5-FU'nun kimyasal etkileşimlerini incelemek amacıyla ATR-FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6.). CH_2 gerilme modlarının frekansları ve band genişliği, CH_3 gerilme modunun frekansı, $\text{C}=\text{O}$ titreşim modu ve fosfat gerilme modunun frekansı incelenmiştir.



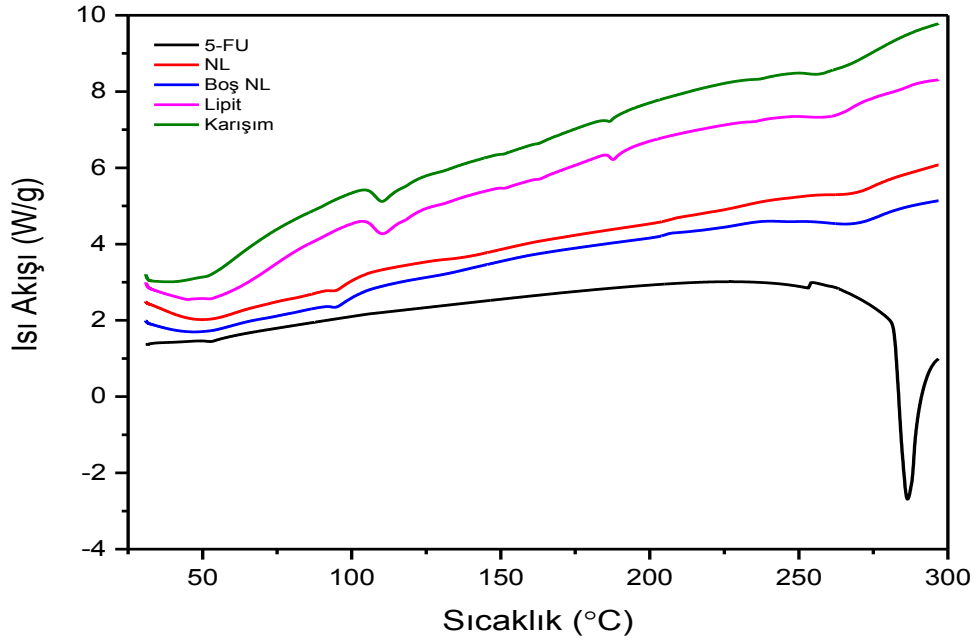
Şekil 4.6. 5-FU, 5-FU ve DPPC fiziksel karışımı. DPPC, boş nanolipozom ve 5-FU yüklü nanolipozoma ait FTIR/ATR spektrumları

5-FU yüklü nanolipozom (NL), boş nanolipozom, 5-FU + DPPC fiziksel karışım, DPPC spektrumlarında lipit yapısına özgü C-H (2846.6 ve 2916.3 cm^{-1}) gerilimi gözlenmiştir. NL ve Boş-NL formülasyonunda bulunan kolesterola ait hidrojen bağı O-H gerilmesi 3654.6 , 3658.4 cm^{-1} 'da görülmektedir. Alifatik bileşiklerin tipik C-H gerilme titreşimleri 3000 cm^{-1} civarında gözlenmektedir. Bütün spektrumlarda 1737.7 cm^{-1} bandında şiddetli ester karbonil grubu $\text{C}=\text{O}$ gerilimi madde içerisindeki tekrarlanan grupların sayısına bağlı olarak artış ve azalış göstermiştir. NL ve boş-NL gruplarında bulunan 1542.1 , 1649.5 cm^{-1} bantlarındaki titreşimlerin kolesterole ait alken ($\text{C}=\text{C}$)

grubuna ait olduğu düşünülmektedir. 1471.2 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bantları C-H eğilme bandının göstergesidir. 5-FU'ya ait 1235.4 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandı C-F gerilmesinden kaynaklanmaktadır. $1059.1, 1093.6\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen absorpsiyon bantları P-O-R gerilme titreşimlerinin en tipik göstergesidir. $721.7, 775.4, 817.5\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen absorpsiyon bantları metil göstergesidir ve sadece uzun zincirli alkanlarda görülmektedir.

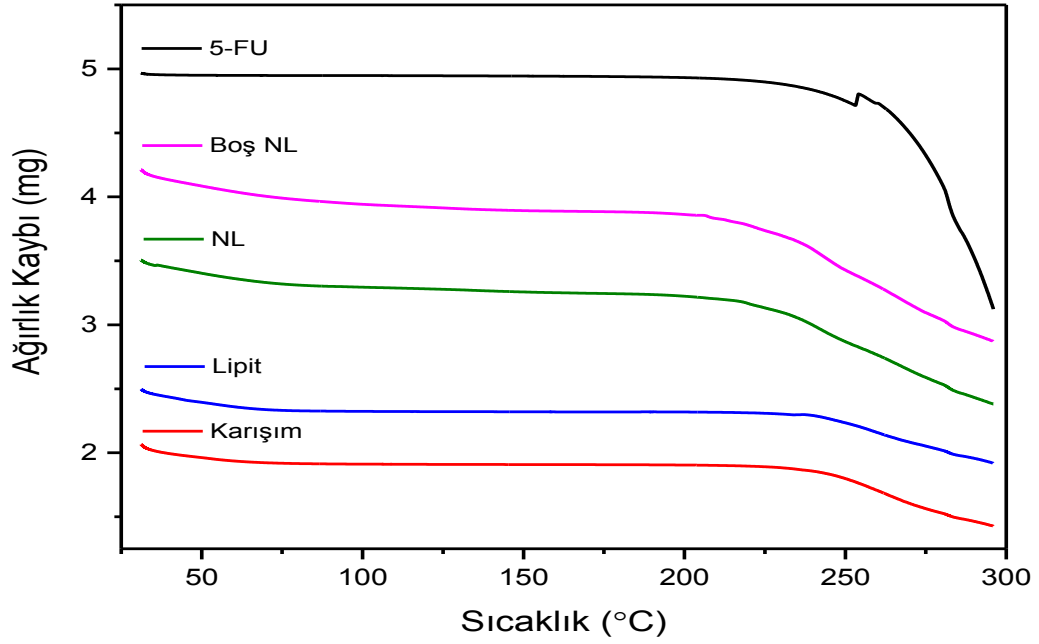
4.6. TGA-DSC Analiz Sonuçları

5-FU, DPPC, 5-FU + DPPC fiziksel karışım, boş Lipo ve Lipo-FU formülasyonlarının TGA ve DSC analizleri yapılmıştır (Şekil 4.10). Boş Lipo ve Lipo-FU formülasyonları liyofilize edildikten sonra TGA analize alınmıştır.



