

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
NANOPARTİKÜL İÇEREN KURU TOZ İNHALER
FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU
VE *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Zeynep Merve Geyik

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
NANOPARTİKÜL İÇEREN KURU TOZ İNHALER
FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU
VE *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Zeynep Merve Geyik

Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Yağmur Akdağ Çaylı

ANKARA

2023

**AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE NANOPARTİKÜL
İÇEREN KURU TOZ İNHALER FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Öğrenci: Ecz. Zeynep Merve Geyik

Danışman: Doç. Dr. Yağmur Akdağ Çaylı

Bu tez çalışması 18.08.2023 tarihinde jürimiz tarafından "Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

*Prof. Dr. Levent Öner
(Hacettepe Üniversitesi)*

Tez Danışmanı:

*Doç. Dr. Yağmur Akdağ Çaylı
(Hacettepe Üniversitesi)*

Üye:

*Dr. Öğr. Üyesi Naile Öztürk
(İnönü Üniversitesi)*

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

21 Ağustos 2023

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI 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 kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

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

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

09/09/2023

Zeynep Merve Geyik

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

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

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

ETİK BEYAN

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

Zeynep Merve Geyik

TEŞEKKÜR

Bilimsel bakış açısı kazanmamı sağlayan, beni TÜBİTAK projesine dahil eden ve fikirleri, bilgisi ve titizliği ile tezimin ilerleyişinde emeklerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Yağmur Akdağ Çaylı'ya,

Bilgileriyle ufkumu açan ve katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Levent Öner ve Prof. Dr. Selma Şahin'e, tezimin her alanında emek veren Doç. Dr. Tuğba Gülsün İnal hocama ve bütün Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı hocalarıma, tezimin analitik kimya kısımları ile ilgili her konuda kapısını çalabileceğim çok değerli hocam Prof. Dr. Emirhan Nemutlu'ya,

Hücre kültürü deneyleri için çok emek veren, her zaman bilgisi için aranan kişi olan Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can Öztürk ve bilgileriyle bizi aydınlatan ve yönlendiren Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya,

Hücre kültürü deneylerinin gerçekleştirilmesinde destek olan Tuğçe Temel'e ve her konuda emek veren Ecz. Gözde Bebek'e, deneylerde yardım eden Ecz. Burcu Nacak ve Ecz. Melek Nur Bilal'e ve laboratuvar arkadaşlarım Ecz. Eylül İlkar ve Ecz. Ece Türkmen'e,

Tez deneyleri için maddi destek sağlayan (Proje Numarası: 120S895) ve tez sürecimde beni yüksek lisans bursu (2210-C) ile destekleyen TÜBİTAK'a ve Hızlı Destek (numara: THD-2022-20294) sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne,

Son üç yılının güzelleşmesini sağlayan ve bana koşulsuz destek olan Öykü Çınar ve Ecz. Berke Kayhan'a,

Hayatım boyunca bana hep destek olan ve zorlu tez günlerimde bana sonsuz anlayış gösteren annem Ferda Geyik ve babam Cafer Geyik'e teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Geyik, Z.M., Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nanopartikül İçeren Kuru Toz İnhaler Formülasyonu Hazırlanması, Karakterizasyonu ve *In Vitro* Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofarmasötik ve Farmakokinetik Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.

Bu tezde küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere gefitinib nanopartikülleri içeren kuru toz inhaler formülasyonu geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 130 nm'nin altında albümine bağlı gefitinib nanopartikülleri yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile hazırlanmış ve tümöre aktif hedefleme amacıyla hyaluronik asit (HA) kaplaması yapılmıştır. Formülasyonlarda hedeflenen boyutlarda tekdüze nanopartiküllerin eldesi için akciğerin yüzeyinde doğal yüzey aktif madde olarak bulunan Dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC) kullanılmıştır. Nanopartiküllerin inhale edilebilir boyutlara ve toz özelliklerine sahip olabilmesi için formülasyonlara taşıyıcılar eklenmiş ve liyofilize edilmiştir. Kuru toz inhaler (KTİ) formülasyonlarının aerosolize olarak akciğerin derinliklerine ulaşabilmesi için partiküllerin 1-5 µm aerodinamik çapa sahip olması amaçlanmıştır. Farklı taşıyıcılar içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının aerodinamik özellikleri Andersen Kademeli Ayırıştırıcı (ACI) ile analiz edilmiştir. Taşıyıcı olarak fenilalanin-mannitol kombinasyonu ile en iyi aerodinamik özellikler ve *in-vitro* salım davranışı sağlanmıştır. Suda çözünmeyen kristal yapılu gefitinibin nanopartikülleri oluşturularak yüzey alanı geniş, inhale edilebilir amorf yapılu liyofilize toz hale getirilmesi ile sudaki çözünürlüğü artırılmıştır. Simüle akciğer sıvısı ortamında yapılan *in vitro* salım deneylerinde geliştirilen KTİ formülasyonunun 72 saat boyunca etkin madde salımına devam ettiği görülmüştür. Lewis Lung Carcinoma-1(LLC1) hücre hattında yapılan 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) testleri ile KTİ formülasyonun 72 saatte gefitinib etkin maddesine göre çok daha düşük dozlarda kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı görülmüştür. Nil kırmızısı yüklenen KTİ formülasyonlarının LLC1 hücrelerine alımı floresans mikroskobu ile görüntülenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kuru toz inhaler, nanoteknoloji, gefitinib, albümin, LLC1.

Bu çalışma TÜBİTAK (Proje No: 120S895) ve Hacettepe BAP (Hızlı Destek numara: THD-2022-20294) tarafından desteklenmiştir. Zeynep Merve Geyik tez süresince TÜBİTAK tarafından yüksek lisans bursu (2210-C) ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Geyik, Z.M., Preparation, Characterization and In Vitro Evaluation of Dry Powder Inhaler Formulation Containing Nanoparticles for the Treatment of Lung Cancer, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Program Master's Thesis, Ankara, 2023. In this thesis, the aim was to develop a dry powder inhaler formulation containing gefitinib nanoparticles for the treatment of non-small cell lung cancer. Gefitinib nanoparticles, below 130 nm in size, were prepared using a high-pressure homogenization method and then coated with hyaluronic acid (HA) for active targeting to the tumor. To achieve uniform nanoparticles in the desired size, Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) present as a natural surfactant on the lung surface was used in the formulations. Carriers were added to the formulations and lyophilized to obtain inhalable particle sizes and powder characteristics. The target was to have particles with a diameter of 1-5 μm to reach the depths of the lungs as aerosolized dry powder inhalers (DPI)s. Different dry powder inhaler formulations containing various carriers were analyzed to evaluate their aerodynamic properties using the Andersen Cascade Impactor (ACI). The combination of phenylalanine-mannitol as carriers provided the best aerodynamic properties and *in vitro* release behavior. The water solubility of poorly soluble crystalline gefitinib was increased by forming gefitinib nanoparticles and converting them into an inhalable amorphous lyophilized powder with a wide surface area. In vitro release experiments in simulated lung fluid showed that the developed DPIs continued to release the active substance for 72 hours. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tests on the Lewis Lung Carcinoma-1 (LLC1) cell line revealed that the DPI reduced the viability of cancer cells at much lower doses compared to gefitinib active pharmaceutical ingredient at 72 hours. Cellular uptake of Nile red-loaded DPI formulations in LLC1 cells was visualized using a fluorescence microscope.

Keywords: Dry powder inhaler, nanotechnology, gefitinib, albumin, LLC1. *This study was supported by TUBITAK (Project No: 120S895) and Hacettepe BAP (Grant number: THD-2022-20294). Zeynep Merve Geyik was supported throughout the thesis by a master's scholarship from TUBITAK (2210-C).*

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN SAYFASI | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xiv |
| ŞEKİLLER | xvi |
| TABLolar | xix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Akciğer Kanseri | 3 |
| 2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi ve Patolojisi | 3 |
| 2.1.2. Akciğer Kanseri Tedavi Yöntemleri | 5 |
| 2.2. Akciğer Kanseri Tedavisinde Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler | 6 |
| 2.3. İnsan Serum Albümini (HSA) Nanopartikülleri | 8 |
| 2.4. HA Bağlı Nanopartiküller | 10 |
| 2.5. Pulmoner Yolla Uygulanan Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler | 10 |
| 2.6. İnhalasyon Sistemleri | 11 |
| 2.6.1. Nebülizer | 11 |
| 2.6.2. Ölçülü Doz İnhaler | 12 |
| 2.6.3. Kuru Toz İnhaler | 13 |
| 2.7. İnhaler Partiküllerinin Aerodinamik Parametrelerinin Ölçümü | 16 |
| 2.7.1. Cam İkili Ayırıştırıcı (Glass Twin Impinger) | 17 |
| 2.7.2. Marple Miller Kademeli Ayırıştırıcı (Marple Miller Cascade Impactor) | 17 |
| 2.7.3. Çok Aşamalı Sıvı Ayırıştırıcı (Multi Stage Liquid Impinger) | 17 |
| 2.7.4. Yeni Nesil Ayırıştırıcı (Next Generation Impactor) | 18 |

| | |
|--|----|
| 2.7.5. Andersen Kademeli Ayırıştırıcı (Andersen Cascade Impactor) (ACI) | 18 |
| 2.8. Gefitinib | 19 |
| 2.8.1. Fizikokimyasal Özellikler | 19 |
| 2.8.2. Farmakolojik Etki Mekanizması | 20 |
| 2.8.3. Farmakokinetik Özellikler | 21 |
| 2.8.4. Yan Etkiler | 22 |
| 2.8.5. Ticari Preparatlar | 22 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 24 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler ve Aletler | 24 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler | 24 |
| 3.1.2. Kullanılan Aletler | 25 |
| 3.2. Etkin Maddenin Miktar Tayini | 26 |
| 3.2.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi | 27 |
| 3.2.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu | 27 |
| 3.3. Nanopartikül Hazırlama Yöntemi | 30 |
| 3.3.1. Formülasyon Çalışmaları | 30 |
| 3.4. Nanopartikül Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları | 32 |
| 3.4.1. Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü | 32 |
| 3.4.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması | 32 |
| 3.4.3. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi | 33 |
| 3.5. KTİ Hazırlama Yöntemi | 33 |
| 3.6. KTİ'lerin Aerodinamik Parametrelerinin Andersen Kademeli Ayırıştırıcı ile Hesaplanması | 34 |
| 3.7. Etkin Madde, Yardımcı Maddeler ve Kuru Toz İnhaler Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler | 35 |
| 3.7.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) | 36 |
| 3.7.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC) | 36 |
| 3.7.3. Termogravimetrik Analiz (TGA) | 36 |
| 3.7.4. X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD) | 36 |
| 3.7.5. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.7.6. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) | 37 |
| 3.7.7. Floresans Spektroskopisi | 37 |
| 3.8. Çözünürlük Tayini | 39 |
| 3.9. <i>In-vitro</i> Salım | 39 |
| 3.9.1. Salım Ortamının Hazırlanması | 41 |
| 3.9.2. Sink Koşulun Sağlanması | 41 |
| 3.9.3. Örneklerin Hazırlanması | 42 |
| 3.9.4. In vitro Salım Düzenegi | 43 |
| 3.10. KTİ İçerisinden Gefitinib Miktar Tayini | 44 |
| 3.11. Stabilité | 44 |
| 3.12. Hücre Kültürü Çalışmaları | 44 |
| 3.12.1. Sitotoksosite Çalışması (MTT) | 45 |
| 3.12.2. Hücre İçine Alım Çalışması | 46 |
| 3.13. İstatistiksel Analiz | 47 |
| 4. BULGULAR | 48 |
| 4.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini | 48 |
| 4.1.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi | 48 |
| 4.1.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu | 50 |
| 4.2. Formülasyon Çalışmaları Sonucu Elde Edilen Nanopartiküllerin Karakterizasyonları | 53 |
| 4.2.1. Yüzey Aktif Madde Kullanımının Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Üzerine Etkisi | 53 |
| 4.2.2. İşlem Parametrelerinin Partikül Boyutu Dağılımına Etkisi | 55 |
| 4.2.3. HA Kaplama Yöntemi ve Zeta Potansiyel Üzerine Etkisi | 58 |
| 4.2.4. Enkapsülasyon Etkinliği | 58 |
| 4.2.5. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi | 58 |
| 4.3. Farklı Taşıyıcıları İçeren KTİ'lerin Aerodinamik Parametreleri | 59 |
| 4.4. Etkin Madde, Yardımcı Maddeler ve Kuru Toz İnhaler Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler | 62 |
| 4.4.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi | 62 |
| 4.4.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC) | 68 |

| | |
|---|-----|
| 4.4.3. Termogravimetrik Analiz (TGA) | 71 |
| 4.4.4. X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD) | 73 |
| 4.4.5. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) | 75 |
| 4.4.6. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) | 76 |
| 4.4.7. Floresans Spektroskopisi | 76 |
| 4.5. Çözünürlük Tayini | 82 |
| 4.6. <i>In-vitro</i> Salım | 83 |
| 4.6.1. <i>In vitro</i> Salım-1 | 83 |
| 4.6.2. <i>In vitro</i> Salım-2 | 84 |
| 4.7. KTİ İçerisinden Gefitinib Miktar Tayini | 86 |
| 4.8. Stabilite | 86 |
| 4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları | 87 |
| 4.9.1. Sitotoksite Çalışması (MTT) | 87 |
| 4.9.2. Hücre İçine Alım | 90 |
| 5. TARTIŞMA | 93 |
| 5.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini ve Validasyonu | 93 |
| 5.2. Nanopartiküllerin Hazırlama Yönteminin Değerlendirilmesi | 94 |
| 5.3. Nanopartikül Formülasyon Çalışmalarının ve Karakterizasyonlarının Değerlendirilmesi | 94 |
| 5.3.1. Yüzey Aktif Maddelerin Etkisi | 95 |
| 5.3.2. HA ile Yüzey Modifikasyonu | 96 |
| 5.3.3. Nanopartiküllerin Yüzey Morfolojileri | 96 |
| 5.3.4. Enkapsülasyon Etkinliği | 97 |
| 5.4. Farklı Taşıyıcıları İçeren KTİ'lerin Hazırlanması | 97 |
| 5.4.1. Farklı Taşıyıcılar İçeren KTİ'lerin Aerodinamik Parametrelerinin Değerlendirilmesi | 98 |
| 5.5. Etkin Madde, Yardımcı Maddeler ve KTİ Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler | 101 |
| 5.5.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC) | 101 |
| 5.5.2. Yüzey Alanı Ölçümü (BET) | 101 |
| 5.5.3. Floresans Spektroskopisi | 102 |

| | |
|---|-----|
| 5.6. Çözünürlük Tayini | 103 |
| 5.7. <i>In-vitro</i> Salım | 103 |
| 5.8. Stabilite | 106 |
| 5.9. Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi | 107 |
| 6. SONUÇ ve ÖNERİLER | 109 |
| 7. KAYNAKLAR | 111 |
| 8. EKLER | 116 |
| EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu | 116 |
| EK-2 : Dijital Makbuz | 117 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|--------------|--|
| ACI | Andersen Kademeli Ayrıştırıcı |
| ALK | Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) |
| BET | Yüzey Alanı Ölçümü |
| BRAF | V-Raf Murin Sarkom Viral Oncogen Homolog B |
| CA | Selüloz Asetat |
| DAD | Foto diyot dizisi dedektör |
| DMF | Dimetilformamid |
| DPPC | Dipalmitoil fosfatidilkolin |
| ED | <i>Emitted Dose</i> |
| EE | Enkapsülasyon etkinliği |
| EF | <i>Emitted Fraction</i> |
| EGF | Epidermal Büyüme Faktörü |
| EGFR | Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) |
| EPR | Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma Etkisi |
| FDA | Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi |
| FISH | Floresan İn Situ Hibridizasyon |
| FT-IR | Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi |
| HA | Hyaluronik asit |
| HPLC | Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi |
| HSA | İnsan Serum Albümini |
| HSPC | Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin |
| ICH | Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu |
| İPD | İnce Partikül Dozu |
| İPF | İnce Partikül Fraksiyonu |
| k' | Kapasite faktörü |
| KHDAK | Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri |
| KOAÇ | Kütle Ortalama Aerodinamik Çap |
| KRAS | Kirsten Sıçan Sarkom Virüsü |
| Ksv | Stern-Volmer quenching sabiti |
| KTI | Kuru Toz İnhaler |
| LLC1 | <i>Lewis Lung Cell Carcinoma-1</i> |

| | |
|-------------------------------|---|
| LOD | Saptanabilirlik sınırı |
| LOQ | Tayin edilebilirlik sınırı |
| MAPK | Mitojen-Aktive Protein Kinaz |
| MOC | Mikro Delik Toplayıcı (<i>Micro Orifice Collector</i>) |
| MTT | 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide |
| N | Teorik tabaka sayısı |
| NabTM | Albümin Bağlı Nanopartikül |
| NK | Nil kırmızısı |
| NLC | Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar |
| ÖDİ | Ölçülü Doz İnhaler |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| ROS1 | C-ros Onkogen 1 |
| R² | Determinasyon katsayısı |
| SLF | Simüle Akciğer Sıvısı |
| SLN | Katı Lipid Nanopartiküller |
| SPARC | Asidik ve Sistin Bakımından Zengin Salgı Proteini |
| SS | Standart Sapma |
| T | Kuyruklanma faktörü |
| t₀ | Ölü zaman |
| CTEM | Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu |
| TGA | Termogravimetrik Analiz |
| TGFα | Tümör Büyüme Faktörü α |
| TKI | Tirozin Kinaz İnhibitörleri |
| VK | Varyasyon Katsayısı |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| XRD | X-Işını Kırınımı Analizi |

ŞEKİLLER

| Şekil | | Sayfa |
|--------------|--|--------------|
| 2.1 | Köken aldıkları hücelere göre akciğer kanserinin alt tipleri. | 5 |
| 2.2 | Albüminin gp60 yolağı ile tümör dokusuna ve hücrelerine alınması. | 9 |
| 2.3 | KTİ formülasyonlarında ilaç ve taşıyıcıyı bir araya getirme yöntemleri. | 14 |
| 2.4 | KTİ cihazlarının sınıflandırılması ve örnekleri. | 16 |
| 2.5 | Gefitinibin molekül yapısı. | 19 |
| 2.6 | Gefitinibin etki mekanizması. | 21 |
| 4.1 | Gefitinibin asetonitril ortamında kalibrasyon doğrusu ve denklemi. | 48 |
| 4.2 | 5 µg/mL gefitinibin asetonitril ortamında 260 nm’de alınmış kromatogramı ve alıkonma zamanı. | 48 |
| 4.3 | Gefitinibin PBS (pH=7,4) ortamında kalibrasyon doğrusu ve denklemi. | 49 |
| 4.4 | 5 µg/mL gefitinibin PBS ortamında 260 nm’de alınmış kromatogramı ve alıkonma zamanı. | 49 |
| 4.5 | Gefitinibin SLF ortamında kalibrasyon doğrusu ve denklemi. | 50 |
| 4.6 | 3 µg/mL gefitinibin SLF ortamında 260 nm’de alınmış kromatogramı ve alıkonma zamanı. | 50 |
| 4.7 | HA-gefitinib-HSA-NP’ye ait TEM görüntüleri. | 59 |
| 4.8 | HA-HSA-NP’ye ait TEM görüntüleri. | 59 |
| 4.9 | Gefitinibe ait FT-IR spektrumu. | 62 |
| 4.10 | HA’ya ait FT-IR spektrumu. | 63 |
| 4.11 | DPPC’ye ait FT-IR spektrumu. | 64 |
| 4.12 | HSA’ya ait FT-IR spektrumu. | 64 |
| 4.13 | Fenilalanine ait FT-IR spektrumu. | 65 |
| 4.14 | Mannitole ait FT-IR spektrumu | 66 |
| 4.15 | Boş KTİ’ye ait FT-IR spektrumu. | 67 |
| 4.16 | KTİ’ye ait FT-IR spektrumu. | 67 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.17 | KTİ, mannitol, fenilalanin, DPPC, HSA, HA, boş KTİ ve gefitinibe ait FT-IR spektrumları. | 68 |
| 4.18 | Gefitinibe ait DSC termogramı. | 68 |
| 4.19 | HSA'ya ait DSC termogramı. | 69 |
| 4.20 | HA'ya ait DSC termogramı. | 69 |
| 4.21 | Mannitole ait DSC termogramı. | 69 |
| 4.22 | Fenilalanine ait DSC termogramı. | 70 |
| 4.23 | DPPC'ye ait DSC termogramı. | 70 |
| 4.24 | Boş KTİ'ye ait DSC termogramı. | 70 |
| 4.25 | KTİ'ye ait DSC termogramı. | 71 |
| 4.26 | Boş KTİ, KTİ, HA, mannitol, fenilalanin, DPPC, HSA ve gefitinibin karşılaştırmalı DSC termogramları. | 71 |
| 4.27 | Gefitinibe ait TGA termogramı. | 72 |
| 4.28 | KTİ'ye ait TGA termogramı. | 72 |
| 4.29 | KTİ-3.ay'a ait TGA termogramı. | 73 |
| 4.30 | KTİ-6.ay'a ait TGA termogramı. | 73 |
| 4.31 | Gefitinib ve KTİ'ye ait XRD difraktogramı. | 74 |
| 4.32 | Gefitinibe ait TEM görüntüleri. | 75 |
| 4.33 | Boş KTİ'ye ait TEM görüntüleri. | 75 |
| 4.34 | KTİ'ye ait TEM görüntüleri. | 75 |
| 4.35 | HSA, gefitinib ve DPPC'ye ait floresans spektrumları. | 77 |
| 4.36 | Artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait floresans spektrumları. | 77 |
| 4.37 | 50 µM oleik asit içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait floresans spektrumları. | 78 |
| 4.38 | 50 µM DPPC içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait floresans spektrumları. | 78 |
| 4.39 | 50 µM HSPC içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait floresans spektrumları. | 79 |

- 4.40** Farklı yüzey aktif maddeleri içeren ve yüzey aktif madde içermeyen ortamlarda artan gefitinib derişimine karşılık F_0/F değerlerini gösteren Stern- Volmer eğrileri. 81
- 4.41** %0,2 SLS içeren SLF ortamında KTİ-10, KTİ-7 ve gefitinibe ait zamana karşı % kümülatif gefitinib salım profili (n=3, ortalama±SS). 84
- 4.42** SLF ortamında HA-gefitinib-HSA-KTİ, HA-gefitinib-HSA-NP ve gefitinibe ait zamana karşı % kümülatif gefitinib salım profili (n=3, ortalama±SS). 86
- 4.43** LLC1 ve L929 hücrelerinde gefitinib çözeltilerinin MTT analizleri. a) 2,5-160 μ M gefitinib derişimlerinde LLC1 hücrelerinin canlılık grafiğı. b) 2,5-160 μ M gefitinib derişimlerinde L929 hücrelerinin canlılık grafiğı. 87
- 4.44** L929 hücrelerinde Boş NP, Boş KTİ ve taşıyıcı karışımının MTT analizleri. a) 24 saatte canlı hücre miktarları. b) 48 saatte canlı hücre miktarları c) 72 saatte canlı hücre miktarları. 89
- 4.45** LLC1 hücrelerinde KTİ, Boş KTİ ve gefitinibin MTT analizleri. a) 24 saatte canlı hücre miktarları. b) 48 saatte canlı hücre miktarları c) 72 saatte canlı hücre miktarları. 90
- 4.46** Nil kırmızısının (NK) LLC1 hücrelerine alımı. a) Hücrelerin ortalama floresans yoğunluğu (MFI). b) Zamana karşı hücrelerin NK alım yüzdesi. 91
- 4.47** NK-NP, NK-KTİ, NK ve otofloresan uygulanan LLC1 hücrelerinin farklı zaman noktalarındaki akım sitometri histogramları. 91
- 4.48** DAPI ile boyanan LLC1 hücre görüntüleri. a) NK uygulanan hücreler b) NK-NP uygulanan hücreler. c) NK-KTİ uygulanan hücreler. d) Otofloresan uygulanan hücreler. 91

TABLOLAR

| Tablo | | Sayfa |
|-------|---|-------|
| 2.1 | ACI cihazında kullanılan aşamaların 28,4, 60 ve 90 L/dk. akış hızlarında <i>cutoff</i> değerleri. | 19 |
| 3.1 | Gefitinibin HPLC ile miktar tayininde kullanılan analiz koşulları. | 26 |
| 3.2 | Yüzey aktif madde belirlenmesi amacıyla yapılan üretimlerdeki sabit işlem parametreleri. | 31 |
| 3.3 | Gefitinib-HSA nanopartikülü üretiminde kullanılan DPPC, HSPC ve Oleik Asitin düşük, orta ve yüksek düzeyleri. | 31 |
| 3.4 | Gefitinib-HSA nanopartiküllerinin Nab™ teknolojisi ile üretiminde kullanılan formülasyon parametreleri. | 32 |
| 3.5. | Gefitinib-HSA-KTİ'lerin taşıyıcı içerikleri (Taşıyıcı kütlesi/ Toplam KTİ kütlesi (%)). | 33 |
| 3.6 | Floresans spektroskopisi için hazırlanan örneklerde HSA, gefitinib, oleik asit ve HSPC derişimleri (μM). | 38 |
| 3.7 | <i>In vitro</i> salım örnekleri, yöntem ve koşullar. | 40 |
| 3.8 | SLF salım ortamının hazırlanmasında kullanılan tuzlar ve derişimleri. | 41 |
| 3.9 | KTİ-10 ve KTİ-7 formülasyonlarının bileşimi. | 42 |
| 3.10 | Gefitinib-HSA-NP ve gefitinib-HSA-KTİ formülasyonlarının bileşimi. | 43 |
| 4.1 | Gefitinibin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimleri için doğruluk değerleri (n=3). | 50 |
| 4.2 | Gefitinibin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerinde tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6). | 51 |
| 4.3 | Gefitinibin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerinde gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları (n=3). | 52 |
| 4.4 | 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gefitinib örneğinin analiz süresi boyunca dayanıklılığı (n=6). | 53 |
| 4.5 | Gefitinibin asetonitril ortamında HPLC tayin metodunun sistem uygunluk değerleri. | 53 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.6 | DPPC'nin partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyele etkisi (n=3, ortalama \pm SS). | 54 |
| 4.7 | HSPC'nin partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyele etkisi (n=3, ortalama \pm SS). | 55 |
| 4.8 | Oleik asitin partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyele etkisi (n=3, ortalama \pm SS). | 55 |
| 4.9 | Nab TM teknolojisi ile üretilen gefitinib-HSA nanopartikülleri için kritik işlem parametreleri ve elde edilen partikül boyutu dağılımları (n=3, ortalama \pm SS). | 57 |
| 4.10 | Gefitinib-HSA nanopartikülünün HA bağlanmadan önceki ve bağlandıktan sonraki partikül boyutu dağılımları ve zeta potansiyeli (n=3, ortalama \pm SS). | 58 |
| 4.11 | Farklı taşıyıcılarla üretilen KTİ formülasyonlarının aerodinamik parametreleri. | 61 |
| 4.12 | Gefitinib, KTİ, KTİ-3. ay ve KTİ 6. aya ait, TGA analizi sonucunda ölçülen ağırlık kaybı değerleri. | 72 |
| 4.13 | Liyofilize NP ve KTİ'nin tek noktalı BET analizi sonucu elde edilen yüzey alanları. | 76 |
| 4.14 | 345 nm'de artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait F ve F ₀ /F değerleri. | 79 |
| 4.15 | 345 nm'de oleik asit içeren ortamda, artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait F ve F ₀ /F değerleri. | 80 |
| 4.16 | 345 nm'de DPPC içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait F ve F ₀ /F değerleri | 80 |
| 4.17 | 345 nm'de HSPC içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait F ve F ₀ /F değerleri. | 81 |
| 4.18 | Yüzey aktif madde içeren ve içermeyen ortamlardaki Stern-Volmer eğrilerine ait regresyon denklemleri. | 82 |

- 4.19** Gefitinibin oleik asit, DPPC, HSPC içeren ve yüzey aktif madde içermeyen ortamda HSA ile etkileşimine ait K_{SV} ve determinasyon katsayısı değerleri. 82
- 4.20** Zamana karşı gefitinib ve KTİ içerisindeki gefitinibin PBS içerisindeki çözünen derişimleri ($\mu\text{g/mL}$) ($n=3$, ortalama \pm SS). 83
- 4.21** KTİ-10, KTİ-7 ve ham gefitinibin %0,2 SLS içeren SLF ortamında zamana karşı salınan % gefitinib miktarı ($n=3$, ortalama \pm SS). 83
- 4.22** HA-gefitinib-HSA-NP, HA-gefitinib-HSA-KTİ ve ham gefitinibin SLF ortamında zamana karşı gefitinib salımı ($n=3$, ortalama \pm SS). 85
- 4.23** KTİ formülasyonunun hızlandırılmış stabilite koşullarında 0, 3 ve 6. ayda aerodinamik parametreleri. 87
- 4.24** Gefitinibe ait LLC1 ve L929 hücrelerinde IC80, IC50 ve IC20 değerleri. 87

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden birisidir ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), vakaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Yıllar içinde, cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedaviler, akciğer kanseri yönetiminde temel yaklaşımlar olmuştur. Ancak, bu tedaviler sıklıkla sınırlı etkinliğe ve önemli sistemik toksisiteye sahiptir, bu da hastaların yaşam kalitelerini artırmak için yeni tedavi stratejilerinin keşfedilmesini zorunlu kılmaktadır. Son yıllarda tanı yöntemlerinin gelişmesi, kanserden sorumlu genlerin tespitine ve bu mutasyonlara yönelik yeni moleküller geliştirilmesine ön ayak olmuştur. Bu gelişmeler sonucunda kanser vakalarında kişiye yönelik tedavi planları ön plana çıkmıştır.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ilaç hedeflemesinin artırılması, ilaç çözünürlüğünün artırılması ve sistemik yan etkilerin azaltılması gibi üstünlüklere sahiptir. Nanopartiküller, küçük boyutları ve modifiye edilebilen yüzeyleri sayesinde antikanser ilaçların tümör bölgesine hedeflenmesini sağlayabilmekte ve kanser tedavisini daha etkili hale getirebilmektedir. Günümüzde metastatik meme kanseri, KHDAK ve pankreatik adenokarsinomlarında kullanılan ve albümine bağlı paklitaksel nanopartiküllerini içeren Abraxane[®], nanopartiküllerin başarılı bir şekilde büyük ölçekte üretilip kanser tedavisinde kullanımına bir örnektir.

Gefitinib, epidermal büyüme faktörü reseptörü tirozin kinaz inhibitörü olarak, KHDAK tedavisinde tümör hücre büyümesini ve çoğalmasını inhibe ederek umut verici sonuçlar göstermiştir. Ancak, gefitinibin sudaki sınırlı çözünürlüğü, biyoyararlanımını ve tedavi etkinliğini etkilemektedir. Bu sorunu aşmak, gefitinibin akciğer kanseri tedavisindeki tam potansiyelini ortaya çıkarmak için önemlidir. Bu sorunu çözebilmek için çalışmamızda, gefitinib nanopartikülleri içeren KTİ formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır ve nanoteknolojinin, gefitinible ilişkili çözünürlüğü iyileştirme ve tümöre hedefleme olanakları araştırılmıştır. Ayrıca KTİ'ler akciğer hastalıklarında üstünlüklere sahip bir farmasötik dozaj şekli olarak kolay uygulanabilirlik, etkin tedavi ve artan hasta uyuncu gibi olumlu özelliklere sahiptir. Bu şekilde gefitinibin lokal bir etkiyle tümör hücresine hedeflenerek etki etmesi amaçlanmıştır. 1-5 µm aralığında aerodinamik çapa sahip KTİ formülasyonu ile

akciğer kanserinin tedavisi için alt solunum yollarına etkili bir şekilde taşınma hedeflenmiştir.

Gefitinib nanopartiküllerinde doğal bir polimer olarak, KHDAK hücrelerinde fazla eksprese edilebilen asidik ve sistin bakımından zengin salgı proteini (SPARC) ile birleşme özelliğine sahip olan albümin kullanılmıştır (1). Nanopartiküller, HA ile kaplanmış, KHDAK dahil çeşitli kanser türlerinde bulunan CD44 reseptörünü aşırı eksprese eden tümör hücreleriyle özgül etkileşimi kolaylaştırması amaçlanmış, yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile 130 nm'nin altında tekdüze HA bağlı gefitinib-albümin nanopartiküllerinin eldesi için üretim yöntemi parametreleri optimize edilmiştir. En iyi aerosolizasyon özellikleri ve akciğerin derinlerine ulaşmayı sağlamak için nanopartiküllere çeşitli taşıyıcılar eklenerek liyofilize edilmiş ve inhale edilebilir kuru toza dönüştürülmüştür. Ayrıca farklı taşıyıcıların aerodinamik özellikler üzerine etkisi de incelenmiştir.

Tez kapsamında geliştirilen optimum formülasyonun kapsamlı bir karakterizasyonu ile aerodinamik özellikler, *in vitro* salım davranışı ve gefitinib nanopartiküllerinin hücre içine alımı ve sitotoksitesi araştırılmıştır. Aerodinamik parametrelerin analizi için Andersen Kademeli Ayırıştırıcı kullanılmıştır ve *in vitro* salım çalışmaları simüle akciğer sıvısı ortamında gerçekleştirilmiştir. LLC1 ve fare fibroblast hücresi (L929) hücre hatlarında yapılan hücre kültürü çalışmaları ile geliştirilen formülasyonun sitotoksik etkisi işlem görmemiş gefitinib ile karşılaştırılmış ve hücre içine alımı akım sitometrisi ile gösterilmiştir.

KHDAK tedavisinde kullanılmak üzere nano-ilaç taşıyıcı sistem içeren inhalerlerin formülasyon çalışmaları yapılmış ve partikül boyutu dağılımı, aerodinamik özellikler, *in vitro* salım özellikleri, çözünürlük, stabilite gibi karakterizasyon çalışmaları ile formülasyonların biyolojik etkileri ve fizikokimyasal özellikleri *in vitro* olarak incelenmiştir. Tez kapsamında geliştirilen formülasyonların üstünlükleri ve sakıncaları tartışılmış ve gelecekte daha yaygın olarak kullanılması öngörülen yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin inhalasyon yoluyla KHDAK tedavisinde uygulanabilirliği açısından bilimsel veriler sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi ve Patolojisi

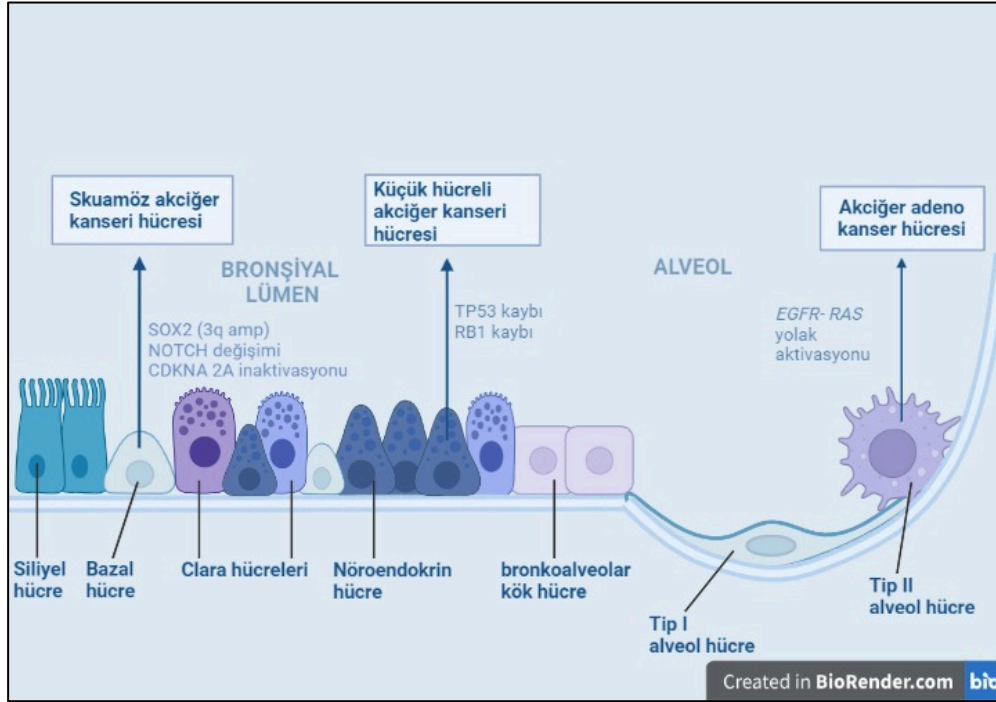
Akciğer kanseri, küresel olarak en sık teşhis edilen ve oldukça tehlikeli bir kanserdir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, 2020 yılında akciğer kanseri 2,21 milyon yeni vakayla ve 1,80 milyon ölümlle dünya genelindeki en sık rastlanan kanserler arasında meme kanserinden sonra ikinci, kanser ölümlerinin ise en önde gelen sebebidir (2). Akciğer kanserine yol açabilen risk faktörleri arasında en önemli olanı sigara tüketimidir. Bunun yanı sıra asbest liflerinin solunması, radon gazı, hava kirliliği, akciğerlere uygulanan radyasyon tedavisi, yüksek miktarda arsenik içeren su tüketimi ve akciğerde farklı hastalıklara bağlı olarak oluşan yara izleri de risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Akciğer kanseri göğüs içinde yayıldığında, belirtiler arasında sürekli ve şiddetli öksürük, hışıltılı solunum, kanlı balgam, göğüste, omuzda ve sırtta ağrılar, ses kısıklığı, yutma zorluğu, tekrarlayan bronşit ve zatürre bulunur. Bununla birlikte, akciğer kanseri göğüs kafesi dışına (karaciğer, lenf bezleri, kemikler, beyin gibi bölgelere) yayıldığında halsizlik, kan pıhtılaşması bozuklukları, bulantı, kusma, denge bozukluğu, kilo kaybı gibi belirtiler ortaya çıkabilmektedir (3).

Tümörün mikroskopik yapısına göre akciğer kanseri küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki ana grupta sınıflandırılmaktadır. Bu iki tip kanserin büyüme hızları, yayılma oranları ve tedavileri farklılık göstermektedir.

KHDAK tüm akciğer kanseri hastalarının %85-90'ında bulunmaktadır ve en sık rastlanan akciğer kanseri türüdür. Adenokanser, skuamöz hücreli kanser ve büyük hücreli kanser olarak üç gruba ayrılmaktadır. Kadınlarda ve sigara kullanmayanlarda daha sık görülen adenokanserlerin akciğerdeki konumlanması genellikle periferik ve subplevral alanlardadır. Skuamöz hücreli kanser erkeklerde daha yüksek oranda görülmekte ve sigara tüketimiyle görülme sıklığı artmaktadır. Akciğere genellikle santral konumda yerleşmesine rağmen periferik alana yerleştiği durumlar da gözlenmektedir. Çoğunlukla kemik ve yumuşak doku invazyonlarına rastlanmaktadır. Büyük hücreli akciğer kanseri ise KHDAK alt tipleri arasında en az rastlanan türdür.

Akciğer dışı organlara yayılma eğilimi diğer türlere göre yüksektir. Çoğunlukla akciğerde periferik konumlanmaya sahiptir. Tabakalar şeklinde gelişen tümör hücreleri yuvarlak poligonal şekildedir (4) (Şekil 2.1).

Akciğer kanserinin gelişim mekanizmaları arasında mutasyona uğramış kanser tetikleyici genler olan onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin kaybı gibi bir dizi etki mekanizması bulunmaktadır. Mitojen-Aktive Protein Kinaz (MAPK) yolağı, hücrelerin büyüme, bölünme, farklılaşma ve ölüm gibi temel fonksiyonlarının kontrol edildiği bir sinyal yoludur. Bu yol, hücrelerin dış ortamdaki sinyalleri algılayarak, bu sinyalleri hücre içine aktaran bir dizi protein kompleksi tarafından yönetilmektedir. Ligandlar hücre dışındaki reseptörlere bağlanmakta ve reseptörlerin içindeki kinaz enzimlerini aktive etmektedir. Bu kinaz enzimleri, hücre içindeki diğer proteinleri fosforile ederek, sinyal yolunu ilerletirler. Bu yol, sonunda DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi gibi önemli biyolojik süreçlerin başlatılmasına neden olmaktadır. Kirsten Sıçan Sarkom Virüsü (KRAS), Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) ve V-Raf Murin Sarkom Viral Oncogen Homolog B (BRAF) gibi onkogenler, bu sinyal yolağında rol oynayan proteinlerdir. Bu genlerin mutasyonları, normal hücrelerin kanserli hücrelere dönüşmesine neden olabilmektedir. Örneğin, KRAS mutasyonları, RAS proteininin sürekli aktif kalmasına ve hücre bölünmesinin artmasına neden olabilmektedir. Bu da kanserli hücrelerin hızla büyüyerek çoğalmasına yol açmaktadır. EGFR ve BRAF mutasyonları ise, MAPK yolunu sürekli aktive ederek hücre büyümesini ve bölünmesini artırmaktadır. Bu mutasyonlar, akciğer kanserinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (4, 5).



Şekil 2.1. Köken aldıkları hücelere göre akciğer kanserinin alt tipleri (5, 6).

2.1.2. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Günümüzde moleküler biyolojinin gelişimi ve kanser tedavisinde etkili mekanizmaların anlaşılması ile bireye yönelik tedavi planları önem kazanmıştır. Bu amaçla farklı moleküler tanı yöntemleri ortaya çıkmıştır. Akciğer kanserinde sıklıkla görülen EGFR veya BRAF mutasyonları olan hastalarda hedefe yönelik tedaviler, bu mutasyonları hedef alarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurmakta veya öldürmektedir. Benzer şekilde, Anaplastik Lenfoma Kinaz (ALK) veya C-ros Onkogen 1 (ROS1) gibi yeniden düzenlenmiş genlerin varlığı da belirlenebilmekte ve bu durumda da hedefe yönelik tedaviler uygulanabilmektedir.

Akciğer kanserinin moleküler patogenezinin belirlenmesinde, ilk olarak kullanılan yöntemler FISH (Floresan İn Situ Hibridizasyon) ve PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi yöntemler iken, invaziv yöntemlerle tümör dokusunun çıkarılmasının zor olduğu hastalarda bu yöntemler sakıncalara sahiptir. Ancak günümüzde invaziv olmayan yeni nesil dizileme teknolojisi ile yapılan sıvı biyopsi yöntemi, kanserin moleküler patogenezinin daha ayrıntılı bir şekilde analiz edilmesine olanak tanımaktadır. Sıvı biyopsi, kanser hücrelerinin kan veya idrar gibi sıvılarda yayılan hücre dışı DNA'sının analiz edilmesine dayanmaktadır. Bu yöntem sayesinde,

kanser hücrelerindeki mutasyonlar, kromozomal değişiklikler, gen ekspresyonu ve protein profilleri gibi birçok farklı moleküler özellik aynı anda analiz edilebilmektedir (7).

