

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELANOMANIN TOPIKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK
METFORMİN YÜKLÜ POLİKAPROLAKTON
NANOPARTİKÜL İÇEREN JEL FORMÜLASYONU
HAZIRLANMASI VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Ziyneti EKE

Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2023

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELANOMANIN TOPIKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK
METFORMİN YÜKLÜ POLİKAPROLAKTON
NANOPARTİKÜL İÇEREN JEL FORMÜLASYONU
HAZIRLANMASI VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Ziyeti EKE

Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç.Dr. Nazlı Erdoğan

ANKARA
2023

**MELANOMANIN TOPIKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK
METFORMİN YÜKLÜ POLİKAPROLAKTON NANOPARTİKÜL İÇEREN
JEL FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI VE İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Öğrenci: Ziyneti Eke
Danışman: Doç. Dr. Nazlı Erdoğan**

Bu tez çalışması 21.08.2023 tarihinde jürimiz tarafından “ Farmasötik Teknoloji Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. Erem Bilensoy</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>	<i>(imza)</i>
Tez Danışmanı:	<i>Doç. Dr. Nazlı Erdoğan</i> <i>Hacettepe Üniversitesi</i>	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Doç. Dr. Fatma Nur Tuğcu Demiröz</i> <i>Gazi Üniversitesi</i>	<i>(imza)</i>

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

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

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.

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

04/09/2023

Ziynet EKE

i

ⁱ“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 **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** 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 **danışmanın** 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 özgün olduğunu, Doç. Dr. Nazlı Erdoğan danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)
Ziyeti EKE

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca ilgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olan, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Nazlı Erdoğan'a,

Yüksek Lisansa başlamamda katkısı olan, bana güvenip cesaretlendiren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Betül Arıca Yegin'e

Hücre kültürü çalışmalarını gerçekleştirmemizdeki desteği ve samimi ilgisi için Dr. Öğr. Üyesi Gamze Varan'a,

Ex-vivo çalışmalardaki yardımları ve özverisi için Dr. Öğr. Üyesi Dilara Örgül'e,

Laboratuvarda ihtiyaç duyduğum her an desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Cem Varan'a ve Ecz. Nurbanu Demirtürk'e,

Eğitimim boyunca katkıları için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma,

Samimiyetleri ve destekleri için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni sevgiyle destekleyen aileme,

Teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Eke, Z. Melanomanın Topikal Yolla Tedavisine Yönelik Metformin Yüklü Polikaprolakton Nanopartikül İçeren Jel Formülasyonu Hazırlanması Ve İn Vitro Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Melanoma metastaz yeteneği yüksek olan, tedavisi en zor kanser türlerindedir. Melanoma tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlara direnç gelişmesi nedeniyle tedavi etkinliği düşüktür. Bunun yanı sıra kemoterapötik ilaçlar ile sistemik yan etkiler de görülebilmekte, bu da sağlıklı dokularda hasar meydana getirebilmektedir. Melanoma tedavisinde kemoterapiye ek olarak, radyoterapi, fotodinamik terapi ve gen terapisi de uygulanmaktadır. Ancak bu yöntemlerin de üstünlükleri ve sakıncaları bulunmaktadır. Kötü prognoz ve tedavideki yetersizlikler göz önüne alındığında, melanomada yenilikçi tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada terapötik madde olarak melanomada antikanser etkinliği olduğu literatür çalışmalarında gösterilmiş biguanidin türevi bir antidiyabetik olan metformin HCl (Met) seçilmiştir. Etkin maddenin patolojik bölgeye lokal olarak uygulanabilmesi ve metforminin nanopartiküllere yüklenmesiyle topikal uygulama sonrası deride tutulumunun artırılması amaçlanmıştır. Topikal uygulamalarda derinin en üst tabakası olan stratum korneumun aşılması zor olmakta ve tedaviyi sınırlamaktadır. Tez çalışmamızda etkin madde Polikaprolakton (PCL) nanopartikül içine hapsedilerek partikül boyutu küçültülmüş ve etkin maddenin deriye penetrasyonu artırılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları ile metformin HCl yüklü PCL Nanopartikül (NP) içeren Kitosan (CS) jel formülasyonunun serbest metformin içeren jele kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür. Yapılan in vitro karakterizasyon ve ex-vivo çalışmalar sonucunda melanomanın topikal yolla tedavisinde Met yüklü PCL nanopartikül içeren kitosan jel formülasyonunun umut vaad eden sistemler olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: metformin HCl, nanopartikül, polikaprolakton, melanoma, topikal