Şekil 4.7. 5-FU, Boş NL, NL ve 5-FU + DPPC fiziksel karışıma ait DSC termogramlarının karşılaştırılması

5-FU 250°C civarında erimeye başlamış, 280°C civarında keskin endotermik erime piki gözlenmiştir. DPPC'ye ait termogramda, DPPC'nin faz geçiş sıcaklığı olan $\sim 50^{\circ}\text{C}$ 'de endotermik erime piki gözlemlenirken, 260°C 'de endotermik pikin ardından, lipidik yapının bozunmasına ilişkin ekzotermik bir eğri gözlemlenmiştir. (Şekil 4.7.).

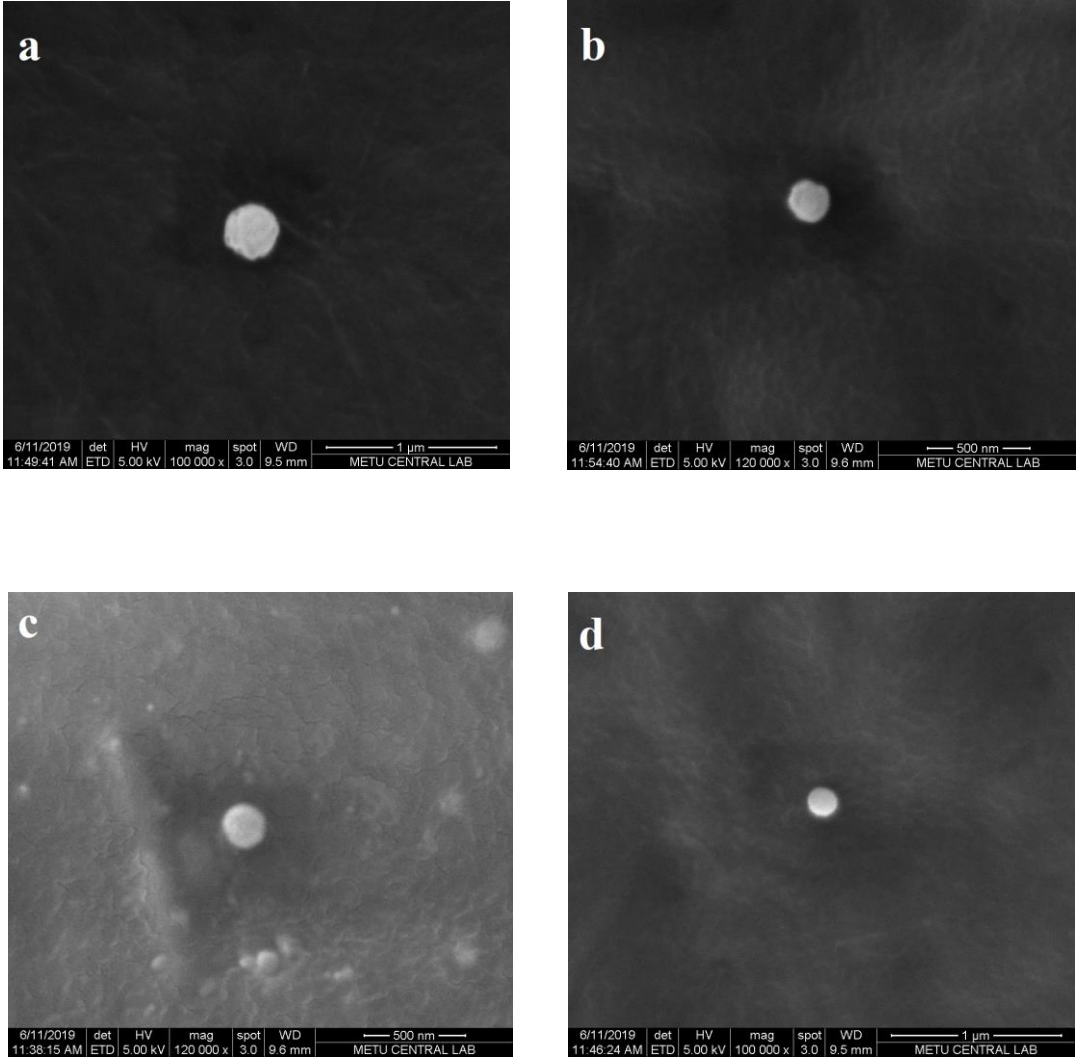


Şekil 4.8. 5-FU, Boş NL, NL ve 5-FU + DPPC fiziksel karışıma ait TGA termogramlarının karşılaştırılması

TGA termogramlarında ise DSC grafiklerine paralel olarak, 5-FU'ya ait kütle kaybının 250°C civarında başlaması, erimenin bu sıcaklıkta başladığını doğrular niteliktedir (Şekil 4.8.). Benzer şekilde, Boş NL, NL, DPPC ve fiziksel karışım termogramlarında, kütle kayıpları 50°C civarında görülmüştür.

4.7. SEM Analiz Sonuçları

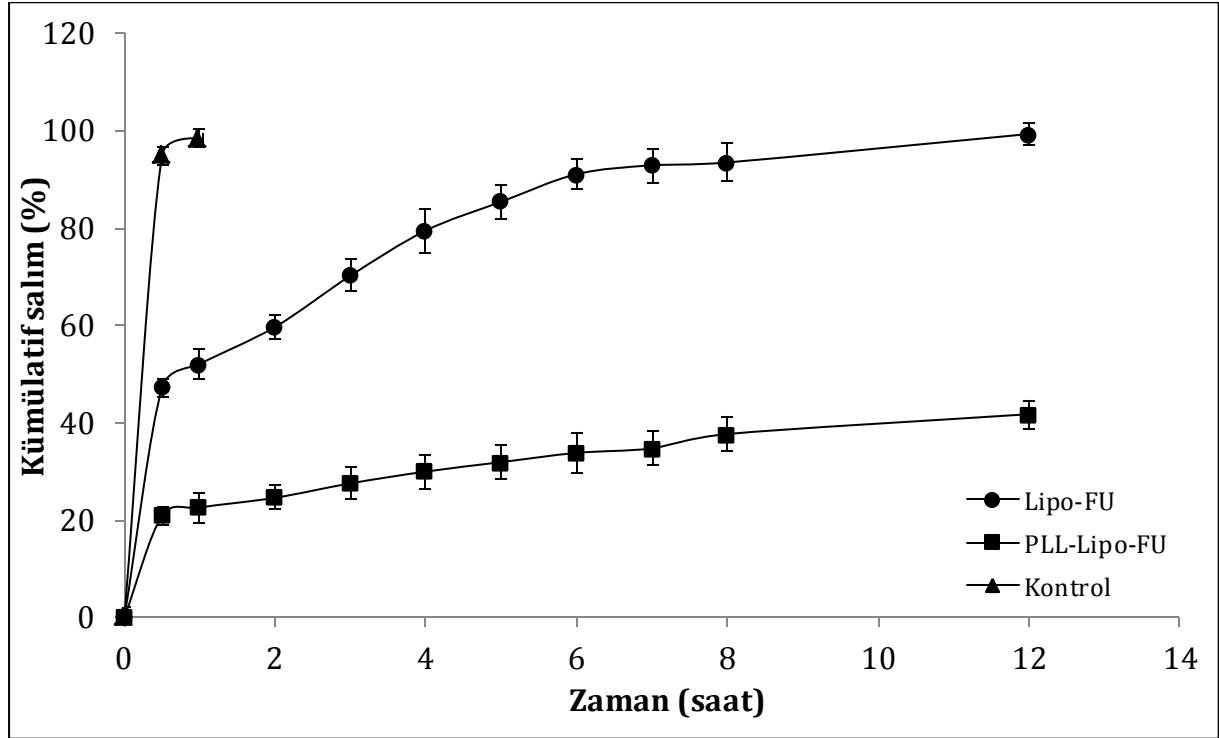
Geliştirilen nanolipozom ve PLL kaplı nanolipozomların partikül boyutunun ve şeklinin incelenmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.9. Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU numunelerine ait SEM görüntüleri a)Lipo-FU, b)Boş Lipo, c)PLL-Lipo-FU, d)Boş PLL-Lipo formülasyonları.