Akciğer kanseri tedavisinde uzak organ tutulumu bulunmayan hastalarda (Evre I ve II) ilk yaklaşım cerrahi olmakla birlikte nüks ihtimalini düşürmek için cis-platin gibi adjuvanlar da tedavi amacıyla kullanılmaktadır (8).

İmmünoterapi, kanser tedavisi için cerrahi ve radyoterapinin yanı sıra önemli bir alternatif tedavi yöntemidir. Bu tedavide kullanılan maddelerle kişinin makrofajları, dendritik hücreleri, doğal öldürücü hücreleri, T ve B lenfositleri aktive edilerek kişinin kendine ait hücrelerinin tümöre karşı cevap üretmesi sağlanmaktadır. Monoklonal antikorlar kanser immünoterapisinde en sık kullanılan ajanlardır. Akciğer kanserinde kullanılan Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı monoklonal antikorlara bevacizumab (Avastin®) ve ramucirumab (Cyramza®) örnek verilebilir. Antikor-ilaç konjugatları da hedeflendirilmiş kanser tedavisinde güncel yaklaşımlardan biridir ve biyolojik olarak aktif sitotoksik ajanla bağlı antikor komplekslerini ifade etmektedirler (9).

Moleküler hedefli tedavide, EGFR-tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler) ve ALK inhibitörleri de sağ kalımı iyileştiren ve son yıllarda kemoterapide sıklıkla kullanılan ajanlardır. ALK inhibitörlerine crizotinib (Xalkori®), seritinib (Zykadia®) ve alektinib (Alecensa®) örnek gösterilebilir. Erlotinib, gefitinib, afatinib, osimertinib ve dacomitinib ise çoğunlukla KHDAK tedavisinde tercih edilen EGFR-TKI'leridir (9).

2.2. Akciğer Kanseri Tedavisinde Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler

Akciğer kanserinin geleneksel tedavisinde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinde görülen lenfödem, saç dökülmesi, dişlerde ve kemiklerde görülen problemler, kilo kaybı, kusma, hafıza ve dikkat bozuklukları, tromboz riski gibi yan etkiler, sistemik yan etkileri azaltmayı amaçlayan hedeflendirilmiş tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekliliğini göstermektedir. Hedeflendirilmiş yeni ilaç taşıyıcı sistemler, bu sorunları aşmak için yoğun olarak çalışılmaktadır. Yeni ilaç taşıyıcı sistemler; ilaçların akciğerlere taşınmasında, etki süresinin uzatılmasında,

tedavi edici dozun düzenlenmesinde ve kanser tedavisinin komplikasyonlarının azaltılmasında önemli üstünlüklere sahiptir (10). Akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ya da kullanılmak üzere çalışmalar yapılan yeni ilaç taşıyıcı sistemler aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (11-17) .

- Lipozomlar
- Katı Lipid Nanopartiküller (SLN)
- Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar (NLC)
- Polimerik Nanotaşıyıcılar
 - Nanopartiküller
 - Polimerik Miseller
 - Dendrimerler
- İnorganik Nanopartiküller
 - Manyetik Nanopartiküller
- Karbon Nanotüpler
- Kuantum Noktaları

Nanopartiküller, diğer taşıyıcı sistemlerinden farklı olarak küçük boyut, büyük yüzey alanı ve yüzey özelliklerinin düzenlenebilmesi gibi özelliklere sahiptir. Ayrıca, terapötik ajanların erken bozunmasını ve fagositoz hücreleri tarafından uzaklaştırılmasını önlemeye yardımcı olmaktadır(18).

Nanopartiküllerin kanser dokusuna pasif olarak hedeflenmesinin başlıca nedenleri artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi (*Extended Permeability and Retention* (EPR)) ile açıklanmaktadır. Bu etki tümörlerin bazı patofizyolojik özelliklerine dayanmaktadır (19):

- Tümörlerde yapısal ve fonksiyonel anormallikleri olan düzensiz neovaskülarizasyon görülmektedir. Besin ve oksijen gereksinimleri gibi acil istekleri karşılamak için tümör damar yapısı çok yoğun, dolambaçlı ve geçirgendir, bazı olgunlaşmamış damarlarda endotel tüplerinin eksik bazal membranları ve fenestre yapıları bulunmaktadır. Son çalışmalar ile

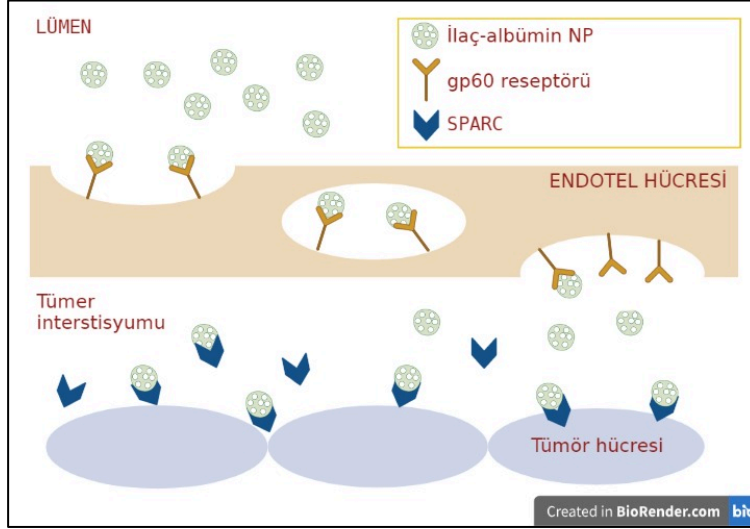
nanopartikül ekstrevasyonunun ana mekanizmasının transendotelial yollar olduğu belirlenmiştir.

- Prostaglandinler, bradikinin, nitrik oksit, peroksinitrit, interlökin 1 beta, interlökin 2, interlökin 6, proteazlar, interferon gamma, VEGF ve HIF-1 alfa gibi inflamatuvar faktörlerinin normalden fazla salınması tümör dokusunda eşgüdömlü hareket ederek EPR etkisinin devamlılığını sağlamaktadır.
- Tümör dokusunda etkin lenfatik drenaj eksikliği ekstrevasyon olan moleküllerin tümör dokusunda tutulmasını kolaylaştırmaktadır.

Akasya, guar, kitosan, jelatin, sodyum aljinat ve albümin gibi biyoparçaları doğal polimerlerle hazırlanan nanopartikül sistemler ile etkili ilaç taşıma sağlanabildiği için, çeşitli sentetik ve yarı sentetik polimerler geliştirilmesine rağmen hala ilaç taşıyıcı sistemlerde doğal polimerler popülerliklerini korumaktadır (20).

2.3. İnsan Serum Albümini (HSA) Nanopartikülleri

İnsan serum albümini (HSA), insan vücudunda temel fizyolojik fonksiyonları olan protein yapıda bir polimerdir. Endojen amino asit kaynağı ve plazma osmotik basıncının sabit tutulmasında rol oynayan önemli bir besin maddesi işlevi görmektedir. Serbest sülfidril grubu ve sekiz disülfid bağına sahip olan albümin, suda yüksek çözünürlüğe sahiptir (pH 7,4 tamponundaki çözünürlüğü: 0,4 g/mL). Doğal bir biyomalzeme olarak da kullanılan HSA; biyoyumlu, non-immunogenik ve biyolojik olarak parçalanabilir bir yapıya sahiptir. Albümin, tümör damarlarındaki mikrovasküler endotelial hücrelerde 60 kDa moleküler ağırlığa sahip bir glikoprotein olan gp60 tarafından aracılık edilen bir yol ile endositoz yoluyla tümör stromasına girebilme özelliğine sahiptir. Daha sonra tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen bir ekstraselüler matris glikoproteini olan SPARC ile birleşmektedir (21). Bu özelliği albüminin tümör dokusuna hedeflenmesini ve kanser tedavisinde bir taşıyıcı olarak kullanılmasını açıklamaktadır (Şekil 2.2) (22).



Şekil 2.2. Albüminin gp60 yoluyla ile tümör dokusuna ve hücrelerine alınması (22).

Albümin, tanı ve tedavide etkili FDA onaylı birçok müstahzarda yardımcı madde ya da etkin madde olarak kullanılmaktadır. Bunlara Tip 2 diyabette kullanılan peptit-albümin füzyonu içeren Tanzeum® (GlaxoSmithKline) ya da toplam kan hacminin belirlenmesinde kullanılan işaretli iyot-albümin içeren Jeanatope® (IsoTex) örnek verilebilir (23, 24).

İlaç yüklü albümin nanopartiküllerinin hazırlanmasında desolvasyon, emülsifikasyon, kendiliğinden oluşum, termal jelasyon, nano-püskürterek kurutma, mikroakışkan teknolojisi ve albümin bağlı nanopartikül (*Nanoparticle Albumin-Bound*, Nab™) teknolojisi yöntemleri kullanılmaktadır (22).

Nab™ teknolojisi, emülsifikasyon yöntemi ile çok benzer olarak organik faz içerisinde çözülen hidrofobik ilaç molekülünün, su fazı içerisinde çözülmüş albümine karıştırma altında eklenmesi ve kaba emülsiyon elde edilmesini içermektedir. Kaba emülsiyon, yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile tekdüze hale getirilir ve nanoemülsiyon elde edilir. Nab™ teknolojisinde, emülsifikasyon yöntemindeki termal ısıtma veya çapraz bağlama ajanı eklenmesi aşaması yerine rotavapor ile organik faz uzaklaştırılmakta ve albümin nanopartikülleri elde edilmektedir. Nab™ teknolojisi ile üretilen Abraxane®, kanser tedavisine yeni bir bakış açısı kazandırmıştır ve metastatik meme kanseri, KHDAK ve pankreatik adenokarsinoma endikasyonları için FDA onayına sahiptir (22).

2.4. Hyaluronik Asit (HA) Bağlı Nanopartiküller

HA, lineer negatif yüklü bir polisakkarittir ve iki alternatif d-glukuronik asit ve N-asetil-d-glukozamin birimlerini içermektedir. Araştırmalar sonucu HA'nın tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilen CD44, hyaluronan aracılı motilite reseptörü ve lenfatik damar endotel reseptörü-1 adlı hücre yüzeyi reseptörleriyle etkileşim kurduğu bilinmektedir. HA'nın bu reseptörlerle etkileşmesiyle bu tür reseptörlerin aktivasyonu, kemoterapötik ajan yüklü nanopartiküllerin hücre içine alımını kolaylaştıran sinyal yanıtlarını uyarma özelliğine sahiptir (25).

Kanser kök hücreleri, tümör oluşumu ve nüksü üzerinde, ayrıca kemoterapi ve radyoterapide sık görülen ilaç direncinde önemli role sahiptir. Günümüzde uygulanan çoğu alternatif tedavi stratejisi, özellikle kanser kök hücrelerini öldürmeyi başaramamaktadır. Araştırmalar sonucu CD44 reseptörünün çeşitli kanser kök hücrelerinin yüzeyinde aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. Bu özellikten yararlanarak HA bazlı nanotaşıyıcılar ile, özellikle ilaç dirençli tümörlerde kanser kök hücrelerinin baskılanması amaçlanmaktadır (21).

2.5. Pulmoner Yolla Uygulanan Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler

Akciğerler yüksek yüzey alanına ve karaciğere/gastrointestinal sisteme göre daha az oranda metabolizasyon enzimlerine sahiptir. Bu nedenle ilaçların pulmoner yolla uygulanması ile yüksek emilim oranı, daha düşük ilaç dozları ile tedavi etkinliği ve hızlı etki başlangıcı sağlanabilmektedir. Fakat solunum sisteminde bulunan mukus, siliyer hücreler ve yerleşik makrofajlar, ilaçların akciğerde lokalizasyonu, penetrasyonu ve adsorpsiyonunu sınırlandıran etkenlerdir. Üst solunum yollarına yerleşen ilaçlar, epitelyum bölgesindeki siliyer hücreler tarafından uzaklaştırılırken, alt solunum yollarındaki ilaçlar, yerleşik alveoler makrofajlar tarafından elimine edilmektedir. Yerleşik alveoler makrofajlar yabancı partikülleri algılayarak fagositoz yoluyla yutar ve lizozomal sindirim gerçekleştirirler (26).

Akciğerde ilaçların biyoyararlanımını etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sıralanabilir (26);

- Sudaki çözünürlük

- Çözünme
- Efflux (akı) oranı
- Alveoler makrofajlar tarafından eliminasyon

Akciğere ilaç hedeflenmesinde kritik olan parametreler ise aşağıdaki şekilde özetlenebilir (26);

- İlaçların hedeflenen bölge veya hücrelere yerleşmesi ve lokalizasyonu,
- Solunum yolu mukusunun ilaca olan geçirgenliği,
- İlacın mukosilyer eliminasyondan kaçma yeteneği,
- Sistemik etki için ilacın epitel hücrelerinden kan dolaşımına taşınabilmesi,
- Enfeksiyon durumlarında bakteriyel biyofilm tarafından ilaçların düşük hapsolme ve inaktivasyonu,
- Alveolar makrofajlar tarafından tolere edilebilir fagositoz aktivitesi,
- Minimum düzeyde konak protein-ilaç molekülü etkileşimleri.

Solunum yoluyla verilen nanopartiküllerin kontrollü salım özellikleri, tümör bölgelerinde ilaç derişimlerini daha uzun süre koruyarak kemoterapinin etkililiğini artırma kapasitesine sahiptir (10).

2.6. İnhalasyon Sistemleri

2.6.1. Nebülizer

Nebülizatörler, bir sıvı çözelti veya süspansiyonu inhalasyon için bir aerosole dönüştürmek amacıyla kullanılan cihazlardır. Bu uygulama yolu, ilaç içeren sulu çözelti veya süspansiyonun, nebülizatörler aracılığı ile aerosolize olarak solunabilir damlacıklara dönüşmesi ve hastaya bir ağızlık veya yüz maskesi yardımıyla verilmesine dayanmaktadır. Şu anda ticari olarak mevcut nebülizatörler, jet (veya pnömatik) küçük hacimli nebülizatörler, ultrasonik nebülizatörler ve mesh nebülizatörleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Jet nebülizatörler venturi esasına dayanırken, ultrasonik nebülizatörler alternatif akımı yüksek frekanslı akustik enerjiye dönüştürmek için ters piezoelektrik etkiyi kullanmaktadır. *Mesh* nebülizatörler ise mikro-pompa teknolojisini kullanarak aerosol eldesini sağlamaktadır (27, 28).

Nebülizatörler, özellikle kistik fibrozis hastalarına antibiyotik gibi ilaçları yüksek dozlarda vermek için kullanışlıdır. Her yaşta ve her hastalık şiddetinde kullanılmaktadırlar, çünkü basit ve kullanımı kolay cihazlardır. İlaç, ağızlık veya yüz maskesi aracılığıyla normal solunum sırasında inhale edilebilmektedir. Ayrıca, fizikokimyasal geçimlilik sorunu yoksa, nebülizatörlere birden fazla ilacın karıştırılması ve aynı anda uygulanması mümkün olmaktadır.

Bu üstünlüklerinin yanı sıra nebülizatörlerin sakıncaları da bulunmaktadır. Yeterli dozu vermek için daha uzun bir tedavi süresi gerektirmektedir. Jet nebülizatörlerin sıkıştırılmış hava kaynağına ihtiyacı bulunmaktadır. Bu durum maliyeti artırmaktadır ve kullanımlarını hastanede yatan veya hareket kabiliyeti olmayan hastalara sınırlamaktadır. Ultrasonik nebülizatörler, kompakt ve taşınabilir olmalarına rağmen, işlem sırasında ortaya çıkan yüksek sıcaklık, ısıya duyarlı ilaçların bozulmasına neden olabilmektedir. Üretilen damlacıklar jet nebülizatörlere göre genellikle daha büyüktür, bu nedenle daha nadir olarak kullanılmaktadır (28).

Son zamanlarda geliştirilen titreşimli *mesh* nebülizatörleri ise bu sınırlamaların birçoğunu aşmayı başarmıştır ve bu sistem ile daha yüksek ince partikül fraksiyonu (İPF) eldesi mümkündür. Ayrıca tedavi süreleri jet ve ultrasonik nebülizatörlere göre daha kısadır (28).

2.6.2. Ölçülü Doz İnhaler

Ölçülü Doz İnhalerler (ÖDİ), ilacın sıvı bir itici madde içinde çözünmüş veya dağılmış olduğu inhalasyon sistemleridir. Formülasyonlarda ek olarak çözücüler, yardımcı çözücüler ve kaydırıcı ajanlar kullanılabilir. Bir dozlama valfi bulundurmaktadır ve valf çalıştırıldığında, belirlenen doz spreynin şeklinde serbest kalmaktadır (27, 28). ÖDİ'lerin küçük boyutları, taşınabilirlikleri, bir kutuda birden çok doz bulundurmaları ve nispeten düşük maliyetleri gibi üstünlükleri bulunmaktadır. Nebülizatörlere kıyasla hızlı kullanım sağlamak ve formülasyonlarda bulunan itici maddenin inert koşullar sağlanmasıyla ilacı nem ve kontaminasyondan korumaktadır (27, 28).

Yüksek damlacık hızı orofarengeal bölgede sıkışmaya neden olmakta, bu da iletilen dozun sadece bir kısmının (%10-20) akciğerlere ulaşması ve ilacın akciğerlere yeterli miktarda iletilmesinin hastanın inhalasyon tekniğine büyük ölçüde bağlı olması ile sonuçlanmaktadır. Bu sorunları çözmek için *Spacer* cihazları ve nefesle çalışan ÖDİ'ler geliştirilmiştir. Ayrıca formülasyonlarda kullanılan itici maddelerin (kloroflorokarbonlar, hidrofloroalkenler) çevresel zararları mevcuttur (28).

2.6.3. Kuru Toz İnhaler (KTİ)

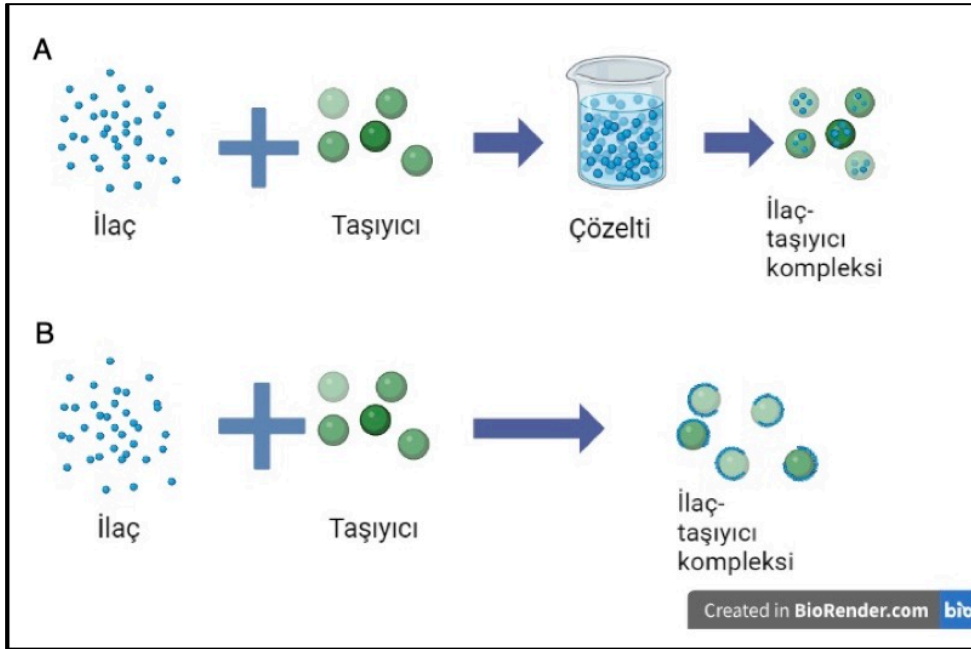
FDA ve farmakopeler, KTİ ve ÖDİ dozaj formlarını sıklıkla birlikte ele almaktadır. ÖDİ ve KTİ'ler için kalite hedefli ürün profili (*Quality Target Product Profile*) unsurlarının örnekleri şunlardır (29):

- Hedeflenen dozaj şekli
- Etki gücü (ÖDİ için hedeflenen ölçülü doz, KTİ için iletilen doz (*delivered dose*))
- Saflık
- Stabilite
- Aerodinamik performans

KTİ'ler, kullanım kolaylığı, kolay taşınabilirlik, düşük maliyet ve yüksek stabilite gibi üstünlükleri nedeniyle günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek performanslı KTİ formülasyonlarının geliştirilmesinde, partikül teknolojisi yaklaşımları çok önemlidir. İyi bir KTİ performansından sorumlu olan ana faktörler, toz partiküllerinin büyüklük dağılımı, kolay akışkanlaşma ve aerosolizasyon özellikleri ile verilen dozun tekrarlanabilirliğidir (30).

KTİ formülasyonlarının üretiminde genellikle iki yaygın yöntem kullanılmaktadır. İlk yöntemde, ilaç ve taşıyıcı bir çözücü içinde çözülerek püskürtülerek kurutma gibi yöntemlerle kurutulur. Bu işlem sonucunda elde edilen partiküllerin boyutu genellikle 1-5 µm aralığındadır ve inhalasyon sırasında ilacın taşıyıcı ile birlikte akciğerin derinliklerine ulaşmasını sağlamaktadır (Şekil 2.3-A) (31). İkinci yöntem ise ilacın taşıyıcı ile partikül etkileşimleri sayesinde birleştirilmesini kapsamaktadır. Bu yöntemde kullanılan taşıyıcılar genellikle 50-200 µm boyutunda kaba partiküllerdir. Taşıyıcı üzerine zayıf kuvvetlerle tutunan ilaç

partikülleri inhalasyon kuvveti ile taşıyıcıdan ayrılarak akciğerin derinliklerine ulaşır. Taşıyıcı ise üst solunum yolunda tutulur (Şekil 2.3-B) (31).



Şekil 2.3. KTİ formülasyonlarında ilaç ve taşıyıcıyı bir araya getirme yöntemleri (31).

Akciğer dokusuna taşıyıcıların potansiyel zararlarına dair sınırlı toksikolojik veriler bulunması nedeniyle, FDA tarafından onaylanmış veya güvenli kabul edilen taşıyıcıların sayısı kısıtlıdır. Bu nedenle, ticari olarak mevcut çoğu KTİ formülasyonunda taşıyıcı olarak genellikle FDA tarafından KTİ taşıyıcısı olarak onaylı olan laktoz kullanılmaktadır (31).

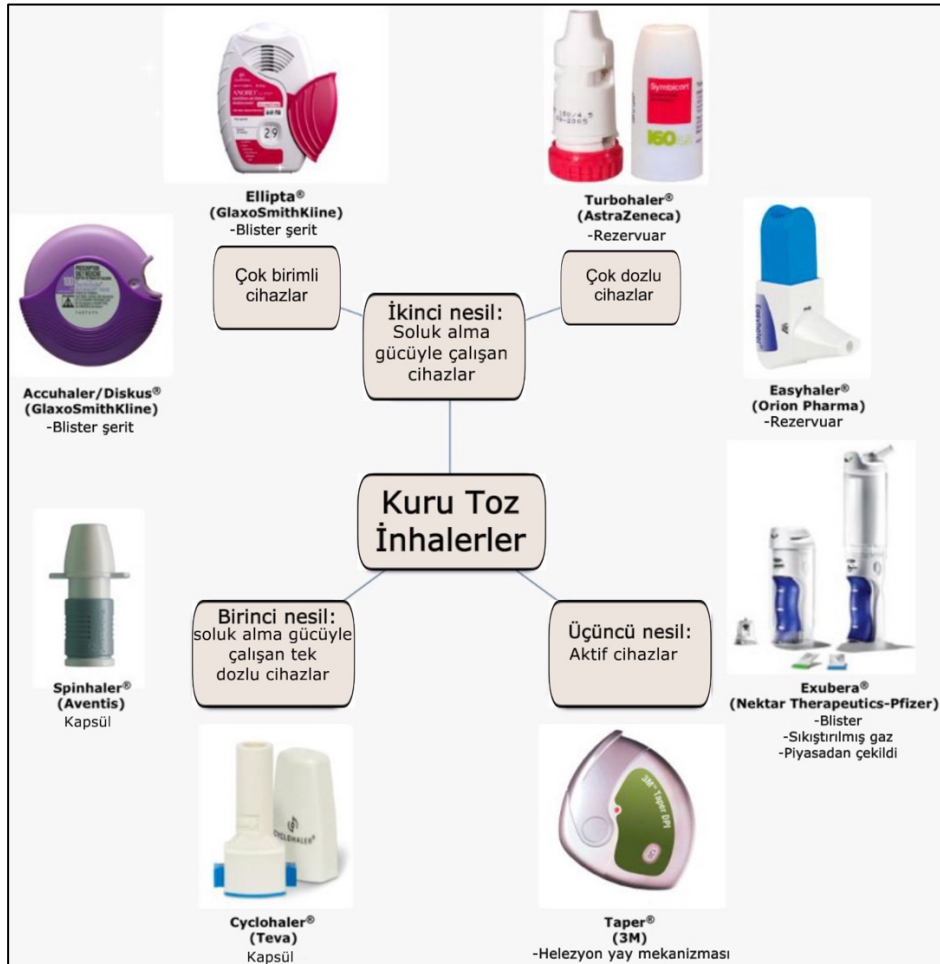
KTİ ürünleri, formülasyon ve bir kap kapak sistemi olmak üzere iki ana parçadan oluşmaktadır. KTİ ilaç formülasyonu, genellikle ilaç etkin maddesi ve yardımcı maddeler (laktoz, magnezyum stearat gibi) içermektedir. KTİ kap kapak sistemi, cihaz bileşen kısmını ve koruyucu ikincil ambalajı içermektedir (29).

Malamatari'ye göre KTİ'ler tasarımlarına göre 1., 2. ve 3. nesil olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Birinci nesil KTİ'ler, kullanımdan önce cihaza yerleştirilen toz dolu bir kapsül içeren tek kullanımlık cihazlardır. Kapsül cihaz içinde açılmakta ve toz inhalasyon yoluyla kullanılmaktadır. Bu tip KTİ'lerde sert jelatin veya hidroksipropilmetilselüloz (HPMC) kapsüller kullanılmaktadır. Neme dayanıksız

formülasyonlar için daha uygun olduğundan son yıllarda HPMC kapsül kullanımını daha yaygındır. Bu gruptaki KTİ cihazları kullanımda birkaç adım gerektirdiği için hasta için zorluk yaratabilen cihazlardır fakat düşük maliyetleri ve basit tasarımları sayesinde hala kullanımları yaygındır. Birinci nesil cihazlara örnek olarak HandiHaler® (Boehringer-Ingelheim/Pfizer), Aerolizer® (Novartis) ve Cyclohaler® (Teva) verilebilir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonlarında Aerolizer® benzeri bir cihaz kullanılmıştır (28).

İkinci nesil KTİ'ler, toz rezervuarından ölçülen dozları sağlayan çok dozlu cihazlar ve her biri önceden ölçülen dozları blister veya diskler içerisinde bulunduran çok birimli cihazlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bu cihazlar kullanım kolaylığını ve doz tekrarlanabilirliğini artırmayı amaçlamaktadır. Çok dozlu cihazlara örnek olarak Turbohaler® (AstraZeneca), Clickhaler® (Innovata Biomed), Easyhaler® (Orion Pharma), Novolizer® (Viatrix GmbH), Pulvinal® (Chiesi) verilebilir. Piyasada bulunan çok birimli cihazlara ise Diskhaler® (GlaxoSmithKline), Accuhaler/Diskus® (GlaxoSmithKline) örnek verilebilir (28).

Üçüncü nesil KTİ'ler aktif cihazlar olarak bilinmektedir ve ilacı dağıtmak için elektriksel veya mekanik enerji kullanarak hastanın soluk alma gücünden bağımsız olarak hassas dozlama sağlama özelliğine sahiptir. Exubera® (Nektar Therapeutics/Pfizer) sıkıştırılmış gaz içeren bir insülin KTİ'si olarak piyasaya sürüldükten sonra geri çekilmiştir. Aktif cihazlar, sistemik etki elde etmek amacı ile pulmoner yoldan ilaç uygulanmasında umut vadetmektedir (28).



Şekil 2.4. Kuru Toz İnhaler cihazlarının sınıflandırılması ve örnekleri (28).

2.7. İnhaler Partiküllerinin Aerodinamik Parametrelerinin Ölçümü

USP 29, bütün ÖDİ ve KTİ'lerin, iletilen doz ve aerodinamik partikül boyutu dağılımının ölçülmesini zorunlu kılmaktadır (32). Bu ölçümlerin yapılabilmesi için farmakopeler tarafından önerilen çeşitli cihazlar/aparatlar bulunmaktadır. Bir inhale sisteminin aerodinamik parametreleri, Kütle Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇ), *Emitted Dose* (ED), % *Emitted Fraction* (%EF), İnce Partikül Dozu (İPD) ve İnce Partikül Fraksiyonu (%İPF) ile ifade edilebilir. Tez kapsamında bu parametrelerin hesaplanma yöntemleri 3. Bölüm (Yöntem ve Bulgular)'da belirtilmiştir.

Aşağıda aerodinamik parametrelerin ölçülmesinde kullanılan farmakopelere kayıtlı cihazlar özetlenmiştir. Tez kapsamında, geliştirilen KTİ formülasyonlarının aerodinamik parametreleri Andersen Kademeli Ayırıştırıcı cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

2.7.1. Cam İkili Ayırıştırıcı (*Glass Twin Impinger*)

Cam ikili ayırıştırıcı, İngiliz Farmakopesi'nde kayıtlı ve sadece iki kademeli olan basitleştirilmiş bir cihazdır. Cihazın parçaları giriş, orofarenksi taklit eden cam ampul, üst (aşama 1) ve alt (aşama 2) aşamalarıdır. Cam ikili ayırıştırıcı, harekete geçen inhaler partiküllerini kaba bir orofaringeal fraksiyona (solunamayan fraksiyon) ve aerodinamik çapı $\leq 6,4$ μm olan ince bir pulmoner fraksiyona ayırarak işlev göstermektedir. Basit bir yöntem olması ve cam malzemenin kullanım kolaylığı nedeniyle rutin analizlerde kullanılmaktadır (33).

2.7.2. Marple Miller Kademeli Ayırıştırıcı (*Marple Miller Cascade Impactor*)

Amerikan Farmokopesi'nde tanımlı, beş aşama ve filtreden oluşan ayırıştırıcıdır. İnhaler aygıtını cihaza bağlamak için farmakopeye uygun kriterlerde bir indüksiyon aygıtı (*induction port*) kullanılmalıdır. 60 L/dk. akış hızında, aşama 1 ile 5'in *cutoff*'ları sırasıyla 10, 5, 2,5, 1,25 ve 0,625 μm 'dir. Partiküllerin aşamalara daha etkin tutunmasını sağlamak için her bir aşamanın partikül toplama yüzeyinin gliserol, silikon yağı veya uygun bir uçucu bir çözücü ile kaplanması önerilmektedir. Analiz edilen örnekler çıkarılabilir toplama kaplarında toplandığı için, tüm cihazın her analiz sonrasında sökülmesine gereksinim duyulmamaktadır. Bu özellik cihazın kullanım kolaylığını artırmaktadır (32).

2.7.3. Çok Aşamalı Sıvı Ayırıştırıcı (*Multi Stage Liquid Impinger*)

Amerikan ve Avrupa Farmakopesi'ne kayıtlı ve inhalerlerin partikül boyutlarına göre ayrılması amacıyla ilk geliştirilen cihazdır. Bir indüksiyon aygıtı ile inhaler cihazına bağlanan cihaz, 4 aşama ve entegre bir son filtreden (5. aşama) oluşmaktadır. Çok aşamalı sıvı ayırıştırıcının aşamaları, diğer geleneksel ayırıştırıcıların aksine nemli tutulmaktadır. Sıvı kullanılmasının işlevi, diğer aşamalı ayırıştırıcılarda toplama yüzeylerinin çözücüler ile kaplanması ile benzer olarak geri sürüklenmeyi önlemektir. 60 L/dk. hacimsel hava akış hızında aşama 1 ile 4'ün *cutoff*'ları sırasıyla 13,0, 6,8, 3,1 ve 1,7 μm 'dir. Filtre (Aşama 5), 1,7 μm 'den küçük partiküllerin tutulmasını sağlamaktadır (32, 34).

2.7.4. Yeni Nesil Ayırıştırıcı (*Next Generation Impactor*)

Yeni Nesil Ayırıştırıcı, Amerikan ve Avrupa Farmakopelerine kayıtlı olan ve endüstriye yönelik inhaler testleri için özel olarak tasarlanmış yüksek akış hızlı ve yüksek performanslı kademeli ayırıştırıcı cihazdır. Paslanmaz çelik, alüminyum ya da uygun benzer materyallerden oluşabilmektedir. Yedi farklı aşama ve son filtre olarak bir mikro delik toplayıcıdan (*Micro Orifice Collector*, MOC) oluşmaktadır. Akış hızı 30-100 L/dk. ve akış hızına bağlı olarak *cutoff* aralığı 0,24-11,7 µm aralığında değişmektedir. Aşamalar arası kayıplar az miktarda olduğundan geri kazanım oranı yüksek bir yöntemdir (32, 34).

2.7.5. Andersen Kademeli Ayırıştırıcı (*Andersen Cascade Impactor*) (ACI)

Andersen kademeli ayırıştırıcı (ACI), son filtre ile birlikte sekiz kademedan oluşan ve endüstride inhaler testlerinde sıklıkla kullanılan ayırıştırıcı sistemidir. Avrupa ve Amerikan Farmakopelerinde ön ayırıştırıcı içeren ve içermeyen formları için farklı cihaz numaralandırmaları mevcuttur. Yapı malzemesi alüminyum, paslanmaz çelik veya diğer uygun malzemeler olabilir. Nazal aerosoller ve spreyler gibi farklı dozaj şekilleri ile de çalışılabilmektedir (32).

Farklı akış hızlarında, aşamaların farklı değerlerde *cutoff* değerlerine sahip olduğu ve nefes alma sırasında 4 kPa basınç düşüşünün olacağına dikkat edilmelidir. Bu nedenle 28,4 L/dk. akış hızından daha yüksek inhalasyon hızlarında çalışmak gerekmektedir. Akış hızı arttıkça aşamalara ait *cutoff* değerleri azalmaktadır ve aşamalar arası ayırma kapasitesi düşmektedir. Bu problemin çözülmesi için 60 ve 90 L/dk. akış hızlarında ACI sisteminde bazı modifikasyonlar yapılmıştır. 60 L/dk. akış hızında sistemden 0 ve 7 aşamaları çıkarılarak -0 ve -1 aşamaları eklenebilmektedir. Farmakopelerde 60 L/dk. akış hızı ve üzerinde 6. ve 7. aşamaların çıkarılabileceği belirtilmektedir. Buna dayanarak, 90 L/dk. akış hızında 0, 6 ve 7 aşamaları çıkarılarak, -0, -1 ve -2 aşamaları eklenebilmektedir. Merkezlerinde delik olan ya da olmayan çeşitlere sahip olan toplama plakalarında da değişiklikler yapılabilmektedir. Bahsi geçen akış koşulları için elde edilen *cutoff* değerleri Tablo 2.1.'de gösterilmiştir (32, 35, 36).

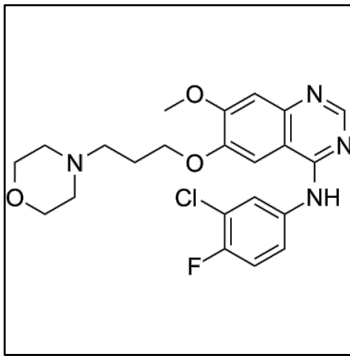
Tablo 2.1. ACI cihazında kullanılan aşamaların 28,4, 60 ve 90 L/dk. akış hızlarında *cutoff* değerleri (36).

| Aşama Numarası | 28,3 L/dk. | 60 L/dk. | 90 L/dk. |
|----------------|------------|----------|----------|
| Aşama -2 | - | - | 8,0 |
| Aşama -1 | - | 8,6 | 6,5 |
| Aşama -0 | - | 6,5 | 5,2 |
| Aşama 0 | 9,0 | - | - |
| Aşama 1 | 5,8 | 4,4 | 3,5 |
| Aşama 2 | 4,7 | 3,2 | 2,6 |
| Aşama 3 | 3,3 | 1,9 | 1,7 |
| Aşama 4 | 2,1 | 1,2 | 1,0 |
| Aşama 5 | 1,1 | 0,55 | 0,22 |
| Aşama 6 | 0,7 | 0,26 | - |
| Aşama 7 | 0,4 | - | - |
| Filtre | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

2.8. Gefitinib

2.8.1. Fizikokimyasal Özellikler

Gefitinib ($C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$) ya da kimyasal ismiyle N-(3-Kloro-4-florofenil)-7-metoksi-6-[3-(morfolin-4-il) propoksi] kinazolin-4-amin, 446,90 g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Moleküler yapısı Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Gefitinibin molekül yapısı (43).

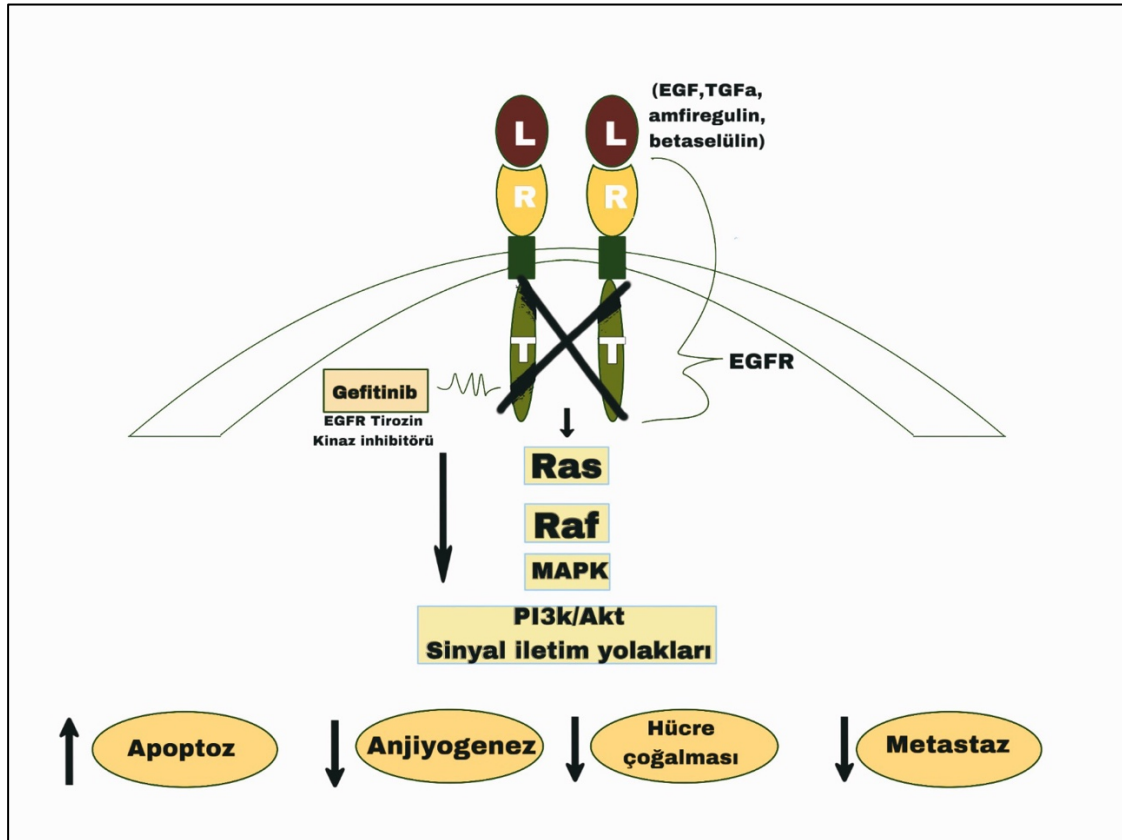
Gefitinib, Avrupa Farmakopesi'ne göre beyaz veya beyaza yakın, kristal bir toz olarak tanımlanmıştır. Suda pratik olarak çözünmezken saf etanolde az çözünür ve heptanda pratik olarak çözünmez (37). Sulu tamponlarda çözünürlüğü, azalan pH ile artmaktadır. 5,4 ve 7,2 olmak üzere iki pK_a 'ya sahiptir ve logP dağılım katsayısı (oktanol/su) 3,75 olarak bulunmuştur (38).

2.8.2. Farmakolojik Etki Mekanizması

Gefitinib, EGFR-TKI grubuna ait bir molekül olup başlıca etkisi EGFR'nin fazla eksprese edildiği kanserlerde tirozin kinaz enzimini inhibe etmesine dayanmaktadır. Günümüzde klinik yaklaşım, EGFR gen ekzon 19 delesyonu ve/veya ekzon 21 L858R nokta mutasyonu gösterilmiş metastatik non-skvamöz KHK hastalarında progresyona kadar kullanılmasını içermektedir (39, 40).

EGFR, akciğer, meme, prostat, yumurtalık, kolon kanserleri dahil olmak üzere çoğu epitelyal tümörde eksprese edilmektedir. EGFR'nin aşırı ekspresyonu, EGFR düzensizliklerinin tümör oluşumuyla sonuçlanabileceği birçok mekanizmadan bir tanesidir. Ek olarak akciğer kanseri hücreleri EGF ve TGF- α gibi EGFR ligandları üretebilmekte ve bunlar daha sonra EGFR'ye bağlanarak premalign ve malign hücrelerin parakrin ve otokrin büyüme uyarımına sebep olabilmektedir (41).

EGF ve TGF- α gibi ligandlar EGFR'nin ekstraselüler bağlanma bölgesine bağlandığında, EGFR proteini konformasyonu değiştirerek heterodimer veya homodimer oluşturmaktadır. Dimerik konformasyonda, EGFR'nin hücre içinde kalan tirozin kinaz alanı, ATP'nin varlığında kolayca otofosforile olabilmekte ve RAS/RAF/MAPK veya PI3K/Akt adlı aşağı sinyal iletim yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu indükleyebilmekte, anjiyogenezi ve metastazı arttırmakta ve apoptozun baskılanmasını sağlayabilmektedir. Şekil 2.6'da gefitinibin, EGFR'nin tirozin kinaz bölgesine bağlanarak fosforilasyonu engellemesi ve bu şekilde tümör gelişimini ve yayılımını indükleyen sinyal yollarını baskılaması gösterilmiştir (42, 43) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Gefitinibin etki mekanizması. EGF = epidermal büyüme faktörü; EGFR = Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü; L = ligand; MAPK = mitojen aktive protein kinaz; PI3K/Akt= fosfatidilinositol-3 kinaz; R = reseptör; T = tirozin kinaz; TGF α = Tümör Büyüme Faktörü α (41).

2.8.3. Farmakokinetik Özellikler

Gefitinibin insandaki farmakokinetik özellikleriyle ilgili bilgiler literatürde oral uygulama için bulunmaktadır. Bu nedenle tez kapsamında verilen bilgiler oral uygulama içindir.