Destekleyen Kurumlar: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 19704 numaralı Hızlı Destek Proje

ABSTRACT

Eke, Z. Preparation and In Vitro Evaluation of Metformin Loaded Polycaprolactone Nanoparticle Containing Gel Formulation for Topical Treatment of Melanoma, Master's Thesis, Pharmaceutical Technology Program, Graduate School of Health Sciences, Hacettepe University, Ankara, 2023.

Melanoma is one of the most challenging types of cancers to treat with a high metastatic capability. Resistance to chemotherapeutic drugs used in melanoma treatment leads to reduced treatment efficacy. Furthermore, systemic side effects can also occur with chemotherapeutic drugs, which can cause damage to healthy tissues. In addition to chemotherapy, radiotherapy, photodynamic therapy, and gene therapy are also applied in melanoma treatment. However, these methods have their advantages and disadvantages as well. Considering the poor prognosis and the shortcomings in treatment, innovative treatments are needed for melanoma. In this thesis, metformin HCl, a biguanide derivative antidiabetic drug that has shown anticancer activity in the literature, was chosen as the therapeutic agent. The aim of the study was to increase the skin retention after topical application by enabling the drug to be applied locally to the pathological area and encapsulating metformin into nanoparticles. Overcoming the stratum corneum, the outermost layer of the skin, is quite challenging in topical applications and limits treatment. In this thesis, metformin HCl (Met) was encapsulated in Polycaprolactone (PCL) nanoparticles to reduce particle size and enhance the penetration of the drug into the skin. Cell culture studies showed that the Chitosan (CS) gel formulation containing metformin HCl-loaded PCL nanoparticles was more effective compared to the gel containing free metformin. In vitro characterization studies and ex-vivo studies concluded that the chitosan gel formulation containing Met-loaded PCL nanoparticles is a promising system for the topical treatment of melanoma.

Keywords: metformin HCL, nanoparticle, polycaprolactone, melanoma, topical

Supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Fast Support Project with number 19704

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Melanoma	4
2.1.1. Risk Faktörleri	4
2.1.2. Melanoma Türleri	5
2.1.3. Melanomada Tedavi Yöntemleri	6
2.2. Metformin	9
2.2.1. Metforminin Fizikokimyasal Özellikleri	9
2.2.2. Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri	10
2.3. Metforminin Melanomada Kullanımı	11
2.4. Derinin Yapısı ve Anatomisi	13
2.5. Melanomada Topikal Tedavi Yaklaşımları	15
2.6. Nanoteknoloji Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler	17
2.6.1. Nanopartiküller	19
2.6.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	19
2.7. Kitosan	22
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	24