SEM görüntüleri DPPC bazlı nanolipozomların ve PLL kaplı DPPC nanolipozomlarının düzgün yüzeyle ve küresel yapıda olduklarını göstermiştir.

4.8. In-vitro Salım Çalışması Sonuçları



Şekil 4.10. Nanolipozom, PLL-kaplı nanolipozom ve kontrol grubuna ait 5-FU in-vitro salım profilleri (n = 6)

Diyaliz membran yöntemi ile yapılan ve kümülatif olarak değerlendirilen *in-vitro* salım çalışmaları sonucunda, etkin madde çözeltisi (kontrol) ile, 0.5. saatin sonunda ilacın %95.01'inin ve 1. saatin sonunda ilacın yaklaşık olarak tamamının salıverildiği gözlenmiştir. Nanolipozom ve PLL kaplı formülasyonlarla ise sürekli bir salım profili elde edilmiş olup, bu formülasyonlar ile 1. saatin sonunda sırasıyla %47.17 ve %20.84 oranda salım gerçekleşmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.10.).

Kinetik değerlendirmeler kapsamında ise, formülasyonlarından etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla salım sonuçlarına dört farklı kinetik model (Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell) uygulanmış ve k/R^2 (salım hız sabiti/determinasyon katsayısı) değerleri, Çizelge 4.17.'de verilmiştir.

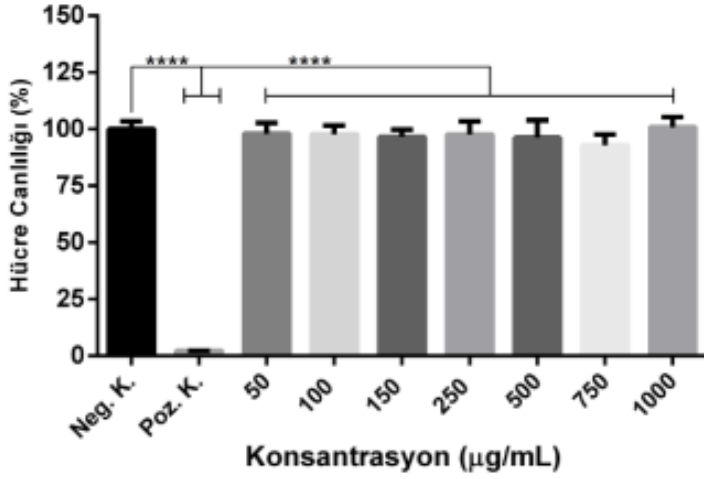
Çizelge 4.17. Formülasyonların in-vitro salım hızı kinetik verileri

Formülasyon		Sıfıncı derece	Birinci derece	Higuchi	Hixson Crowell
Lipo-FU	k	53.5515	4.4168	33.3250	0.8047
	R ²	0.8443	0.9675	0.9504	0.8853
PLL-Lipo-FU	k	21.4578	4.3695	14.4365	0.3537
	R ²	0.9675	0.9805	0.9918	0.9766

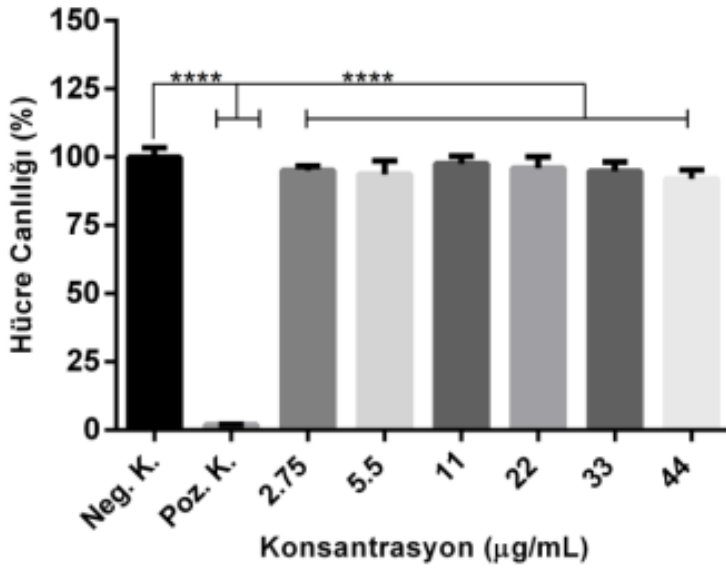
Nanolipozom formülasyonu için, en yüksek determinasyon katsayısı değeri (R²=0.9675) bulunmuş ve salımın birinci dereceden kinetik modele uyduğu gösterilmiştir. PLL kaplı olan nanolipozomlar için ise, en yüksek değer (R²=0.9918) Higuchi kinetik model ile elde edilmiştir.