Absorbsiyon

Gefitinibin pik plazma derişimleri uygulamadan 3-7 saat sonra ortaya çıkmaktadır. Kanser hastalarında ortalama mutlak biyoyarlanım %59 olarak hesaplanmıştır. Gefitinibin düşük mide pH'sında daha iyi çözünerek biyoyarlanımının artabileceği, gastrik pH'nın pH 5'in üzerinde tutulduğu sağlıklı gönüllülerde yapılan bir çalışmada, gefitinib maruziyetinin % 47 oranında azalması ile gösterilmiştir (44).

Dağılım

Gefitinib dokulara geniş bir dağılım göstermektedir. Ortalama kararlı durum dağılım hacmi 1400 L olarak bulunmuştur. Kanda HSA'ya ve alfa 1-asit glikoproteine bağlanmaktadır (44).

Biyotransformasyon

Gefitinibin metabolizasyonunda etkili olan başlıca enzimler, CYP3A4 ve CYP2D6'dır. Hayvan çalışmalarında gefitinibin önemli miktarda herhangi bir enzim indüksiyonu yaptığı gözlenmemiştir.

Metabolitleri feçeste beş adet ve plazmada ise sekiz adet olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan ana metabolit O-desmetil gefitinibtir ve bu metabolitin farelerde tümör hücresi büyümesi üzerinde inhibitör etkisi olmadığı tespit edilmiştir (44).

Eliminasyon

Gefitinibin eliminasyonu başlıca feçes yoluyla olmaktadır, renal eliminasyonu uygulanan dozun %4'ünden daha azını oluşturmaktadır. Ortalama yarılanma ömrü kanser hastalarında 41 saattir. Total plazma klerensi yaklaşık 500 mL/dk. olarak hesaplanmıştır (44).

2.8.4. Yan etkiler

Gefitinibin oral kullanımında en sık görülen yan etkileri diyare ve deri reaksiyonları (döküntü, akne, kuru cilt ve prurit) olarak raporlanmıştır. Bunun dışında yaygın ya da çok yaygın görülen yan etkileri, hafif ve orta dereceli anoreksiya, konjunktivit, blefarit ve göz kuruluğu, epistaksis ve hematüri gibi hemoraji, intersitisyel akciğer hastalığı, kusma, bulantı, ağız kuruluğu, karaciğer enzimlerinde yükselme, tırnak bozukluğu, alopesi, alerjik reaksiyonlar, anjiyoödem, ürtiker, proteinüri ve sistittir. İntersitisyel akciğer hastalığı, diğer TKI'lerin de sebep olabileceği ölümcül bir hastalıktır (40, 45).

2.8.5. Ticari Preparatlar

Gefitinib, 2003 yılında platin ve dosetaksel bazlı tedavinin yararlı olmadığı ilerlemiş KHDAK hastalarında üçüncü basamak tedavide kullanılmak üzere hızlandırılmış FDA onayı almıştır ve Iressa® (250 mg, Astra Zeneca) adıyla piyasaya sunulmuştur. Sonrasında Astra Zeneca'nın sürdürdüğü Faz III çalışmalarında gefitinibin KHDAK hastalarında plaseboya göre sağ kalım sürecini uzatmadaki verilerin yetersizliğinden ötürü FDA tarafından yeni hastalarda kullanımına kısıtlama getirilmiştir. 2015 yılında ise yeni klinik araştırmalar sonucunda EGFR gen ekzon 19 delesyonu ve/veya ekzon 21 L858R mutasyonu gösteren metastatik KHDAK hastalarında birinci basamak tedavide kullanılmak üzere FDA onayı almıştır. Günümüzde gefitinib içeren müstahzarlar dünya genelinde birçok ülkede kullanılmaktadır. Piyasada yalnızca tablet formunda müstahzarlar mevcuttur. FDA onaylı Iressa® (250 mg, Astra Zeneca), 250 mg gefitinib içeren film kaplı tablet laktoz monohidrat, mikrokristalin selüloz, kroskarmeloz sodyum, povidon, sodyum lauril sülfat ve magnezyum stearat, hipromelloz, polietilen glikol 300, titanyum dioksit, kırmızı ve sarı demir oksit içerir. Ülkemizde piyasada olan gefitinib içeren preparatlar ise Gefira® (250 mg, Teva İlaç) ve Iressa®'dır. Bu ilaçlar Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun ek izlemeye tabi ilaçlar listesindedir (44, 46, 47).

3) GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Malzemeler ve Aletler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

| | |
|----------------------------------|--------------------------|
| Asetonitril..... | Merck/Almanya |
| D-mannitol..... | Merck/Almanya |
| DMEM..... | ATCC/ABD |
| DMSO..... | CDH/Hindistan |
| DPPC..... | Cayman Chemicals/ABD |
| Etanol | Isolab/Türkiye |
| Gefitinib..... | Hetero Labs/Hindistan |
| HPMC kapsül..... | Capsugel, Colmar/ Fransa |
| HSPC..... | Sigma Aldrich/Almanya |
| Hyaluronik asit..... | New Directions/Kanada |
| İzopropil alkol..... | Sigma Aldrich/Almanya |
| Kloroform..... | Merck/Almanya |
| L-fenilalanin..... | Millipore/ Almanya |
| L-lösin..... | Sigma Aldrich/Almanya |
| Laktoz..... | Sigma Aldrich/Almanya |
| Oleik asit..... | Cayman Chemicals/ABD |
| Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)..... | Sigma Aldrich/Almanya |

| | |
|---------------|-----------------------|
| Sükroz..... | Isolab/Türkiye |
| Trehaloz..... | Goldbio/ABD |
| Tween 20..... | Sigma Aldrich/Almanya |

3.1.2. Kullanılan Aletler

| | |
|---|-----------------------------------|
| Akım sitometri cihazı..... | FACS Aria II, BD/ABD |
| Andersen Kademeli Ayırıştırıcı..... | Copley Scientific/ İngiltere |
| CO2'li inkübatör..... | PHCBI/ABD |
| Diferansiyel taramalı kalorimetre..... | TA Instruments/ABD |
| Düşük Hacimli Yüksek Basıncılı Homojenizatör..... | Microfluidics LV1/ USA |
| ELISA mikroparka okuyucu..... | Thermo Fisher Scientific Inc./ABD |
| Etüv..... | Dedeoğlu/Türkiye |
| Floresans spektrometresi..... | Shimadzu RF/Japonya |
| Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi | Perkin Elmer/ABD |
| Hassas terazi..... | Mettler Toledo/İsviçre |
| HPLC dedektörü..... | Shimadzu/Japonya |
| HPLC kolonu..... | Inertsil ODS-3V/ Japonya |
| HPLC..... | Shimadzu/Japonya |
| İnhaler aygıtı..... | Plastiap SpA/İtalya |
| Laminar akışlı hücre kültürü kabini..... | Molecular Devices/ABD |
| Liyofilizatör..... | Labconco/ABD |
| Manyetik karıştırıcı..... | IKA/Almanya |

| | |
|---|--|
| Millipore MilliQ su saflaştırma sistemi..... | Merck Millipore/Almanya |
| Nanosizer..... | Malvern Zetasizer Nano ZS/İngiltere |
| Termogravimetrik analiz..... | TA Instruments/ABD |
| Ultra-turrax..... | High shear dispersion homogenizer, IKA/Almanya |
| Ultrasantrüfjü tüpü..... | Merck Millipore/Almanya |
| Ultrasonik banyo..... | AdvantageLab/Almanya |
| X-Işını difraktometresi..... | Rigaku Ultima-IV/ABD |
| Yatay çalkalayıcılı su banyosu | Memmert/Almanya |
| Yüksek Basınçlı Homojenizatör..... | High Shear Fluid Processor, Newton/ABD |
| Yüksek Kontrastlı Taramalı Elektron Mikroskobu..... | FEI/ABD |

3.2. Etkin Madde Miktar Tayini

Gefitinib miktar tayini, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu, Japonya) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Miktar tayini yönteminde Chandrashekara ve arkadaşlarının kullandığı sistem parametreleri küçük değişiklikler ile modifiye edilmiştir (48). Asetonitril:amonyum asetat tamponu pH 5; 37: 63 (%h/h) mobil faz olarak kullanılmış, 1 mL/dk. akış hızında, 50 µL enjeksiyon hacminde ve 260 nm’de foto diyot dizisi dedektör (DAD) dedektörüyle analizler yapılmıştır. Ayrım İnertsil ODS-3V HPLC kolonu (Japonya) ile gerçekleştirilmiştir. Miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Gefitinibin HPLC ile miktar tayininde kullanılan analiz koşulları.

| | |
|------------------|--|
| Kolon | Inertsil ODS-3V (C18, 5 µm 4,6 x 250 mm) |
| Mobil faz | Asetonitril:amonyum asetat tamponu, 37:63 (%h/h), pH=5 |
| Sıcaklık | 30 °C |
| Enjeksiyon Hacmi | 50 µL |

| | |
|------------------------|------------------------|
| Akış hızı | 1 mL/dk. |
| Dedektör ve Dalga boyu | 260 nm ve DAD dedektör |

3.2.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Çözünme testi ortamı, ACI ve *in vitro* salım çalışmalarında kullanılan ortamlar göz önünde bulundurularak, sırasıyla pH=7,4 *phosphate buffered saline* (PBS), asetonitril, simüle akciğer sıvısı (SLF) ortamlarında kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Etkin madde asetonitrilde çözündürülerek 50 µg/mL stok çözelti hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler, kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi istenen ortama göre PBS, asetonitril ya da SLF ile yapılmıştır. Elde edilen standart çözeltilerin pik alanları ile kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir.

3.2.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Çalışmada kullanılan HPLC yönteminin güvenilirliği Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) Q2 Analitik Yöntem Validasyonu kılavuzu dikkate alınarak yapılan validasyon çalışmasıyla gösterilmiştir (49). Bu amaçla doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik), duyarlılık, özgülük, saptanabilirlik sınırı (LOD) ve tayin edilebilirlik sınırı (LOQ), dayanıklılık (etkin maddenin saptanması ve tayini aşamasında) ölçütleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

Artan derişim ile doğru orantılı olarak artan gefitinibin pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusallığı değerlendirilmiştir. Pik alanlarına karşılık gelen derişimlerden hareketle kalibrasyon doğrusu denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) elde edilmiştir (49).

Doğruluk (Accuracy)

Analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığının incelenmesi için analitik yöntem validasyonunda doğruluk parametresi incelenmiştir (49).

Bu kapsamda düşük, orta, yüksek olmak üzere üç farklı derişimde (1 µg/mL, 10 µg/mL, 40 µg/mL) örneklerden üçer adet hazırlanmıştır ve her bir örnek aynı gün içerisinde 3 defa analiz edilmiştir. % geri kazanım değeri tayin edilerek analiz çıktılarının gerçek değere yakınlığı değerlendirilmiştir (Eşitlik 3.1). Ölçümler arası farklılık, varyasyon katsayısı değerleri ile gösterilmiştir.

$$\% \text{Geri Kazanım} = \frac{\text{Tayin Edilen Derişim}}{\text{Eklenen Derişim}} \times 100 \quad (3.1)$$

Kesinlik (Precision)

Kesinlik, analitik yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığını ifade etmektedir. Kesinlik, tekrar edilebilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleriyle açıklanmaktadır. Tekrar elde edilebilirlik, laboratuvarlar arası analizleri ifade etmektedir (49). Tez kapsamında tekrar edilebilirlik ve ara kesinlik parametreleri aritmetik ortalama, standart sapma (SS), varyasyon katsayısı (VK) sonuçları ile değerlendirilmiştir.

Tekrar Edilebilirlik (Repeatability)

Aynı koşullarda ve aynı derişimde hazırlanan gefitinib çözeltilerinin aynı koşullarda analizi ile elde edilen sonuçların tekrar edilebilirliği incelenmiştir. Stok çözeltilerden 1 µg/mL ve 40 µg/mL olacak şekilde düşük ve yüksek iki derişimde örnekler hazırlanmıştır. Aynı çözeltiler art arda HPLC cihazına 6 kez enjekte edilmiştir ve pik alanları elde edilmiştir. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır. Tekrar edilebilirliğin gösterilmesi için VK'nın %2'den küçük olması hedeflenmektedir (49).

Ara Kesinlik (Intermediate Precision)

Ara kesinlik rastgele olayların analitik prosedürün kesinliği üzerindeki etkilerini ifade etmektedir. İncelenebilecek varyasyonlara farklı analiz günleri, farklı analistler, farklı ekipman örnek verilebilir. Tez kapsamında 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 40 µg/mL derişimlerindeki gefitinib çözeltileri her bir derişimde 3 ayrı çözelti olacak şekilde bir gün arayla tekrar hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Ortalama, SS ve VK hesaplanmıştır. VK'nın %2'den küçük olması hedeflenmiştir (49).

Özgüllük (Specificity)

Özgüllük, analiz sonuçlarının analiz edilecek madde dışındaki safsızlık, parçalanma ürünü, yardımcı maddelerden vb. etkilenmemesini ifade etmektedir (49). Tez çalışmaları kapsamında üretilen KTİ formülasyonunun içeriğinde bulunan yardımcı maddeler (HA, HSA, DPPC, fenilalanin, mannitol), ACI analizinde plakaları kaplamakta kullanılan Tween 20, *in vitro* salım deneylerinde kullanılan SLF ortamı ve çözünürlük testinde kullanılan PBS; gefitinib miktar tayininde kullanılan metot ile analiz edilmiş ve gefitinibin alıkonma zamanına yakın bir noktada pik verip vermediği gözlemlenmiştir.

Duyarlılık (*Sensitivity*)

Saptanabilirlik (*Limit of detection-LOD*) ve miktar tayini sınırı (*Limit of quantification-LOQ*) bir analizin duyarlılığının ifadeleridir. LOD sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu derişim olarak hesaplanırken, LOQ sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu derişim olarak ele alınmıştır (49).

Dayanıklılık (*Stability*)

Etkin maddenin analiz süresince stabil kalmasının bir ölçütü olarak incelenmiştir. 50 µg/mL olarak hazırlanan gefitinib çözeltilerinin hazırlandığı anda, 6., 12. ve 24. saatlerde ölçümleri yapılmıştır ve sonuçlar arasında anlamlı bir fark olmaması amaçlanmıştır.

Sistem Uygunluk Testleri (*System Suitability Tests*)

Sistem uygunluk testleri, sistemin analiz sırasında düzgün çalıştığını göstermektedir. Sistem uygunluk parametreleri olan kapasite faktörü, kolon etkinliği (teorik tabaka sayısı) ve simetri (kuyruklanma) faktörü incelenmiştir. Maddenin kolondan elüe olma hızı kapasite faktörü (k') ile açıklanmaktadır. Bu değerin 2'nin üzerinde olması istenen bir durumdur. Kapasite faktörü Eşitlik 3.2'ye göre hesaplanmıştır (50).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3.2)$$

t_R : Maddenin alıkonma zamanı, t_0 : Ölü zaman (kolonda tutunamayan maddenin alıkonma zamanı)

Kolon etkinliği teorik tabaka sayısı (N) ile ifade edilmektedir. Eşitlik 3.3. kullanılarak hesaplanmıştır. Bu değerin 2000'in üzerinde olması ayırımın kabul edilebilir olduğunu gösteren faktörlerden birisidir (50).

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{t_w} \right)^2 \quad (3.3)$$

N: Teorik tabaka sayısı, t_R : Maddenin alıkonma zamanı, w: Pikin taban genişliği

Kuyruklanma faktörü (*tailing factor*, T), piklerin asimetrisini ifade etmektedir. Kuyruklanma faktörünün 1 olması pikin tam simetrik olduğunu göstermektedir ve bu değerin 2'den küçük olması istenmektedir (50).

3.3. Nanopartikül Hazırlama Yöntemi

Gefitinib bağlı HSA nanopartikülleri Nab™ teknolojisinden hareketle hazırlanmıştır (51). Organik faz içerisinde çözünen gefitinib ve yüzey aktif madde, HSA içeren su fazına ultraturrax altında eklenmiştir. Elde edilen karışım yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek nanoemülsiyon elde edilmiştir. Organik faz uçurulduktan sonra HA çözeltisi eklenerek nanopartiküllerin HA kaplaması yapılmıştır. Partikül boyutu 130 nm'den düşük, monodispers ve enkapsülasyon etkinliği yüksek nanopartiküllerin üretimi amacıyla formülasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.3.1. Formülasyon Çalışmaları

Formülasyonda kullanılacak nanopartikülde kritik işlem parametreleri, yüzey aktif madde türü ve miktarı, organik faz türü, organik faz hacmi/formülasyon hacmi, HSA/gefitinib oranı, ultraturrax hızı, homojenizasyon sayısı, homojenizasyon sıcaklığı, homojenizasyon basıncı, yüzey aktif madde varlığı olarak belirlenmiştir. Öncelikle yüzey aktif maddeye karar vermek amacıyla diğer parametreler sabit tutularak yüzey aktif madde içermeyen ve çeşitli oranlarda yüzey aktif madde içeren nanopartiküller üretilmiştir. Üretimlerde sabit tutulan işlem parametrelerine Tablo 3.2'de yer verilmiştir. Bu üretimlerde yüksek basınçlı homojenizatör olarak Low Volume Microfluidizer cihazı kullanılmıştır. Yüksek, orta ve düşük düzeylerde

dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidilkolin (HSPC) ve oleik asitin organik faza eklenmesi ile partikül büyüklüğü dağılımları incelenmiştir. Tüm yüzey aktif maddeler için yüksek düzey, toplam nanoemülsiyon hacmi içerisinde 2 mg/mL, orta düzey 1 mg/mL ve düşük düzey ise 0,2 mg/mL olarak belirlenmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.2. Yüzey aktif madde belirlenmesi amacıyla yapılan üretimlerdeki sabit işlem parametreleri.

| Organik faz | HSA/gefitinib (a/a) | Organik faz hacmi/ Formülasyon hacmi (%) | Ultraturrax hızı (rpm) | Homojenizasyon sayısı | Homojenizasyon Basıncı (PSI) | Homojenizasyon sıcaklığı |
|------------------------|---------------------|--|------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|
| Etanol:Kloroform (4:6) | 9,83 | 6,46 | 11000 | 10 | 24000 | Oda sıcaklığı |

Tablo 3.3. Gefitinib-HSA nanopartikülü üretiminde kullanılan DPPC, HSPC ve Oleik Asitin düşük, orta ve yüksek düzeyleri.

| Yüzey Aktif Madde | Düşük (mg/mL) | Orta (mg/mL) | Yüksek (mg/mL) |
|-------------------|---------------|--------------|----------------|
| DPPC | 0,2 | 1 | 2 |
| HSPC | 0,2 | 1 | 2 |
| Oleik asit | 0,2 | 1 | 2 |

Gefitinib-HSA nanopartiküllerinin yüzeyi, HA ile elektrostatik biriktirme tekniği kullanılarak modifiye edilmiştir. Bu tekniğin kullanılması ile, HSA üzerindeki NH₂ grupları ile HA'nın yüzeyindeki karboksilat gruplarının etkileşmesiyle HA-HSA bağlanması amaçlanmıştır (25). Chen ve arkadaşlarının çalışmalarına dayanarak nanopartikül süspansiyonuna HA:HSA oranı %5 olacak şekilde %0,2 HA içeren sulu çözeltiden eklenip 30 dk. 750 rpm'de karıştırılmıştır (52). HA eklenmesi sonucu partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyel tayinleri yapılmıştır.

Formülasyon çalışmalarında HSA/gefitinib oranı, organik faz türü ve hacim oranı, ultraturrax hızı ve homojenizasyon parametrelerinin belirlenmesi için farklı üretimler yapılmıştır. Üretim parametrelerindeki noktalar ön çalışmalara ve literatür bilgilerine dayanarak karar verilmiştir (53). Bu üretimlerde yüksek basınçlı homojenizatör olarak büyük hacimlerde üretim yapılabilen *High shear fluid processor* (Newton, Massachusetts) cihazı kullanılmıştır. Yüzey aktif madde olarak ön

denemelerde en iyi sonucu veren 1 mg/mL derişiminde DPPC organik faza eklenmiştir. Farklı parametreler ile yapılan üretimlere ait bilgiler Tablo 3.4'te sunulmuştur.

Tablo 3.4. Gefitinib-HSA nanopartiküllerinin Nab™ teknolojisi ile üretiminde kullanılan formülasyon parametreleri.

| No | HSA/gefitinib | Organik faz | | Ultraturax | Homojenizasyon | | | Yüzey aktif madde varlığı* |
|----|---------------|-------------------------|---|------------|--------------------|---------------|------------|----------------------------|
| | | Etanol: kloroform (h:h) | Organik faz hacmi/Formülasyon hacmi (%) | | Karışma hızı (rpm) | Sıcaklık (°C) | Tur sayısı | |
| 1 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 10 | 20.000 | - |
| 2 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 20 | 20.000 | - |
| 3 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 30 | 20.000 | - |
| 4 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 10 | 15.000 | - |
| 5 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 20 | 15.000 | - |
| 6 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 30 | 15.000 | - |
| 7 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 10 | 25.000 | - |
| 8 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 20 | 25.000 | - |
| 9 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | 25 | 30 | 25.000 | - |
| 10 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 11.000 | -10 | 10 | 25.000 | - |
| 11 | 6 | 1:9 | 1,96 | 14.500 | 50 | 15 | 20.000 | - |
| 12 | 6 | 1:9 | 1,96 | 14.500 | 50 | 15 | 20.000 | + |

3.4. Nanopartikül Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1. Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Partikül boyutu dağılımı, nanopartiküller sistemler ile kanser tedavisinde EPR etkisi açısından en önemli parametredir. Bu nedenle partikül boyutu dağılımı formülasyon çalışmaları sırasında dinamik ışık saçılımı (DLS) metodu kullanılarak ölçülmüştür. Zeta potansiyel ölçümleri HA kaplanmış ve kaplanmamış nanopartiküllerde Malvern Zetasizer Nano ZS cihazında 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.4.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Hesaplanması

Tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerde gefitinibin enkapsülasyon etkinliğini (EE%) hesaplamak için nanopartikül süspansiyonu 10.000 Da (MWCO) ultrasantrifüj filtreleri kullanılarak 6000 rpm'de 8 dakika boyunca konsantre edilmiştir. Bu şekilde enkapsüle olmamış gefitinib toplama tüpünde ayrıştırılmıştır. Toplama tüpünde biriken gefitinib derişimi HPLC analizi ile ölçülmüştür. Bu fraksiyondaki gefitinib miktarı enkapsüle olmayan gefitinibi ifade etmektedir. Enkapsülasyon etkinliği Eşitlik 3.4'e göre hesaplanmıştır (53).

$$EE(\%) = \frac{\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı (mg)} - \text{Enkapsüle olmayan etkin madde miktarı (mg)}}{\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.4.3. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Gefitinib-HSA nanopartikülleri ve gefitinib içermeyen HSA nanopartikül süspansiyonları liyofilize edilmiş ve suda disperse edilmiştir. Örnekler morfolojileri incelenmek üzere FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin (CTEM) cihazı ile görüntülenmiştir.

3.5. KTİ Hazırlama Yöntemi

Gefitinib-HSA-KTİ formülasyonları, en iyi aerodinamik özellikleri gösteren taşıyıcı yada taşıyıcı kombinasyonuna karar vermek amacıyla mannitol, laktoz, sükroz, trehaloz, lösin ve fenilalanin taşıyıcılarını tek başına ya da kombinasyonları halinde içerecek şekilde hazırlanmıştır. Tablo 3.2'deki işlem parametreleri ile yüzey aktif madde eklenmeden hazırlanan nanopartikül süspansiyonlarına Tablo 3.5'te gösterilen taşıyıcıların sudaki çözeltileri eklenmiştir ve -20°C'de 24 saat dondurulmuştur. Ardından -80°C'de 0,01 mmHg basınçta 72 saat süresince liyofilize edilerek poröz görünümlü kuru tozlar elde edilmiştir.

Tablo 3.5. Gefitinib-HSA-KTİ'lerin taşıyıcı içerikleri (Taşıyıcı kütlesi/Toplam KTİ kütlesi (%)).

| KTİ no | Mannitol (%) | Laktoz (%) | Sükroz (%) | Trehaloz (%) | Lösin (%) | Fenilalanin (%) |
|--------|--------------|------------|------------|--------------|-----------|-----------------|
| 1 | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 50 | - | - | - | - | - |

| | | | | | | |
|----|----|----|----|----|-------|-------|
| 3 | - | 50 | - | - | - | - |
| 4 | - | - | 50 | - | - | - |
| 5 | - | - | - | 50 | - | - |
| 6 | - | - | - | - | 50 | - |
| 7 | - | - | - | - | - | 50 |
| 8 | - | - | - | - | 33,33 | 16,67 |
| 9 | 50 | - | - | - | 16,67 | 8,33 |
| 10 | 25 | - | - | - | - | 25 |

3.6. KTİ'lerin Aerodinamik Parametrelerinin Andersen Kademeli Ayırıştırıcı ile Hesaplanması

Tez kapsamında geliştirilen KTİ'lerin aerodinamik parametreleri, USP 43 kriterlerine göre, ACI (Copley Scientific, Nottingham, İngiltere) cihazı kullanılarak belirlenmiştir (32). Cihaz; kauçuk ağızlık, indüksiyon aygıtı (*induction port*), 8 adet ACI aşaması (-1. Aşama, 0. Aşama, 1. Aşama, 2. Aşama, 3. Aşama, 4. Aşama, 5. Aşama, 6. Aşama) ve filtre parçalarından oluşmaktadır. Partiküllerin cihazın her aşamasında bulunan plakalara tutunmasını sağlamak için Tween 20'nin etanol içerisindeki %2 (h/h)'lik çözeltisi ile ACI plakaları kaplanmış ve kurumaları beklenmiştir. Cihazın tüm parçaları birleştirilerek vakum pompasına bağlanmıştır. Formülasyonlar, size 3 HPMC kapsüllerine (Capsugel, Colmar, Fransa) tartılarak doldurulmuştur. Dolu kapsüller Aerolizer® tasarımındaki RS01 inhaler aygıtının (Plastiap SpA, İtalya) kapsül haznesine yerleştirilerek aygıt kapatılmıştır ve tartılmıştır. Kapsül kenarlarındaki butonlara basılarak delinmiştir. Aygıt ACI cihazının kauçuk ağızlık parçasına takıldıktan sonra cihaz inhalerden 4 L hava akışını sağlayacak şekilde 60 L/dk. hava akış hızıyla 4 saniye boyunca çalıştırılmıştır. Kalibre edilmiş elektronik dijital akış ölçer akış hızının kontrolü için kullanılmıştır. Cihaz bu şekilde 3 defa çalıştırılmıştır. Vakum her durdurulduktan sonra partiküllerin yerleşmesi için 30 saniye beklenmiştir. İnhaler aygıtı, işlemler tamamlandıktan sonra tekrar tartılmış ve başlangıç tartımı ile aradaki fark hesaplanarak aygıtı terk eden KTİ miktarı belirlenmiştir. ACI cihazının her aşamasında tutunan formülasyon miktarını ölçebilmek amacıyla; inhaler aygıtı, kapsül, kauçuk ağızlık, indüksiyon aygıtı, 8 adet aşama ve filtre asetonyril ile ayrı ayrı yıkanarak 5 dk. süre ile ultrasonik banyoda

tutulmuştur ve balon jojelerin içerisine alınarak her bir örnek eşit hacme tamamlanmıştır. Örnekler HPLC analizine tabi tutulmuştur. Aerodinamik parametreler olan % Emitted Dose (ED), Kütle Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇ), İnce Partikül Dozu (İPD) ve İnce Partikül Fraksiyonu (İPF) hesaplanmıştır.

% Emitted dose (ED): İnhaler aygıtını terk eden dozun yüzdesini ifade etmektedir. İnhaler aygıtını terk eden dozun bütün ACI sisteminden geri kazanılan doza oranlanması ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5) (54).

$$\% \text{ Emitted dose (ED)} = \frac{\text{Emitted dose}}{\text{Geri kazanılan gefitinib}} \times 100 \quad (3.5)$$

Kütle Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇ): Aerodinamik çapın (log skalası) fonksiyonu olarak kümülatif yüzde gefitinib miktarı (olasılık skalası) eksponansiyel grafiğinden elde edilmiştir (34).

İnce Partikül Dozu (İPD): Aerodinamik çapı 5 µm'den küçük mikropartikül miktarı ağırlık olarak hesaplanmıştır (55).

İnce Partikül Fraksiyonu (İPF): İnce partikül dozunun *emitted dose*'a oranı ile elde edilmiştir (Eşitlik 3.6) (55).

$$\text{İPF (\%)} = \frac{\text{İPD}}{\text{ED}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.7. Etkin Madde, Yardımcı Maddeler ve KTİ Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

Gefitinib-HSA-KTİ, gefitinib içermeyen HSA-KTİ ve bu formülasyonlarda kullanılan etkin ve yardımcı maddeler olan gefitinib, HSA, HA, DPPC, L-fenilalanin ve D-mannitolün fizikokimyasal özelliklerini incelemek ve literatürle uyumluluklarını değerlendirmek için FT-IR, TGA, XRD ve TEM analizleri yapılmıştır. KTİ formülasyonunda, taşıyıcının yüzey alanı artışına etkisini gözlemlemek amacıyla BET analizi gerçekleştirilmiştir. Gefitinibin HSA'ya bağlanma özelliğinin ve yüzey aktif

maddelerin bağlanma üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla HSA'nın floresans ışımaya özelliğinden yararlanılarak floresans spektroskopisi deneyleri yapılmıştır.

3.7.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektrofotometresi (FT-IR)

KTİ formülasyonundaki etkin madde olan gefitinib ve yardımcı maddeler olan HA, DPPC, HSA, fenilalanin, mannitol ve HSA-KTİ ile gefitinib-HSA-KTİ formülasyonlarının FT-IR spektrumları Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX cihazı kullanılarak $600-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyları aralığında elde edilmiştir.

3.7.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC)

Q-100 TA Instruments kullanılarak gerçekleştirilen DSC analizlerinde, gefitinib-HSA-KTİ, HSA-KTİ, gefitinib, liyofilize HSA, HA, D-mannitol ve L-fenilalaninin; alüminyum panlar içerisine yaklaşık 5 mg tartılarak ölçüm parametrelerine kaydedilmiştir. Azot atmosferi altında ve $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında erime pikleri incelenmiş ve literatür verileri ile karşılaştırılmıştır.

3.7.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

TGA analizi ile gefitinib, gefitinib-HSA-KTİ ve hızlandırılmış stabilite koşullarında ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ bağıl nem) 3 ve 6 ay saklanmış gefitinib-HSA-KTİ formülasyonlarının % nem içerikleri saptanmıştır. SDT650 TA Instruments TGA-DSC cihazında azot ortamında, $25^{\circ}\text{C}-600^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında, $10^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ ısıtma hızında deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)

Kristal yapıyı incelemek amacıyla Rigaku Ultima-IV X-Işını Kırınım Cihazı ile analizler gerçekleştirilmiştir. Gefitinib ve gefitinib-HSA-KTİ formülasyonlarının kristal yapıları incelenerek, nanopartikül üretimi ve liyofilizasyon işlemlerinin kristal yapı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

3.7.5. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM)

3.4.3'te değinilen yöntem ile gefitinib ve HSA-gefitinib-KTİ'ye ait yüzey morfolojisi ve partikül boyutları incelenmiştir.

3.7.6. Yüzey Alanı Ölçümü (BET)

Liyofilizasyon yöntemi ile kurutulan ve taşıyıcı içermeyen HSA-gefitinib nanopartikülleri ve %50 oranında mannitol-fenilalanin içeren HSA-gefitinib-KTİ'lerin tek noktalı BET analizi AUTOSORB-1C/MS cihazı ile yüzey alanları ölçülmüştür. KTİ formülasyonunda taşıyıcıların yüzey alanını artırma özelliğinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

3.7.7. Floresans Spektroskopisi

Floresans spektroskopisi, ilaçların serum albümine bağlanmasını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Çoğu ilaç, HSA'nın triptofan kalıntısına bağlanır, bu da HSA'nın intrinsik floresans özelliğinin sönmesine yol açar (56). Gefitinibin HSA'ya afinitesini araştırmak, aynı zamanda formülasyonda kullanımının denemesi planlanan yüzey aktif maddelerin (DPPC, HSPC, oleik asit) afiniteye etkisini araştırmak için sabit konsantrasyonlarda yüzey aktif madde (50 µM) ve HSA (1µM) varlığında ve artan gefitinib konsantrasyonlarında (0-20 µM) Stern Volmer eğrileri incelenmiştir (Eşitlik 3.7) (57). Floresan ölçümleri, Shimadzu RF 6000 Spectro-Fluorophotometer cihazı kullanılarak yapılmıştır. Tarama hızı 6000 nm/dk.; eksitasyon ve emisyon bant genişlikleri 5 nm'dir. Eksitasyon dalga boyu Tanzadehpanah ve arkadaşlarının çalışmasına dayanarak 280 nm olarak alınmış, HSA, gefitinib ve DPPC'nin spektrumları 290 ile 455 nm arasında kaydedilmiştir (56).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3.7)$$

F_0 : Bağlanmadan önceki intensite

F : Bağlanmadan sonraki intensite

K_{sv} : Stern-Volmer quenching sabiti

Q : Etkin madde konsantrasyonu

HSA stoğu, PBS pH 7,4'te $7,52 \times 10^{-5}$ M derişiminde hazırlanmıştır. Gefitinibin (5×10^{-4} M) stok çözeltisi, ilacın uygun miktarının etanol içinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Oleik asit, DPPC ve HSPC maddelerinin uygun derişimlerde stok çözeltileri etanolde çözümlenerek hazırlanmıştır. Gefitinibin HSA'ya afinitesinin incelenmesi için HSA derişimi ($1 \mu\text{M}$) sabit tutularak, 0-20 μM arası artan derişimlerde gefitinib içeren örnekler hazırlanmıştır (Tablo 3.6) ve 290-455 nm aralığında floresans spektrumları kaydedilmiştir. Fotometrik ölçüm için HSA'nın floresans ışımalarının pik yaptığı nokta olan 345 nm dalga boyu seçilmiştir. 345 nm'de fotometrik ölçümleri alındıktan sonra intensite değerleri kaydedilmiştir. Farklı yüzey aktif maddeleri içeren ortamlarda F_0/F değerlerinin gefitinib derişimlerine bağlı değişimini gösteren grafikler ve regresyon denklemleri oluşturulmuştur.

Tablo 3.6. Floresans spektroskopisi için hazırlanan örneklerde HSA, gefitinib, oleik asit ve HSPC derişimleri (μM).

| No | HSA (μM) | Gefitinib (μM) | Oleik asit (μM) | DPPC (μM) | HSPC (μM) |
|----------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|
| A ₀ | 1 | - | - | - | - |
| X ₀ | 1 | - | 50 | - | - |
| Y ₀ | 1 | - | - | 50 | - |
| Z ₀ | 1 | - | - | - | 50 |
| A ₁ | 1 | 1 | - | - | - |
| A ₂ | 1 | 5 | - | - | - |
| A ₃ | 1 | 10 | - | - | - |
| A ₄ | 1 | 12,5 | - | - | - |
| A ₅ | 1 | 15 | - | - | - |
| A ₆ | 1 | 20 | - | - | - |
| X ₁ | 1 | 1 | 50 | - | - |
| X ₂ | 1 | 5 | 50 | - | - |
| X ₃ | 1 | 10 | 50 | - | - |
| X ₄ | 1 | 12,5 | 50 | - | - |
| X ₅ | 1 | 15 | 50 | - | - |
| X ₆ | 1 | 20 | 50 | - | - |

| | | | | | |
|----------------|---|------|---|----|----|
| Y ₁ | 1 | 1 | - | 50 | - |
| Y ₂ | 1 | 5 | - | 50 | - |
| Y ₃ | 1 | 10 | - | 50 | - |
| Y ₄ | 1 | 12,5 | - | 50 | - |
| Y ₅ | 1 | 15 | - | 50 | - |
| Y ₆ | 1 | 20 | - | 50 | - |
| Z ₁ | 1 | 1 | - | - | 50 |
| Z ₂ | 1 | 5 | - | - | 50 |
| Z ₃ | 1 | 10 | - | - | 50 |
| Z ₄ | 1 | 12,5 | - | - | 50 |
| Z ₅ | 1 | 15 | - | - | 50 |
| Z ₆ | 1 | 20 | - | - | 50 |

3.8. Çözünürlük Tayini

Düşük çözünürlüğe sahip gefitinibin, tez kapsamında geliştirilen gefitinib-HSA-KTİ formülasyonu içerisinde çözünürlüğünün artırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla PBS (pH=7,4) ortamında çözünürlük tayini yapılmıştır. Gefitinib ve gefitinib-HSA-KTİ aşırı doymuş çözelti oluşturacak miktarlarda 6 adet kapaklı tüpe tartılmış ve örnekler üzerine 1,75 mL PBS eklenmiştir. Su banyosuna yerleştirilen kapaklı tüpler 37°C’de çalkalamaya bırakılmıştır. Çözünürlüğün tam doygunluğa ulaştığını gözlemlemek için farklı zamanlarda (1., 6. ve 12. saatler) örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden çözünmeyen gefitinibi uzaklaştırmak için (nanopartikül halindeki gefitinib vb.) 0,22 µm selüloz asetat (CA) membrandan süzümüştür. Örnekler HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.9. *In-vitro* Salım

Tez kapsamında iki ayrı salım çalışması gerçekleştirilmiştir ve salım çalışması 1 ve 2 olarak numaralandırılmıştır. Salım çalışması-1’de formülasyonlarda kullanılan taşıyıcıların gefitinibin salımına etkisini incelemek amacıyla gefitinib-HSA nanopartikülleri ile beraber fenilalanin-mannitol (1:1) karışımını taşıyıcı olarak içeren KTİ (KTİ-10) ve gefitinib-HSA nanopartikülleri ile beraber fenilalanini tek başına

taşıyıcı olarak içeren KTİ (KTİ-7)'nin *in vitro* salım özellikleri gefitinib ile karşılaştırmalı olarak yüzey aktif madde içeren simüle akciğer sıvısı (SLF) ortamında incelenmiştir.

Salım çalışması-2'de ise yüzey aktif madde içermeyen SLF ortamında gefitinib-HSA nanopartiküllerinin ve gefitinib-HSA-KTİ'nin gefitinib ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* salım deneyleri yapılmıştır. Tez kapsamında gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmalarında kullanılan örnekler ve salım koşulları Tablo 3.7'de özetlenmiştir.

Tablo 3.7. *In vitro* salım örnekleri, yöntem ve koşullar.

| Salım no | Yöntem | Ortam | Sıcaklık (°C) | Çalkalama yöntemi | Örnekler |
|----------|-----------------------------|---------------------|---------------|----------------------|---|
| 1 | Diyaliz membran (12-14 kDa) | %0,2 SLS içeren SLF | 37 | Yatay çalkalayıcı | KTİ-7 KTİ-10 gefitinib |
| 2 | Diyaliz membran (12-14 kDa) | SLF | 37 | Manyetik karıştırıcı | gefitinib-HSA-KTİ (KTİ-10) gefitinib-HSA-NP gefitinib |

3.9.1. Salım ortamının (SLF) hazırlanması

In vitro salım çalışmaları için kullanılmak üzere akciğer interstisyel sıvısını taklit eden SLF salım ortamı olarak seçilmiştir. Tablo 3.8’de verilen tuzlar tartılarak yeterli miktarda saf su içerisinde çözünmesi için en fazla çözücü gerekenden en az çözücü gerekene göre sırayla eklenmiş ve hacim yavaş yavaş istenen hacme saf su ile tamamlanmıştır.

Tablo 3.8. SLF salım ortamının hazırlanmasında kullanılan tuzlar ve derişimleri (58).

| | Derişim (g/L) |
|---|---------------|
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,203 |
| NaCl | 6,019 |
| KCl | 0,298 |
| Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O | 0,268 |
| Na ₂ SO ₄ | 0,071 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,368 |
| NaH ₃ C ₂ O ₂ .3H ₂ O | 0,952 |
| NaHCO ₃ | 2,604 |
| Na ₃ H ₅ C ₆ O ₇ .2H ₂ O | 0,097 |

Salım çalışması-1’de suda çözünürlüğü nötral pH’da çok düşük olan gefitinibin *in vitro* salım sırasında analiz sınırının altında kalmaması ve sink koşullarının sağlanması amacıyla salım ortamına %0,2 sodyum lauril sülfat (SLS) eklenmiştir. Salım çalışması-2’de ise yüzey aktif maddesiz ortamda formülasyonların salım davranışları incelenmek istendiğinden SLS içermeyen SLF ortamı salım ortamı olarak kullanılmıştır.

3.9.2. Sink koşulun sağlanması

Salım çalışması-2 için gefitinibin salım ortamı olarak seçilen %0,2 SLS içeren SLF ortamındaki doyunluk çözünürlüğü hesaplanmıştır. Bu amaçla çözünebilecek miktardan fazla miktarda gefitinib %0,2 SLS içeren SLF ortamında 24 saat boyunca 37°C’de yatay çalkalayıcıda çalkalanmış ve örnek alınmıştır. Alınan örnek 0,22 µm por açıklığına sahip CA filtreden süzülerek HPLC analizine tabi tutulmuştur. Bu

sayede çözünen gefitinib derişimi ölçülmüştür. Elde edilen 0,04805 mg/mL değeri salım ortamında gefitinibin doygunluk çözünlüğü olarak kabul edilmiştir. Diyaliz membranların içlerine ortalama 0,24 mg gefitinib konulmuştur. 0,24 mg gefitinibi çözmek için 5,06 mL salım ortamı gerekmektedir.

Avrupa Farmakopesi'ne göre Sink koşulu, dissolüsyon ortamının hacminin doygunluk çözünlüğü için gereken hacmin 3-10 katı arasında olması ile sağlanmaktadır (37). Salım ortamı gefitinib örnekleri için 40 mL olarak seçilmiştir ve bu hacim sink koşulu sağlamaktadır.

3.9.3. Örneklerin hazırlanması

Taşıyıcı çeşidinin *in vitro* salım davranışına etkisinin gözlemlenmesi amacıyla gefitinib-HSA nanopartiküllerine HA kaplaması yapılmıştır. Fenilalanin ve fenilalanin-mannitol (1:1) çözeltileri taşıyıcı olarak eklendikten sonra elde edilen örnekler liyofilize edilmiştir. KTİ-7 ve KTİ-10 formülasyonlarının içeriklerine Tablo 3.9'da yer verilmiştir.

Tablo 3.9. KTİ-7 ve KTİ-10 formülasyonlarının bileşimi.

| | KTİ-10 | KTİ-7 |
|---|----------|----------|
| Gefitinib | 6 mg | 6 mg |
| HSA | 36 mg | 36 mg |
| DPPC | 30 mg | 30 mg |
| HA | 1,8 mg | 1,8 mg |
| Fenilalanin | 37,49 mg | 74,98 mg |
| Mannitol | 37,49 mg | - |
| *Sodyum kaprilat + sodyum N-asetiltriptofanat | 1,18 mg | 1,18 mg |

*Formülasyonda kullanılan %20 albümin solüsyonunun (Grifols®) içerdiği tuzlar

KTİ formülasyonları ortalama 0,1 mg gefitinib içerecek şekilde; ham gefitinib ise ortalama 0,24 mg olacak şekilde tartılıp 0,5 mL %0,2 SLS içeren SLF ortamında disperse edilmiştir (n=3).

Yüzey aktif madde içermeyen ortamda gerçekleştirilen salım çalışması için taşıyıcı içermeyen HA-Gefitinib-HSA nanopartikülleri (gefitinib-HSA-NP) ve fenilalanin-mannitol taşıyıcılarını içeren HA-gefitinib-HSA-KTİ aynı yöntemle üretilmiş ve liyofilize edilmiştir. Tablo 3.10'da üretilen formülasyonların içerikleri verilmiştir.

Tablo 3.10. Gefitinib-HSA-NP ve gefitinib-HSA-KTİ formülasyonlarının bileşimi.

| | HA-gefitinib-HSA-NP | HA-gefitinib-HSA-KTİ (KTİ-10) |
|---|---------------------|----------------------------------|
| Gefitinib | 6 mg | 6 mg |
| HSA | 36 mg | 36 mg |
| DPPC | 30 mg | 30 mg |
| HA | 1,8 mg | 1,8 mg |
| Fenilalanin | - | 37,49 mg |
| Mannitol | - | 37,49 mg |
| *Sodyum kaprilat + sodyum N-asetiltriptofanat | 1,18 mg | 1,18 mg |

*Formülasyonda kullanılan %20 albümin solüsyonunun (Grifols®) içerdiği tuzlar

KTİ formülasyonları ve ham gefitinib ortalama 0,1 mg gefitinib içerecek şekilde tartılmış ve 0,5 mL SLF ortamında disperse edilmiştir (n=3).

3.9.4. *In vitro* salım düzeneği

Sigma membran (12-14 kDa por açıklığı) %0,2 SLS içeren SLF ile ıslatılarak bir gece bekletilmiştir. 0,5 mL SLF'de redisperse edilen formülasyonlar eşit boyutlardaki diyaliz torbalarına konulmuş ve torbaların ağızları sıkıca bağlanmıştır. KTİ-7 ve KTİ-10 formülasyonları için 20 mL, gefitinib için 40 mL salım ortamı eklenmiştir. Örnekler ağzı kapaklı kaplarda 37°C sıcaklığa ayarlanan yatay çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. 10 dk., 15 dk., 30 dk., 1 sa., 2 sa., 4 sa., 6 sa., 12 sa. noktalarında 350 µL salım ortamından örnek alınarak yerine 350 µL taze salım ortamı eklenmiştir. Alınan örnekler HPLC'de analiz edilmiştir.

Yüzey aktif madde içermeyen SLF ortamında yapılan salım çalışması için benzer şekilde 12-14 kDa por açıklıklı diyaliz membran kullanılmıştır. Diyaliz membranların içine koyulan disperse HA-gefitinib-HSA-NP, HA-gefitinib-HSA-KTİ ve gefitinib örnekleri 500 mL SLF ortamına yerleştirilmiştir. Ağzı kapaklı kaplarda 37 °C sıcaklığa ayarlanan manyetik karıştırıcıda 400 rpm’de karışmaya bırakılmıştır. 5 dk., 10 dk., 15 dk., 30 dk., 1 sa., 2 sa., 4 sa., 6 sa., 12 sa., 24 sa., 36 sa., 48 sa., 58 sa. ve 72 sa. noktalarında 350 µL salım ortamından örnek alınmış yerine 350 µL taze salım ortamı eklenmiştir. Alınan örnekler HPLC’de analiz edilmiştir.

3.10. KTİ İçerisinden Gefitinib Miktar Tayini

KTİ örneklerinin içerisinden gefitinib miktarının tayininde her bir tüpten yaklaşık 1 mg olacak şekilde üç örnek tartılarak alınmış ve HSA-gefitinib nanopartiküllerini parçalayarak gefitinibi açığa çıkarmak amacıyla 4 mL asetonitril eklenerek 1 dk. boyunca ultrasonik banyo işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen örnek HPLC analizine tabi tutularak KTİ içerisindeki % gefitinib miktarı tüm örnekler için hesaplanmıştır.

3.11. Stabilite

KTİ örnekleri üçer adet size 3 HPMC kapsüllere tartılarak konulmuştur. Kapsüller ağzı sıkıca kapatılan flakonlara yerleştirilmiştir. Aerodinamik parametreleri ve nem içerikleri 0, 3 ve 6. aylarda incelenmek için hızlandırılmış stabilite koşullarında (40±2 °C, %75 ± 5 bağıl nem) stabilite kabinlerine konulmuştur.

Belirtilen zaman noktalarındaki nem içerikleri TGA analizinde ağırlık kaybı değerleri kaydedilerek, aerodinamik parametreler ise belirtilen zaman noktalarında ACI analizleri gerçekleştirilerek elde edilmiştir (n=3).

3.12. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında hücre kültürü çalışmalarında sitotoksisite analizi ve hücre içine alım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite analizinde L929 fare hücre fibroblast hücre hattı ve LLC-1 fare akciğer kanseri hücre hattı kullanılmıştır. MTT kullanılarak sitotoksisite analizleri gerçekleştirilmiştir. Nil Kırmızısı yüklü

nanopartiküllerin LLC1 hücrelerine alımı akım sitometri yöntemiyle ve floresan mikroskobu ile incelenmiştir.

3.12.1. Sitotoksosite Çalışması (MTT)

L929 fare fibroblast hücre hattı ve LLC-1 fare akciğer kanseri hücre hattı; %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotikleri içeren DMEM hücre ortamı içerisinde ekilmiş, 37°C sabit sıcaklıkta %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat boyunca adezyonları sağlanmıştır.

2,8 mg gefitinib 0,195 mL DMSO içerisinde çözülerek 32.000 µM gefitinib derişimi sağlanmıştır. Bu çözelti %1 oranında gefitinib-DMSO çözeltisini içerecek şekilde DMEM ile seyreltilmiştir. Böylece 320 µM gefitinib örneği elde edilmiştir. 100 µL olarak ekilen hücre kuyucuklarına 100 µL örnek eklendiğinde maksimum %0,5 DMSO oranına ulaşılmıştır. En derişigi 160 µM olmak üzere DMEM ile seyreltmeler yapılarak 80 µM, 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM dozlarında gefitinib LLC1 ve L929 hücrelerine uygulanmıştır. İnkübasyon süreleri olarak belirlenen 24 sa., 48 sa. ve 72 sa. sonra kuyulara 25 µL MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saat bekletilmek üzere tekrar inkübatöre yerleştirilmiştir. Bu aşamayı takiben 80 µL %45'lik dimetilformamid (DMF) içinde çözülmüş %23 SDS (pH=4,7) eklenmiştir. 16 saat 37°C etüvde inkübe edilen plakların 570 nm'de absorbansları spektrometre ile ölçülerek sitotoksik etki kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Gefitinibin LLC-1 ve L929 hücre hatları için IC₂₀, IC₅₀ ve IC₈₀ değerleri hesaplanmıştır. Her iki hat için de ortak bir optimal doz belirlenmiştir.

Sağlıklı hücrede yardımcı maddelerin hücre canlılığına etkisini gözlemlemek amacıyla L929 hücre hattına gefitinib içermeyen liyofilize nanopartikül (Boş NP), gefitinib içermeyen KTİ (Boş KTİ) ve taşıyıcı (fenilalanin+mannitol) karışımı uygulanmıştır. Boş KTİ ve Boş NP Tablo 3.4'te formülasyon no 12'ye ait üretim parametreleriyle gefitinib içermeyen hazırlanmıştır. Liyofilize edilen Boş KTİ ve Boş NP formülasyonları gefitinib içermesi halinde 240 µM gefitinib içerecek miktarda yardımcı maddeyi içerecek şekilde tartılmıştır. 1,2 mL DMEM içerisinde disperse edildikten sonra 5 dk. süreyle sonikasyona tabi tutulmuşlardır ve hazırlanan örnekler DMEM ile seyreltilerek en derişikten seyreltiğe doğru L929 hücrelerine

uygulanmıştır. Kuyucuklara örnek eklendiğinde 1/2 oranında seyrelme olduğu göz önünde bulundurulmuştur. Gefitinib için uygulanan MTT prosedürü tekrarlanarak her derişimin 24 sa., 48 sa. ve 72 sa. noktalarında hücre canlılıkları kaydedilmiştir.

Kanserli hücrede KTİ formülasyonlarının hücre canlılığına etkisini gözlemlenmek amacıyla LLC-1 hücrelerine KTİ, gefitinib ve kontrol grubu olarak boş KTİ örnekleri hazırlanmıştır. 2,15 mg gefitinib 0,2 mL DMSO içerisinde çözülerek 24.000 μ M gefitinib derişimi sağlanmıştır. Bu çözelti %1 oranında gefitinib-DMSO çözeltisini içerecek şekilde DMEM ile seyreltilmiştir. Böylece 240 μ M gefitinib örneği elde edilmiştir. 240 μ M gefitinib içerecek ağırlıkta KTİ ve 240 μ M gefitinib içerecek ağırlıkta yardımcı madde içeren Boş KTİ tartılmış ve 1,2 mL DMEM içerisinde disperse edilerek 5 dk. süreyle sonikasyona tabi tutulmuştur. Örnekler hücre kuyucuklarına eklendiğinde 1/2 oranında seyrelme sağlanmıştır ve en derişigi 120 μ M olmak üzere DMEM ile seyrelmeler yapılarak 60 μ M, 30 μ M, 15 μ M, 7,5 μ M, 3,75 μ M ve 1,875 μ M derişimlerinde örnekler LLC1 hücrelerine uygulanmıştır. MTT prosedürü tekrarlanarak her derişimin 24 sa., 48 sa. ve 72 sa. noktalarında hücre canlılıkları kaydedilmiştir.

3.12.2. Hücre İçine Alım

Hücre içine alımın gösterilebilmesi için LLC1 hücrelerine Nil kırmızısı boyası yüklü nanopartikül formülasyonu (NK-NP), Nil kırmızısı yüklü KTİ formülasyonu (NK-KTİ) ve ham Nil kırmızı (NK) uygulanmıştır. 24 kuyucuklu plakalara ekilen LLC1 hücreleri %80 yoğunluğa ulaştığında 15 μ M gefitinibe eşdeğer Nil kırmızısı taşıyan nanopartikül, KTİ ve Nil kırmızısı eklenmiştir. 2 saat sonra hücreler tripsinize edilip kaldırılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Takiben akım sitometri cihazında hücre içinde Nil kırmızısı taşıyan hücre miktarı yüzdesi ve ortalama floresan yoğunluğu cinsinden ölçülmüştür. Muamele edilmemiş hücrelerin otofloresans emisyonu kontrol olarak kullanılmıştır.

NK-NP, NK-KTİ ve NK ile inkübe edilen LLC1 hücreleri 2 saatlik inkübasyonun ardından 50xg'de 3 dakika süreyle sitosantrüfüj edilmiştir. Hücreler %4 paraformaldehit ile sabitlenerek ve 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile zıt boyanmıştır. Görüntüler floresan mikroskopisi (Olympus, Center Valley) ile alınmış

ve ImageJ Fiji Yazılımı (NIH) ile işlenmiştir. Floresan mikroskobu altında DAPI ve Nil kırmızı görüntüleri alınarak Nil kırmızısı boyasının hücre içinde görüntüsünün alınabilmesi amaçlanmıştır.

3.13. İstatistiksel Analiz

Tez kapsamında elde edilen veriler çeşitli istatistiksel yöntemlerle analiz edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm SS cinsinden verilmiş, analitik validasyon için VK değerleri hesaplanmıştır. İki ortalamanın karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi, birden çok grubun karşılaştırılmasında öncelikle ANOVA testi, takiben Bonferroni post-hoc analizi yapılarak gruplar arası farklılıklar KaleidaGraph® yazılımı ile hesaplanmıştır. $p < 0,05$ olan durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

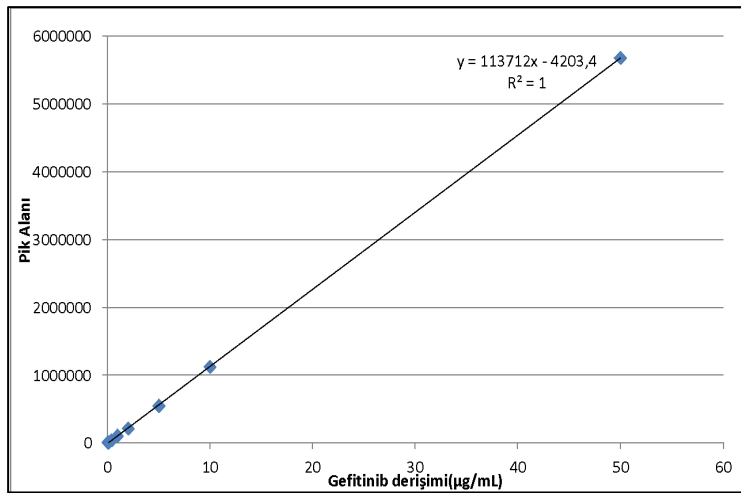
4. BULGULAR

4.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini

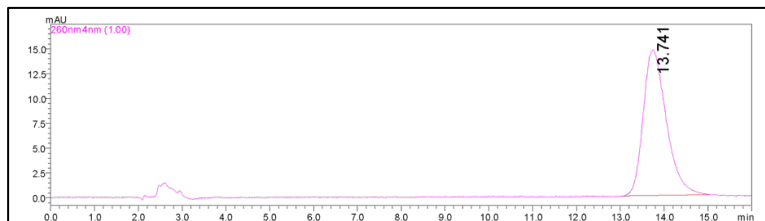
4.1.1. Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Çözücü Olarak Asetonitrilin Kullanılması

ACI analizlerinde ve KTİ'nin gefitinib içeriğinin ölçümünde kullanılmak üzere asetonitril çözücü ortamında gefitinibin 0,04 µg/mL, 0,08 µg/mL, 0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL 5 µg/mL, 10 µg/mL ve 50 µg/mL derişimlerinde kalibrasyon örnekleri hazırlanmıştır. Stok ve seyreltmelerin tamamında asetonitril kullanılmıştır. Örnekler Bölüm 3.2'de açıklanan HPLC metodu ile analiz edilmiş ve artan derişimlerdeki pik alanlarına karşı korelasyon grafiğine, regresyon analizi sonucu elde edilen regresyon denklemine ve determinasyon katsayısı (R^2)'na Şekil 4.1'de yer verilmiştir. 5 µg/mL derişimdeki kalibrasyon örneğine ait 260 nm'deki kromatogram ve alıkonma zamanı Şekil 4.2'de verilmiştir.



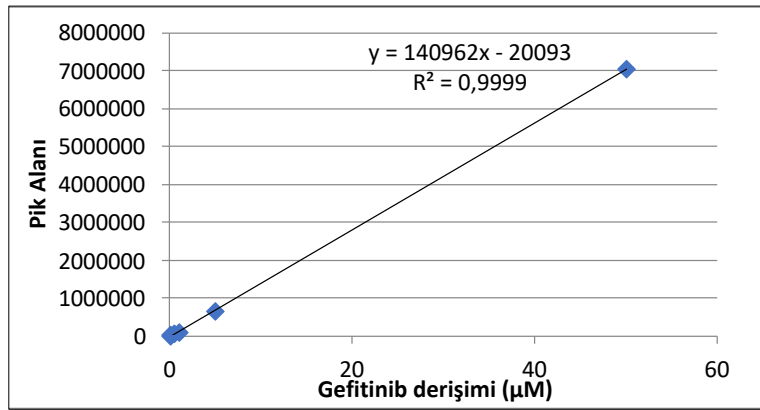
Şekil 4.1. Gefitinibin asetonitril ortamında kalibrasyon doğrusu ve denklemi.



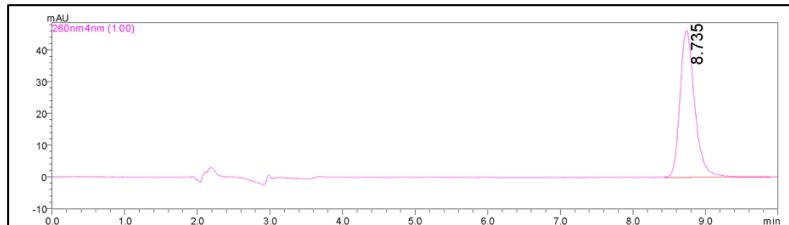
Şekil 4.2. 5 µg/mL gefitinibin asetonitril ortamında 260 nm'de alınmış kromatogramı ve alıkonma zamanı.

Çözücü Olarak PBS (pH=7,4) Kullanılması

Çözünürlük testinde kullanılacak olan PBS ortamında kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Asetonitrilde çözülen 100 ppm gefitinib stoğu üzerinden PBS ile seyreltmeler yapılarak 50 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL ve 0,05 µg/mL derişimlerinde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır ve HPLC analizleri yapılmıştır. Şekil 4.3'te elde edilen kalibrasyon denklemi ve determinasyon katsayısı verilmiştir. Şekil 4.4'te PBS ile seyreltilmiş 5 µg/mL gefitinibe ait 260 nm'deki kromatogram görüntüsü ve alıkonma zamanına yer verilmiştir.



Şekil 4.3. Gefitinibin PBS (pH=7,4) ortamında kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

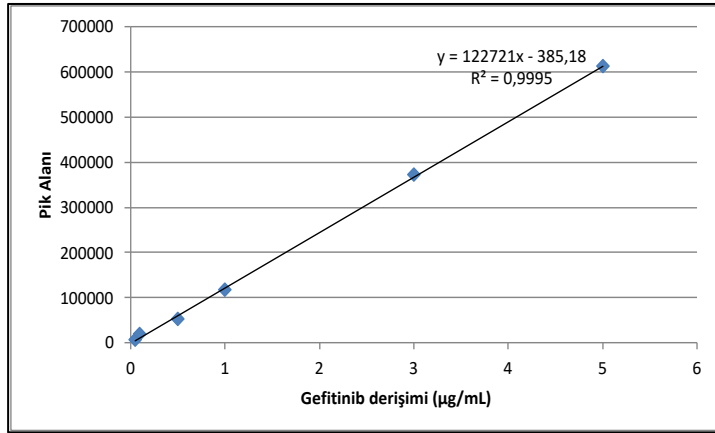


Şekil 4.4. 5 µg/mL gefitinibin PBS ortamında 260 nm'de alınmış kromatogramı ve alıkonma zamanı.

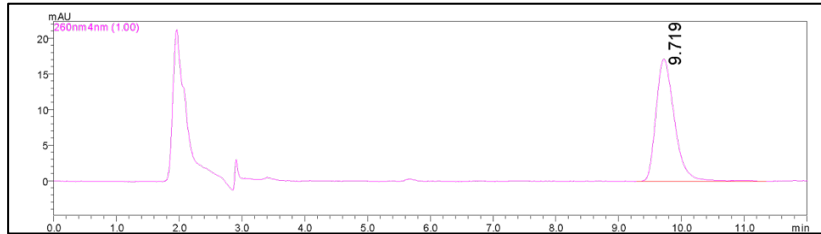
Çözücü Olarak SLF Kullanılması

In vitro salım deneyinde kullanılmak amacıyla SLF ortamında kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Asetonitrilde çözülen 50 µg/mL gefitinib stoğu üzerinden SLF ile seyreltmeler yapılarak 5 µg/mL, 3 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,1 µg/mL ve 0,05 µg/mL derişimlerinde kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır ve HPLC analizleri yapılmıştır. Şekil 4.5'te elde edilen kalibrasyon denklemi ve determinasyon katsayısı

verilmiştir. Şekil 4.6’da SLF ile seyreltilmiş 3 µg/mL gefitinibe ait 260 nm’deki kromatogram görüntüsü ve alıkonma zamanına yer verilmiştir.



Şekil 4.5. Gefitinibin SLF ortamında kalibrasyon doğrusu ve denklemi.



Şekil 4.6. 3 µg/mL gefitinibin SLF ortamında 260 nm’de alınmış kromatogramı ve alıkonma zamanı.

4.1.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Doğruluk (Accuracy)

Düşük, orta, yüksek olarak seçilen üç farklı derişimde örneklerin, elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak derişimleri ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Tüm derişimlerde % varyasyon katsayısı %2’nin altında bulunmuştur.

Tablo 4.1. Gefitinibin 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 40 µg/mL derişimleri için doğruluk değerleri (n=3).

| | Eklenen Derişim (µg/mL) | | | Tayin Edilen Derişim (µg/mL) | | | % Geri Kazanılan | | |
|--|-------------------------|----|----|------------------------------|--------|--------|------------------|---------|---------|
| | 1 | 10 | 40 | 0,990 | 9,974 | 40,162 | 99,019 | 99,745 | 100,406 |
| | 1 | 10 | 40 | 1,004 | 10,132 | 40,258 | 100,414 | 101,316 | 100,646 |

| | | | | | | | | | |
|----------|---|----|----|-------|--------|--------|---------|---------|---------|
| | 1 | 10 | 40 | 1,029 | 9,920 | 40,162 | 102,889 | 99,203 | 100,405 |
| Ortalama | | | | 1,008 | 10,008 | 40,194 | 100,774 | 100,088 | 100,486 |
| SS | | | | 0,016 | 0,090 | 0,045 | 1,600 | 0,896 | 0,113 |
| %VK | | | | 1,588 | 0,895 | 0,112 | 1,588 | 0,895 | 0,113 |

Kesinlik

ICH Q2 kılavuzunda kesinlik parametrelerinden olan tekrar edilebilirlik ve ara kesinlik, aritmetik ortalama, standart sapma (SS), varyasyon katsayısı (VK) sonuçları ile değerlendirilmiştir.

Tekrar edilebilirlik

Yüksek ve düşük derişimler olarak seçilen 40 µg/mL ve 1 µg/mL derişimlerde hazırlanan örnekler art arda 6 ölçüme tabi tutulmuştur. Sonuçlara ait varyasyon katsayılarının %2'den küçük olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Gefitinibin 1 µg/mL ve 40 µg/mL derişimlerinde tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).

| Gefitinib derişimi (µg/mL) | Tayin Edilen Derişim (µg/mL) | Tayin Edilen Ortalama Derişim ± SS (µg/mL) | % VK |
|----------------------------|------------------------------|--|-------|
| 1 | 0,992 | 0,997±0,016 | 1,605 |
| | 0,968 | | |
| | 1,100 | | |
| | 0,996 | | |
| | 1,010 | | |
| | 1,006 | | |
| 40 | 40,140 | 40,210±0,078 | 0,194 |
| | 40,170 | | |
| | 40,178 | | |
| | 40,272 | | |
| | 40,163 | | |

| | | | |
|--|--------|--|--|
| | 40,340 | | |
|--|--------|--|--|

Ara Kesinlik

Düşük, orta ve yüksek derişimlerde sırasıyla 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 40 µg/mL gefitinib içeren örnekler üç farklı günde tekrar hazırlanarak analiz edilmiştir (Tablo 4.3). Gün içi ve günler arası olarak değerlendirilen varyasyon katsayıları %2'nin altındadır.

Tablo 4.3. Gefitinibin 1 µg/mL, 10 µg/mL ve 40 µg/mL derişimlerinde gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları (n=3).

| Gefitinib derişimi (µg/mL) | Gün İçi | | Günler Arası | |
|----------------------------|--|-------|--|-------|
| | Tayin Edilen Ortalama Derişim ± SS (µg/mL) | %VK | Tayin Edilen Ortalama Derişim ± SH (µg/mL) | %VK |
| 1 | 1,008±0,016 | 1,588 | 0,986±0,019 | 1,943 |
| 10 | 10,009±0,090 | 0,895 | 9,902±0,010 | 1,007 |
| 40 | 40,194±0,045 | 0,113 | 40,155±0,153 | 0,381 |

Özgüllük

HA, HSA, DPPC, fenilalanin, mannitol, Tween 20, SLF ortamı, PBS ortamı; gefitinib miktar tayininde kullanılan metot ile analiz edilmiştir. Gefitinibin pik verdiği alıkonma zamanında herhangi bir pik görülmemesi, HPLC metodunun özgüllüğünü göstermektedir.

Duyarlılık

Shimadzu sistemi üzerinden yapılan hesaplamalar sonucunda gefitinibin teşhis sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 0,128 µg/mL ve 0,386 µg/mL olarak bulunmuştur.

Dayanıklılık

Analiz süresi boyunca gefitinibin dayanıklılığı gösterilmek amacıyla 50 µg/mL derişiminde örnek hazırlandıktan hemen sonra, 6. saatte, 12. saatte ve 24. saatte analiz edilmiştir (Tablo 4.4). Yapılan analizlerde elde edilen derişimler, taze hazırlanan örneğin derişimi ile Mann-Whitney U testi yardımıyla karşılaştırılmış ve farklılıkların istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür ($p>0,05$). Bu durum, etkin maddenin analiz süresi boyunca dayanıklı olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.4. 50 µg/mL gefitinib örneğinin analiz süresi boyunca dayanıklılığı (n=6).

| Zaman (saat) | Eklenen Derişim (µg/mL) | Tayin Edilen Derişim (µg/mL) ±SS |
|--------------|-------------------------|----------------------------------|
| 0 | 50 | 49,563± 0,084 |
| 6 | 50 | 50,073± 0,090 |
| 12 | 50 | 50,149± 0,057 |
| 24 | 50 | 50,607± 0,073 |

Sistem Uygunluk Testleri

Gefitinibin HPLC metoduyla ölçümüne ait sistem uygunluk faktörleri olan kapasite faktörü, teorik tabaka sayısı ve simetri faktörü hesaplanmıştır (Tablo 4.5). Simetri faktörünün 2'nin altında ve kapasite faktörünün 2000'in üzerinde olması sistem uygunluk hedeflerini karşılamaktadır.

Tablo 4.5. Gefitinibin ACN ortamında HPLC tayin metodunun sistem uygunluk değerleri.

| | |
|---------------------------|----------|
| Kapasite faktörü (k') | 4,285 |
| Teorik tabaka sayısı (N) | 3330,372 |
| Simetri faktörü (T) | 1,407 |

4.2. Formülasyon Çalışmaları Sonucu Elde edilen Nanopartiküllerin Karakterizasyonları

4.2.1. Yüzey Aktif Madde Kullanımının Partikül Boyutu Dağılımı ve Zeta Potansiyel Üzerine Etkisi

Yüzey aktif maddelerin partikül büyüklüğüne etkisini gözlemlemek için yapılan çalışmada elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyel değerleri 0,22 µm CA membran filtreden süzülmeden önce ve süzildükten sonra DPPC, HSPC ve oleik asit için sırasıyla Tablo 4.6, 4.7 ve 4.8’de verilmiştir. Bütün tablolarda yüzey aktif madde kullanılmadan aynı yöntemle hazırlanarak elde edilen partikül boyutu ve zeta potansiyel değerlerine de yer verilmiştir. DPPC ve HSPC yüzey aktif maddelerinin derişimi arttıkça partikül boyutlarında azalma gözlenmiştir. Bunun aksine oleik asitin derişimi arttıkça partikül boyutlarında da artış kaydedilmiştir. Oleik asit miktarının artmasıyla daha tek düze (monodispers) partiküllerin elde edilmesi PDI değerindeki azalmaya bağlı olarak gözlenmiştir. DPPC ve HSPC kullanımında ise en yüksek tek düzelik ve dolayısıyla en düşük PDI değeri orta düzeyde yüzey aktif madde içeren nanopartiküller ile elde edilmiştir. Süzme işleminin HSPC’nin orta düzeyi hariç tüm yüzey aktif maddelerin bütün derişimlerinde partikül boyutu ve PDI değerlerinde azalma sağladığı gözlenmiştir. Yüzey aktif madde kullanılmayan formülasyon ile karşılaştırıldığında, kullanılan bütün yüzey aktif maddelerin nanopartikül boyutunda küçülmeye yol açtığı görülmüştür. Yüzey aktif madde kullanımının 130 nm altında nanopartiküllerin eldesi için gerekli olduğuna karar verilmiştir. Zeta potansiyelin yüzey aktif madde derişimlerine bağlı düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir. 130 nm’nin altında en tekdüze nanopartikül eldesini sağladığı için 1 mg/mL DPPC yüzey aktif maddesi formülasyon çalışmalarının ilerleyen aşamalarında kullanılmıştır.

Tablo 4.6. DPPC’nin partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyele etkisi (n=3, ortalama ± SS).

| DPPC derişimi (mg/mL) | Ortalama partikül boyutu (nm) | PDI | Zeta potansiyeli (mV) | Filtre (0,22 µm CA) |
|------------------------------|--------------------------------------|-------------|------------------------------|----------------------------|
| 0 | 215,4±2,89 | 0,361±0,011 | 39,7±0,57 | - |
| 0 | 131,6±1,834 | 0,265±0,008 | 25,7±0,45 | + |
| 2 | 100,8±3,749 | 0,351±0,009 | 44,9±1,16 | - |
| 2 | 94,04±1,160 | 0,302±0,040 | 30,2±1,85 | + |
| 1 | 126,3±0,378 | 0,236±0,016 | 44,2±1,04 | - |
| 1 | 115,7±1,002 | 0,202±0,027 | 44,7±1,31 | + |
| 0,2 | 144,0±1,908 | 0,396±0,013 | 45,1±1,78 | - |

| | | | | |
|-----|-------------|-------------|-----------|---|
| 0,2 | 113,5±3,179 | 0,319±0,067 | 46,3±2,29 | + |
|-----|-------------|-------------|-----------|---|

Tablo 4.7. HSPC'nin partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyele etkisi (n=3, ortalama ± SS).

| HSPC derişimi (mg/mL) | Ortalama partikül boyutu (nm) | PDI | Zeta potansiyeli (mV) | Filtre (0,22 µm CA) |
|-----------------------|-------------------------------|-------------|-----------------------|---------------------|
| 0 | 215,4±2,890 | 0,361±0,011 | 39,7±0,570 | - |
| 0 | 131,6±1,834 | 0,265±0,008 | 25,7±0,450 | + |
| 2 | 178,1±6,332 | 0,418±0,027 | 42,5±1,780 | - |
| 2 | 159,0±7,032 | 0,277±0,009 | 44,3±0,737 | + |
| 1 | 130,5±2,721 | 0,236±0,016 | 44,2±1,910 | - |
| 1 | 161,9±3,647 | 0,275±0,003 | 43,4±0,153 | + |
| 0,2 | 187,1±7,100 | 0,428±0,016 | 42,1±2,460 | - |
| 0,2 | 93,73±0,510 | 0,267±0,011 | 26,6±3,760 | + |

Tablo 4.8. Oleik asitin partikül boyutu dağılımı ve zeta potansiyele etkisi (n=3, ortalama ± SS).

| Oleik asit derişimi (mg/mL) | Ortalama partikül boyutu (nm) | PDI | Zeta potansiyeli (mV) | Filtre (0,22 µm CA) |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------|-----------------------|---------------------|
| 0 | 215,4±2,890 | 0,361±0,011 | 39,7±0,57 | - |
| 0 | 131,6±1,834 | 0,265±0,008 | 25,7±0,45 | + |
| 2 | 192,3 ±1,361 | 0,134±0,020 | 47,8±2,40 | - |
| 2 | 176,9±2,577 | 0,080±0,024 | 49,8±1,79 | + |
| 1 | 190,8±2,194 | 0,191±0,023 | 47,8±1,21 | - |
| 1 | 166,4±3,758 | 0,120±0,003 | 45,8±1,25 | + |
| 0,2 | 162,9±1,159 | 0,272±0,003 | 42,6±2,15 | - |
| 0,2 | 120,0±1,007 | 0,202±0,027 | 46,5±2,19 | + |

4.2.2. İşlem Parametrelerinin Partikül Boyutu Dağılımına Etkisi

Nab™ teknolojisi ile üretilen HSA-gefitinib nanopartikülleri için kritik işlem parametreleri; organik faz türü, organik faz/su fazı, gefitinib/HSA oranı, homojenizasyon sayısı, homojenizasyon sıcaklığı, homojenizasyon basıncı ve yüzey

aktif madde varlığı olarak belirlenmiştir. Yüzey aktif madde olarak organik faza toplam hacimde derişimi 1 mg/mL olacak şekilde DPPC eklenmiştir. Homojenizasyon işleminde High shear fluid processor (Newton, Massachusetts) cihazı kullanılmıştır. Farklı işlem parametreleri kullanılarak elde edilen partikül boyutu dağılım sonuçlarına Tablo 4.9'da yer verilmiştir. Formülasyon 7, 8 ve 9 karşılaştırıldığında yüksek basınçlı ortamda (25000 PSI) homojenizasyon tur sayısına bağlı olarak partiküllerin agregasyonu sonucu boyut ve PDI artışı gözlenirken, formülasyon 1, 2 ve 3 karşılaştırıldığında daha düşük basınçta (20000 PSI) en yüksek tur sayısında en küçük partikül boyutu ve PDI değerlerine sahip partiküller elde edilmiştir. Formülasyon 3, 4 ve 5'te ise seçilen en düşük basınçta (15000 PSI) en küçük partikül boyutu ve PDI'nın 20. turda elde edildiği, 30. turda ise partiküllerin agregasyona uğradığı gözlenmiştir. Formülasyon 10'da işlem esnasında oluşabilecek ısınmaya karşı soğutma haznesine buz yerleştirilmiş ve homojenizasyon işlemi sonucunda faz ayrışması gözlenmiştir. Pang X ve arkadaşlarının çalışmasına göre daha düşük organik faz/toplam hacim oranlarında (%1,96) en düşük HSA-gefitinib nanopartikül boyutunun elde edildiği gözlenmektedir (53). Tez kapsamında bu organik faz oranında yüzey aktif madde olarak DPPC kullanılarak sabit sıcaklıkta (50 °C) üretim yapılmış ve 150 nm altında partiküller elde edilmiştir (Formülasyon no: 12).

Tablo 4.9. Nab™ teknolojisini ile üretilen gefitinib-HSA nanopartikülleri için kritik işlem parametreleri ve elde edilen partikül boyutu dağılımları (n=3, ortalama±SS).

| Formülasyon | Organik faz | | Homojenizasyon | | | | Partikül boyutu (nm) | PDI | |
|-------------|-------------|-------------------|-------------------------------|----------|------------|--------------|----------------------|--------------|----------------------------|
| | HSA/gef | Etanol: kloroform | %Organik faz hacmi/topm hacim | Sıcaklık | Tur sayısı | Basınç (PSI) | | | Yüzey aktif madde varlığı* |
| 1 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 10 | 20000 | - | 1181±356,0 | 0,885±0,111 |
| 2 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 20 | 20000 | - | 1573±108,5 | 0,441±0,023 |
| 3 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 30 | 20000 | - | 231.2±31,91 | 0,293±0,025 |
| 4 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 10 | 15000 | - | 1196±530,5 | 0,706±0,225 |
| 5 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 20 | 15000 | - | 159.1 ±11,23 | 0,401±0,061 |
| 6 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 30 | 15000 | - | 1681±358,1 | 1,000±0,000 |
| 7 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 10 | 25000 | - | 251.0±14,56 | 0,348±0,032 |
| 8 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 20 | 25000 | - | 281.3 ±9,921 | 0,470±0,005 |
| 9 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | 25 °C | 30 | 25000 | - | 458.1±68,38 | 0,918±0,184 |
| 10 | 9,83 | 4:6 | 6,46 | -10 °C | 10 | 25000 | - | Ölçülemedi. | |
| 11 | 6 | 1:9 | 1,96 | 50 °C | 15 | 20000 | - | 421,3±23,29 | 0,468±0,103 |
| 12 | 6 | 1:9 | 1,96 | 50 °C | 15 | 20000 | + | 117,1±20,21 | 0,389±0,020 |

*Yüzey aktif madde olarak 5:1 (DPPC:gef) oranında DPPC kullanılmıştır.

4.2.3. HA Kaplama Yöntemi ve Zeta Potansiyel Üzerine Etkisi

HA kaplaması Chen ve ark.'nın çalışmasına göre %5 HA:albümin oranında satürasyona ulaştığı göz önüne alınarak bu oranda HA, 1 mg/mL DPPC içeren gefitinib-HSA nanopartikül süspansiyonuna eklenmiştir ve 750 rpm'de 30 dk. karıştırılmıştır (52). HA eklemesinden önce ve sonra elde edilen partikül boyutları ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.10'da sunulmuştur. HA kaplaması ile partikül boyutunda artış gözlenirken zeta potansiyeli HA'nın negatif yükü nedeniyle negatifleşmiştir. Hedeflenen partikül boyutuna ulaşmak amacıyla formülasyon CA membran filtreden (0,22 µm) süzülükten sonra 114,5±10,870 nm boyutunda negatif yüklü HA-HSA-gefitinib nanopartikülleri elde edilmiştir.

Tablo 4.10. gefitinib-HSA nanopartikülünün HA bağlanmadan önceki ve bağlandıktan sonraki partikül boyutu dağılımları ve zeta potansiyeli (n=3, ortalama±SS).

| | Ortalama partikül boyutu (nm) | PDI | Zeta potansiyel (mV) |
|---|--------------------------------------|-------------|-----------------------------|
| gefitinib-HSA NP | 117,1±20,210 | 0,389±0,020 | 19,3±0,681 |
| HA-gefitinib-HSA NP | 326,8±2,476 | 0,423±0,028 | -24,5±0,289 |
| HA-gefitinib-HSA nanopartikülleri (süzülme sonrası) | 114,5±10,870 | 0,390±0,035 | -24,6±1,370 |

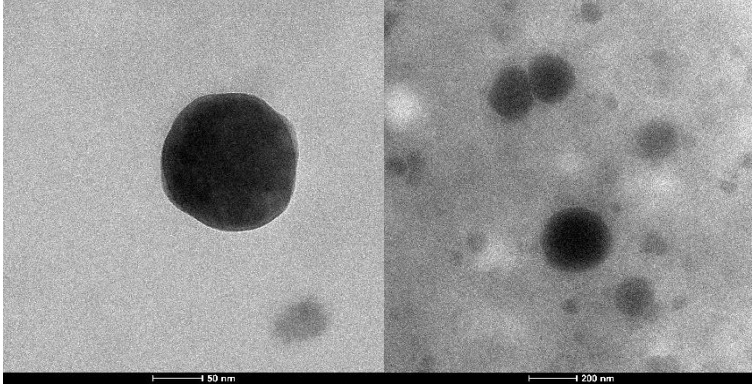
4.2.4. Enkapsülasyon Etkinliği

Tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerde gefitinibin enkapsülasyon etkinliği (%EE) Eşitlik 3.4'e göre hesaplandığında %97,44 ± %0,3 (ortalama ± SS, n=3) olarak bulunmuştur. Gefitinibin oldukça büyük oranda HSA nanopartikülleri içine hapsediği gösterilmiştir.

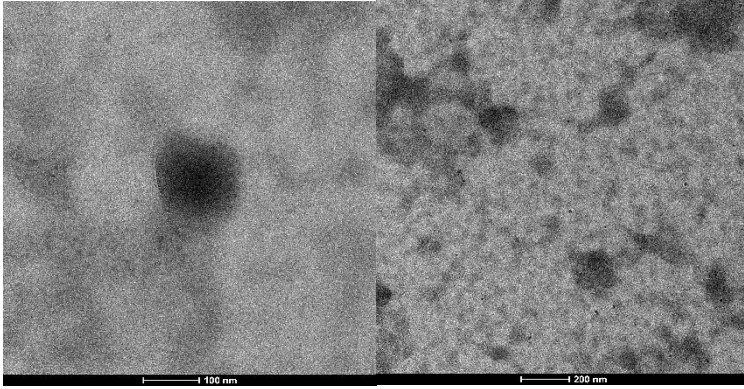
4.2.5. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Elde edilen nanopartiküllerin yüzey morfolojileri ve boyutları CTEM ile görüntülenmiştir. Aynı yöntemle hazırlanan ve gefitinib içeren (HA-gefitinib-HSA-

NP) ve içermeyen (HA-HSA-NP) liyofilize nanopartiküllerinin görüntüleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Nanopartiküllerin HSA nanopartikülleriyle ilgili literatürlere uyumlu olarak küresel yapıya sahip olduğu görülmüştür (52, 59). Lazer difraksiyon ölçümleri ile uyumlu olarak 50-250 nm aralığında nanopartiküller gözlenmiştir.



Şekil 4.7. HA-gefitinib-HSA-NP’ye ait TEM görüntüleri.



Şekil 4.8. HA-HSA-NP’ye ait TEM görüntüleri.

4.3. Farklı Taşıyıcıları İçeren Kuru Toz İnhalerlerin Aerodinamik Parametreleri

Taşıyıcı içermeyen ve mannitol, laktoz, sükroz, trehaloz, lösin ve fenilalanini taşıyıcı olarak tek başına ya da Tablo 4.1’de belirtilen oranlarda içeren tozların aerodinamik parametreleri (%ED, KOAÇ, İPD ve İPF) hesaplanmıştır. Taşıyıcıların ED üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı ve tüm formülasyonların %97 üzerinde aerosolize olarak kapsülü terk ettiği gözlenmiştir. KOAÇ değerleri mannitol, laktoz,

lösün, fenilalanin, fenilalanin-lösün, fenilalanin-lösün-mannitol ve fenilalanin-mannitol taşıyıcılarını içeren formülasyonlarda 5 µm altında elde edilmiştir. İPD, kapsüllere tartılabilen toz miktarlarının tozların hacimlerine bağlı olarak farklılık gösterebilmesinden dolayı karşılaştırmada kullanılmamıştır. Bunun yerine tez kapsamında aerodinamik çapı 5 µm'nin altında olan toz miktarını sağlıklı bir şekilde değerlendirebilmek için İPF parametresi karşılaştırmaya tabi tutulmuştur. En yüksek İPF, taşıyıcı olarak fenilalanin ve fenilalanin-mannitol içeren formülasyonlarda sırasıyla 51,2 ve 49,2 olarak hesaplanmıştır. Aerodinamik parametrelere dayanarak tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonuna taşıyıcıların eklenmesinin aerodinamik parametreleri iyileştirdiği ve hedeflenen en düşük KOAÇ ve İPF'nin 7 ve 10 no'lu KTİ formülasyonları ile sağlandığı gözlenmektedir. Stabilite ve *in vitro* hücre kültürü deneylerinde 10 numaralı KTİ formülasyonu kullanılmıştır. Fenilalaninin tek taşıyıcı olarak kullanıldığı formülasyonlarda (7 numaralı formülasyon) dansitenin çok düşük ve dolayısıyla toz hacminin çok yüksek olmasından ötürü kapsüle tartılabilen etkin madde miktarı oldukça azdır. Tartılabilen dozun hedeflenen gefitinib dozunun ve ACI deneylerinde tayin sınırının altında kalabilme riski taşıdığı ve mannitol-fenilalanin kombinasyonunu içeren 10 numaralı formülasyon *in vitro* salım deneyleri sonucu daha yüksek miktarda % gefitinib salımı gösterdiği için stabilite ve *in vitro* hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tablo 4.11. Farklı taşıyıcılarla üretilen KTI formülasyonlarının aerodinamik parametreleri.