4.11. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

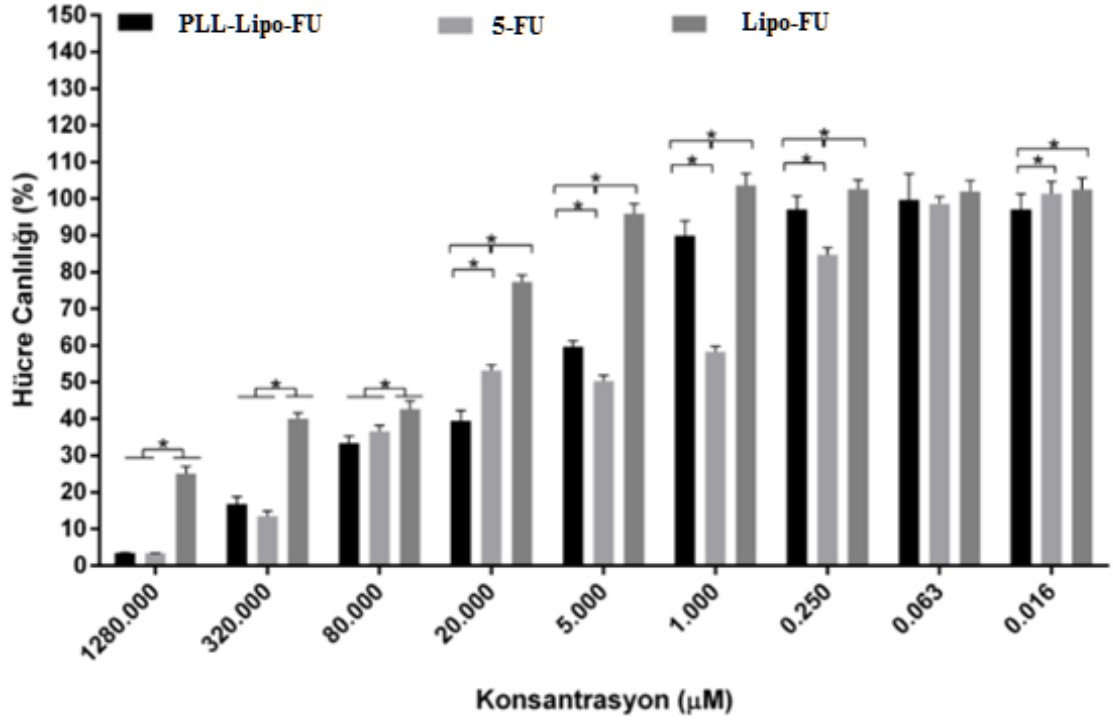
İlaç içermeyen formülasyonlarda herhangi bir toksik etki gözlenmezken, ilaç yüklü formülasyonlarda konsantrasyona bağlı olarak toksik etki gözlemlenmiştir. Toksik etki konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır. Bu sonuç, hem nanolipozom formülasyonlarında hem de 5-FU çözelti grubunda tespit edilmiştir. Yapılan analizler sonucu 5-FU, Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU lipozomların EC₅₀ değerleri tespit edilmiş olup sırasıyla 11.57, 104.6 ve 13.15 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Boş Lipo formülasyonu. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak t-test yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.



Şekil 4.12. Boş PLL-Lipo formülasyonu. Gruplar arası istatistiksel analiz metodu olarak t-test yapıldı. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. İstatistiksel analiz sonucu anlamlı ise **** ile etiketleme yapıldı.



Şekil 4.13. PLL-Lipo-FU, serbest 5-FU çözeltisi ve Lipo-FU canlılık sonuçları. İstatiksel analiz yöntemi olarak 2-yönlü ANOVA yapıldı. Gruplar arasında fark olup olmadığının anlaşılması için Tukey's testi kullanıldı. İstatiksel analiz sonucu anlamlı ise * ile etiketleme yapıldı.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında; malign melanom tedavisinde intratümöral uygulamaya yönelik, 5-FU yüklü nanolipozom formülasyonlarının hazırlanması ve bu formülasyonlara yüzey kaplama/modifikasyon işlemleri yapılarak, ileri dönem ilaç/gen kombinasyon uygulamaları için yeni bir nanolipozom modelinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

5-FU, timidilat sentaz inhibitörü olarak görev yaparak DNA sentezini inhibe etmektedir. Özellikle cilt kanseri tedavisinde topikal olarak kullanılmaktadır. Ancak deriden penetrasyonunun düşük olması nedeniyle, tedavide terapötik konsantrasyonu yetersiz kalmaktadır. İntravenöz uygulamalarında ise, yarılanma ömrünün kısa olması (6-20 dk), dokulara geniş dağılım göstermesi ve dermatit, kardiyak toksisite, merkezi sinir sistemi hasarı gibi yan etkilere neden olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu amaçla tez kapsamında, etkin maddenin yarılanma ömrünün uzatılması, kontrollü salım sistemlerinin hazırlanarak uygulama sıklığının/dozunun azaltılması, buna bağlı toksik ve yan etkilerin önlenmesi, hasta uyuncunun artırılması için nanolipozomların hazırlanması planlanmıştır. Nanolipozomlar, biyolojik membranlara benzer yapıda olmaları nedeniyle yüksek penetrasyon kabiliyetine sahip olup, biyoyumlu olmaları bakımından avantaj sağlamaktadırlar.

Bu doğrultuda tez kapsamında;

İlk aşamada; etkin madde miktar tayini ve analitik yöntem validasyon çalışmaları yapılmıştır. Yöntemin; özgünlük, seçicilik, doğrusallık, doğruluk, geri elde edilebilirlik, kesinlik kriterlerini karşıladığı ve etkin maddenin çalışma süresince stabilitesini koruduğu ispatlanmıştır.

İkinci aşamada; formülasyon ve yöntem optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, yöntem parametrelerinin (sonikasyon süresi, lipit yapısı, pozitif/negatif lipit oranı, pH ve sürfaktan etkisi), formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Nanolipozom formülasyonları ince film tabaka oluşturma yöntemi ile hazırlanmış ve PB, ZP, PDI ve EE bakımından değerlendirilmiştir. Hazırlama sırasında, dört farklı sonikasyon süresi (5, 15, 25 ve 30 dk) uygulanarak çalışmalar yürütülmüş ve Lipoid S100 ile hazırlanan nanolipozomlarda sonikasyon süresinin artışına bağlı olarak daha homojen ve daha küçük partikül boyutuna sahip (142.9 ± 4.100) lipozomlar elde edilmiştir. Yapılacak tüm formülasyonlarda, sonikasyon süresinin 30 dk olarak ayarlanmasına karar verilmiştir.

Lipit yapısının formülasyon üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, dört farklı lipit (Lipoid- α -fosfotidilkolin, Lipoid S100, Fosfolipon 90G ve DPPC) kullanılarak nanolipozomlar hazırlanmış (lipit:kolesterol oranı 9:1), DPPC ile hazırlanan formülasyonlarda en yüksek %EE değeri ($\%15.8 \pm 3.960$) bulunmuştur. Yine bu formülasyonda, en düşük PDI değeri (0.233 ± 0.012) ve en yüksek zeta potansiyel değeri (34.7 ± 0.462 mV) gözlenmiş olup, ileri dönem çalışmalarda, lipit olarak DPPC kullanılmasına karar verilmiştir.

Son yıllarda, kanser tedavisinde sadece kemoterapötik ajan kullanılması yetersiz kalmakta, ilaca karşı gelişen direnci ve yüksek dozda uygulama sonucunda oluşan yan etkileri önlemek amacıyla yenilikçi yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. İlaç/gen kombinasyonu ürünler ile tedavi, en güncel yaklaşımlar arasında olup, buna yönelik yenilikçi formülasyon geliştirilmesine çalışılmaktadır. Nanolipozomlar, yüzey yüklerinin değiştirilebilmesi ve yüzeylerine istenen modifikasyonun yapılabilmesi bakımından dikkat çekmektedirler. Bu amaçla tez kapsamında, 5-FU yüklü nanolipozomlara, anyonik ve katyonik özellik kazandırılmış, daha sonra yüzey kaplama/modifikasyon işlemleri uygulanmıştır. Yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesi bakımından, katyonik lipit olarak SA kullanılmıştır. Anyonik lipit olarak ise, DCP kullanılarak nanolipozomlar hazırlanmıştır. DPPC:anyonik/katyonik lipit:CH oranı, 7:2:1 olacak şekilde formülasyonlar hazırlanmıştır. ZP değeri, SA içeren nanolipozomlar ve DCP içeren nanolipozomlar için sırasıyla, 79.1 ± 1.200 ve -21.4 ± 0.781 olarak bulunmuş olup, yüzey yüklerinin istenen şekilde modifiye edildiği sonucuna varılmıştır.