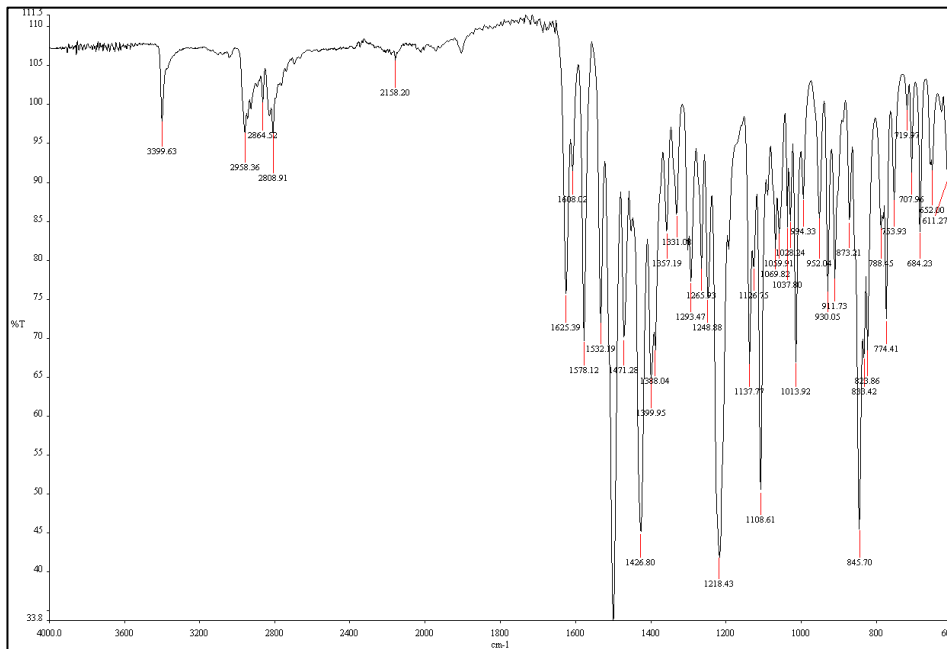
| No | Mannitol (%) | Laktoz (%) | Sükroz (%) | Trehaloz (%) | Lösün (%) | Fenilalanin (%) | EF (%) | KOAÇ (µm) | İPD (µg) | İPF (%) |
|----|--------------|------------|------------|--------------|-----------|-----------------|--------|-----------|----------|---------|
| 1 | - | - | - | - | - | - | 99,6 | 5,11 | 89,14 | 36,1 |
| 2 | 50 | - | - | - | - | - | 98,7 | 4,64 | 26,45 | 37,8 |
| 3 | - | 50 | - | - | - | - | 98,4 | 4,14 | 21,15 | 40,9 |
| 4 | - | - | 50 | - | - | - | 99,4 | 5,61 | 20,40 | 20,4 |
| 5 | - | - | - | 50 | - | - | 98,8 | 5,18 | 41,50 | 36,5 |
| 6 | - | - | - | - | 50 | - | 97,9 | 4,59 | 20,60 | 38,9 |
| 7 | - | - | - | - | - | 50 | 98,1 | 3,57 | 17,85 | 51,2 |
| 8 | - | - | - | - | 33,33 | 16,67 | 97,9 | 3,69 | 16,25 | 43,1 |
| 9 | 50 | - | - | - | 16,67 | 8,33 | 98,0 | 4,24 | 15,85 | 39,0 |
| 10 | 25 | - | - | - | - | 25 | 97,6 | 3,92 | 24,44 | 49,2 |

4.4. Etkin Madde, Yardımcı Maddeler ve Kuru Toz İnhaler Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

4.4.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Gefitinib, HA, DPPC, liyofilize HSA, fenilalanin, mannitol, boş KTİ formülasyonu ve KTİ formülasyonlarının 600-4000 cm^{-1} dalga boyları aralığında FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 4.9-16'da verilmiştir. Şekil 4.17'de ise bu spektrumların her birinin karşılaştırmalı görüntüsüne yer verilmiştir.

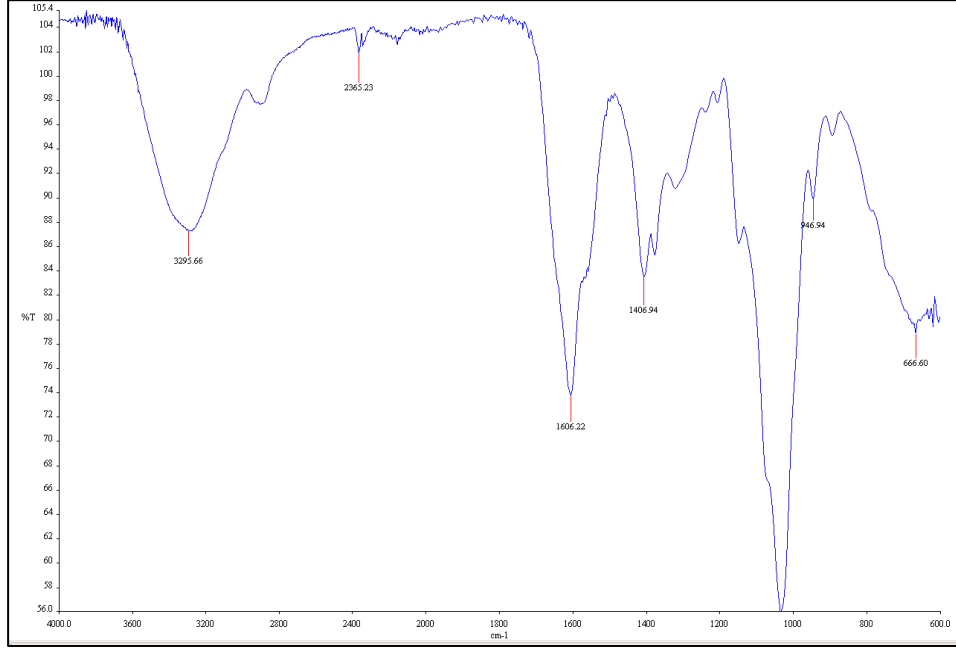
Şekil 4.9'da gefitinibe ait FT-IR spektrumunda gefitinibin fonksiyonel grubu olan NH 3400 cm^{-1} 'de pik görülmektedir. Gefitinibin aril grubundaki CH_2 için 2958 cm^{-1} , C=N için 1625 cm^{-1} ve C=C için 1578 cm^{-1} 'de pikler gözlemlenmektedir. 930 cm^{-1} 'deki pikin varlığı, saf gefitinibin yapısında bulunan bir C-F grubunun varlığını doğrulamaktadır (60).



Şekil 4.9. Gefitinibe ait FT-IR spektrumu.

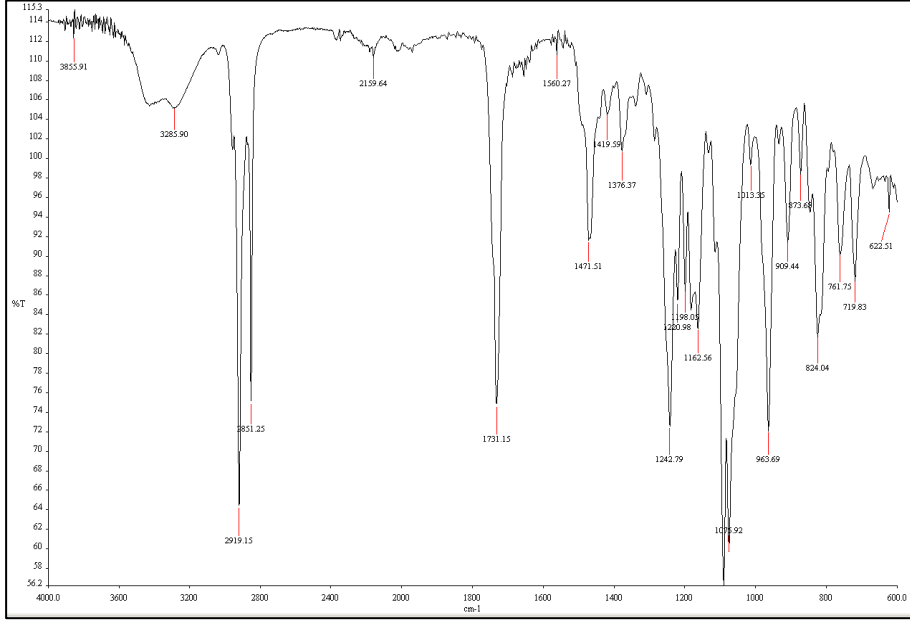
Şekil 4.10'da verilen HA spektrumunda, literatürdeki bulgulara benzer şekilde 3295,66 cm^{-1} 'de hidroksil (tek bağ -OH) ve amino (tek bağ -NH) gruplarının gerilme titreşimiyle oluşan geniş bir pik görülmektedir. Ayrıca, N-asetil (-COCH₃) ve karboksilat (-COO) gruplarındaki karbonil gruplarının simetrik gerilme titreşimi ile

1606 cm^{-1} 'de ve karboksilatın asimetrik gerilme titreşimiyle 1407 cm^{-1} 'de iki keskin pik gözlenmiştir. Ek olarak HA yapısındaki glikozidik (eter) bağlardan ötürü 1040 cm^{-1} 'de keskin bir pike rastlanmıştır (61).



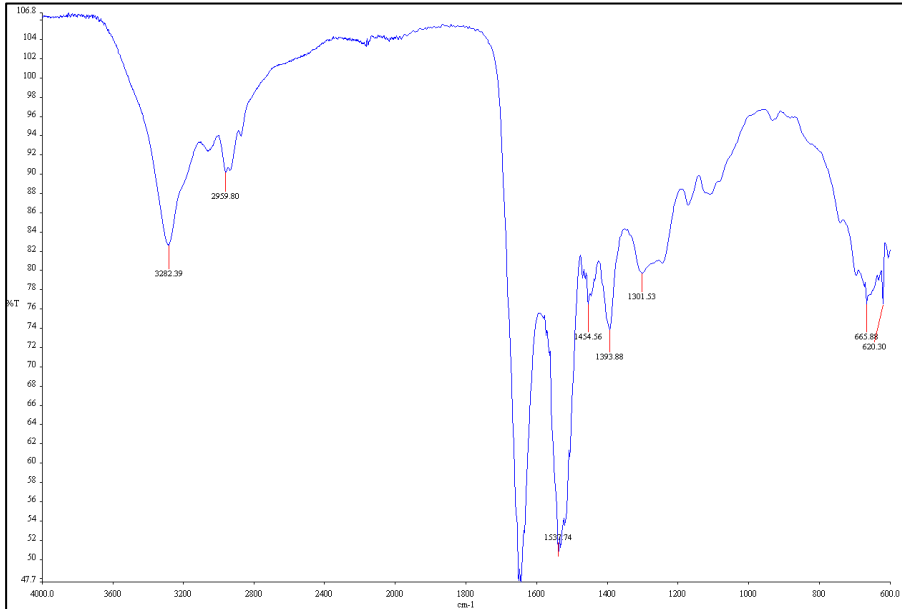
Şekil 4.10. HA'ya ait FT-IR spektrumu.

DPPC'ye ait FT-IR spektrumunda, literatür ile uyumlu olarak, CH_2 antisimetrik gerilme (2919 cm^{-1}), $\text{C}=\text{O}$ gerilme (1731 cm^{-1}) ve PO_2^- çift gerilme bantları (1242 cm^{-1}) gözlenmektedir (62) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. DPPC'ye ait FT-IR spektrumu.

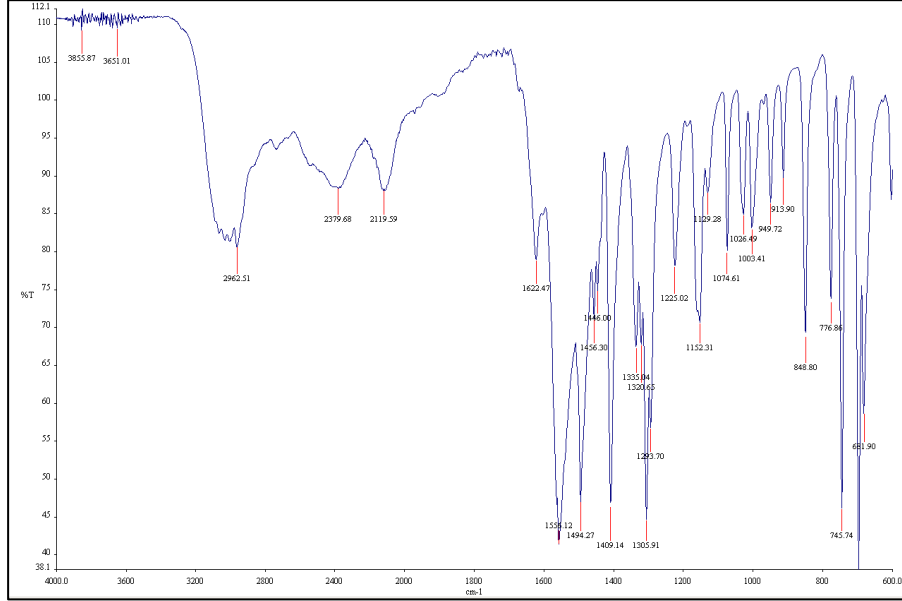
Şekil 4.12'te HSA'ya ait FT-IR spektrumunda amid I ve II pikleri sırasıyla $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ ve $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülmektedir. $3292,39\text{ cm}^{-1}$ 'de hidroksil (tek bağ -OH) grubuna ait pik gözlenmiştir (63).



Şekil 4.12. HSA'ya ait FT-IR spektrumu.

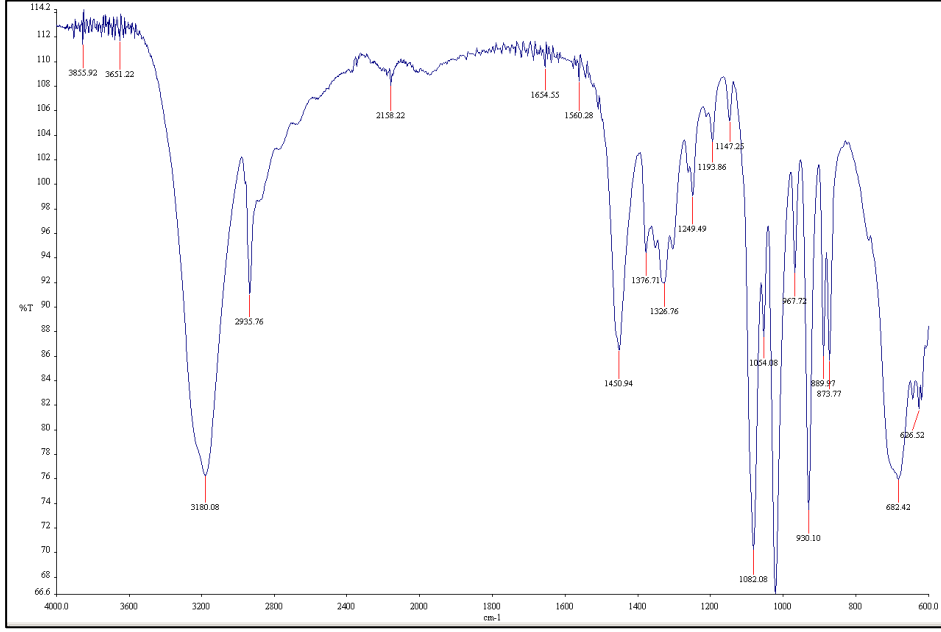
Fenilalanine ait FT-IR spektrumunda 2962 cm^{-1} 'deki pik, $-\text{NH}_2$ 'nin var olduğunu gösteren N-H gerilme titreşimini göstermektedir (Şekil 4.13). 1622 cm^{-1} 'de, aromatik halkanın titreşiminden kaynaklı pik mevcuttur. Yaklaşık 2120 cm^{-1} 'deki

absorpsiyon piki, l-amino asitlerin karakteristik pikidir (64). Yaklaşık 1555 cm^{-1} 'deki absorpsiyon piki ise, karboksil grubunun varlığını göstermektedir. 1152 cm^{-1} 'de de $-\text{NH}_2$ salınım piki görülmektedir (65).



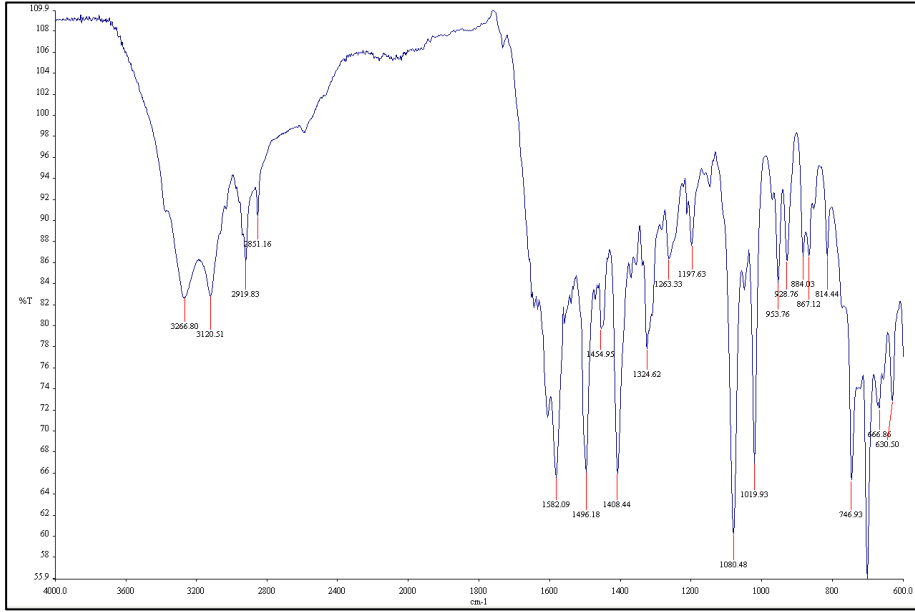
Şekil 4.13. Fenilalanine ait FT-IR spektrumu.

Şekil 4.14'te mannitole ait FT-IR spektrumu verilmiştir. 3180 cm^{-1} 'deki pik –OH gerilme piklerine aitken 2936 cm^{-1} 'de $-\text{CH}$ gerilme piki görülmektedir. $-\text{CH}_2$ makas titreşimleri ise 1450 cm^{-1} 'de pik vermiştir. $1030\text{--}1125\text{ cm}^{-1}$ arasında kalan piklerin primer ve sekonder alkollerin $-\text{CO}$ gerilmelerine ait olduğu görülmektedir (66).

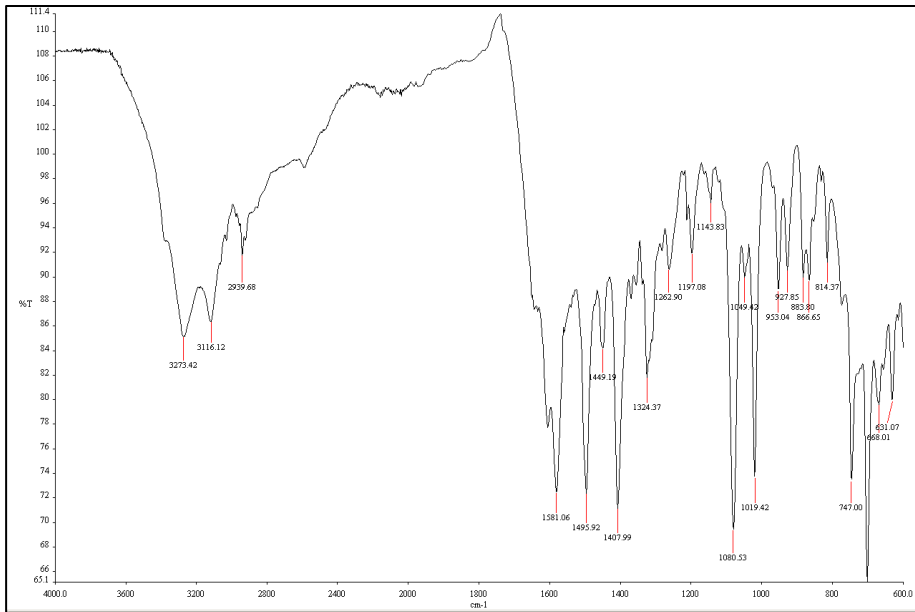


Şekil 4.14. Mannitole ait FT-IR spektrumu.

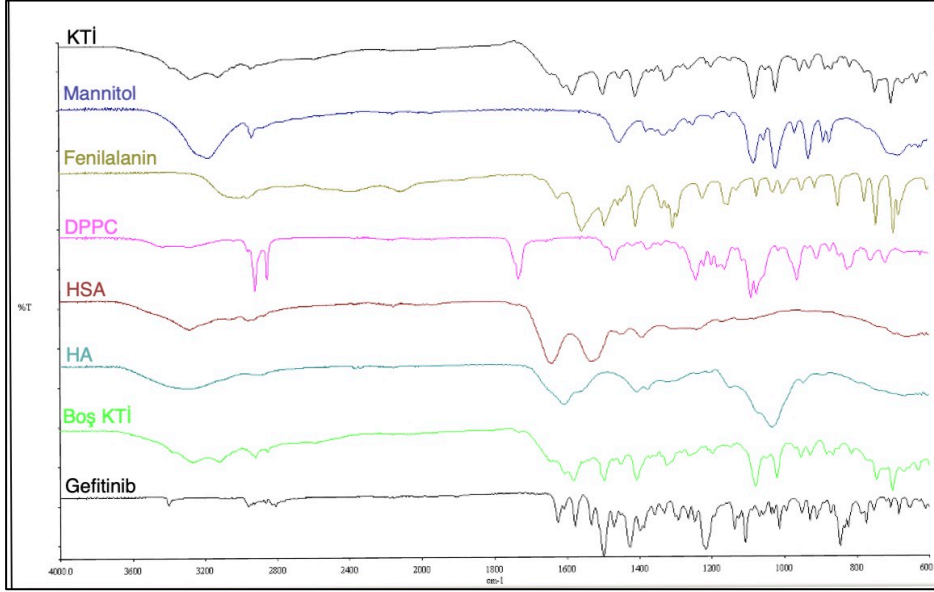
Şekil 4.15 ve Şekil 4.16’da sırasıyla etkin madde içermeyen KTİ formülasyonu (boş KTİ) ve etkin madde içeren KTİ formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları verilmiştir. Şekil 4.17’de ise tüm spektrumların karşılaştırmalı görüntüsü yer almaktadır. Şekil 4.17’de gefitinib içeren ve içermeyen KTİ formülasyonlarında baskın absorpsiyon piklerinin, beklenildiği üzere formülasyonda görece yüksek miktarda bulunan mannitol, fenilalanin ve HSA’ya ait olduğu görülmektedir.



Şekil 4.15. Boş KTİ'ye ait FT-IR spektrumu.



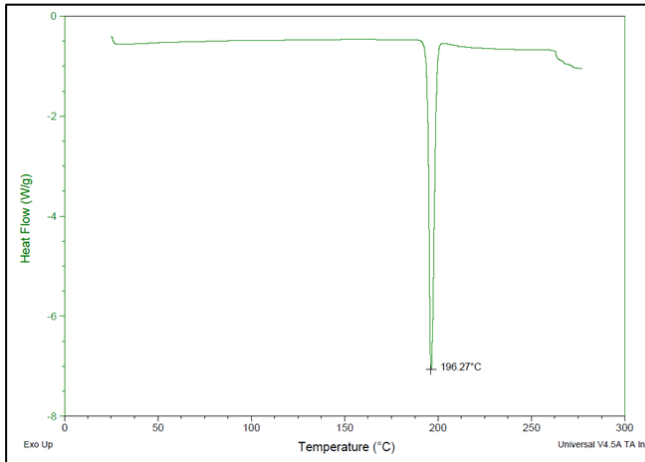
Şekil 4.16. KTİ'ye ait FT-IR spektrumu.



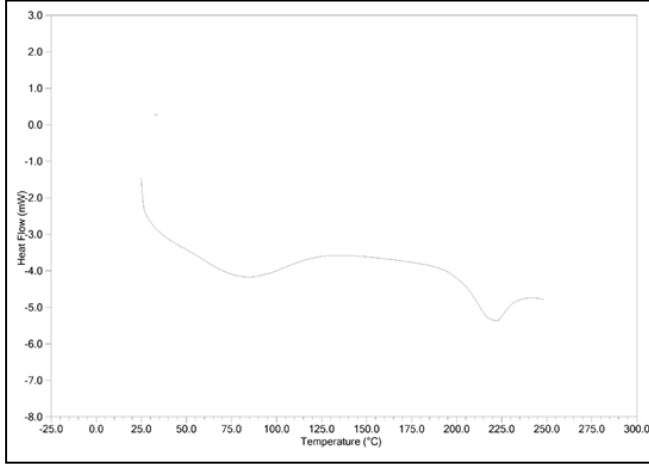
Şekil 4.17. KTI, mannitol, fenilalanin, DPPC, HSA, HA, boş KTI ve gefitinibe ait FT-IR spektrumları.

4.4.2. Differansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC)

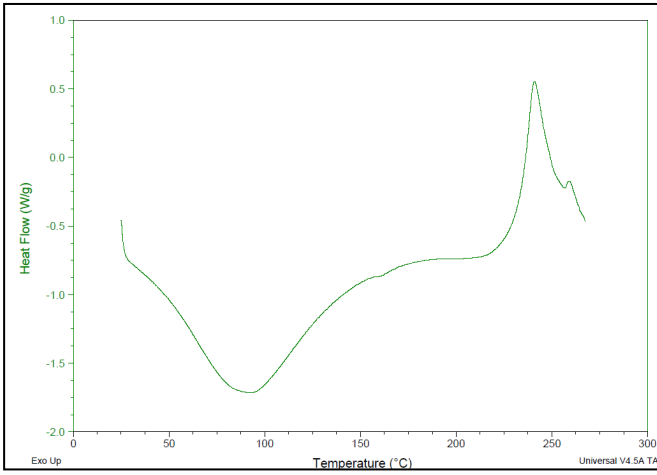
KTI formülasyonundaki gefitinib, HSA, HA, mannitol, fenilalanin ve DPPC maddelerinin termogramları sırasıyla Şekil 4.18-4.23 arasında gösterilmiştir. Boş KTI ve KTI'nin DSC termogramları sırasıyla Şekil 4.24 ve 4.25'te verilmiştir. Gefitinib, HSA, HA, mannitol ve fenilalanin maddelerinin erime pikleri literatür ile uyumludur (67-71). Şekil 4.26'da verilen karşılaştırmalı termogramlar incelendiğinde formülasyondaki gefitinib ve HA maddelerinin erime piklerinin, beklenildiği üzere, taşıyıcı ve HSA'nın erime pikleri tarafından maskelendiği görülmektedir.



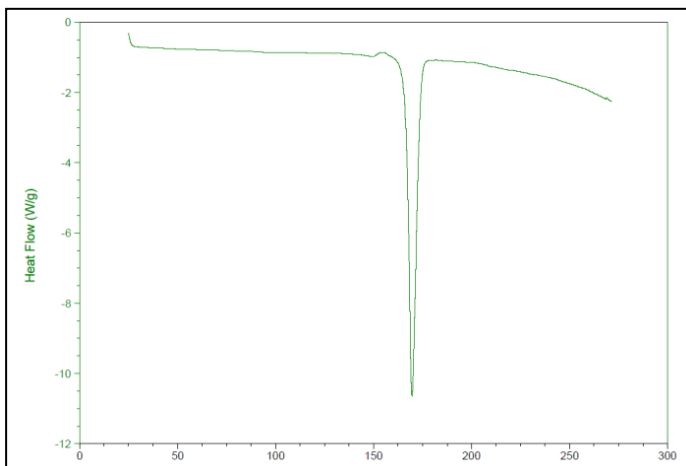
Şekil 4.18. Gefitinibe ait DSC termogramı.



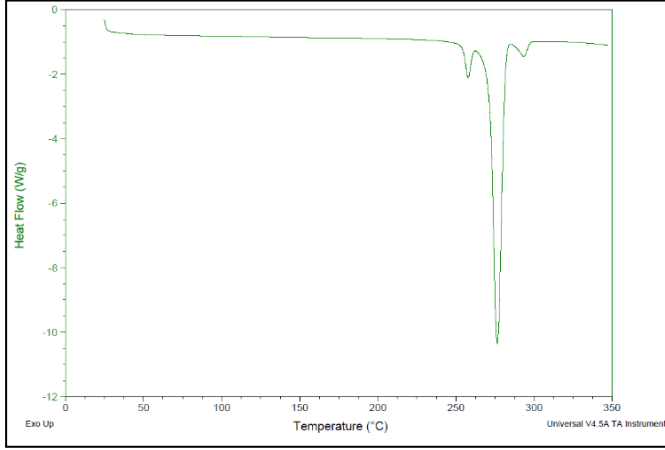
Şekil 4.19. HSA'ya ait DSC termogramı.



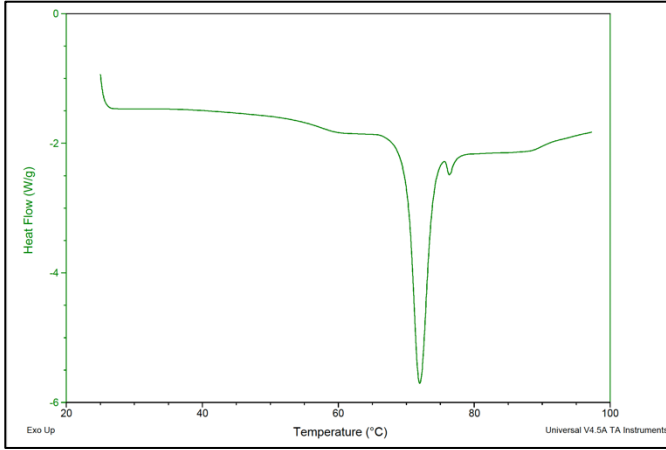
Şekil 4.20. HA'ya ait DSC termogramı.



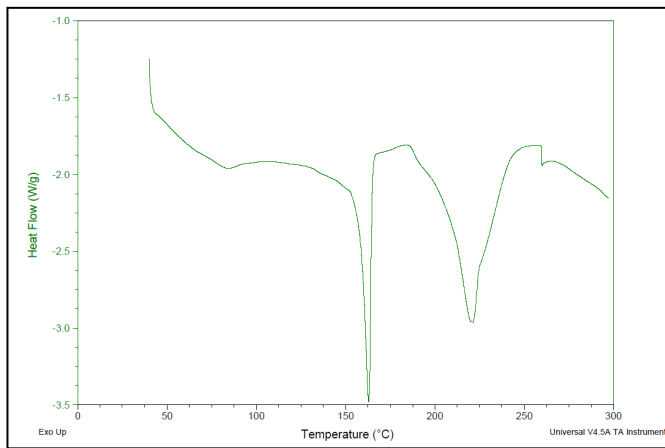
Şekil 4.21. Mannitole ait DSC termogramı.



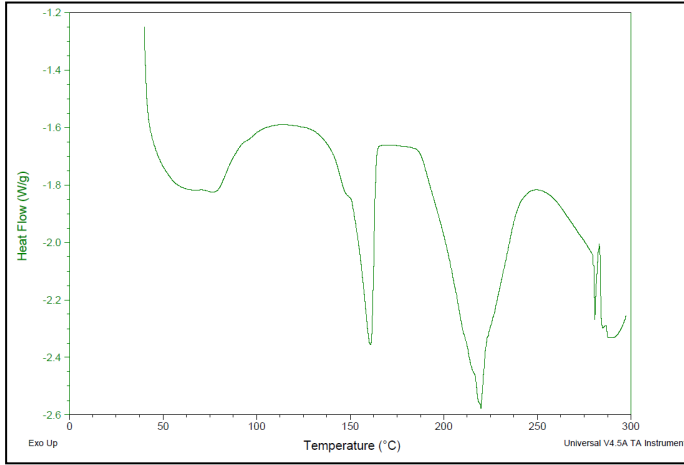
Şekil 4.22. Fenilalanine ait DSC termogramı.



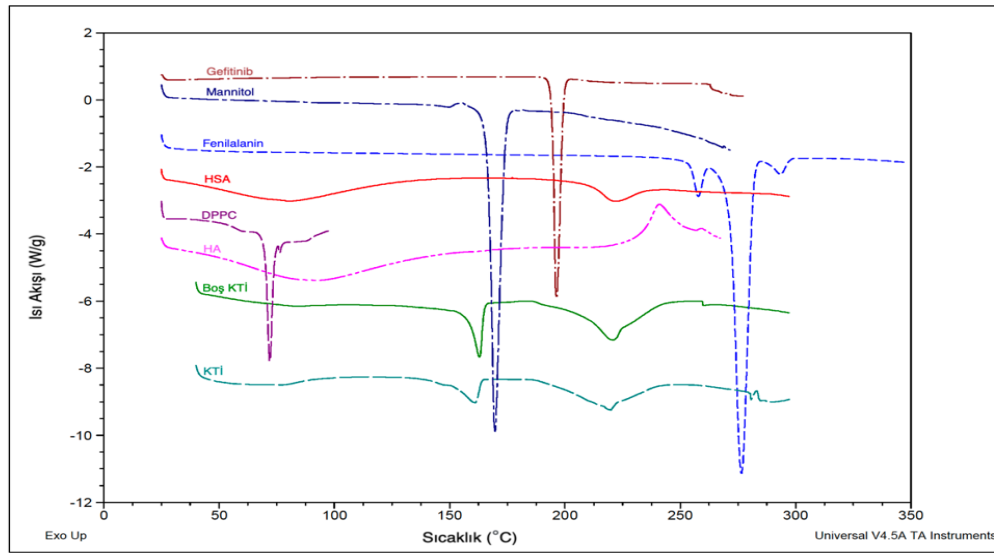
Şekil 4.23. DPPC'ye ait DSC termogramı.



Şekil 4.24. Boş KTİ'ye ait DSC termogramı.



Şekil 4.25. KTİ'ye ait DSC termogramı.



Şekil 4.26. Boş KTİ, KTİ, HA, mannitol, fenilalanin, DPPC, HSA ve gefitinibin karşılaştırmalı DSC termogramları.

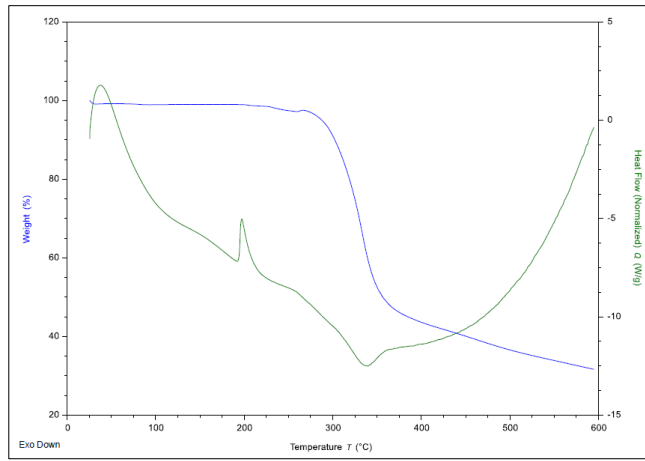
4.4.3. Termogravimetrik Analiz (TGA)

TGA analizi ile gefitinib ve KTİ, ICH Q1A kılavuzuna göre hızlandırılmış stabilite koşullarında ($40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $\%75\pm 5$ bağıl nem) 6 ay boyunca saklanmıştır (72). KTİ formülasyonunun stabilite testi öncesi, 3. ay ve 6. aylardaki ağırlık kaybı değerleri saptanmıştır (Tablo 4.12). Elde edilen ağırlık kaybı değerleriyle partiküllerinin yüzeyine adsorbe olan % nem içerikleri kestirilebilmektedir, bu sayede stabilite koşullarının nem çekme özelliğine etkisi incelenmiştir (73). Gefitinibe göre KTİ'nin daha yüksek nem içeriğine sahip olması beklenen bir durumdur. Liyofilizasyon işlemi ile tozun yüzey alanı artmış ve nem çekme potansiyeli de buna bağlı olarak artmıştır (74). $\%75$ bağıl nem koşulunda saklanan KTİ kapsüllerinin stabilite süresi boyunca

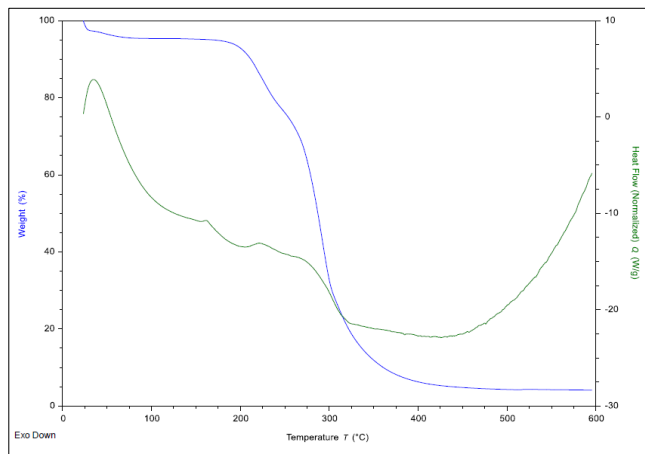
belirgin bir nem çekme durumu ile karşılaşılmanıştır. Şekil 4.27-4.30'da ise sırasıyla gefitinib, KTİ, KTİ-3. ay ve KTİ-6. aya ait TGA termogramları verilmiştir.

Tablo 4.12. Gefitinib, KTİ, KTİ-1. ay, KTİ-3. ay ve KTİ 6. aya ait, TGA analizi sonucunda ölçülen ağırlık kaybı değerleri.

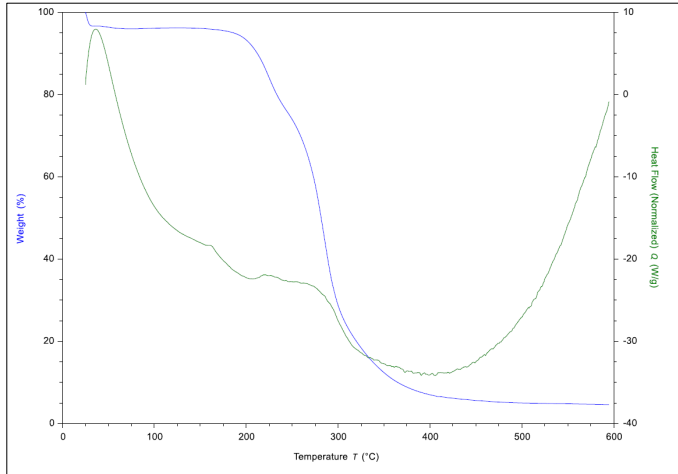
| Numune | Ağırlık kaybı (%) |
|-----------|-------------------|
| Gefitinib | 0,983 |
| KTİ | 3,579 |
| KTİ-3. ay | 3,756 |
| KTİ-6. ay | 3,440 |



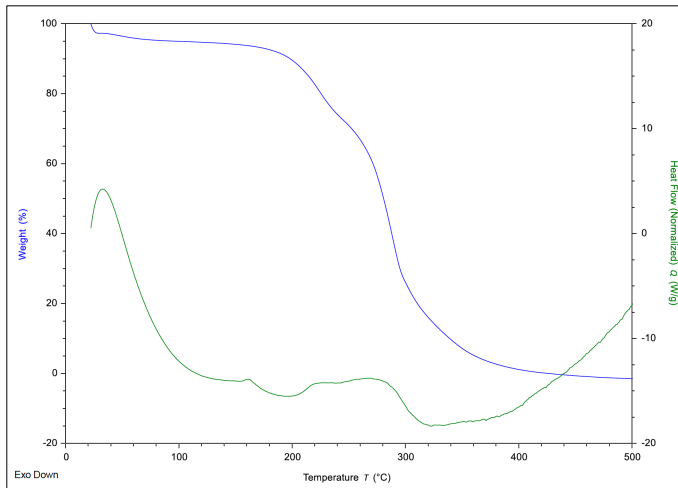
Şekil 4.27. Gefitinibe ait TGA termogramı.



Şekil 4.28. KTİ'ye ait TGA termogramı.



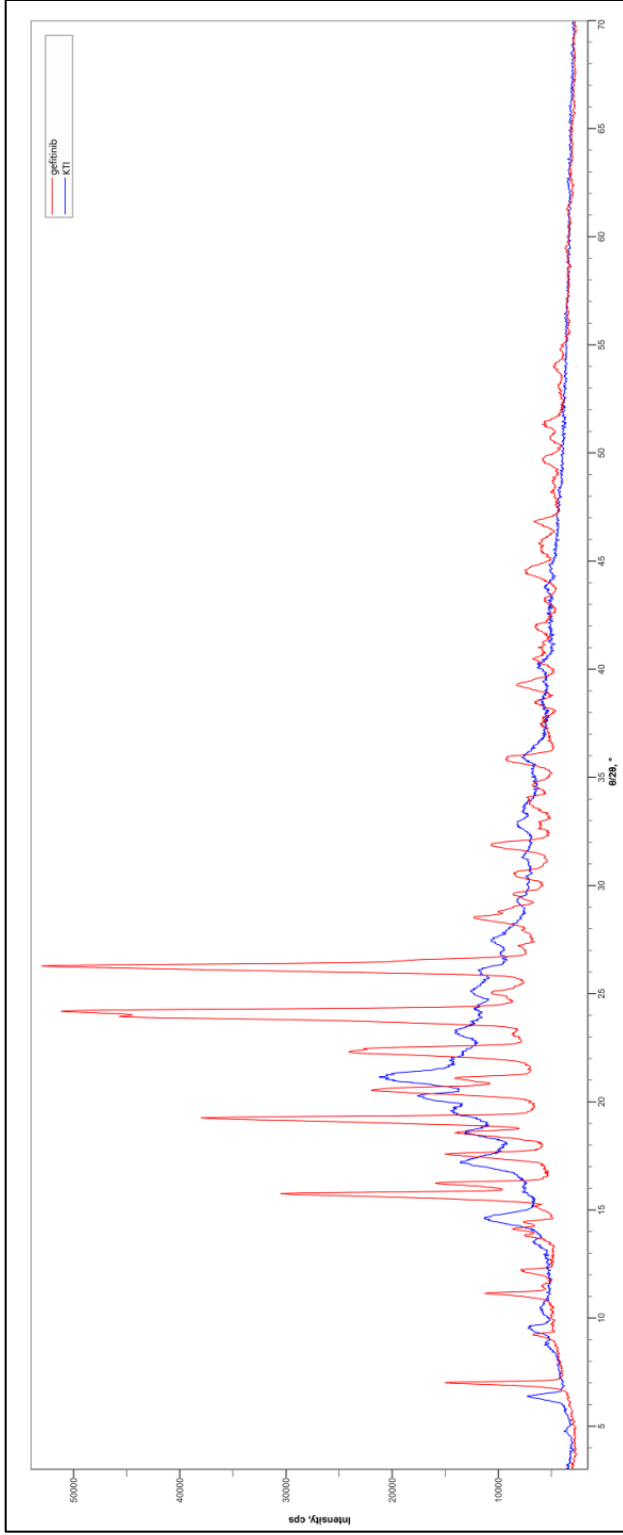
Şekil 4.29. KTİ-3.ay'a ait TGA termogramı.



Şekil 4.30. KTİ-6.ay'a ait TGA termogramı.

4.4.4. X-Işını Kırınımı Analizleri (XRD)

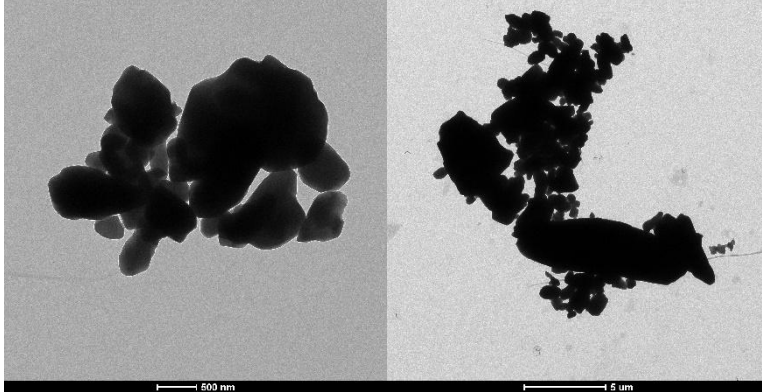
Şekil 4.31'de gefitinib ve KTİ'ye ait XRD difraktogramları verilmiştir. XRD difraktogramında piklerin görülmesi kristal yapı varlığını ifade etmektedir. Amorf yapı varlığında ise, XRD difraktogramında herhangi bir pik gözlenmemektedir (35). Gefitinibin XRD difraktomunda yüksek intensite değerlerine sahip keskin pikler görülmesi, kristal yapısını göstermektedir. KTİ difraktogramında ise daha düşük intensite değerlerine sahip yayvan pikler görülmektedir. Bu durum KTİ'nin bir miktar kristal yapı içermekle birlikte, genel olarak amorf yapıya sahip olduğunu göstermektedir.



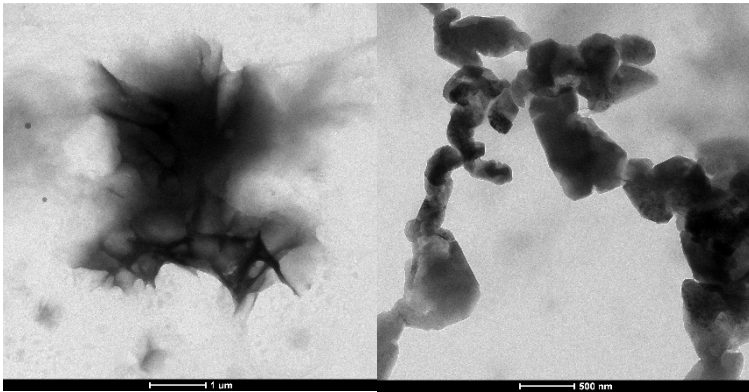
Şekil 4.3.1. Gefitinib ve KTI'ye ait XRD diffraktogramı.

4.4.5. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM)

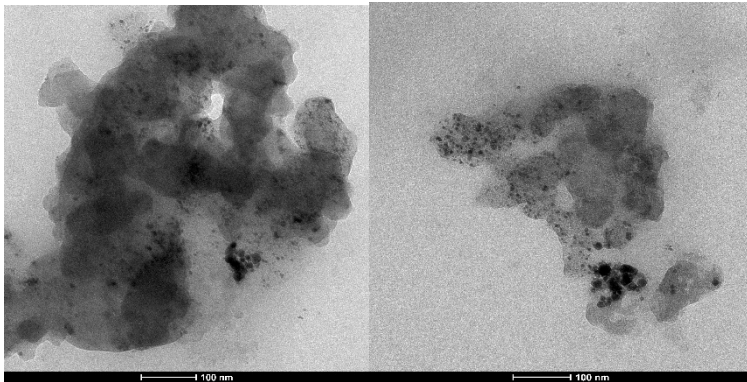
Gefitinib, boş KTİ ve KTİ formülasyonlarının morfolojik yapıları sırasıyla Şekil 4.32-34'te incelenmiştir. Gefitinibin, spesifikasyonlarına uygun olarak mikronize kristal yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. KTİ görüntülerinde liyofilizasyon işleminin etkisiyle küresel yapının kaybolmuş olduğu görülmektedir.



Şekil 4.32. Gefitinibe ait TEM görüntüleri.



Şekil 4.33. Boş KTİ'ye ait TEM görüntüleri.



Şekil 4.34. KTİ'ye ait TEM görüntüleri.

4.4.6. Yüzey Alanı Ölçümü (BET)

Liyofilize nanopartikül ve liyofilize KTİ formülasyonlarının yüzey alanı ölçümleri BET analizi ile yapılmıştır. Taşıyıcı olarak kütlece %50 oranında fenilalanin-mannitol karışımını içeren KTİ'nin, herhangi bir taşıyıcı içermeyen nanopartikül formülasyonuna göre yüzey alanı karşılaştırılmıştır. Tek noktalı BET analizi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.13'te gösterilmiştir. Taşıyıcıların eklenmesiyle elde edilen KTİ'nin, taşıyıcı içermeyen nanopartiküllere kıyasla yaklaşık 6 kat daha fazla yüzey alanına sahip olduğu görülmüştür.

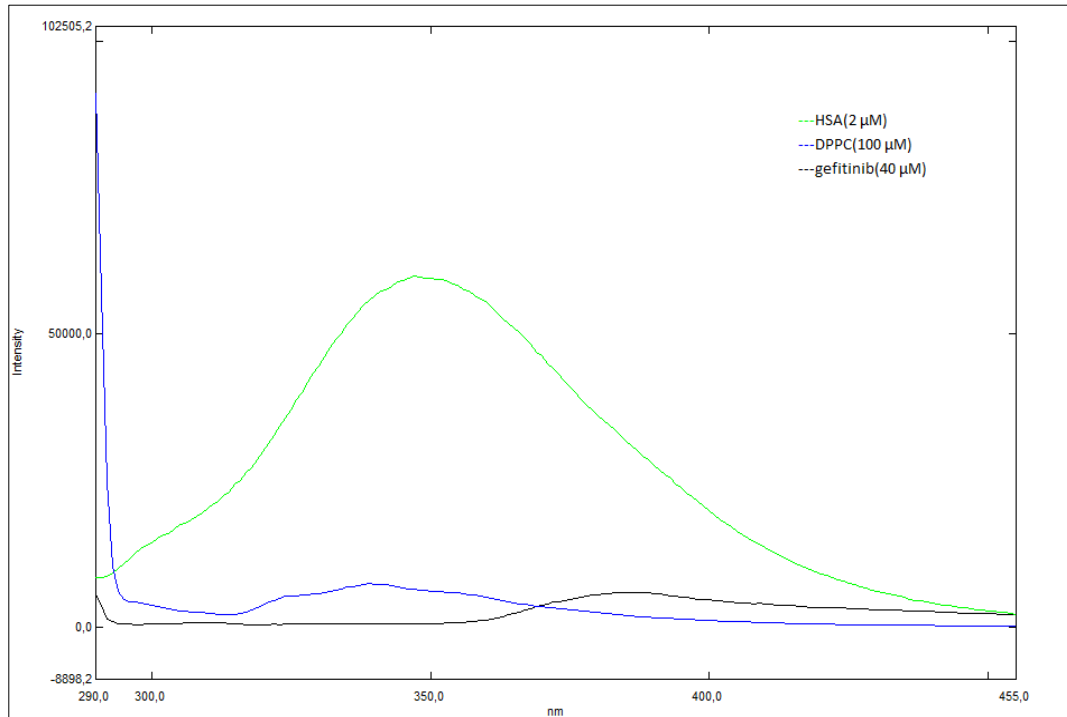
Tablo 4.13. Liyofilize NP ve KTİ'nin tek noktalı BET analizi sonucu elde edilen yüzey alanları.

| Numune | Yüzey alanı (m ² /g) |
|-------------------------|---------------------------------|
| Liyofilize nanopartikül | 12,62 |
| Liyofilize KTİ | 79,97 |

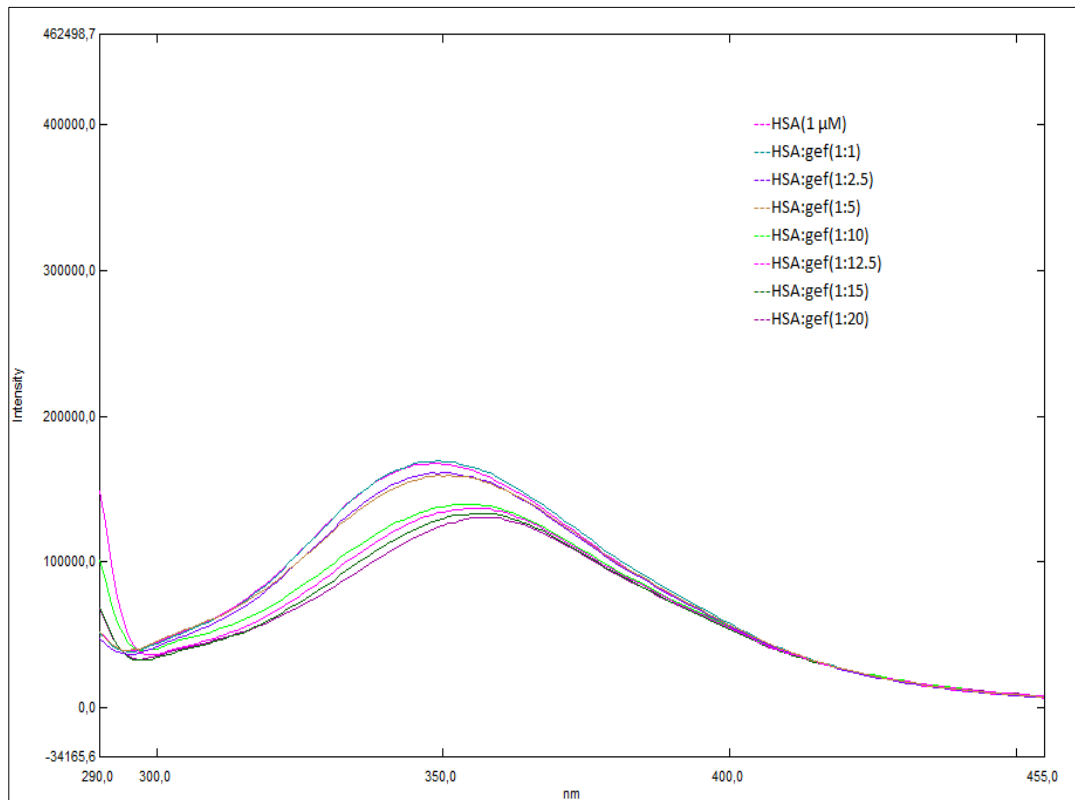
4.4.7. Floresans Spektroskopisi

Gefitinib, DPPC ve HSA'nın 290-455 nm arasındaki floresans spektrumu Şekil 4.37; 1 µM HSA ve 1-20 µM aralığında artan derişimlerde gefitinib içeren örneklerin spektrumu Şekil 4.36; 1 µM HSA, 50 µM oleik asit ve 1-20 µM aralığında artan derişimlerde gefitinib içeren örneklerin spektrumu Şekil 4.37; 1 µM HSA, 50 µM DPPC ve 1-20 µM aralığında artan derişimlerde gefitinib içeren örneklerin spektrumu Şekil 4.38; 1 µM HSA, 50 µM HSPC ve 1-20 µM aralığında artan derişimlerde gefitinib içeren örneklerin spektrumu Şekil 4.39'da gösterilmiştir. Şekil 4.35'e göre HSA'nın incelenen dalga boyu aralığında floresans ışımaya yaptığı ve 345 nm'de pik noktası gözlenirken, gefitinib ve DPPC'ye ait floresans ışımaya gözlenmemiştir.

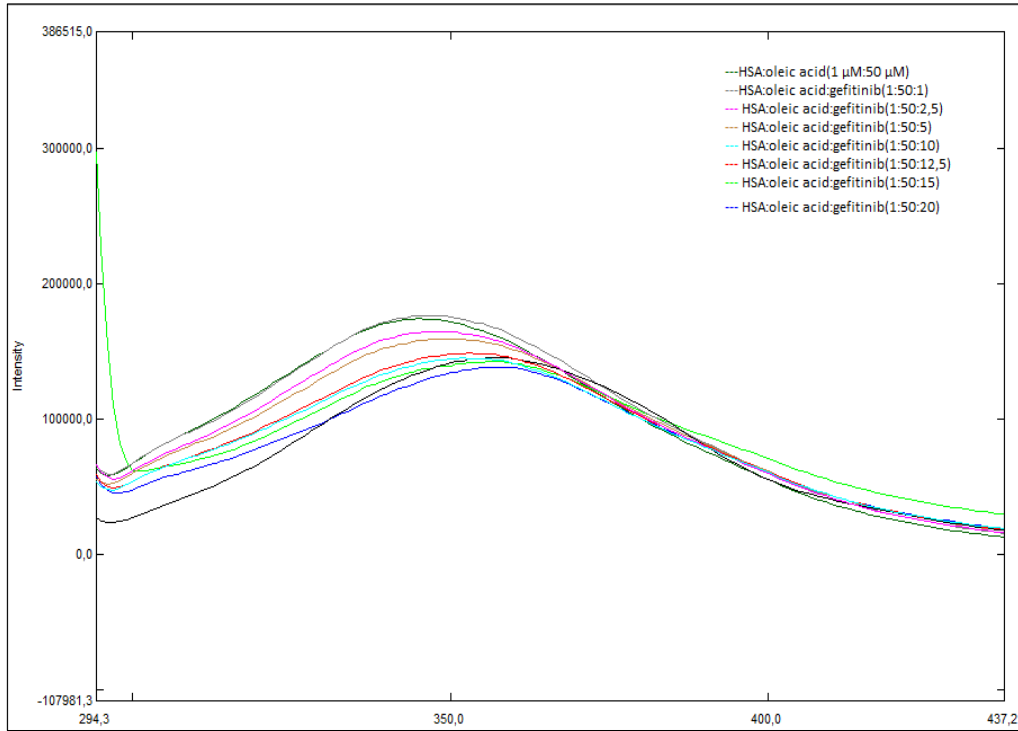
Şekil 4.38 incelendiğinde gefitinibin HSA floresans intesitesinde baskılamaya yol açtığı ve HSA'ya ait maksimum emisyon dalga boyunda derişimine bağlı olarak bir artışa yol açtığı görülmüştür.



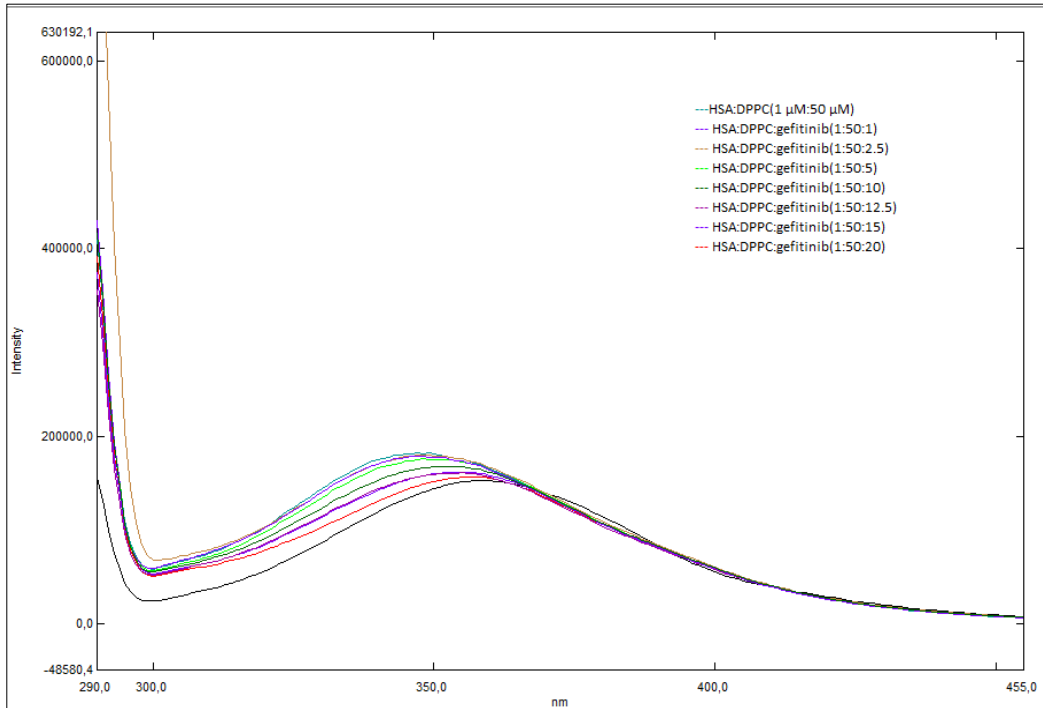
Şekil 4.35. HSA, gefitinib ve DPPC'ye ait floresans spektrumları.



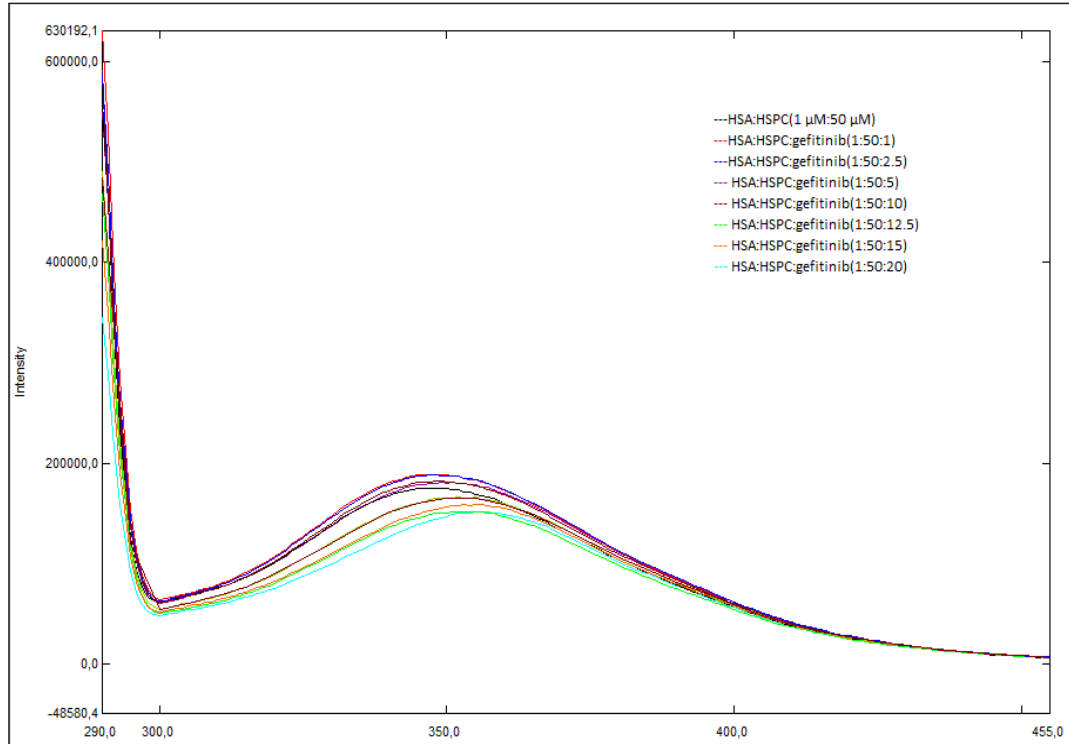
Şekil 4.36. Artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait floresans spektrumları.



Şekil 4.37. 50 μM oleik asit içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait floresans spektrumları.



Şekil 4.38. 50 μM DPPC içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait floresans spektrumları.



Şekil 4.39. 50 μM HSPC içeren ortamda artan gefitinib konsantrasyonunda HSA'ya ait floresans spektrumları.

Yüzey aktif madde içermeyen ortamda 1 μM HSA (A_0), ve 1-20 μM (A_1 - A_6) arası artan gefitinib derişimlerinde, 345 nm'de ölçülen floresans intensite değerlerine (F) Tablo 4.14'te yer verilmiştir. 50 μM oleik asit içeren ortamda 1 μM HSA (X_0), 1-20 μM (X_1 - X_7) arası artan gefitinib derişimlerinde, 345 nm'de ölçülen floresans intensite değerlerine Tablo 4.15'te yer verilmiştir. Tablo 4.16'da 50 μM DPPC içeren ortamda 1 μM HSA (Y_0), 1-20 μM (Y_1 - Y_6) arası artan gefitinib derişimlerinde floresans intensite değerleri; Tablo 4.17'de ise 50 μM HSPC içeren ortamda 1 μM HSA (Z_0), 1-20 μM (Z_1 - Z_6) arası artan gefitinib derişimlerinde floresans intensite değerleri gösterilmiştir. HSA için floresans sönümleyicisi (quencher) olan gefitinibin bulunmadığı örneklerin (A_0 , X_0 , Y_0 , Z_0) intensiteleri F_0 olarak kabul edilmiştir.

Tablo 4.14. 345 nm'de artan gefitinib derişimlerinde HSA'ya ait F ve F_0/F değerleri.

| Örnek | Gefitinib derişimi (μM) | F | F_0/F |
|-------|--------------------------------------|------|---------|
| A_0 | 0 | 1256 | 1 |
| A_1 | 1 | 1286 | 0,976 |
| A_2 | 2,5 | 1220 | 1,029 |

| | | | |
|----------------|----|------|-------|
| A ₃ | 5 | 1182 | 1,062 |
| A ₄ | 10 | 988 | 1,270 |
| A ₅ | 15 | 993 | 1,264 |
| A ₆ | 20 | 916 | 1,370 |

Tablo 4.15. 345 nm’de oleik asit içeren ortamda, artan gefitinib derişimlerinde HSA’ya ait F ve F₀/F değerleri.

| Örnek | Gefitinib derişimi (µM) | F | F ₀ /F |
|----------------|-------------------------|------|-------------------|
| X ₀ | 0 | 1259 | 1 |
| X ₁ | 1 | 1346 | 0,935 |
| X ₂ | 2,50 | 1195 | 1,053 |
| X ₃ | 5 | 1188 | 1,060 |
| X ₄ | 10 | 1056 | 1,275 |
| X ₅ | 12,5 | 1056 | 1,133 |
| X ₆ | 15 | 995 | 1,265 |
| X ₇ | 20 | 963 | 1,307 |

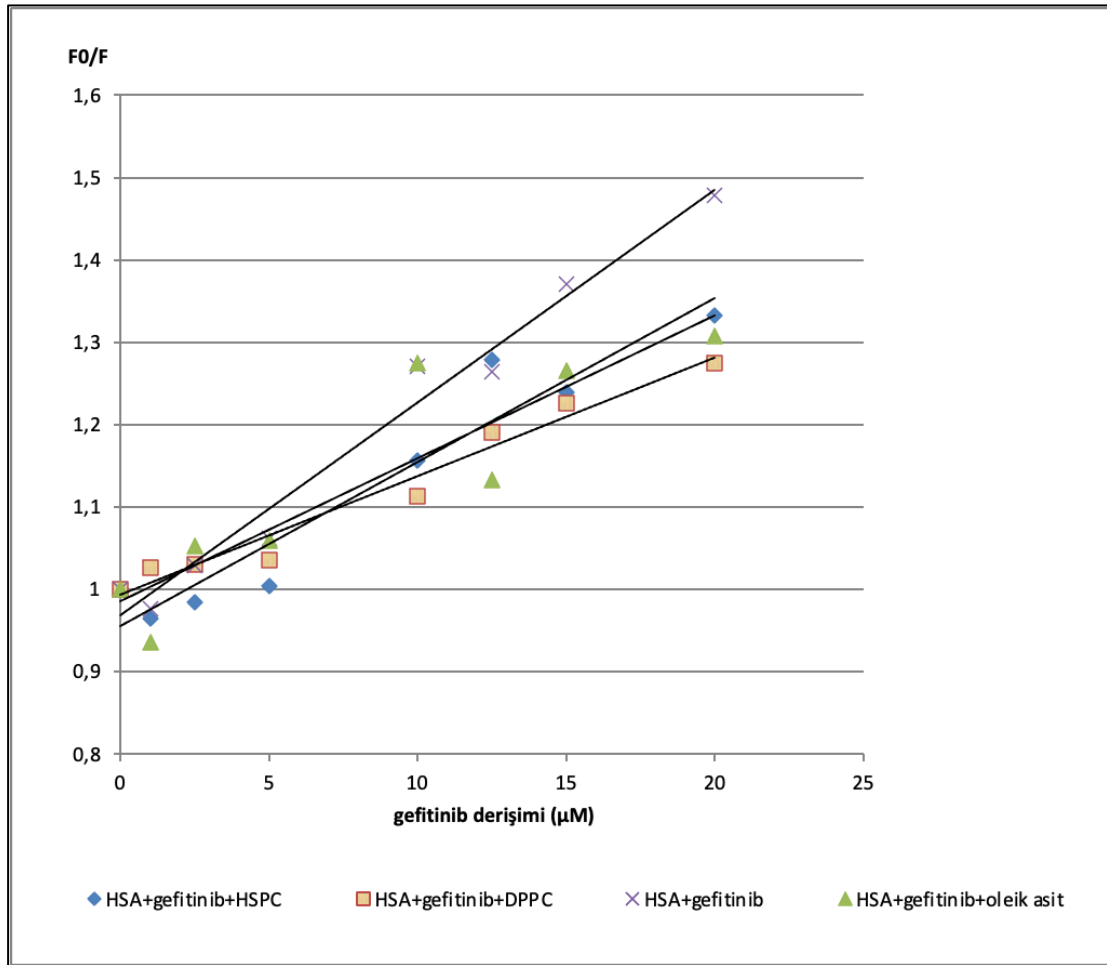
Tablo 4.16. 345 nm’de DPPC içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA’ya ait F ve F₀/F değerleri.

| Örnek | Gefitinib derişimi (µM) | F | F ₀ /F |
|----------------|-------------------------|------|-------------------|
| Y ₀ | 0 | 1370 | 1 |
| Y ₁ | 1 | 1335 | 1,026 |
| Y ₂ | 2,50 | 1329 | 1,031 |
| Y ₃ | 5 | 1323 | 1,036 |
| Y ₄ | 10 | 1231 | 1,113 |
| Y ₅ | 12,5 | 1151 | 1,191 |
| Y ₆ | 15 | 1117 | 1,227 |
| Y ₇ | 20 | 1074 | 1,275 |

Tablo 4.17. 345 nm’de HSPC içeren ortamda artan gefitinib derişimlerinde HSA’ya ait F ve F₀/F değerleri.

| Örnek | Gefitinib derişimi (μM) | F | F_0/F |
|----------------|--------------------------------------|------|---------|
| Z ₀ | 0 | 1368 | 1 |
| Z ₁ | 1 | 1419 | 0,964 |
| Z ₂ | 2,50 | 1390 | 0,984 |
| Z ₃ | 5 | 1363 | 1,004 |
| Z ₄ | 10 | 1226 | 1,157 |
| Z ₅ | 12,5 | 1077 | 1,278 |
| Z ₆ | 15 | 1104 | 1,239 |
| Z ₇ | 20 | 1026 | 1,333 |

Şekil 4.40'ta gefitinib derişimine karşı yüzey aktif madde bulunan ve bulunmayan ortamlarda F_0/F değerlerine ait Stern-Volmer eğrilerine yer verilmiştir. Tablo 4.18'de ise bu eğrilere ait regresyon denklemleri ve determinasyon katsayıları (R^2) verilmiştir.



Şekil 4.40. Farklı yüzey aktif maddeleri içeren ve yüzey aktif madde içermeyen ortamlarda artan gefitinib konsantrasyona karşılık F_0/F değerlerini gösteren Stern-Volmer eğrileri.

Tablo 4.18. Yüzey aktif madde içeren ve içermeyen ortamlardaki Stern-Volmer eğrilerine ait regresyon denklemleri.

| Ortam | Regresyon Denklemi | R ² |
|--------------------------|------------------------|----------------|
| HSA+gefitinib | $y = 0,0258x + 0,9687$ | 0,9783 |
| HSA+gefitinib+oleik asit | $y = 0,0174x + 0,9851$ | 0,8183 |
| HSA+gefitinib+DPPC | $y = 0,0143x + 0,9940$ | 0,9684 |
| HSA+gefitinib+HSPC | $y = 0,0199x + 0,9561$ | 0,9277 |

3.7.7. Floresans Spektroskopisi başlığı altında açıklanan Eşitlik 3.7 kullanılarak oleik asit, DPPC, HSPC içeren ve yüzey aktif madde içermeyen ortamlarda gefitinibin HSA ile etkileşimine ait Stern Volmer sabiti (K_{SV}) değerleri ve Stern Volmer eğrilerinden elde edilen determinasyon katsayısı değerleri Tablo 4.19'da sunulmuştur. Yüzey aktif madde içermeyen ortamda gefitinibin HSA'ya bağlanma özelliğinin daha yüksek olduğu gözlenirken, yüzey aktif madde içeren ortamlar içerisinde en yüksek bağlanma görülen yüzey aktif maddenin HSPC olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.19. Gefitinibin oleik asit, DPPC, HSPC içeren ve yüzey aktif madde içermeyen ortamda HSA ile etkileşimine ait K_{SV} ve determinasyon katsayısı değerleri.

| Ortamdaki Yüzey Aktif Madde | K_{SV} (Lmol ⁻¹) | R ² |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------|
| - | $2,58 \times 10^4$ | 0,98 |
| Oleik Asit | $1,74 \times 10^4$ | 0,82 |
| DPPC | $1,43 \times 10^4$ | 0,97 |
| HSPC | $1,99 \times 10^4$ | 0,93 |

4.5. Çözünürlük Tayini

Tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonunun gefitinibin çözünürlüğüne etkisi, çözünürlük tayini deneyiyle PBS ortamında tayin edilmiştir. Tablo 4.20'de gefitinibin ve KTİ içerisindeki gefitinibin 1, 6 ve 12. saatlerdeki çözünürlüklerine yer

verilmiştir. KTİ içerisindeki gefitinib ve ham gefitinibin ikisi de 6. saatte doyumluk çözünürlüğüne ulaşmıştır. Gefitinibin PBS ortamında doyumluk çözünürlüğü 0,061 $\mu\text{g}/\text{mL}$; KTİ içerisindeki gefitinibin ise 0,169 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak ölçülmüştür. Geliştirilen KTİ formülasyonunun gefitinibin çözünürlüğünü 2-3 kat arası artırdığı yapılan çözünürlük tayini ile gösterilmiştir.

Tablo 4.20. Zamana karşı gefitinib ve KTİ içerisindeki gefitinibin PBS içerisindeki çözünür derişimleri ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n=3\pm\text{SS}$).

| ÖRNEK | Zamana göre çözünür gefitinib derişimi ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | |
|----------------------|--|-------------------|-------------------|
| | 1 saat | 6 saat | 12 saat |
| gefitinib | 0,060 \pm 0,002 | 0,061 \pm 0,004 | 0,054 \pm 0,004 |
| gefitinib içeren KTİ | 0,137 \pm 0,016 | 0,169 \pm 0,029 | 0,111 \pm 0,011 |

4.6. *In-vitro* Salım

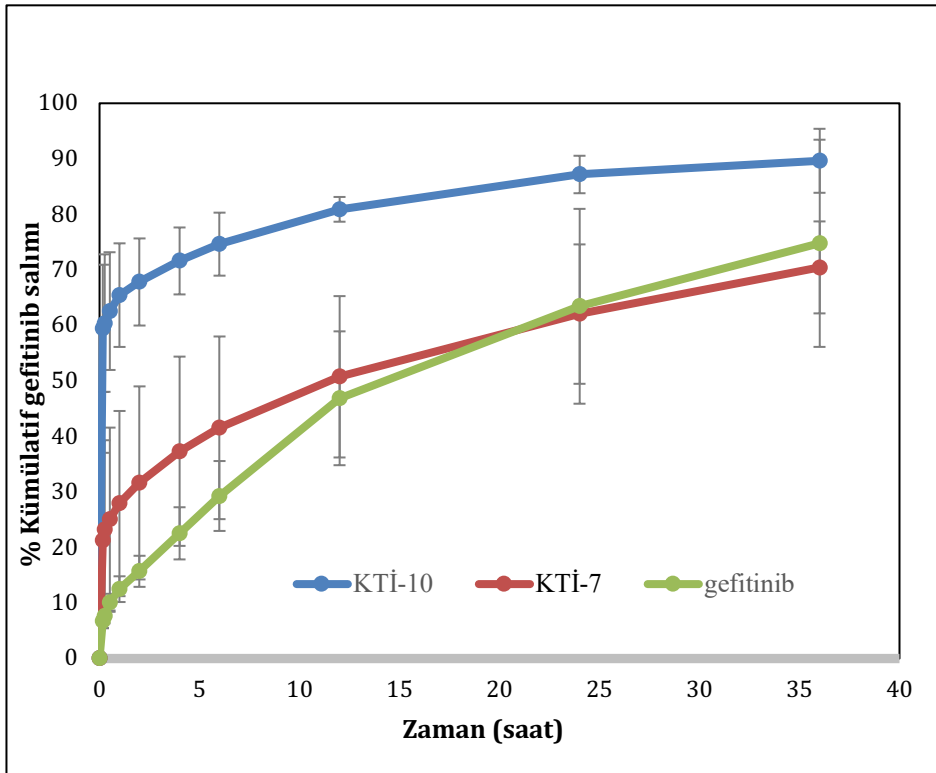
4.6.1. *In-vitro* Salım-1

En iyi aerodinamik özellikleri gösteren taşıyıcıların (fenilalanin ve fenilalanin-mannitol karışımı) salım özelliklerine olan etkisini incelemek amacıyla %0,2 SLS içeren SLF ortamında yapılan *in-vitro* salım çalışmasında KTİ-10; HA-gefitinib-HSA nanopartiküllerini ve taşıyıcı olarak fenilalanin-mannitol karışımını içerirken, KTİ-7 HA-gefitinib-HSA nanopartiküllerini ve taşıyıcı olarak fenilalanini içermektedir. Tablo 4.21’de KTİ-10 ve KTİ-7’nin ani bir ilaç salımı ile 10. dakikaya kadar içeriğindeki gefitinibin sırasıyla %59 ve %21’ini saldığı görülmektedir. KTİ-7’nin KTİ-10’a göre daha yavaş bir salım gösterdiği fakat her iki KTİ formülasyonunun da ilk 12 saat içerisinde ham gefitinibe göre daha fazla miktarda etkin maddeyi salım ortamına bıraktığı görülmüştür (Şekil 4.41). 36 saatin sonunda KTİ-10 en yüksek yüzdede gefitinibi (%90) salmışken, KTİ-7 ve ham gefitinibin benzer yüzdelerde (sırasıyla %70 ve %75) gefitinibi saldığı görülmektedir.

Tablo 4.21. KTİ-10, KTİ-7 ve ham gefitinibin %0,2 SLS içeren SLF ortamında zamana karşı salınan % gefitinib miktarı ($n=3\pm\text{SS}$).

| Zaman (saat) | KTİ-10 | KTİ-7 | Gefitinib |
|--------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| 0,17 | 59,467 \pm 11,462 | 21,255 \pm 15,795 | 6,744 \pm 1,255 |

| | | | |
|------|---------------|---------------|---------------|
| 0,25 | 60,414±12,380 | 23,197±16,119 | 7,628±1,292 |
| 0,5 | 62,574±10,601 | 25,120±16,470 | 10,036±1,620 |
| 1 | 65,448±9,329 | 27,910±16,676 | 12,495±2,317 |
| 2 | 67,817±7,844 | 31,630±17,385 | 15,709±2,799 |
| 4 | 71,607±6,028 | 37,333±17,043 | 22,549±4,697 |
| 6 | 74,630±5,674 | 41,554±16,448 | 29,275±6,294 |
| 12 | 80,901±2,230 | 50,743±14,530 | 46,873±12,054 |
| 24 | 87,176±3,374 | 62,032±12,553 | 63,440±17,547 |
| 36 | 89,643±5,762 | 70,444±8,281 | 74,783±18,657 |



Şekil 4.41. %0,2 SLS içeren SLF ortamında KTİ-10, KTİ-7 ve gefitinibe ait zamana karşı % kümülatif gefitinib salım profili (n=3, ortalama±SS).

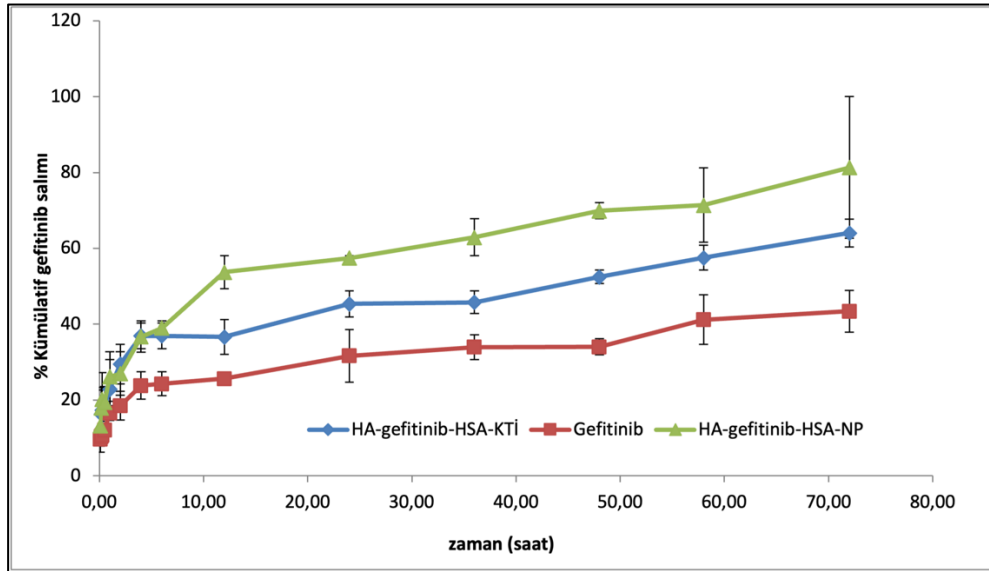
4.6.2. *In-vitro* Salım-2

KTİ formülasyonlarında taşıyıcıların varlığının salıma etkisini gözlemlemek amacıyla yüzey aktif madde içermeyen SLF ortamında yapılan salım çalışmasında zamana karşı salınan % kümülatif gefitinib miktarı Tablo 4.22 ve Şekil 4.42'de gösterilmiştir. Taşıyıcıları içermeyen liyofilize NP formülasyonu neredeyse tüm zaman noktalarında en yüksek gefitinib salımını göstermiştir ve 72 saat sonunda

içeriğindeki gefitinibin %81'ini salmıştır. Fenilalanin ve mannitolü taşıyıcı olarak içeren KTİ formülasyonu, 72 saat sonunda içeriğindeki gefitinibin %56'sını salmıştır. Ham gefitinib ise KTİ ve NP formülasyonları ile karşılaştırıldığında diyaliz membrandan daha yavaş geçmiştir ve 72 saat sonunda %43'ünün salım ortamına geçtiği gözlenmiştir.

Tablo 4.22. HA-gefitinib-HSA-NP, HA-gefitinib-HSA-KTİ ve ham gefitinibin SLF ortamında zamana karşı gefitinib salımı (n=3±SS).

| Zaman (saat) | HA-gefitinib-HSA-KTİ | Gefitinib | HA-gefitinib-HSA-NP |
|--------------|----------------------|---------------|---------------------|
| 0,08 | 9,280±3,384 | 9,622±2,038 | 13,262±9,330 |
| 0,17 | 13,995±7,535 | 10,378±2,234 | 17,973±7,614 |
| 0,25 | 15,152±3,839 | 14,731±7,200 | 20,246±9,885 |
| 0,5 | 15,502±5,356 | 19,204±12,351 | 19,473±5,777 |
| 1 | 18,700±10,653 | 22,212±9,942 | 26,162±8,221 |
| 2 | 29,244±5,221 | 25,489±12,723 | 26,956±8,098 |
| 4 | 34,204±5,773 | 29,393±10,287 | 36,708±5,879 |
| 6 | 34,205±5,775 | 29,764±10,041 | 38,980±2,666 |
| 12 | 34,028±6,452 | 32,366±11,676 | 53,696±6,226 |
| 24 | 39,814±10,150 | 35,776±9,938 | 57,452±0,913 |
| 36 | 40,104±10,260 | 35,390±7,455 | 62,924±6,825 |
| 48 | 49,960±20,811 | 37,309±6,340 | 69,903±2,976 |
| 58 | 50,389±12,810 | 41,164±8,022 | 71,407±13,928 |
| 72 | 56,291±13,974 | 43,385±6,686 | 81,312±26,429 |



Şekil 4.42. SLF ortamında HA-gefitinib-HSA-KTİ, HA-gefitinib-HSA-NP ve gefitinibe ait zamana karşı % kümülatif gefitinib salım profili (n=3, ortalama±SS).

4.7. KTİ İÇERİSİNDEN GEFİTİNİB MİKTAR TAYİNİ

3.10. KTİ İÇERİSİNDEN GEFİTİNİB MİKTAR TAYİNİ başlığında tarif edilen yöntemle hazırlanan KTİ örneklerine yapılan HPLC analizi sonucunda $1,75 \pm 0,24$ (n=3±SS) gefitinib içerdikleri tespit edilmiştir. Bu işlem, KTİ içerisindeki gefitinib miktarını en doğru şekilde tespit etmek için *in vitro* salım, ACI ve hücre kültürü deneylerinden önce uygulanmıştır.

4.8. Stabilite

Hızlandırılmış stabilite koşullarında KTİ'ye ait aerodinamik parametrelerin değişimi 0., 3. ve 6. aylarda ACI analizleri gerçekleştirilerek incelenmiştir (Tablo 4.23). 0, 3 ve 6. Aylardaki KOAÇ farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (ANOVA-Bonferroni testi). Stabilite testi boyunca görülen EF (%) düşüşü de ANOVA testi sonucu anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). ED değerleri kapsüle tartılan değişken toz miktarlarına bağlı olduğu için stabilite testi sonuçlarında dikkate alınmamıştır. 0, 3 ve 6. Aylardaki %İPF farklılıkları da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$) (ANOVA-Bonferroni testi).