Benzer şekilde, ortam pH'sının etkisi de incelenmiş ve DPPC:DCP:CH lipit karışımı ile hazırlanan lipozomlarda, pH=7 iken enkapsülasyonun 21 ± 4.230 , pH=9 olarak ayarlandığında ise 45 ± 9.610 olarak arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). 5-FU, hidrofilik olduğu için etkin madde yükleme oranı, etkin maddenin sulu fazda çözünmesine ve lipozomun oluşturulması sırasında lipozom membranı içerisine, bu sulu fazın girebilmesine bağlı olmaktadır. 5-FU'nun bazik çözeltilerde negatif yüklü olduğu ve % 70 oranında iyonize olduğu bilinmektedir. Çünkü 5-FU'nun pKa değeri 8.0'dir [86]. Bu sebeple tez kapsamında etkin maddenin iyonizasyonu için pH göz önünde bulundurulmuştur. Etkin maddenin iyonize olduğu pH aralığında, DPPC lipidi negatif olmakta ve negatif bir lipit olan DCP ile bu sayede daha stabil anyonik lipozom oluşturmaktadır. Nötr ortamlarda DPPC zwitteriyonik özellikte olduğu için DCP ile agrege olmaması açısından bazik çözelti kullanılmıştır, aksi takdirde DPPC pozitif yüklü olacak ve DCP ile agrege olacaktır. Hem 5-FU iyonizasyonu hem de DPPC'nin negatif yüklenmesi için, pH=9 aralığında NaOH ile bazik hale getirilmiş distile su çözücü olarak kullanılmıştır.

Son olarak %EE değerini daha da arttırabilmek için, hazırlama esnasında ortama farklı sürfaktanlar (Tween 80, Tween 20, PVA) eklenmiş ve farklı sürfaktanların karakterizasyon parametreleri üzerine etkileri değerlendirilmiştir. DPPC ile hazırlanan nanolipozomlara PVA eklendiğinde en yüksek enkapsülasyon (81.2 ± 5.090) elde edilmiştir. Gen tedavisine yönelik formülasyonlar hazırlamak için, elde edilen anyonik nanolipozomların yüzeylerine polimerik kaplama yapılmasına karar verilmiştir. PVA eklendiğinde en yüksek enkapsülasyon elde edilmesine rağmen, PVA iyonik etkileşimi önlemiş ve polimerik kaplama yapılamamıştır.

Genel olarak, farklı lipit türevleri, kolesterol ve diğer bileşenlerin kullanıldığı formülasyonlar, etkin madde enkapsülasyon oranı ve stabilite açısından değerlendirildiğinde en iyi sonuçlar ana formülasyon bileşenleri DPPC, DCP ve CH olan formülasyonlarla elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmalara, DPPC:DCP:CH ile hazırlanan anyonik nanolipozomlar ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bu nanolipozomlar Lipo-FU adıyla kodlanmıştır. Anyonik nanolipozomların, negatif yükü sebebiyle serum proteinleri ve eritrositlere düşük oranda bağlanır ve stabilitesi

yüksektir. Nükleik asitlerin elektriksel kuvvetlerle bağlanabilmesi amacıyla da, yüzeyleri pozitif yüklü polimer ile kaplanabilmektedir. Bu amaçla tez kapsamında, anyonik nanolipozomların yüzeyine hidrofilik polimer kaplaması için farklı oranlarda toksik olmayan, biyobozunur ve çalışmalarda en çok kullanılan polimerler olan PLL ve PEI kullanılmıştır. PLL çok fazla proton içermez, dolayısıyla endozomal kaçışta daha başarılı olduğundan gen tedavisi çalışmaları için uygundur. Bu amaçla, farklı polimer:lipit oranlarında çalışmalar yürütülmüş ve lipit miktarı 0.176 mg/mL ve 1:10 (v/v) PLL çözeltisi (3 mL) ile hazırlanan formülasyon ile en yüksek EE değeri (%83.17±1.130) gözlenmiş olup, ideal PB (97.19±7.223), ZP (20.3±0.057) ve PDI (0.287±0.067) değerleri elde edilmiştir. SEM analizleri yapılmış ve homojen, küresel veziküller görüntülenmiştir. Bu nanolipozomlar PLL-Lipo-FU adıyla kodlanmıştır.

Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU formülasyonlarının EE değerleri sırasıyla ~ %42 ve %86 civarında bulunurken, PEI formülasyonlarının EE değeri ~ %12 olarak bulunmuştur. PEI ile hazırlanan formülasyonlarda zamanla agregasyon ve çökme meydana gelmiştir. PLL içeren nanokomplekslerin partikül büyüklüğünün 100 nm civarında olması, pozitif membran yükü ve kolloidin homojen dağılımı sebebiyle gen transfeksiyon çalışmaları için uygun formülasyon olarak belirlenmiş olup, *in-vitro* salım ve hücre kültürü çalışmalarında bu formülasyon kullanılmıştır. ZP, partiküllerin agregasyonunun engellenmesinde önemli bir parametre olup, bu değerlere göre stabilite testleri sonucunda, +4°C'de Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU formülasyonlarının stabilitesini 30 gün boyunca koruduğu gözlenmiştir. CH eklenmesinin stabiliteyi olumlu yönde etkilediği ve kan proteinleri ile lipit tabaka birleşmesini azaltarak, opsonizasyonu önlediği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, nanolipozom formülasyonlarının hazırlanması sırasında CH ilavesi yapılmıştır.

Formülasyonların kimyasal karakterizasyon çalışmaları kapsamında, ATR-FTIR analizleriyle molekül bağ yapıları, DSC/TGA termogramlarıyla da termodinamik özellikleri aydınlatılmıştır. Bu amaçla, 5-FU, DPPC, 5-FU + DPPC fiziksel karışım, boş Lipo ve Lipo-FU formülasyonlarının analizleri gerçekleştirilmiştir. 5-FU, 250°C civarında erimeye başlamış, 280°C civarında keskin endotermik erime piki gözlenmiştir. DPPC'ye ait termogramda, DPPC'nin geçiş sıcaklığı olan ~50°C'de

endotermik erime piki gözlemlenirken, 260°C'de endotermik pikin ardından, lipidik yapının bozunmasına ilişkin ekzotermik bir eğri gözlemlenmiştir. Bu sıcaklıktan sonraki sıcaklık değerlerinde, 5-FU içeren formülasyonlarda 5-FU'ya ait erime piki termogramlarda görülmemiştir. Liyofilize formülasyonların analizlerinde benzer termogram sonuçları elde edilmiştir. Bu durum, nanolipozomal yapılarda elde edilen düşük enkapsülasyon yüzdeleri ve enkapsülasyon sırasında etkin maddenin nanolipozomlara amorf düzende dahil olmasına dayandırılmıştır [87]. TGA termogramlarında ise DSC grafiklerine paralel olarak, 5-FU'ya ait kütle kaybının 250°C civarında başlaması, erimenin bu sıcaklıkta başladığını doğrular niteliktedir. Benzer şekilde, nanolipozom, polimer ve fiziksel karışım termogramlarında, kütle kayıpları 50°C civarında görülmüştür. 250°C'deki kütle kayıplarının ise, Şekil 4.10'da görüldüğü üzere lipit yapısının bozulması ile beraber oluştuğu düşünülmektedir.

Üçüncü aşamada; diyaliz membran yöntemi ile *in-vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Serbest 5-FU (etkin madde çözeltisi) ile karşılaştırıldığında Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU formülasyonları ile uzatılmış bir salım profili elde edilmiştir. Salım sonuçlarına kinetik modeller uygulanarak formülasyonların salım mekanizmaları Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU için belirlenmiştir.

In-vitro salım grafiklerine bakıldığında Lipo-FU formülasyonunun birinci derece salım kinetiğine sahip olduğu görülmüştür. Birinci derece salım kinetiği, çözünme hızının yüksek olduğu hidrofilik etkin maddenin salımının konsantrasyona bağlı olduğunu göstermektedir. İlk aşamada gözlenen ani salım (30 dk ~%47), nanolipozom yüzeyine tutunan ve çeper kısmında yer alan etkin maddenin hızla çözünme ortamına geçmesine dayandırılmıştır. Daha sonra gözlenen kontrollü salım ise, çekirdek kısmında yer alan etkin maddenin lipit tabakalar arasından sızarak/difüze olarak ortamda salıverilmesi sonucu daha yavaş bir salım göstermesine dayandırılmıştır. PLL-Lipo-FU formülasyonunun salım grafiği verilerinden elde edilen determinasyon katsayısı ise bu formülasyonda etkin maddenin Higuchi salım kinetiğine uygun olarak salındığını göstermektedir. Higuchi salım kinetiğinde ise, etkin maddenin suda hızlıca çözünmeyen bir matriksten salınmasına benzer bir şekilde, salım zamana bağlı olarak daha yavaş gerçekleşmektedir. Bir diğer deyişle, Higuchi salım kinetiği, etkin maddenin membran

yüzeinin erozyonu ile salındığı matriksleri tanımlamaktadır. Bu da nanolipozomların yüzeinin PLL kaplamasının varlığını doğrular niteliktedir. PLL-Lipo-FU formülasyonunda 5-FU'nun etki mekanizmasına uygun olarak etkin madde daha düşük dozda ve sürekli bir şekilde salınmıştır.

Son aşamada; nanolipozomların A431 epidermal karsinom hücre hattı üzerinde hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. Etkin madde içermeyen formülasyonların (Lipo ve PLL-Lipo) hücreler için toksik olmadığı saptanmıştır ve güvenilirliğinin yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. PLL-Lipo-FU formülasyonun, A431 hücrelerinin doza bağlı bir şekilde büyümesini inhibe ettiği gözlenmiştir. Aynı zamanda bu formülasyon içine enkapsüle edilen ilaç miktarının, hücrelerin ölümünü sağlamak için yeterli bir konsantrasyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak; optimize edilen nanolipozom formülasyonları (Lipo-FU ve PLL-Lipo-FU) ile uzun süreli etki sağlanmış olup, 5-FU'nun yarılanma ömrünün uzatıldığı, sık kullanımın önlenmesine bağlı olarak yan etkilerinin azaltıldığı ve hasta uyuncunun arttırılabildiği formülasyonlar geliştirilmiştir. Nano boyutu ve yüksek penetrasyon kabiliyeti nedeniyle, bu formülasyonların intratümöral uygulamayı takiben, vasküler bir tümör olan malign melanom tümörlerinde, lokal seviyede artmış bir terapötik cevap oluşturabileceği öngörülebilmektedir. Ayrıca, PLL-Lipo-FU formülasyonu ilk defa geliştirilmiş olup, ilaç/gen kombinasyon terapisi uygulamaları için yeni bir nanolipozom modeli oluşturmaktadır. PLL kaplı nanolipozomlar, membran yükünün pozitif olması nedeniyle toksik olan katyonik lipitlerden oluşan lipopleks modellerine alternatif olarak sunulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Buzođlu, H. [cited 2019 19 May]; Available from: <https://www.hakanbuzoglu.com/component/content/article/164-dermatoloji/deri-rengi-ve-duzensizlikleri/1312-melanositler>.
2. Nasr, S.L. *How Albinism Works*. [cited 2019 June 16]; Available from: <https://health.howstuffworks.com/skin-care/problems/medical/albinism1.htm>.
3. Sundstrom, K. *Beginning Signs of Skin Cancer*. 2017 [cited 2019 June 16]; Available from: <https://healthyliving.azcentral.com/beginning-signs-of-skin-cancer-12174115.html>.
4. Can Baykal, A.P.E., *Malign Melanoma: Risk Factors and Major Clinical Findings*. Turk J Dermatol, 2015. **1**: p. 1-7.
5. Gülçelik, M.A. *Malign Melanomun Cerrahi Tedavisii*. 2015 [cited 2019 19 May]; Available from: <https://www.slideshare.net/mehmetaligulcelik/malign-melanom-54540932>.
6. *Types of Melanoma*. [cited 2019 May 12]; Available from: <https://www.aimatmelanoma.org/about-melanoma/types-of-melanoma/>.
7. ChemSpider. *Fluorouracil*. [cited 2019 17 May]; Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3268.html>.
8. *Drug Delivery Liposome Art Print by Alfred Pasięka*. [cited 2019 11 May]; Drug delivery liposome, computer artwork. This artificially-constructed, spherical vesicle possesses a selectively-permeable wall that closely resembles the membrane of a living cell. The membrane consists of a dual layer of phospholipids. Each phospholipid consists of a phosphate group head (blue) and a fatty acid tail (orange). Liposomes can be used to carry drugs or genes to target cells. This is particularly useful for highly toxic cancer drugs as it reduces unpleasant side effects.]. Available from: <https://fineartamerica.com/featured/drug-delivery-liposome-alfred-pasieka.html?product=art-print>.
9. Emrah Kırtıl, M.H.Ö., *Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarıda Kullanımı: Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi* Akademik Gıda, 2014. **12**(4): p. 41-57.
10. Torrice, M., *Does nanomedicine have a delivery problem?* Chemical & Engineering News, 2016. **94**(25): p. 16-19.
11. Bulbake U, D.S., Kommineni N, Khan W, *Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review*. Pharmaceutics, 2017. **9**(2): p. 12.
12. Abbas Yurdakul, R.A., *Structures and classification of liposomes*. Tekstil ve Konfeksiyon, 2007. **4**.
13. Taylor, K.M.G., Morris, R.M., *Thermalanalysis of phase-transition behavior in liposomes*. Thermochemica Acta, 1995. **248**: p. 289-301.
14. Koynova, R. and M. Caffrey, *Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1376**(1): p. 91-145.
15. Kupper, T.S. and R.C. Fuhlbrigge, *Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(3): p. 211-222.
16. Scherer, D. and R. Kumar, *Genetics of pigmentation in skin cancer--a review*. Mutat Res, 2010. **705**(2): p. 141-53.
17. Society, A.C. *Cancer Facts & Figures 2016*. 2016 [cited May 15 2019]; Available from:

<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>.