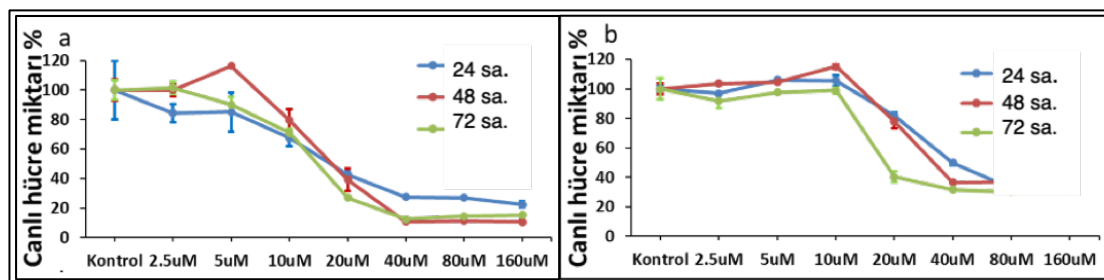
Tablo 4.23. KTİ formülasyonunun hızlandırılmış stabilite koşullarında 0, 1, 3 ve 6. ayda aerodinamik parametreleri.

| | EF (%) | KOAÇ (μm) | ED (μm) | İPF (%) |
|-------|------------------|---------------------------|----------------------|------------------|
| 0. ay | 97,62 \pm 0,95 | 4,40 \pm 0,26 | 13,79 \pm 5,51 | 42,84 \pm 2,62 |
| 3. ay | 94,01 \pm 2,52 | 4,02 \pm 0,69 | 9,45 \pm 1,25 | 47,10 \pm 7,25 |
| 6. ay | 92,43 \pm 5,37 | 5,51 \pm 0,99 | 7,97 \pm 0,26 | 35,63 \pm 6,39 |

4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.9.1. Sitotoksikite Çalışması (MTT)

Gefitinib çözeltisinin LLC1 ve L929 hücrelerinde farklı derişimlerde titre edilerek MTT analizleri yapılmıştır. Şekil 4.43.a 2,5-160 μM arası 7 farklı derişime titre edilen gefitinib çözeltisinin LLC1 hücrelerine uygulanması sonucu elde edilen hücre canlılığı grafiklerini, Şekil 4.43.b. ise aynı derişimlerde gefitinib uygulaması sonucu L929 hücre canlılığı grafiğini göstermektedir. Subtoksik (IC20), yarı-maksimum inhibisyon (IC50) ve %80 inhibisyonu ifade eden IC80 derişimleri 24 saat, 48 saat ve 72 saat olmak üzere üç farklı inkübasyon süresi için Graphpad yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır (Tablo 4.24). Gefitinibin L929 ve LLC1 hücreleri için 24 saatteki IC50 değerleri sırasıyla 27,75 μM ve 11,42 μM olarak bulunmuştur. Gefitinibin akciğer kanserli hücrelerde (LLC1), sağlıklı hücrelere (L929) göre daha düşük dozlarda hücre canlılığını azaltan etki yaptığı görülmektedir. Gefitinibin LLC1 hücrelerindeki MTT deneyi esas alınarak formülasyonların MTT deneylerinde orta derişim ve hücre içine alımda kullanılacak derişim olarak 15 μM seçilmiştir.



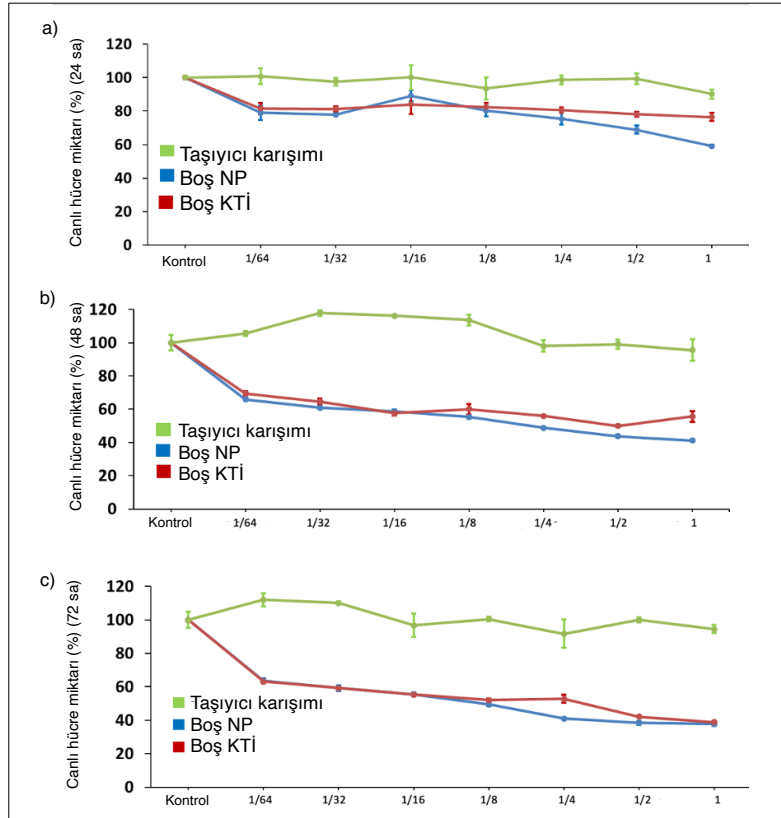
Şekil 4.43. LLC1 ve L929 hücrelerinde gefitinib çözeltilerinin MTT analizleri. a) 2,5-160 μM gefitinib derişimlerinde LLC1 hücrelerinin canlılık grafiği. b) 2,5-160 μM gefitinib derişimlerinde L929 hücrelerinin canlılık grafiği.

Tablo 4.24. Gefitinibe ait LLC1 ve L929 hücrelerinde IC80, IC50 ve IC20 değerleri.

| | | IC80 (μM) | IC50 (μM) | IC20 (μM) |
|------|-------|------------------------|------------------------|------------------------|
| LLC1 | 24 sa | 21,12 | 11,42 | 6,18 |
| | 48 sa | 23,17 | 14,96 | 9,66 |

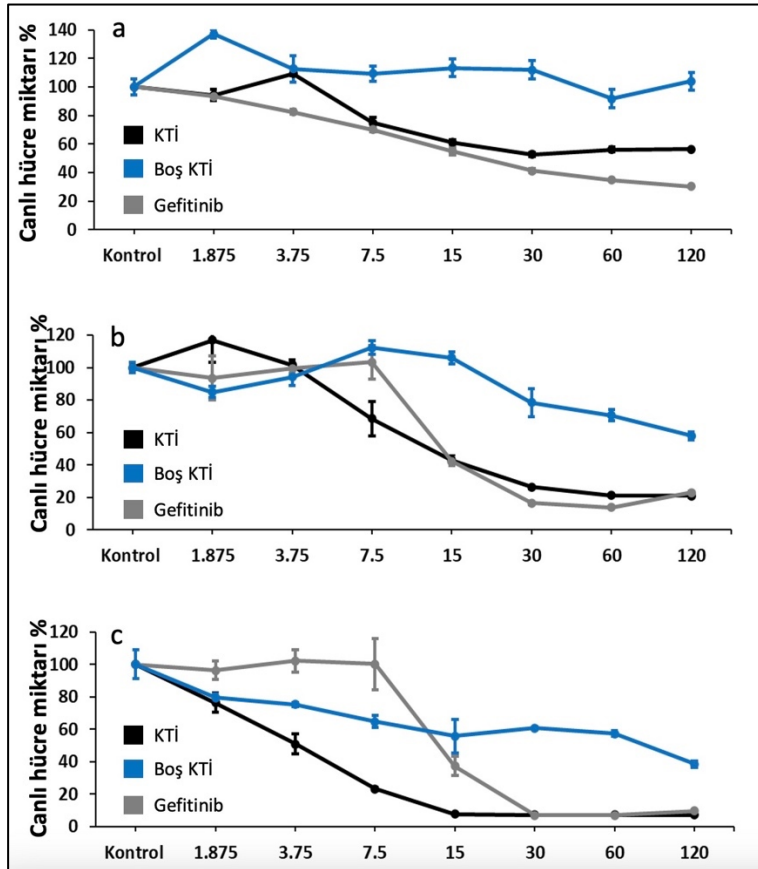
| | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|
| | 72 sa | 18,37 | 11,99 | 7,83 |
| L929 | 24 sa | 42,56 | 27,75 | 18,09 |
| | 48 sa | 21,89 | 20,41 | 19,03 |
| | 72 sa | 19,48 | 18,35 | 17,29 |

240 μ M gefitinibe eşdeğer olarak hazırlanan stok çözeltiler olan Boş NP, Boş KTİ ve taşıyıcı karışımları (fenilalanin-mannitol (1:1)) L929 hücrelerine uygulanarak MTT deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklara eklenme sonrası 120 μ M gefitinibe eşdeğer hale gelen örnekler Şekil 4.46'daki grafiklerin x eksenlerinde '1' olarak ifade edilmiştir. x eksenindeki diğer noktalar seyrelme oranlarını ifade etmektedir. NP, Boş KTİ ve taşıyıcı karışımını L929 hücrelerine uygulanması sonrası 24, 48 ve 72 saat maruziyet sonucu hücre canlılıkları MTT testi ile gösterilmiştir (Şekil 4.44). Taşıyıcı karışımının hiçbir derişimde ve zamanda sitotoksik etkisi görülmemektedir. 15 μ M gefitinibe eşdeğer olan boş KTİ, %80'den fazla hücre canlılığına sebep olarak 24 saatte subtoksik etki gösterirken, 48 ve 72. saatlerde sırasıyla %60 ve %52 hücre canlılığına neden olmuştur. Boş NP, boş KTİ'ye göre L929 hücrelerinde bir miktar daha sitotoksik etki gösterirken bu fark hiçbir zaman noktasında anlamlı bulunmamıştır (Mann-Whitney U testi, $p>0,05$).



Şekil 4.44. L929 hücrelerinde Boş NP, Boş KTİ ve taşıyıcı karışımının MTT analizleri. a) 24 saatte canlı hücre miktarları. b) 48 saatte canlı hücre miktarları c) 72 saatte canlı hücre miktarları.

LLC1 hücrelerine 1,875 μM , 3,75 μM , 7,5 μM , 15 μM , 30 μM , 60 μM ve 120 μM derişimlerinde gefitinib, KTİ ve yine bu derişimlere eşdeğer Boş KTİ örnekleri uygulanmıştır (Şekil 4.45). LLC1 hücrelerinde 24 saat KTİ ve gefitinibe maruziyet sonucunda sırasıyla %61 ve %55 canlılık gözlenmiştir. 15 μM üzeri dozlarda derişim arttıkça gefitinibin KTİ'ye göre daha yüksek sitotoksik etkisi görülmektedir. 48 saat uygulamada KTİ 3,75-7,5 μM dozlarda sitotoksik etki gösterirken ham gefitinib bu doz aralığında sitotoksik etki göstermemektedir. 15 μM dozda KTİ ve ham gefitinib aynı miktarda sitotoksik etki göstermiştir. KTİ'nin hedeflenen şekilde düşük dozlarda kanserli hücrelere sitotoksik etkisi en net 72. saatte gözlenmektedir. Uygulanan en düşük dozdan itibaren sitotoksik etki gösteren KTİ 3,75 μM dozda LLC1 hücrelerinin yarısını öldürürken, gefitinib 7,5-15 μM arası bir dozda ancak bunu sağlayabilmiştir. Boş KTİ'nin 24 saatte hiçbir dozda sitotoksik etkisi görülmezken 48 ve 72 saat maruziyette sitotoksik etkiye neden olmaktadır.

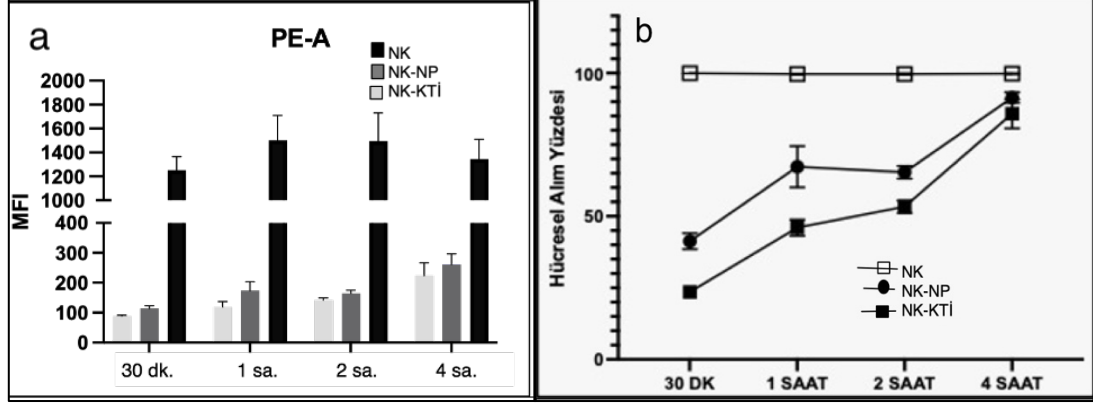


Şekil 4.45. LLC1 hücrelerinde KTİ, Boş KTİ ve gefitinibin MTT analizleri. a) 24 saatte canlı hücre miktarları. b) 48 saatte canlı hücre miktarları c) 72 saatte canlı hücre miktarları.

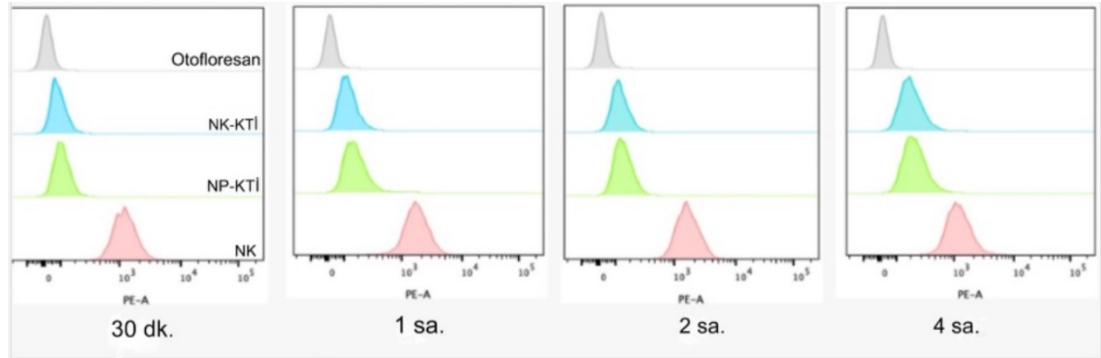
4.9.2. Hücre İçine Alım

15 µM gefitinibe eşdeğer Nil kırmızısı taşıyan liyofilize nanopartikül (NK-NP), 15 µM gefitinibe eşdeğer Nil kırmızısı taşıyan KTİ (NK-KTİ) ve Nil kırmızısı LLC1 hücrelerine uygulanarak akım sitometri cihazında hücre içinde Nil kırmızısı taşıyan hücre miktarı zamana karşı yüzde ve ortalama floresan yoğunluğu (MFI) cinsinden ölçülmüştür (Şekil 4.46) ve akım sitometri histogramları farklı zaman noktalarında alınmıştır (Şekil 4.47). NK-KTİ ve NK-NP uygulanan LLC1 hücrelerinin formülasyonların içerisindeki Nil kırmızısını zamanla hücre içine alarak floresans intensitelerinin arttığı gözlenmiştir. NK-NP formülasyonunun 4 saat sonunda içerdiği Nil kırmızısının %90'ının hücre içine alınırken, NK-KTİ formülasyonunun %85'i hücre içine alınmıştır.

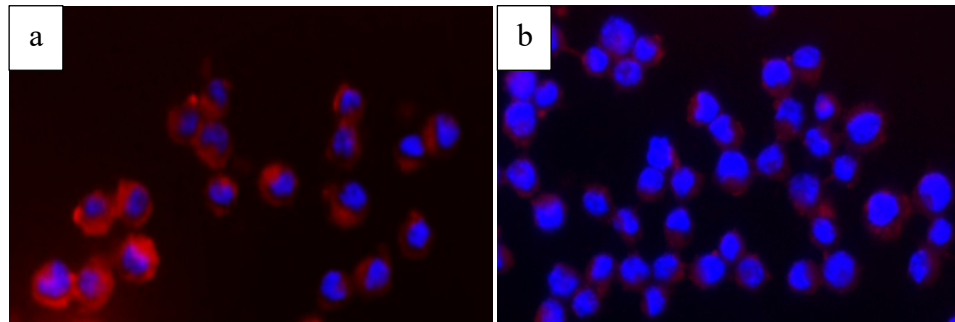
Hücre çekirdekleri DAPI ile boyanarak Nil kırmızısı boyasının hücre içinde görüntüsü incelendiğinde NK-KTİ ve NP-KTİ'nin içerisindeki Nil kırmızısının hücrelerin içine geçtiği gözlenmiştir (Şekil 4.48).

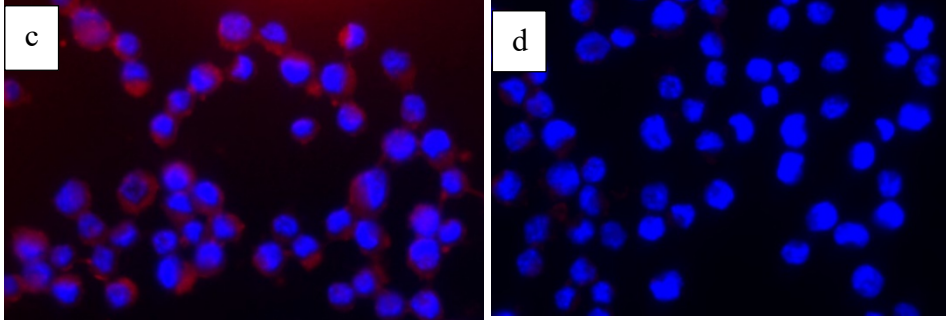


Şekil 4.46. Nil kırmızısının LLC1 hücrelerine alımı. a) Hücrelerin ortalama floresans yoğunluğu (MFI). b) Zamana karşı hücrelerin Nil kırmızısı alım yüzdesi.



Şekil 4.47. NK-NP, NK-KTİ, NK ve otofloresan uygulanan LLC1 hücrelerinin farklı zaman noktalarındaki akım sitometri histogramları.





Şekil 4.48. DAPI ile boyanan LLC1 hücre görüntüleri. a) NK uygulanan hücreler b) NK-KTİ uygulanan hücreler. c) NK-NP uygulanan hücreler. d) Otofloresan uygulanan hücreler

5. TARTIŞMA

5.1. Etkin Maddenin Miktar Tayini ve Validasyonu

Etkin maddenin miktar tayininin tez kapsamında çalışılacak çözücüler ve ortamlarda istenen aralıklarda doğru, kesin ve güvenilir sonuç vermesinin sağlanması için HPLC yönteminin validasyon çalışması yapılmış ve validasyon ölçütleri değerlendirilmiştir.

Gefitinibin HPLC yöntemi ile miktar tayininin validasyonunda Chandrashekara ve arkadaşlarının kullandığı sistem parametreleri modifiye edilmiştir. Çözücü olarak asetonitril kullanılan ortamda oluşturulan kalibrasyon eğrisinin 0,04-50 µg/mL derişim aralığında determinasyon katsayısı 1 olarak bulunmuş olup doğrusallık kriterini karşılamaktadır (Bkz. Şekil 4.1). PBS ortamında 0,05-50 µg/mL derişim aralığında determinasyon katsayısı 0,999 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 4.3). Aynı şekilde SLF ortamında gerçekleştirilen kalibrasyon çalışmasında 0,05-5 µg/mL derişim aralığında determinasyon katsayısı 0,9995 olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.5) ve bu ortamlarda belirtilen aralıklarda doğrusallık sağlanmaktadır. Gefitinibe ait alıkonma zamanları asetonitril, PBS ve SLF ortamlarında sırasıyla 13,74 dk., 8,73 dk. ve 9,72 dk. olarak kaydedilmiştir (Bkz. Şekil 4.2, 4.4, 4.6). Formülasyonda ve analiz ortamlarında kullanılan yardımcı maddelerin tamamı sisteme enjekte edilmiş ve 20 dk. analiz süresi boyunca gefitinib pikiyle çakışan herhangi bir pik vermedikleri gösterilmiştir. Bu yöntemle analiz metodunun gefitinibe özgülüğü gösterilmiştir (48).

Asetonitril ortamında yapılan doğruluk, gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik testlerinde varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunarak analiz yönteminin bu parametreleri karşıladığı gösterilmiştir (Bkz. Tablo 4.1-4.3). Gefitinib örneklerinin 24 saat içerisinde aralıklarla analiz edilmesiyle elde edilen derişimler arasında anlamlı farkın olmaması ile gefitinibin 24 saat boyunca stabil olduğu gösterilmiştir (Bkz. Tablo 4.4). Sistem uygunluk parametrelerinden kapasite faktörü 4,2865, teorik tabaka sayısı 3330 ve simetri faktörü 1,4 olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 4.5). Bu veriler FDA'in "*Validation of Chromatic methods*" rehberindeki hedefleri karşılamaktadır (50).

5.2. Nanopartiküllerin Hazırlama Yönteminin Değerlendirilmesi

İlaçların albümine geri dönüşümlü non-kovalent bağlanması elektrostatik/hidrofobik etkileşimlere dayanmaktadır. Bu zayıf etkileşim şekli ilacın albüminden ayrılarak hızla salınmasına olanak tanınmasından ötürü sıklıkla tercih edilmektedir. Bu bağlanma şekli aynı zamanda biyoterapötiklerin albümine bağlanmasında da kullanılmaktadır. Çünkü non-kovalent bağlanma daha hızlı ayrışmayı sağlamakta ve biyoterapötiklerin hedef bölge ile etkileşimini ve büyük moleküllerin girişine izin vermeyecek bölgelere daha hızlı nüfuz etmesini ve difüzyonunu teşvik etmektedir (75). Buna karşın daha nadir de olsa albüminin ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasında kovalent bağlanmanın üstünlükleri de araştırılmıştır. Bir çalışmada kimyasal modifikasyonla elde edilen albümine kovalent bağlı paklitaksel ile eliminasyon süresinin uzatıldığı ve AUC değerinin serbest paklitakसेle göre artırılarak farmakokinetik özelliklerinin iyileştirildiği gözlenmiştir (76).

Tez kapsamında hidrofobik moleküllerin albümine non-kovalent bağlanma özelliğini kullanan Nab™ teknolojisi ile nanopartiküller üretilmiştir. Nab™ teknolojisi, hidrofobik kemoterapötikleri içeren formülasyonlarda kullanılan ve toksik etkiler gösteren çözücüler ve çapraz bağlayıcı ajanlar (örn. Kremofor, polisorbata 80, glüteraldehit) kullanılmadan ilaçların seçici ve etkili bir şekilde hedeflenmesini sağlayan bir yöntem olması sebebiyle ilaç endüstrisinde ses getiren bir yöntem olmuştur (75). Nab™ teknolojisiyle üretilen nanopartiküllerde yüzey aktif madde kullanımı zorunlu değildir. Tez kapsamında geliştirilen gefitinib-HSA nanopartiküllerinde yüzey aktif madde kullanılmadan da 200 nm boyutlarında tekdüze partiküller elde edilebilmesine rağmen yüzey aktif madde olarak akciğer yüzeyinde doğal olarak bulunan bir yüzey aktif madde olan DPPC kullanımıyla 117 nm boyutlarında tekdüze partiküller elde edilmiştir. Nab™ teknolojisinde yüksek basınçlı homojenizasyon işleminde homojenizasyon sıcaklığının partikül oluşumuna etkisi, homojenizatör cihazından kaynaklı parametreler (*chamber* tipi vs) ve cihazın alabileceği örnek hacmi, üretimin tekrarlanabilirliği ve ölçek büyütme açısından dikkat edilmesi gereken unsurlardır.

5.3. Nanopartikül Formülasyon Çalışmalarının ve Karakterizasyonlarının Değerlendirilmesi

5.3.1. Yüzey Aktif Maddelerin Etkisi

Nanopartikül üretiminde yüzey aktif madde kullanımı daha küçük boyutta, monodispers ve stabil partiküller elde etmek için yaygın bir yaklaşımdır. Yüzey aktif maddeler özellikle emülsifikasyon aşaması içeren üretimlerde yağ ve su fazlarının yüzey gerilimlerini düşürerek damlacık oluşumunu ve dolayısıyla nanopartikül oluşumunu kolaylaştırabilmektedir (77). Bu bağlamda daha düşük boyutta ve monodispers gefitinib-HSA nanopartikülleri elde etmek amacıyla farklı yüzey aktif maddeler (DPPC, HSPC, oleik asit) kullanılarak partikül boyutu dağılımına etkileri incelenmiştir.

HSPC, soyadan elde edilen bir fosfolipittir ve lipozom formülasyonlarının üretiminde literatürde kullanımına yer verilmektedir (78). Tez kapsamında geliştirilen gefitinib-HSA nanopartiküllerinde yüzey aktif madde olarak kullanımında partikül boyutlarında ve PDI değerlerinde küçülme sağladığı gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.7). Yüksek maliyetli oluşu ve DPPC'nin yüzey aktif madde olarak kullanımına göre üstünlük sağlamayışından ötürü formülasyon geliştirmenin ileriki aşamalarında kullanılmamıştır.

Oleik asit, hayvan ve bitkisel dokularda bol miktarda bulunan bir yağ asididir ve sıvı formda bulunmaktadır. Pang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada oleik asidin organik faza eklenmesiyle 200 nm'den küçük monodispers gefitinib-HSA nanopartikülleri elde edilmiştir (53). Tez kapsamında da bunu doğrulayacak şekilde farklı derişimlerde oleik asidin organik faza eklenmesiyle partikül boyutlarında ve PDI değerlerinde küçülme görülmüştür (Bkz. Tablo 4.8). Fakat oleik asitin akciğer hasarına yol açabileceği ve akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ile ilişkilendirilen çeşitli inflamatuvar araçların sentezine neden olabileceği için tez kapsamında formülasyon geliştirmenin ileriki aşamalarında kullanılmamıştır (79).

DPPC, bir fosfatidilkolin baş grubuna bağlı iki C16 palmitik asit grubundan oluşan bir fosfolipittir ve amfifilik özelliğe sahiptir. Aynı zamanda akciğer yüzeyinde bol miktarda bulunan bir fosfolipit olarak alveoler sıvının yüzey gerilimini düşürerek alveollerin yapısının korunması ve gaz değişiminin sağlanmasında önemli role sahiptir. DPPC'nin yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanımı ile ilgili araştırmalar

genellikle lipozomlar üzerindedir. Zajac ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada gefitinibe benzer şekilde TKI inhibitörü olan sorafenib, DPPC lipozomları içerisine başarıyla enkapsüle edilmiş ve 105 nm boyutunda monodispers lipozomlar elde edilmiştir (80). DPPC, tez kapsamında gefitinib-HSA nanopartiküllerinde yüzey aktif madde olarak kullanılarak partikül boyutunda bütün derişimlerde küçülme sağlamıştır. DPPC kullanımı ile EPR etkisi için hedeflenen 130 nm altındaki partiküller elde edilmesi kolaylaşmıştır (Bkz. Tablo 4.6). Bu bağlamda hem akciğer yüzeyinde doğal olarak bulunduğundan akciğere toksik etkisinin diğer yüzey aktif maddelere göre oldukça az olduğu düşünülen ve daha tekdüze partikül boyutu dağılımını sağlayan DPPC'nin akciğere hedefli nanopartiküllerin geliştirilmesinde umut vadecici olduğu görülmüştür.

5.3.2. HA ile Yüzey Modifikasyonu

Gefitinib-HSA nanopartiküllerinin tümör yüzeyinde normalden daha fazla eksprese edilen CD44 reseptörlerine hedeflendirilmesini sağlamak amacıyla HA ile modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Yüksek negatif yüke sahip olan HA, pozitif yüklü gefitinib-HSA nanopartikül süspansiyonuna eklenerek, HSA yüzeyindeki pozitif yüklü NH₂ gruplarının HA yüzeyindeki karboksilat gruplarıyla etkileşmesi amaçlanmıştır. HA'nın pozitif yüklü partiküller ile etkileşerek bağlanması, herhangi bir kimyasal modifikasyon gerektirmemesi sebebiyle kolaylık sağlamaktadır (21). Elde edilen HA kaplı gefitinib-HSA nanopartiküllerinde partikül boyutunda büyüme görülürken polidispersitede önemli bir değişim gözlenmemiştir. HA kaplanması sonrasında pozitif yüklü nanopartiküllerin yüksek negatif yüke kavuştukları görülmüştür (Bkz. Tablo 4.10). Shen ve Li'nin HSA-erlotinib nanopartiküllerine HA yüzey modifikasyonu yaptıkları çalışmada, tez kapsamında elde edilen nanopartiküllere benzer olarak 112 nm boyutunda negatif yüklü partiküller elde edilmiştir. *In-vitro* hücre kültürü çalışmalarında HA modifikasyonunun erlotinib-HSA nanopartiküllerinin A549 hücrelerine alımını kolaylaştırdığı görülmüştür. Aynı zamanda farelerde gerçekleştirilen *in vivo* deneylerde HA modifikasyonunun biyoyararlanımı ve ilacın kalış süresini artırdığı görülmüştür (25).

5.3.3. Nanopartiküllerin Yüzey Morfolojileri

Nanopartiküllerin yüzey morfolojileri ve boyutları TEM görüntülemesiyle incelendiğinde literatürdeki HSA nanopartikülleriyle paralel olarak küresel yapıda nanopartiküller elde edildiği görülmüştür. Görüntülenen partiküllerin boyutları DLS ölçümleri ile uyumlu olarak 200 nm'nin altındadır. Gefitinibin mikron boyuttaki kristal yapısına HSA nanopartiküllerinin görüntülerinde rastlanmamış olması gefitinibin nanopartikül içerisine hapsedildiğini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.7 ve Şekil 4.32) (81).

5.3.4. Enkapsülasyon Etkinliği

Gefitinibin HSA nanopartikülleri içerisine etkin bir şekilde hapsedildiği, ultrasantrifüj yöntemi kullanılarak enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması ile gösterilmiştir. Serbest gefitinib, düşük moleküler ağırlıklı olduğu için ultrasantrifüj filtresinin 10 kDa olan porlarından sıyrılarak filtrenin aşağısına inerken, HSA'ya bağlı olan gefitinib fraksiyonu 66,5 kDa molekül ağırlığına sahip olan HSA ile beraber filtreden geçememiştir. Filtratta bulunan serbest gefitinib fraksiyonu enkapsüle olmayan gefitinibi temsil ettiğinden, bu fraksiyondaki gefitinib ağırlığı total gefitinib ağırlığından çıkarılarak hesaplama yapılmış ve gefitinib-HSA nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği %97 olarak bulunmuştur. Pang ve ark. tarafından Nab™ yöntemi ile geliştirilen gefitinib-HSA nanopartiküllerinde enkapsülasyon etkinliği $85.50 \pm 0.58\%$ olarak hesaplanmıştır (53). Bu durum gefitinibin HSA nanopartiküllerinin içine yüksek oranda enkapsüle olma özelliğine sahip olduğunu göstermektedir.

5.4. Farklı Taşıyıcıları İçeren KTİ Formülasyonlarının Hazırlanması

FDA kılavuzuna göre KTİ formülasyonlarında taşıyıcı kullanımında dikkat edilmesi gereken unsurlar, etken madde ve taşıyıcı oranları, taşıyıcının formülasyon ile fiziksel ve kimyasal uyumluluğu ve partikül boyutu dağılımına olan etkisidir. Etkin madde, yardımcı maddeler ve kap kapak/cihazı oluşturan parça ile mikroskobik düzeyde parçacıklar arası etkileşimler (örneğin, kohezif ve adeziv özellikler, yüzey aktivitesi, spesifik yüzey alanı, formülasyonun statik yük özellikleri) de önem arz etmektedir. Bu özellikler ve etkileşimler, toz karışımının tekdüzeliğini (*blend uniformity*), toz akışını ve iletilen dozu etkileyebilmektedir (29).

Tez kapsamında, nanopartikül süspansiyonlarına, mannitol, sükroz, laktoz ve trehaloz gibi taşıyıcıların ve lösin ve fenilalanin aminoasitlerinin sudaki çözeltileri eklenerek dondurulmuş ve liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Formülasyona farklı taşıyıcıların eklenmesiyle nanopartikül içeren KTİ'lerin aerodinamik özelliklerinin, redispersibilitesinin ve akış özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca nanopartiküller, dondurarak kurutma işleminin stresine dayanamama riskine sahip ince ve kırılabilir yapıya sahiptir (82). Bu nedenle kullanılan taşıyıcı ve aminoasitlerin nanopartiküllerin yapısını liyofilizasyon işlemi sırasında koruyarak kriyoprotektan işlevi görmeleri de amaçlanmıştır. Liyofilizasyon sonrasında suda redisperse olabilen, organoleptik gözlem ile homojen bir dağılım gösterdiği görülen ve partikül boyutu dağılımı anlamlı ölçüde değişmeyen, stabil nanopartikülleri içeren tozlar elde edilmiştir. Literatürde püskürterek kurutma (*spray drying*), püskürterek dondurarak kurutma (*spray freeze drying*) ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yöntemiyle hazırlanan nanopartikül içeren kuru toz inhaler formülasyonları bulunmaktadır (82), (83, 84).

Tez kapsamında geliştirilen negatif yüklü albümin nanopartiküllerinin diğer yöntemlerle kurutma işlemine tabi tutulması gelecek çalışmalara konu olabileceği potansiyeline sahiptir.

5.4.1 Farklı Taşıyıcılar İçeren KTİ'lerin Aerodinamik Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Tez kapsamında farklı taşıyıcılarla ve taşıyıcısız elde edilen liyofilize KTİ'lerin aerodinamik parametreleri ACI cihazı yardımıyla ölçülmüştür ve taşıyıcıların aerodinamik özelliklere etkisi incelenmiştir. Taşıyıcı içermeyen formülasyonlar (Bkz. Tablo 4.11 KTİ no:1) diğerlerine göre daha fazla İPD sağlaması yönünden üstünlüğe sahiptir. Akciğere yüksek miktarlarda etken madde verilmesi istenen hastalıklarda bu nedenle taşıyıcı içermeyen KTİ'lerin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Böyle durumlarda partikül mühendisliği çalışmaları ile etken maddenin partikül boyutunu ve akış özelliğini iyileştirmek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır (jet öğütme, süperkritik sıvı teknolojisi, yüksek basınçlı homojenizasyon, püskürterek kurutma, püskürterek dondurarak kurutma vb.) (35). Tez

kapsamında mikronize kristal yapıdaki ham gefitinib, albümin ile beraber yüksek basınçlı homojenizasyon işlemiyle nanopartikül hale getirilmiştir. Normal şartlarda nano boyutlu partiküller ekshalasyon ile solunum yolundan geri atılmaktadır, ACI testinde bu durumu filtre aşamasına takılan fraksiyon yansıtmaktadır. Taşıyıcı içermeyen gefitinib-HSA nanopartikül süspansiyonu liyofilizasyon işleminden sonra ACI testine tabi tutulduğunda filtre aşamasında takılan fraksiyon çok düşük bir miktardadır ve partiküllerin aerodinamik çapı yaklaşık 5 µm olarak hesaplanmıştır. Bu durum liyofilizasyon işleminin KOAÇ değeri 1-5 µm olan inhale edilebilir partiküller içeren toz yapısını oluşturmada taşıyıcılardan bağımsız olarak aktif rol oynadığını göstermektedir. Tez kapsamında geliştirilen gefitinib-HSA nanopartikülünü içeren KTİ, hem pasif hem aktif hedeflendirme ile akciğer kanserinin düşük dozlarda kemoterapötik kullanımıyla tedavisini amaçladığından, taşıyıcısız olarak hazırlanan ve yüksek etken madde yüzdesi içeren KTİ üretimi ana hedeflerden biri olarak belirlenmemiştir. Düşük dozlarda gefitinib nanopartiküllerinin kemoterapötik etkinliği ile ilgili nihai karar *in-vivo* deneyler yapılarak verilmelidir.

Partiküllerin akciğere ulaşabilmesi için aerodinamik çaplarının 1-5 µm olması gerekmektedir. Laktoz, mannitol, lösin, fenilalanin, lösin-fenilalanin, lösin-fenilalanin-mannitol, fenilalanin-mannitol taşıyıcıları veya taşıyıcı kombinasyonları ile bu hedef sağlanarak 5 µm'den küçük KOAÇ değerleri elde edilmiştir.

% *Emitted dose*, aerosolize olarak inhaler cihazını terk eden etken madde yüzdesini ifade etmektedir. Üretilen bütün KTİ formülasyonlarında %97 üzerinde %ED değerlerinin elde edilmesi, liyofilizasyon yönteminin aerosolizasyona olumlu katkı sağladığını göstermektedir. Taşıyıcıların bu yönde anlamlı bir katkısı olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca kullanılan HPMC kapsülü ile formülasyonlar arasında istenmeyen yönde bir adezyon ve/veya elektrostatik etkileşme bulunmadığı, tozun nefes alma kuvvetiyle kapsülü rahatlıkla terk edebildiği görülmüştür. % *Emitted dose* oranlarının literatürde püskürterek kurutma ile elde edilen KTİ formülasyonlarına göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür (54, 85).

İPD, KTİ formülasyonlarında partikül boyutu 5 µm'nin altında olan ilaç dozunu ifade etmektedir. Bu durum akciğere ulaşması beklenen ilaç miktarını temsil etmektedir. Hazırlanan bütün KTİ formülasyonlarında 15 µg üzerinde İPD değerleri

elde edilmiştir. Liyofilize toz hacimleri taşıyıcıya ve taşıyıcı miktarına göre değiştiğinden kapsüle tartılabilen toz miktarları değişkenlik göstermiş ve bu nedenle İPD miktarları bütün formülasyonlarda aerodinamik özelliklerden bağımsız olarak farklı bulunmuştur. Bu nedenle tez kapsamında en iyi KTİ taşıyıcısının seçiminde İPD'nin ACI sisteminden toplanan toplam doz miktarına (*emitted dose*) oranını gösteren %İPF değerleri dikkate alınmıştır.

Mannitol, KTİ formülasyonlarında aerosolizasyonu ve partikül dispersiyonunu iyileştirmek için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda literatürde püskürterek kurutma işleminde protein yapısının korunması amacıyla ve liyofilizasyon işleminde kriyoprotektan olarak kullanımına da yer verilmiştir. Tez kapsamında geliştirilen gefitinib-HSA nanopartiküllerini içeren formülasyonlarda mannitolün kullanımı hem HSA'nın yapısını liyofilizasyon işlemine karşı korumak hem de nanopartiküllerin agregasyonunu azaltmak amaçlıdır. Kaialy ve Nokhodchi'nin salbutamolü farklı mannitol türleriyle kombine ettiği KTİ'lerde liyofilize mannitolün, püskürterek kurutulmuş ve işlem görmemiş mannitole göre daha iyi aerodinamik özellikler gösterdiği görülmüştür (77,86).

Aminoasitler, son yıllarda partikül mühendisliği çalışmalarında özellikle biyolojik yapıları ilaçların (DNA, enzim vs.) KTİ formülasyonlarında yüzey morfolojisini ve aerosolizasyonu iyileştirmek ve biyolojik yapıyı püskürterek kurutma işlemine karşı korumak için kullanılmaktadır. Farhangi ve ark. püskürterek kurutulmuş siprofloksasin KTİ'lerinin hazırlanmasında lösün ve fenilalanin aminoasitlerini taşıyıcıya göre %10-20 oranlarında anti-adezyon ajanı olarak kullanmış ve bu aminoasitlerin yüzey aktif özelliklerinden ötürü mikropartiküllerin boyutlarını azalttığını ve FPF üzerinde fenilalaninin lösine göre daha olumlu etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir (87). Tez kapsamında geliştirilen KTİ'lerde fenilalanin ve lösün daha yüksek oranlarda kullanılmış ve lösünün tek başına kullanımında laktoz ve mannitole göre aerodinamik özelliklerde üstünlük sağlamadığı görülmüştür. Fakat fenilalaninin tek başına taşıyıcı olarak liyofilize KTİ formülasyonunda kullanımı ile aerosolizasyon özellikleri ve aerodinamik çapı iyi olan, poröz yapıda tozlar elde edilmiştir. Fenilalanin, liyofilizasyon sonrası dansitesi oldukça düşük olan yüksek hacimli tozların eldesini sağlamıştır. Formülasyon hacminin çok yüksek olması, bir

kapsüle toz yapısı bozulmadan sığabilecek olan etkin madde miktarını oldukça azalttığından, yine aerodinamik açıdan arzulanan İPF ve KOAÇ değerlerine sahip olan fenilalanin-mannitol karışımı taşıyıcı olarak seçilmiş ve tez kapsamındaki KTİ karakterizasyonlarında bu formülasyon kullanılmıştır (88).

5.5. Etkin Madde, Yardımcı Maddeler ve KTİ Formülasyonları Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal İncelemeler

5.5.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve Differansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi (DSC)

Gefitinib ve yardımcı maddeler ile yapılan FT-IR ve DSC analizlerinde formülasyonlarda kullanılan tüm maddelerin literatürdeki ile uyumlu fonksiyonel gruplara sahip olduğu ve literatüre benzer erime noktalarına sahip olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.9-16 ve. Şekil 4.18-23). FTIR analizi sonucunda KTİ formülasyonlarında gözlenen baskın fonksiyonel grupların beklenildiği üzere formülasyonda yüksek oranda bulunan mannitol, fenilalanin ve HSA'ya ait olduğu görülmüştür.

KTİ formülasyonunun DSC analizi sonucunda mannitole ve HSA'ya ait erime pikleri gözlenmiştir. KTİ termogramında gefitinibe ait erime pikinin gözlenmemesi gefitinibin nanopartikül içine hapsolmasından ve/veya miktarca formülasyonda gözlenemeyecek kadar az olmasından kaynaklanmaktadır. Gefitinibin nanopartikül içerisinde hapsoldüğü, enkapsülasyon etkinliği gibi farklı karakterizasyon çalışmalarıyla gösterilmiştir. KTİ formülasyonunun DSC termogramında mannitole aite erime pikinin ham mannitole göre daha düşük bir sıcaklıkta gözlenmesi, liyofilizasyon işlemi sırasında kristal yapısındaki değişimlerden ve formülasyondaki yardımcı maddelerle fiziksel/kimyasal etkileşimlerden kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir (82).

5.5.2. Yüzey Alanı Ölçümü (BET)

KTİ'lerin aerosolizasyonu ve akciğerde dağılımı, formülasyona ait fizikokimyasal özellikler, partikül boyutu, şekli, yüzey alanı ve morfolojisi gibi faktörlere dayanmaktadır. Bu faktörlerden biri olan yüzey alanı, yüzey geometrisinin

bir ölçütüdür ve partikül boyutu da yüzey alanının temel belirleyicisidir. Partiküllerin yüzeylerindeki düzensizliklerin sayısı arttıkça ve partikül boyutu azaldıkça, yüzey alanı artmaktadır. Tez kapsamında KTİ formülasyonunun yüzey alanı ölçülmüş ve fenilalanin-mannitol karışımından oluşan taşıyıcının yüzey alanına etkisinin görülmesi için taşıyıcıları içermeyen liyofilize formülasyon ile karşılaştırılmıştır. Taşıyıcı varlığının KTİ yüzey alanını yaklaşık 6 kat artırdığı gözlenmiştir. Yüzey alanı artışı, çözücüye temas eden yüzeyi artırdığından KTİ'lerin akciğer yüzeyindeki dispersibilitesi için genellikle istenen bir durumdur. Sethuraman ve Hickey'in tüberküloz tedavisi için ürettikleri mikroküre formundaki KTİ'ler üzerinde yapılan analizlerde yüzey alanı ve İPF'nin pozitif bir korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. Tez kapsamında gerçekleştirilen ACI analizlerinde de taşıyıcı içeren KTİ formülasyonunun daha yüksek İPF'ye sahip olduğu görülmüştür (89, 90).