18. Institute, N.C. *SEER Stats Fact Sheets: Melanoma of the skin*. [cited 2019 15 May]; Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>.
19. Katalinic, A., U. Kunze, and T. Schäfer, *Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer)*. *British Journal of Dermatology*, 2003. **149**(6): p. 1200-1206.
20. Diepgen, T.L. and V. Mahler, *The epidemiology of skin cancer*. *British Journal of Dermatology*, 2002. **146**: p. 1-6.
21. Leiter, U. and C. Garbe, *Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer—the role of sunlight*, in *Sunlight, vitamin D and skin cancer*. 2008, Springer. p. 89-103.
22. Flohil, S.C., et al., *Trends in Basal cell carcinoma incidence rates: a 37-year Dutch observational study*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013. **133**(4): p. 913-918.
23. Wehner, M.R., et al., *Indoor tanning and non-melanoma skin cancer: systematic review and meta-analysis*. *Bmj*, 2012. **345**: p. e5909.
24. Oncology, A.S.o.C. *Melanoma*. 2015 [cited 2019 May 13]; Available from: <http://www.cancer.net/cancer-types/melanoma/view-all>.
25. Çaynak, Z.C., *Kutanöz Malin Melanom'da Yüksek Doz İnterferon Tedavisi*, in *5. Genel Cerrahi Kliniği*. 2006. p. 51.
26. Schreier, H.B., J. , *Liposomes and Niosomes as Topical Drug Carriers - Dermal and Transdermal Drug Delivery*. *Journal of Controlled Release*, 1994. **30**: p. 1-15.
27. Mason, J.T., C. Huang, and R.L. Biltonen, *Calorimetric investigations of saturated mixed-chain phosphatidylcholine bilayer dispersions*. *Biochemistry*, 1981. **20**(21): p. 6086-92.
28. ALKAN, H., *Lipozomlar. 1. Özellikleri ve Hazırlama Yöntemleri* FABAD J. Pharm. Sci., 1983. **8**: p. 181 - 196.
29. Taylor, T.M., et al., *Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2005. **45**(7-8): p. 587-605.
30. Lasch, J., et al., *A method to measure critical detergent parameters. Preparation of liposomes*. *Anal Biochem*, 1983. **133**(2): p. 486-91.
31. W.W. *Phosphatidylcholine and related lipids structure, occurrence, biochemistry and analysis*. 2013 [cited 2019 18 May]; Available from: <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/pc/index.htm>.
32. Lipids, A.P. *Lipids For Liposome Formation*. [cited 2019 18 May]; Available from: <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/lipids-for-liposome-formation>.
33. Little, A., et al., *A double-blind, placebo controlled trial of high-dose lecithin in Alzheimer's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1985. **48**(8): p. 736-42.
34. Sulkowski, W.W., et al., *The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability*. *Journal of Molecular Structure*, 2005. **744-747**: p. 737-747.
35. Fresta M., W.E., Puglisi G., *Enhanced therapeutic effect of cytidine -5'- difosfate choline when associated with GM1 containing small liposomes as demonstrated in rat ischemia model*. *Pharmaceutical Research*, 1995. **12**: p. 1769-1774.

36. Zırh-Gürsoy, A., *Lipozomlar*, in *Kontrollü Salım Sistemleri*, A. Zırh-Gürsoy, Editor. 2014, Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri San.Tic.Ltd.Şti.: İstanbul. p. 107-108.
37. Himanshu Anwekar, S.P.a.A.K.S., *Liposome- as drug carriers*. Int. J. of Pharm. & Life Sci. (IJPLS), 2011. **2**(7): p. 945-951.
38. Liu, D., F. Liu, and Y.K. Song, *Recognition and clearance of liposomes containing phosphatidylserine are mediated by serum opsonin*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1235**(1): p. 140-6.
39. Brandl, M., *Liposomes as drug carriers: a technological approach*. Biotechnol. Annu. Rev., 2001. **7**: p. 59-85.
40. Garidel, P., Johann, C., Blume, A. 2000, *Thermodynamics of lipid organization and domain formation in phospholipid bilayers*. J. Liposome Res., 2000. **10**: p. 131-158.
41. Maurer, N., D.B. Fenske, and P.R. Cullis, *Developments in liposomal drug delivery systems*. Expert Opin Biol Ther, 2001. **1**(6): p. 923-47.
42. Maeda, H., *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. Adv Enzyme Regul, 2001. **41**: p. 189-207.
43. Massing, U. and S. Fuxius, *Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness*. Drug Resist Updat, 2000. **3**(3): p. 171-177.
44. Gibis, M., E. Vogt, and J. Weiss, *Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes*. Food Funct, 2012. **3**(3): p. 246-54.
45. Panya, A., et al., *Effects of chitosan and rosmarinic acid esters on the physical and oxidative stability of liposomes*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(9): p. 5679-84.
46. Sayiner O., C.T., *Targeting with nanocarrier systems*. Ankara Ecz Fak. Derg., 2016. **40**(3): p. 62-79.
47. Laye, C., D.J. McClements, and J. Weiss, *Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan*. J Food Sci, 2008. **73**(5): p. N7-15.
48. Wagner, K., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H., *Nebulization of liposomal rhcu/zn-Sod with a novel vibrating membrane nebulizer*. J. Liposome Res, 2006. **16**: p. 113-125.
49. Sharma A., S.U.S., *Liposomes in drug delivery: progress and limitations* International Journal of Pharmaceutics, 1997. **154**: p. 123-140.
50. A. Gürsoy, B.D., E. Pişkin, N.N. Peppas, *Lipozomlar*, in *Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler*. 1989, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi: İstanbul.
51. Vemuri S., R.C.T., *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. Pharmaceutica Acta Helvetica, 1995. **70**: p. 95-111.
52. JP, R., *Liposomes*. The science and practice of pharmacy. Vol. 21. 2006, Maryland: William&Wilkins Lippincott.
53. Degim, Z., et al., *The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in Kangal dogs and visualization of phagocytosis of liposomes*. J Biomed Mater Res, 2002. **61**(2): p. 246-51.
54. Yücel, Ç., *Doksisiklinin Lipozom ve Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Hücre Kültüründen Geçişlerinin İncelenmesi*, in *Pharmaceutical Technology Department*. 2010, Gazi University: Ankara. p. 174.
55. Jain, R.K., *Transport of molecules across tumor vasculature*. Cancer Metastasis Rev, 1987. **6**(4): p. 559-93.