5.5.3. Floresans Spektroskopisi

Tez kapsamında geliştirilen nanopartiküllerin oluşturulmasında gefitinibin HSA'ya bağlanabilme özelliği kritik öneme sahiptir. HSA ve gefitinibin van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağlarıyla etkileşerek zayıf etkileşimlerle birbirine bağlandığı literatürde gösterilmiştir (56). Tez kapsamında HSA'nın floresans ışımaya özelliği sayesinde, artan derişimlerde gefitinibe bağlanma özelliği incelenmiştir. Aynı zamanda yüzey aktif madde olarak formülasyon çalışmalarında nanopartikül eldesinde kullanılan HSPC, DPPC ve oleik asidin HSA-gefitinib bağlanmasına etkisini gözlemlemek amacıyla bu yüzey aktif maddeleri bulunduran ortamlarda da floresans spektroskopisi deneyleri yapılmıştır. Molarite cinsinden 1-20 katı arasında artan derişimlerde gefitinibi bağlama özelliği incelenen HSA'nın 20 katı molaritede gefitinibi bağlayabildiği görülmüştür (Bkz. Tablo 4.15). Stern-Volmer sabitlerine bakılarak yüzey aktif maddelerin HSA'nın gefitinib bağlama özelliğini artırmadığı gözlenmiştir (Bkz. Tablo 4.18). Yüzey aktif maddelerin kullanımıyla nanopartiküllerin boyutlarında yaşanan düşüşün, emülsifikasyon aşamasında yüzey gerilimini azaltarak nanoemülsiyon oluşumunu kolaylaştırmalarına dayanmakta olduğu düşünülmektedir. Tanzadepahnah ve ark. HSA-gefitinib bağlanmasını göstermek için gerçekleştirdikleri floresans spektroskopisi deneylerinde sıcaklık artışı ile Ksv ve bağlanma sabiti (Ka) değerlerindeki düşüşün nedeninin HSA-gefitinib

kompleksinin stabilitesindeki azalmadan kaynaklandığı belirtilmiştir (56). Bu duruma dayanarak nanopartikül üretim işlemi sırasında oluşan ısınmaların ya da yüksek sıcaklıkta üretim yapmanın HSA-gefitinib bağlanmasını bir miktar azaltabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Tez kapsamında en tekdüze ve küçük boyutlu gefitinib-HSA nanopartiküllerin 50 °C'de yüksek basınçlı homojenizasyon işlemi ile sağlanmıştır. Gefitinibin HSA'ya bağlanma özelliğinin yüksek basınçtan da etkilenebileceği düşünülmektedir.

5.6. Çözünürlük Tayini

Gefitinib, BCS Class II olarak adlandırılan düşük çözünürlük-yüksek permeabiliteye sahip moleküller sınıfında yer almaktadır. Suda çözünmeyen etkin maddelerin çözünebilirliğini artırmak, formülasyon stratejilerinde kritik öneme sahiptir. Fizyolojik pH'yı taklit eden PBS (pH=7,4) ortamında yapılan çözünürlük tayininde gefitinibin 0,061 µg/mL derişimde doyunluk çözünürlüğüne sahip olduğu gözlenmiştir. Tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonu içerisindeki gefitinib ise aynı ortamda 0,169 µg/mL derişimde doyunluk çözünürlüğüne ulaşmıştır. KTİ formülasyonu içerisinde gefitinibin çözünürlüğünün yaklaşık 2-3 kat artması; kristal formda bulunan ham gefitinibin liyofilizasyon işlemi ile KTİ içerisinde amorf forma dönüşmesi, KTİ formülasyonunun taşıyıcıların da yardımıyla geniş yüzey alanına sahip olması ve suda kolayca ıslanıp disperse olabilmesi, formülasyon içerisinde yüzey aktif madde bulunması gibi faktörlerle açıklanabilir. Liyofilizasyon yöntemi gibi püskürterek kurutma işleminin de suda az çözünen ilaçların amorf forma dönüşerek çözünürlüğünü artırabildiği bilinmektedir. Mangal ve ark. düşük çözünürlüklü azitromisini L-lösin ile birlikte püskürterek kurutma işlemine tabi tutmasıyla birlikte elde edilen KTİ'lerin içeriğindeki azitromisinin çözünürlüğünün arttığı gösterilmiştir (91).

5.7. *In-vitro* Salım

Akciğer için uygulanabilir standart bir *in vitro* salım yönteminin tasarlanması, akciğerlerin yüzeyinde oldukça az miktarda sulu çözelti ve akciğer için spesifik yüzey aktif maddeleri içermesi gibi benzersiz özelliklere sahip olması nedeniyle bazı zorluklara sahiptir (92). Tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonlarından akciğer

ortamında gefitinib salımını simüle edebilmek amacıyla akciğer interstisyel sıvısını taklit eden SLF, salım ortamı olarak kullanılmıştır. SLF, akciğere ulaşması hedeflenen dozaj formlarının salım ve dissolüsyon çalışmalarında kullanılan bir çözeltilerdir ve nötral pH'ya sahiptir (pH=7,4). Sağlıklı bir insanda hava yollarında akciğer yüzeyi sıvısının pH'sı alt solunum yollarında $7,1 \pm 0,1$ iken üst solunum yollarında $6,6 \pm 0,1$ 'dir (80). Ayrıca literatürde akciğerdeki yüzey aktif madde içeriğini taklit etmek için DPPC ile hazırlanan SLF çözeltileri de mevcuttur. Fakat DPPC'nin sudaki düşük çözünürlüğünden dolayı bu çözeltinin hazırlanmasında ince film tabakası oluşturma yöntemi gibi çok basamaklı bir hazırlama yöntemi kullanılması, bu yöntemin kısıtlı kullanımına yol açmaktadır (92).

Salım ortamının pH'sının salım özellikleri üzerinde etkili bir faktör olduğu bilinmektedir. Bu nedenle salım ortamlarının hedeflenen organ/dokudaki pH'yı taklit edebilmesi *in vitro/in vivo* korelasyon açısından önemli olabilmektedir (93). Aynı zamanda hedeflenen hastalıkla birlikte ortaya çıkabilecek başka hastalıkların da pH'ya etkisi göz önünde bulundurulmalıdır (Örn. Akciğer kanserinin immün sistemi zayıflatarak pnömoni gelişmesini kolaylaştırması) (94). Akciğer kanserinde tümör mikroçevresinde düşük pH değerlerine rastlansa bile kistik fibroziste olduğu gibi tüm solunum yolunu etkileyen bir pH değişim etkisi ile ilgili henüz yeterli literatür bulunmamaktadır (80, 95). Dolayısıyla tez kapsamında KHDAK tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen KTİ'nin salım çalışması için nötral pH'daki SLF kullanılmıştır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen salım çalışması-1'de gefitinibin tayin edilebilirlik limitinin altına düşmeden sink koşullarının sağlanabilmesi için gefitinibin çözünürlüğünü artırmak amacıyla SLF ortamına %0,2 oranında SLS eklenmiştir. İlk bir saat içerisinde KTİ-7 ve KTİ-10'un sırasıyla %28 ve %65 gefitinib salımları, ani salım yaptıklarını göstermektedir. Ham gefitinib ise ilk bir saatte %10 oranında salınmıştır. KTİ-10 formülasyonunda taşıyıcı olarak kullanılan mannitolün sudaki çözünürlüğünün çok yüksek olması, formülasyonun sulu ortamda hızlıca disperse olarak gefitinib salımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. KTİ-7 formülasyonunda sudaki çözünürlüğü mannitole göre daha düşük olan fenilalanin kullanımının ani salım özelliğini düşürdüğü gözlenmiştir. KTİ-10 36 saat sonunda içeriğindeki gefitinibin

%90'ını salarak en yüksek kümülatif gefitinib salımını göstermiştir. Aerodinamik özellikleri benzer şekilde iyileştiren taşıyıcılar olduğu gösterilen fenilalanin ve fenilalanin-mannitol karışımı arasında, fenilalanin-mannitolün taşıyıcı olarak kullanılmasının salımdaki üstünlüğü göz önüne alınarak stabilite ve *in vitro* salım deneylerinde bu formülasyon kullanılmıştır. Taşıyıcıların çözünürlüklerinin ve formülasyondaki diğer maddelere olan adeziv özelliklerinin salım özelliğini etkilediği ve mannitolün fenilalanine göre daha hızlı bir salıma ve yüksek miktarda kümülatif etkin madde salımına neden olduğu gösterilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen 2 numaralı salım yüzey aktif madde bulunmayan SLF ortamında gerçekleştirilmiştir ve 1 numaralı salımda KTİ-10 formülasyonunda görülen ani salım etkisinin aynı formülasyon içeriğine sahip olan HA-gefitinib-HSA-KTİ formülasyonunda daha az miktarda gözlenmiştir (salım no:1, KTİ-10 1. saat sonunda gefitinib salımı %65; salım no:2, HA-gefitinib-HSA-KTİ 1. saat sonunda gefitinib salımı %19). Bu durumun deney tasarımındaki farklılıklardan kaynaklı olabileceği gibi (Bkz. Tablo 3.7) salım ortamında yüzey aktif madde bulunmamasının etkisi de olduğu söylenebilir. Yüzey aktif maddeler KTİ formülasyonunun suda dispersiyonunu hızlandırarak ve gefitinib çözünürlüğünü artırarak gefitinibin daha hızlı bir şekilde diyaliz membrandan geçmesini sağlamıştır. KTİ formülasyonlarına taşıyıcı eklenmesinin salım davranışına etkisini gözlemlemek amacıyla salım no-2'de taşıyıcılar eklenmeden hazırlanan HA-gefitinib-HSA-NP ve fenilalanin-mannitol taşıyıcılarıyla hazırlanan HA-gefitinib-HSA-KTİ karşılaştırılmıştır. HA-gefitinib-HSA-KTİ 72 saat sonunda içindeki gefitinibin %56'sını salmışken HA-gefitinib-HSA-NP %81'ini salmıştır. Her iki formülasyonda da 72 saat sonunda %43 salınan ham gefitinibden daha yüksek miktarda gefitinib salımı sağlanmıştır. Bu durum, tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonunun ham gefitinibden daha fazla gefitinib saldığı göstermekle birlikte salım özelliğinin artmasındaki ana unsurların nanopartikül oluşturma ve/veya liyofilizasyon işlemleri olduğunu göstermektedir. Taşıyıcıların eklenmesi suda dispersiyonu iyileştirerek salımı bir miktar artırmakla birlikte, taşıyıcıların diğer formülasyon bileşenleri ile adezyon göstermesi ve formülasyonda yüksek miktarda bulunması, gefitinibin nanopartiküllerin içinden salımını bir miktar geciktirmektedir. Bu nedenle liyofilize KTİ formülasyonlarında taşıyıcı kullanımına karar verilirken aerodinamik özellikleri

iyileştirmeleriyle beraber formülasyondan etkin madde salımını yavaşlatma/azaltma ihtimalleri de göze alınarak, yarar-zarar ilişkisi değerlendirilmelidir. Tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonunda düşük dozlarda kemoterapötik kullanarak akciğerin derinlerine inen ve tümöre etki eden formülasyonlar geliştirilmesi amaçlandığından aerodinamik özelliklere öncelik verilmiş ve fenilalanin-mannitol kombinasyonun taşıyıcı olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

Arora ve ark. tarafından geliştirilen KTİ formülasyonunda, vorikonazol yüklü polilaktid mikropartikülleri püskürterek kurutmaya elde edilmiştir. PBS salım ortamında diyaliz membran yöntemiyle gerçekleştirilen *in vitro* salım deneyinde vorikonazol yüklü polilaktid mikropartiküllerinin 48 saat boyunca vorikonazol saldığı ve 48 saat sonunda toplam %92 oranında vorikonazolün salındığı görülmüştür. Ham vorikonazolün tek başına püskürterek kurutmaya tabi tutulmasıyla elde edilen inhale edilebilir vorikonazolün ise %90'ının 2 saat içerisinde ani bir salım yaptığı gözlenmiştir. Bu bağlamda polilaktik asit gibi polimerlerin kuru toz inhaler formülasyonlarında uzatılmış salımı sağlayabileceği ortaya konmuştur. Tez kapsamında geliştirilen ve polimer yapıda HSA'yı içeren KTİ formülasyonlarının da 72 saat boyunca etken madde salımına devam etmesi, HSA'nın uzatılmış salım sağlayabilme potansiyelini ortaya koymaktadır (96).

5.8. Stabilite

Tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonunun HPMC kapsüllere konulup 6 ay boyunca hızlandırılmış stabilite şartlarına maruz bırakılmasıyla aerodinamik özellikler ve nem içerikleri sırasıyla ACI ve TGA analizleri ile incelenmiştir. 3. ayda yapılan ACI analizlerine KOAÇ değerlerinde az miktarda düşüş ve İPF değerindeki az miktarda yükseliş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. 6. ayda görülen düşük miktarda da olsa aerodinamik parametrelerdeki istenmeyen yöndeki değişim de istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (Bkz. Tablo 4.23). Aynı şekilde yapılan TGA analizlerinde formülasyonun nem içeriğinde 3. ve 6. aylarda anlamlı değişimler gözlenmemiştir. 6. ayda nem içeriğinde artış olmamasına rağmen aerodinamik partikül çapında artış gözlenmesi, bu durumun formülasyonun nem çekme özelliğinden olmadığı, aerodinamik özelliklerdeki değişimin toz yapısındaki kekleşme gibi farklı

durumlardan kaynaklanabileceğini göstermektedir (97). Tüm bunlar göz önüne alınarak 6 ay boyunca yüksek nem ve sıcaklığa karşı aerodinamik özellikleri ve nem çekme özelliği yönünden stabil KTİ formülasyonları geliştirildiği görülmüştür.

5.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında geliştirilen gefitinib-HSA nanopartiküllerini içeren KTİ formülasyonlarının akciğer kanseri hücrelerinde etkisinin görülmesi için LLC1, sağlıklı hücrelerde toksik etkisinin görülmesi amacıyla genellikle toksisite testlerinde kullanılan L929 hücre hattı kullanılarak MTT analizi yapılmıştır. MTT hücre canlılık testi, yaşayan hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat-dehidrojenaz enzimi ile özgül olarak tepkimeye giren tetrazolyum tuzu kullanılarak oluşan mavi formazan kristallerinin kalorimetrik ölçümüyle hücrelerin metabolik aktivitelerinin kantitatif olarak ölçülmesini sağlamaktadır (98).

Gefitinibin LLC1 ve L929 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat inkübasyonları sonucu hücre canlılıklarında zamana bağlı belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. 24. saatteki IC50 değerleri incelendiğinde gefitinibin LLC1 hücreleri üzerinde L929 hücrelerine göre 2-3 kat daha fazla öldürücü olduğu gözlenmiştir. Gefitinibin EGFR mutasyonu gösteren kanser hücrelerinde metastazı azalttığı bilinmektedir dolayısıyla adenokarsinomlu LLC1 hücrelerinin gefitinibin sitotoksik etkisine karşı sağlıklı L929 hücrelerine göre daha az dayanıklı olduğu görülmüştür. Sağlıklı fare fibroblast hücrelerinde gefitinibin sitotoksik olmayan dozu (IC20) 18 µM olarak bulunmuştur, bu doz KTİ formülasyonlarının MTT ve hücre içine alımı için optimal doz olarak belirlenen 15 µM'ın üzerindedir. Yani tez kapsamında LLC1 üzerinde kullanılan 15 µM doz sağlıklı hücreler için toksik değildir. Tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonunda taşıyıcı olarak kullanılan fenilalanin-mannitol karışımının L929 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı gösterilmiştir. USP-NF'de ve FDA yönergelerinde tek ismi geçen KTİ taşıyıcısı olan laktoz, laktoz alerjisi gibi durumlarda sakıncalı olabilmektedir. Bu bağlamda tez kapsamında ve literatürde de KTİ'lerin aerodinamik özelliklerinde iyileşme sağladığı gösterilen fenilalanin ve mannitolün de akciğere toksik etki yapmadan kullanılacak taşıyıcılar olarak gösterilmesi önemlidir, bu taşıyıcıların güvenilirlikleri insan akciğeri hücre hatları ve farklı simüle akciğer modelleri kullanılarak pekiştirilmelidir.

MTT analizlerine göre tez kapsamında geliştirilen gefitinib-HSA nanopartiküllerini içeren KTİ formülasyonu akciğer kanseri hücrelerinin baskılanmasında ilk 24 saatte ham gefitinibe göre bir üstünlük göstermemiştir. 72 saat inkübasyon süresinden sonra nanopartikülleri içeren KTİ formülasyonun çok düşük dozlarda bile sitotoksik etkisi gözlenirken ham gefitinib 24 saat inkübasyonu ile benzer bir profil çizmiştir. KTİ 3,75 μM dozda LLC1 hücrelerinin yarısını öldürürken, gefitinib 7,5-15 μM arası bir dozda ancak bunu sağlayabilmiştir. Pang ve arkadaşlarının gefitinib-HSA nanopartikülleri ve gefitinib çözeltisini karşılaştırdığı *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında nanopartiküllerin insan bronkoalveoler karsinoma (NCI-H358) hücrelerinde geç apoptozu ve hücre ölümünü artırdıkları gözlenmiştir (53). Aynı zamanda NCI-H358 hücreleri ile yapılan MTT testlerinde 48 ve 72. saatlerde gefitinib-HSA nanopartiküllerinin serbest gefitinibden daha düşük IC50 değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir. Pang ve ark. bu durumu NCI-H358 hücrelerindeki SPARC'ın fazla ekspresyonuna bağlı olarak HSA nanopartiküllerinin hücre içine serbest gefitinibden daha fazla alınması ile ilgili olarak yorumlamıştır (53). Tez kapsamında LLC1 hücreleri ile elde edilen sonuçlar bu durum ile paralellik göstermektedir. Formülasyondaki HSA'nın SPARC etkileşmesi ve nanopartikül kaplamasında kullanılan HA'nın CD44 aracılı hücre içine alımı ile kanser hücrelerine ilaç alımını artırarak gefitinibin sitotoksik etkisini daha düşük dozlarda sağladığı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

1. Gefitinib-HSA nanopartikülleri Nab™ teknolojisinde küçük değişiklikler yapılarak üretilmiştir ve 130 nm'nin altında tekdüze nanopartiküller elde edilmiştir. Bu yöntemde kritik işlem parametreleri organik faz türü, organik faz/su fazı, gefitinib/HSA oranı, homojenizasyon sayısı, homojenizasyon sıcaklığı, homojenizasyon basıncı, yüzey aktif madde türü ve derişimi olarak belirlenmiştir. Homojenizasyon sayısı arttıkça partiküllerin agregasyona uğrayarak büyüebildiği görülmüştür. Daha düşük oranlarda organik faz kullanımının partikül boyutlarında küçülme sağladığı gözlenmiştir. Homojenizasyon sırasında ortaya çıkabilecek sıcaklık değişimlerinin kontrol edilmesi ve belli bir sıcaklıkta üretim yapılmasının metodun tekrarlanabilirliği açısından önem arz ettiği görülmüştür.
2. Akciğer yüzeyinde doğal olarak bulunan bir yüzey aktif madde olan DPPC'nin formülasyonlarda yüzey aktif madde olarak kullanımının 130 nm altında tekdüze gefitinib-HSA nanopartiküllerinin elde edilmesini kolaylaştırıldığı görülmüştür.
3. Nanopartiküllerin CD44 reseptörleri aracılığıyla tümöre aktif hedeflendirilmesi için HA kaplanmıştır. Bu işlem sonucunda yüzey yükünün negatifleştiği ve partikül boyutlarının büyüdüğü gözlenmiştir.
4. Elde edilen nanosüspansiyonların inhale edilebilir hale getirilmesi için çeşitli taşıyıcılar eklenerek ya da eklenmeden liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Liyofilizasyon işlemi sayesinde mikron boyutlu aerodinamik çapa sahip, geniş yüzey alanlı, amorf formda ve poröz yapılı tozlar elde edilmiştir.
5. Laktoz, mannitol, trehaloz, sükroz, fenilalanin ve lösinin taşıyıcı olarak kullanımı ile aerodinamik parametrelerin değişimi ACI verilerine dayanarak incelenmiştir. Fenilalanin ve fenilalanin-mannitol taşıyıcılarının en yüksek oranda ince partiküllerin elde edilerek akciğerin derinliklerine en iyi ulaşma potansiyeline sahip taşıyıcılar olduğu görülmüştür.
6. *In vitro* salım çalışmaları sonucunda liyofilize gefitinib nanopartiküllerinin, işlenmemiş gefitinibe göre daha yüksek oranda gefitinib saldıdığı görülmüştür. Bu

durum liyofilizasyon işlemi sayesinde yüzey alanı geniş ve suda kolay disperse olabilen tozların elde edilmesine ve gefitinib çözünürlüğünün formülasyon içerisinde artmasına bağlanmaktadır. Fenilalaninin taşıyıcı olarak mannitol ile kombine olarak kullanımının tek başına kullanımına göre daha yüksek oranda gefitinib salımını sağladığı görülmüştür. KTİ formülasyonlarından gefitinib salımı simüle akciğer sıvısı ortamında 72 saat boyunca devam etmiştir.

7. Gefitinib-HSA nanopartiküllerini içeren KTİ formülasyonlarının LLC1 hücre hattı üzerinde 72 saat inkübasyon süresi sonucunda işlenmemiş gefitinibe göre daha düşük IC50 değerine sahip olduğu gösterilmiştir. Nil kırmızısı içeren KTİ formülasyonlarının içerisinde Nil kırmızısının LLC1 hücrelerinin içlerine alındığı floresans boyama ile gözlenmiştir.
8. Tez kapsamında geliştirilen KTİ formülasyonunun 6 ay boyunca hızlandırılmış stabilite koşullarına maruz kalması sonucu nem içeriği ve aerodinamik özellikleri yönünden stabil kaldığı gösterilmiştir.

Geliştirilen HSA nanopartiküllerine gefitinibin yüklenmesi, HSA'nın hidrofobik ilaçları bağlama kapasitesi ile sınırlıdır. Daha yüksek miktarlarda gefitinibin HSA nanopartiküllerine yüklenebilirliğinin gözlemlenmesi için desolvasyon, emülsifikasyon, kendiliğinden oluşum, termal jelasyon, nano-püskürterek kurutma, mikroakışkan teknolojisi gibi albümin nanopartikül oluşturma yöntemleri ile nanopartiküller hazırlanabilir. Aynı zamanda HSA nanofiberleri ve nanoçubuklarının yükleme etkinliği açısından nanopartiküllere göre üstünlükleri de literatürde incelenmiştir (99).

KTİ formülasyonlarının aerodinamik özelliklerinin taşıyıcılar olmadan iyileştirilmesi için nanopartikül süspansiyonlarının püskürterek kurutma yöntemiyle içerisindeki sıvının uzaklaştırılması denenebilir. Formülasyonlarda kullanılan taşıyıcı miktarları azaltılarak aerodinamik parametrelerde kötüleşme olup olmadığı araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Ahmet B, Elif C, Omer Fatih O, Ebru K. Impact of SPARC expression on pembrolizumab treatment response and prognostic role in advanced stage non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2023;41(16_suppl):e21042-e.
2. Cancer who2022 [Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
3. Derneği TT. Akciğer Kanseri [Available from: <https://toraks.org.tr/site/resources/aegrotationes/p/3>.
4. Gül C. Akciğer Kanseri Hastalarda Braf, Kras, Nras Ve Ptk3ca Gen Mutasyonlarının Belirlenmesinin Prognostik Ve Terapötik Etkisinin Araştırılması : Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2021.
5. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet Oncology*. 2005;6(5):322-7.
6. Swanton C, Govindan R. Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer. (1533-4406 (Electronic)).
7. Koçana C, Toprak S, Yaşa Çevik B, Hekimoğlu H, Sözer S. Cell Free DNA and Genometastasis. *Experimed*. 2019;9:69-74.
8. Cortés AA, Urquizu LC, Cubero JH. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: state-of-the-art. *Translational lung cancer research*. 2015;4(2):191.
9. Lee SH. Chemotherapy for Lung Cancer in the Era of Personalized Medicine. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2019;82(3):179-89.
10. Sharma P, Mehta M, Dhanjal DS, Kaur S, Gupta G, Singh H, et al. Emerging trends in the novel drug delivery approaches for the treatment of lung cancer. *Chem Biol Interact*. 2019;309:108720.
11. Bhirde AA, Patel V, Gavard J, Zhang G, Sousa AA, Masedunskas A, et al. Targeted Killing of Cancer Cells in Vivo and in Vitro with EGF-Directed Carbon Nanotube-Based Drug Delivery. *ACS Nano*. 2009;3(2):307-16.
12. Choi SH, Jin S-E, Lee M-K, Lim S-J, Park J-S, Kim B-G, et al. Novel cationic solid lipid nanoparticles enhanced p53 gene transfer to lung cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008;68(3):545-54.
13. Shao Z, Shao J, Tan B, Guan S, Liu Z, Zhao Z, et al. Targeted lung cancer therapy: preparation and optimization of transferrin-decorated nanostructured lipid carriers as novel nanomedicine for co-delivery of anticancer drugs and DNA. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1223-33.
14. Maiolino S, Russo A, Pagliara V, Conte C, Ungaro F, Russo G, et al. Biodegradable nanoparticles sequentially decorated with Polyethyleneimine and Hyaluronan for the targeted delivery of docetaxel to airway cancer cells. *J Nanobiotechnology*. 2015;13:29.
15. Liu J, Liu J, Chu L, Wang Y, Duan Y, Feng L, et al. Novel peptide-dendrimer conjugates as drug carriers for targeting nonsmall cell lung cancer. *Int J Nanomedicine*. 2010;6:59-69.
16. Zhang L, Liu Z, Kong C, Liu C, Yang K, Chen H, et al. Improving Drug Delivery of Micellar Paclitaxel against Non-Small Cell Lung Cancer by Co-loading Itraconazole as a Micelle Stabilizer and a Tumor Vascular Manipulator. *Small*. 2018;14(51):1802112.
17. Yokoyama T, Tam J, Kuroda S, Scott AW, Aaron J, Larson T, et al. EGFR-targeted hybrid plasmonic magnetic nanoparticles synergistically induce autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(11):e25507.
18. Calzoni E, Cesaretti A, Polchi A, Di Michele A, Tancini B, Emiliani C. Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *J Funct Biomater*. 2019;10(1).
19. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. LID - 10.3390/jpm11080771 [doi] LID - 771. (2075-4426 (Print)).
20. Sharma U, Badyal PN, Gupta S. Polymeric nanoparticles drug delivery to brain: A review. *Int J Pharmacol*. 2015;2(5):60-9.
21. Lei C, Liu X-R, Chen Q-B, Li Y, Zhou J-L, Zhou L-Y, et al. Hyaluronic acid and albumin based nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2021;331:416-33.
22. Spada A, Emami J, Tuszynski JA, Lavasanifar A. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. *Mol Pharm*. 2021;18(5):1862-94.
23. Lee ES, Youn YS. Albumin-based potential drugs: focus on half-life extension and nanoparticle preparation. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2016;46(4):305-15.

24. An FF, Zhang XH. Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery. *Theranostics*. 2017;7(15):3667-89.
25. Shen Y, Li W. HA/HSA co-modified erlotinib-albumin nanoparticles for lung cancer treatment. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:2285-92.
26. Lee W-H, Loo C-Y, Traini D, Young PM. Inhalation of nanoparticle-based drug for lung cancer treatment: Advantages and challenges. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;10(6):481-9.
27. Ali M. Pulmonary Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*: Elsevier Inc; 2010.
28. Malamataris MS. Engineering Nanoparticle Agglomerates as Dry Powders for Pulmonary Drug Delivery: UCL; 2016.
29. Metered Dose Inhaler (MDI) and Dry Powder Inhaler (DPI) Products -Quality Considerations Guidance for Industry, (2018).
30. Kadota K, Sosnowski TR, Tobita S, Tachibana I, Tse JY, Uchiyama H, et al. A particle technology approach toward designing dry-powder inhaler formulations for personalized medicine in respiratory diseases. *Advanced Powder Technology*. 2020;31(1):219-26.
31. Peng T, Lin S, Niu B, Wang X, Huang Y, Zhang X, et al. Influence of physical properties of carrier on the performance of dry powder inhalers. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(4):308-18.
32. 27) USP&NfU-N. United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 32-NF 27). 2009.
33. Eedara BB, Bastola R, Das SC. Dissolution and Absorption of Inhaled Drug Particles in the Lungs. *Pharmaceutics*. 2022;14(12).
34. Agency EM. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 7.02008.
35. Çaylı YA. Antibiyotik İçeren Kuru Toz İnhaler Formülasyonu Tasarımı Ve Permeabilite Çalışmaları: Hacettepe; 2017.
36. Scientific C. Driving Results in Inhaler Testing. 2021.
37. European Pharmacopoeia, (2019).
38. (CHMP). Gefitinib Mylan. 2018.
39. Lee VHF, Tin VPC, Choy T-s, Lam K-o, Choi C-w, Chung L-p, et al. Association of Exon 19 and 21 EGFR mutation patterns with treatment outcome after first-line tyrosine kinase inhibitor in metastatic non-small-cell lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2013;8(9):1148-55 %@ 556-0864.
40. AstraZeneca. Iressa 250 mg Kısa Ürün Bilgisi. TITCK.
41. Liu CY, Seen S. Gefitinib therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Pharmacother*. 2003;37(11):1644-53.
42. Liu CY, Seen S. Gefitinib Therapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Annals of Pharmacotherapy*. 2003;37(11):1644-53.
43. Araki T, Yashima H, Shimizu K, Aomori T, Hashita T, Kaira K, et al. Review of the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer with Gefitinib. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2012;6:CMO.S7340.
44. AstraZeneca. IRESSA: EPAR- Product Information. 2009 22.07.2009. Report No.: Iressa-EMEA/H/C/001016 - IA/0037.
45. Shah RR. Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced Interstitial Lung Disease: Clinical Features, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Dilemmas. *Drug Saf*. 2016;39(11):1073-91.
46. Kazandjian D, Blumenthal GM, Yuan W, He K, Keegan P, Pazdur R. FDA Approval of Gefitinib for the Treatment of Patients with Metastatic EGFR Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(6):1307-12.
47. TITCK. Ek İzlemeye Tabi İlaçlar Listesi 2023 [Available from: <https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/57>].
48. Chandrashekara KA, Udipi A, Reddy CG. Separation and estimation of process-related impurities of gefitinib by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*. 2014;52(8):799-805.
49. Agency EM. ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Haziran 1995.
50. Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods, (Kasım 1994).
51. Desai N. Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel (Abraxane®). *Albumin in Medicine*2016. p. 101-19.

52. Chen Z, Chen J, Wu L, Li W, Chen J, Cheng H, et al. Hyaluronic acid-coated bovine serum albumin nanoparticles loaded with brucine as selective nanovectors for intra-articular injection. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3843-53.
53. Pang X, Yang P, Wang L, Cao J, Cheng Y, Sheng D, et al. Human serum albumin nanoparticulate system with encapsulation of gefitinib for enhanced anti-tumor effects in non-small cell lung cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;52:997-1007.
54. Zhong Q. Co-Spray Dried Mannitol/Poly(amidoamine)-Doxorubicin Dry-Powder Inhaler Formulations for Lung Adenocarcinoma: Morphology, In Vitro Evaluation, and Aerodynamic Performance. *AAPS PharmSciTech*. 2018;19(2):531-40.
55. Laube BL, Janssens HM, Jongh FHCd, Devadason SG, Dhand R, Diot P, et al. What the pulmonary specialist should know about the new inhalation therapies. *European Respiratory Journal*. 2011;37(6):1308-417.
56. Tanzadehpanah H, Mahaki H, Moghadam NH, Salehzadeh S, Rajabi O, Najafi R, et al. Binding site identification of anticancer drug gefitinib to HSA and DNA in the presence of five different probes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2019;37(4):823-36.
57. Salem AA, Lotfy M, Amin A, Ghattas MA. Characterization of human serum albumin's interactions with safranal and crocin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques. *Biochem Biophys Rep*. 2019;20:100670.
58. Moss OR. Simulants of lung interstitial fluid. 1979(0017-9078 (Print)).
59. Gao Y, Nai J, Yang Z, Zhang J, Ma S, Zhao Y, et al. A novel preparative method for nanoparticle albumin-bound paclitaxel with high drug loading and its evaluation both in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2021;16(4):e0250670.
60. Alshehri S, Alanazi A, Elzayat EM, Altamimi MA, Imam SS, Hussain A, et al. Formulation, In Vitro and In Vivo Evaluation of Gefitinib Solid Dispersions Prepared Using Different Techniques. *Processes*. 2021;9(7).
61. Abu Elella MH, Mohamed RR, Sabaa MW. Synthesis of novel grafted hyaluronic acid with antitumor activity. *Carbohydr Polym*. 2018;189:107-14.
62. Sariisik E, Kocak M, Kucuk Baloglu F, Severcan F. Interaction of the cholesterol reducing agent simvastatin with zwitterionic DPPC and charged DPPG phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2019;1861(4):810-8.
63. Reshma, Vaishnav SK, Yadav T, Sinha S, Tiwari S, Satnami ML, et al. Antidepressant drug-protein interactions studied by spectroscopic methods based on fluorescent carbon quantum dots. *Heliyon*. 2019;5(5):e01631.
64. Wang L, Hui X, Geng H, Ye L, Zhang A-y, Shao Z, et al. Synthesis and gelation capability of mono- and disubstituted cyclo(L-Glu-L-Glu) derivatives with tyramine, tyrosine and phenylalanine. *Colloid and Polymer Science*. 2017;295(9):1549-61.
65. Zheng X, Xu K, Wang Y, Shen R, Wang Q. Study of hydrogen explosion control measures by using l-phenylalanine for aluminum wet dust removal systems. *RSC Adv*. 2018;8(72):41308-16.
66. Bruni G, Berbenni V, Milanese C, Girella A, Cofrancesco P, Bellazzi G, et al. Physico-chemical characterization of anhydrous D-mannitol. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2009;95(3):871-6.
67. Dhurve P, Tripathi A, Gidwani B, Vyas A. Investigating the phase-solubility and compatibility study of anticancer drug complexed with β -cyclodextrin and HP- β -cyclodextrin. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2018;9(3).
68. Qu N, Sun Y, Li Y, Hao F, Qiu P, Teng L, et al. Docetaxel-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles: synthesis, characterization, and evaluation. *Biomed Eng Online*. 2019;18(1):11.
69. Han L, Zhao Y, Yin L, Li R, Liang Y, Huang H, et al. Insulin-loaded pH-sensitive hyaluronic acid nanoparticles enhance transcellular delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(3):836-45.
70. Agatonovic-Kustrin S, Markovic N, Ginic-Markovic M, Mangan M, Glass BD. Compatibility studies between mannitol and omeprazole sodium isomers. *J Pharm Biomed Anal*. 2008;48(2):356-60.
71. Lu J. Characterization and pseudopolymorphism of l-phenylalanine anhydrous and monohydrate forms. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;6(4):269-77.
72. Stability Testing of new Drug Substances and Products, (2003).
73. Wu L, Miao X, Shan Z, Huang Y, Li L, Pan X, et al. Studies on the spray dried lactose as carrier for dry powder inhalation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;9(6):336-41.
74. Morsy M, Abdel-Salam AI, Mostafa M, Elzwayy A. Promoting the humidity sensing capabilities of titania nanorods/rGO nanocomposite via de-bundling and maximizing porosity and surface area through lyophilization. *Micro and Nano Engineering*. 2022;17.

75. Spada A, Emami J, Tuszynski J, Lavasanifar A. The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 2021;XXXX.
76. Dosio F, Brusa P, Crosasso P, Arpicco S, Cattel L. Preparation, characterization and properties in vitro and in vivo of a paclitaxel–albumin conjugate. *Journal of Controlled Release*. 1997;47(3):293-304.
77. Morsy SM. Role of Surfactants in Nanotechnology and Their Applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3(5).
78. Gholami L, Momtazi-Borojeni AA, Malaekheh-Nikouei B, Nikfar B, Amanolahi F, Mohammadi A, et al. Selective Cellular Uptake and Cytotoxicity of Curcumin-encapsulated SPC and HSPC Liposome Nanoparticles on Human Bladder Cancer Cells. *Curr Pharm Des*. 2023;29(13):1046-58.
79. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, Castro-Faria MV, Castro-Faria-Neto HC. Acute Respiratory Distress Syndrome: Role of Oleic Acid-Triggered Lung Injury and Inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015:260465.
80. Zajac M, Dreano E, Edwards A, Planelles G, Sermet-Gaudelus I. Airway Surface Liquid pH Regulation in Airway Epithelium Current Understandings and Gaps in Knowledge. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7).
81. Vogel V, Langer K, Balthasar S, Schuck P, Mächtle W, Haase W, et al. Characterization of serum albumin nanoparticles by sedimentation velocity analysis and electron microscopy. 1192002. p. 31-6.
82. Varshosaz J, Ghaffari S, Khoshayand MR, Atyabi F, Dehkordi AJ, Kobarfard F. Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles using D-optimal experimental design. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2012;17(2):187-94.
83. Ali ME, Lamprecht A. Spray freeze drying for dry powder inhalation of nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;87(3):510-7.
84. Marante T, Viegas C, Duarte I, Macedo AS, Fonte P. An Overview on Spray-Drying of Protein-Loaded Polymeric Nanoparticles for Dry Powder Inhalation. *Pharmaceutics*. 2020;12(11).
85. Wang H, George G, Islam N. Nicotine-loaded chitosan nanoparticles for dry powder inhaler (DPI) formulations – Impact of nanoparticle surface charge on powder aerosolization. *Advanced Powder Technology*. 2018;29(12):3079-86.
86. Kaialy W, Nokhodchi A. Freeze-dried mannitol for superior pulmonary drug delivery via dry powder inhaler. *Pharm Res*. 2013;30(2):458-77.
87. Farhangi M, Mahboubi A, Kobarfard F, Vatanara A, Mortazavi SA. Optimization of a dry powder inhaler of ciprofloxacin-loaded polymeric nanomicelles by spray drying process. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2019;24(5):584-92.
88. Li HY, Seville PC, Williamson IJ, Birchall JC. The use of amino acids to enhance the aerosolisation of spray-dried powders for pulmonary gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*. 2005;7(3):343-53.
89. Muthumanickam A, N D, Ramkanth DS, S A, Sheikuduman MS, K G, et al. Dry Powder Inhalers - An Overview. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2010;1.
90. Sethuraman VV, Hickey AJ. Powder properties and their influence on dry powder inhaler delivery of an antitubercular drug. (1530-9932 (Electronic)).
91. Mangal S, Nie H, Xu R, Guo R, Cavallaro A, Zemlyanov D, et al. Physico-Chemical Properties, Aerosolization and Dissolution of Co-Spray Dried Azithromycin Particles with L-Leucine for Inhalation. *Pharm Res*. 2018;35(2):28.
92. Marques MRC, Loebenberg R, Almukainzi M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*. 2011;18(3):15-28.
93. Radivojev S, Zellnitz S, Paudel A, Frohlich E. Searching for physiologically relevant in vitro dissolution techniques for orally inhaled drugs. *Int J Pharm*. 2019;556:45-56.
94. Ichihara E, Miyahara N, Maeda Y, Kiura K. Managing Lung Cancer with Comorbid Interstitial Pneumonia. *Internal Medicine*. 2020;59(2):163-7.
95. Lee R, Choi YJ, Jeong MS, Park YI, Motoyama K, Kim MW, et al. Hyaluronic Acid-Decorated Glycol Chitosan Nanoparticles for pH-Sensitive Controlled Release of Doxorubicin and Celecoxib in Nonsmall Cell Lung Cancer. *Bioconjugate Chemistry*. 2020;31(3):923-32.
96. Arora S, Haghi M, Loo CY, Traini D, Young PM, Jain S. Development of an inhaled controlled release voriconazole dry powder formulation for the treatment of respiratory fungal infection. *Mol Pharm*. 2015;12(6):2001-9.

97. Radivojev S, Pinto JT, Fröhlich E, Paudel A. Insights into DPI sensitivity to humidity: An integrated in-vitro-in-silico risk-assessment. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;52:803-17.
98. Carmichael J Fau - DeGraff WG, DeGraff Wg Fau - Gazdar AF, Gazdar Af Fau - Minna JD, Minna Jd Fau - Mitchell JB, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. (0008-5472)
99. Joshi MK, Li Z, Tiwari AP, Yang IH. Designing the next-generation serum albumin-based nanoplatfom for biomedical applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;87.

8. EKLER

EK-1 : Tez Çalışması Orijinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: AKCİĞER KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE NANOPARTİKÜL İÇEREN KURU TOZ İNHALER FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE IN VITRO DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: ZEYNEP MERVE GEYİK

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 137

Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nanopartikül İçeren Kuru Toz İnhaler Formülasyonu Hazırlanması, Karakterizasyonu ve In Vitro Değerlendirilmesi

ORJİNALLİK RAPORU

| | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 9 %9 BENZERLİK ENDEKSİ | 9 %9 İNTERNET KAYNAKLARI | 2 %2 YAYINLAR | 2 %2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |
|-------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|----------|---|---------------------|
| 1 | openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | 3 %3 |
| 2 | acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı | 2 %2 |
| 3 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | 1 %1 |
| 4 | dergipark.org.tr İnternet Kaynağı | <1 <%1 |
| 5 | avesis.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı | <1 <%1 |
| 6 | www.mdpi.com İnternet Kaynağı | <1 <%1 |
| 7 | dspace.kocaeli.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | <1 <%1 |
| 8 | patents.google.com İnternet Kaynağı | <1 <%1 |

EK-2: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Zeynep Merve Geyik
Ödev başlığı: MERVE GEYİK TEZ
Gönderi Başlığı: Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nanopartikül...
Dosya adı: TEZ_MERVE_6_eyl_1_son_turnitin.docx
Dosya boyutu: 7.52M
Sayfa sayısı: 137
Kelime sayısı: 25,053
Karakter sayısı: 174,629
Gönderim Tarihi: 08-Eyl-2023 01:35ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2160214869

TEZ

Ödev başlığı: MERVE GEYİK TEZ

Gönderi Başlığı: Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nanopartikül...

Dosya adı: TEZ_MERVE_6_eyl_1_son_turnitin.docx

Dosya boyutu: 7.52M

Sayfa sayısı: 137

Kelime sayısı: 25,053

Karakter sayısı: 174,629

Gönderim Tarihi: 08-Eyl-2023 01:35ÖÖ (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2160214869

Copyright 2023 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