56. Bharadwaj, R., et al., *Topical delivery of paclitaxel for treatment of skin cancer*. Drug Dev Ind Pharm, 2016. **42**(9): p. 1482-94.
57. Gupta, R.R., Jain, S. K.Varshney, M., *AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2005. **41**: p. 25-32.
58. Li, J., et al., *Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma*. Nanomedicine, 2015. **11**(3): p. 769-94.
59. Berciano-Guerrero, M.A., et al., *Nanoparticles in melanoma*. Curr Med Chem, 2014. **21**(32): p. 3701-16.
60. Dianzani, C., et al., *Drug delivery nanoparticles in skin cancers*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 895986.
61. T. Montier, T.B., P.-A. Jaffres, J.-J. Yaouanc, and P. Lehn, *Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bioinspired lipids as an example*. Current Gene Therapy, 2008. **8**(5): p. 296–312.
62. C. Tros de Ilarduya, Y.S., N. Duzgunes, *Gene delivery by lipoplexes and polyplexes*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **40**(3): p. 159–170.
63. Koltover, I., T. Salditt, and C.R. Safinya, *Phase diagram, stability, and overcharging of lamellar cationic lipid-DNA self-assembled complexes*. Biophys J, 1999. **77**(2): p. 915-24.
64. Sternberg, B., *New structures in complex formation between DNA and cationic liposomes visualized by freeze-fracture electron microscopy*. FEBS Letters, 1994. **356**(2-3): p. 361– 366.
65. Koltover, I., et al., *An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery*. Science, 1998. **281**(5373): p. 78-81.
66. J. O. Radler, I.K., T. Salditt, C. R. Safinya, *Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes*. Science, 1997. **275**(5301): p. 810–814.
67. J. Gustafsson, G.A., G. Karlsson, and M. Almgren, *Complexes between cationic liposomes and DNA visualized by cryo-TEM*. Biochimica et Biophysica Acta, 1995. **1235**(2): p. 305–312.
68. Choi, I.K., et al., *Strategies to increase drug penetration in solid tumors*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 193.
69. Demeneix, B., et al., *Gene transfer with lipospermines and polyethylenimines*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **30**(1-3): p. 85-95.
70. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7297-301.
71. Kichler, A., et al., *Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study*. J Gene Med, 2001. **3**(2): p. 135-44.
72. Akinc, A., et al., *Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis*. J Gene Med, 2005. **7**(5): p. 657-63.
73. [cited 2019 May 9]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biofiles/poly-lysine.html>.
74. Eliyahu, H., Y. Barenholz, and A.J. Domb, *Polymers for DNA delivery*. Molecules, 2005. **10**(1): p. 34-64.
75. T, M., *Intracellular processing of poly (ethylene imine)/ribozyme complexes can be observed in living cells by using confocal laser scanning microscopy and inhibitor experiments*. Pharm Res, 2002. **19**(2): p. 140-6.

76. Administration, U.S.D.o.H.a.H.S.F.a.D., *Guidance Document*, in *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics*. 2015, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research: New Hampshire.
77. ICH Harmonised Tripartite Guideline, in *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*. 2005.
78. Administration, U.S.F.a.D., in *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018, Center for Drug Evaluation and Research: Rockville, MD.
79. Shabir, G.A., *Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis - Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **987**(1-2): p. 57-66.
80. Siaghy, E.M., et al., *High-performance liquid chromatographic analysis of muscular interstitial arginine and norepinephrine kinetics. A microdialysis study in rats*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2000. **745**(2): p. 279-86.
81. Olukman, M., Şanlı, O., Kondolot Solak, E., *Release of Anticancer Drug 5-Fluorouracil from Different Ionically Crosslinked Alginate Beads*. *J. Biomaterials and Nanobiotech.*, 2012. **3**: p. 469-479.
82. Mutalik, S., Shetty, P.K., Kumar, A., Kalra, R., Parekh, H.S., "Enhancement in deposition and permeation of 5-fluorouracil through human epidermis assisted by peptide dendrimers. *Drug Delivery*, 2014. **21**: p. 44-54.
83. Yuan, G., Rong, L., Duanyun, S., Changxiao, L. , *Determination of 5-Fluorouracil in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. *Trans.Tianjin Univ.*, 2010. **16**: p. 167-173.
84. Kavitha, K., Srinivasa Rao, A., Nalini, C., *An Investigation on Enhancement of Solubility of 5 Fluorouracil by Applying Complexation Technique-Characterization, Dissolution and Molecular Modeling Studies*. *J. Applied Pharm. Science*. **3**: p. 162-166.
85. Mu Xiaomei, Z.Z., *Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006. **318**: p. 55–61.
86. Araie, M.K.a.M., *Iontophoresis of 5-fluorouracil into the conjunctiva and sclera*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1989. **30**(3): p. 583–585.
87. Darvishi B., M.S., Kamalinia G, Samadi N., Amini M., Mostafavi S.M.,Maghazei S.,Atyabi F. and Dinarvanda R., *Preparation and Antibacterial Activity Evaluation of 18-β-glycyrrhetic Acid Loaded PLGA Nanoparticles*. *Iran J Pharm Res.*, 2015. **14**: p. 373–383.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
NÜFUS ETÜTLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
NÜFUS ETÜTLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 08/07/2019

Tez Başlığı : İntratümöral Uygulamaya Yönelik Nanolipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 85 sayfalık kısmına ilişkin, 15/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etütleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

08.07.2019

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Ümran YAMAN

Öğrenci No: N17137414

Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Programı: Yüksek Lisans

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. İpek EROĞLU

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ümran YAMAN
Doğum yeri : Elbistan
Doğum tarihi : 29/06/1994
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi : Oğuzlar mh. 1597.sk No:8-A/4 Yazgülü Sitesi Elvankent
Etimesgut/ANKARA
Telefon : +905396990246
Elektronik posta adresi : umranyaman@hotmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Bülent Ecevit Üniversitesi – Biyomedikal Mühendisliği
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi – Nanoteknoloji ve Nanotıp
Anabilim Dalı

İş Tecrübesi

04/2017- 08/2017 : Biyomedikal Mühendisi. YDA Sağlık Beştepe Mh. Nergis
Sokak. No: 7. Via Tower İş Merkezi. Kat: 21 D:50
Söğütözü/Ankara
06/2016 - 09/2016 : Misafir Öğrenci. St Andrews Üniversitesi. Biomolecular
Sciences Building. University of St Andrews. North Haugh.
St Andrews. Fife. KY16 9ST UK