3.1.2. Kullanılan Cihazlar	25
3.2. Yöntem ve Deneyler	26
3.2.1. Metformin Hidroklorür'ün HPLC ile in Vitro Miktar Tayini	26
3.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu	26
3.2.3. Boş Polikaprolakton (PCL) Nanopartiküllerinin Hazırlanması	28
3.2.4. Formülasyon Çalışmaları	29
3.2.5. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu	30
3.2.6. Boş Kitosan (CS) Jel ve Metformin HCl Yüklü PCL Nanopartikül İçeren Kitosan (CS) Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonu	31
3.2.7. Boş Kitosan Jel ve Metformin Yüklü PCL Nanopartikül İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu	32
3.2.8. Sitotoksisite Çalışmaları	33
3.2.9. Ex Vivo Çalışmalar	35
4. BULGULAR	36
4.1. Metformin HCL'nin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini	36
4.1.1. Kalibrasyon	36
4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu	37
4.2. Formülasyon Çalışmaları	43
4.2.1. Boş PCL Nanopartiküllerin Hazırlanması	43
4.2.2. Metformin HCL Yüklü PCL Nanopartiküllerin Hazırlanması	43
4.3. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu	45
4.3.1. Nanopartikül Formülasyonlarının Mikroskopla Görüntülenmesi	45
4.3.2. İn Vitro Salım Çalışmaları	46
4.3.3. Fiziksel Stabilitate	47
4.4. Boş Kitosan (CS) Jel ve Metformin Yüklü PCL Nanopartikül İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonu	48
4.4.1. Boş Kitosan Jel ve Metformin Yüklü PCL Nanopartikül İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu	50
4.5. Sitotoksisite Çalışmaları	56
4.6. Ex Vivo Çalışmalar	59
5. TARTIŞMA	63

5.1.	Metformin HCl'nin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	63
5.2.	Metformin HCl Yüklü PCL Nanopartikülleri İçin Yapılan Formülasyon Çalışmaları	64
5.3.	Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu	66
5.4.	Metformin HCl Yüklü PCL Nanopartikül içeren CS Jel Hazırlanması	69
5.5.	Sitotoksosite Çalışmaları	72
5.6.	Ex Vivo Çalışmalar	74
6.	SONUÇ	75
7.	KAYNAKLAR	77
8.	EKLER	84
	EK 1 Turnitin Ekran Görüntüsü	
	EK 2 Dijital Makbuz	
9.	ÖZGEÇMİŞ	86

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ADP:** Adenozin difosfat
- AMP:** Adenozin monofosfat
- AMPK:** AMP ile aktifleştirilen protein kinaz
- ATP:** Adenozin trifosfat
- CTLA-4:** Sitotoksik T Lenfosit Antijen 4
- CS:** Kitosan
- DCM:** Diklorometan
- DNA:** Deoksiribonükleik asit
- EE:** Enkapsülasyon etkinliği
- ERK:** Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazlar
- FDA:** Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
- HPLC:** Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
- LKB1:** Serin-threonine kinaz karaciğer kinaz B1
- LOD:** Tanıma sınırı
- LOQ:** Tayin sınırı
- MEK:** Mitojen aktif protein kinaz
- Met:** Metformin HCL
- mTOR:** Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
- NaOH:** Sodyum hidroksit
- NF-κB:** Nükleer Faktör Kappa B
- OCT-1:** Organik katyon taşıyıcı-1
- PD-1:** Programlanmış Hücre Ölümü Protein 1
- PF68:** Pluronic F68
- PCL:** Polikaprolakton
- PVA:** Polivinil alkol
- SCC:** Skuamöz hücreli karsinom
- STAT3:** Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü
- SS:** Standart sapma

UV: Ultraviyole

VK: Varyasyon katsayısı

X: Ortalama

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1. 1. Melanoma tedavisinde FDA tarafından onaylanmış ilaçlar	8
2. 1. Metformin HCL'nin kimyasal formülü	9
2. 2. Metforminin kanser hücrelerine etkileri	11
2. 3. Metforminin melanoma üzerine etkileri	12
2. 4. Derinin Yapısı	15
2.5. Nanoilaçların biyolojik çevreleri ile etkileşimlerini etkileyebilecek farklı yüzey yapıları	18
2. 6. Emülsiyon oluşturma / çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi	20
2. 7. Çift emülsiyon yönteminin şematik gösterimi	21
2. 8. Nanopresipitasyon yönteminin şematik gösterimi	22
2. 9. Kitosanın moleküler yapısı	22
4. 1. Metformin HCL'ye (100 µg/mL) ait HPLC kromatogramı	36
4. 2. Metforminin HCL'nin kalibrasyon doğrusu ve denklemi	37
4. 3. Metformin ve diğer maddelerin HPLC spektrumlarının karşılaştırması. a) Metformin HCL b)PCL c) PF68 d) DCM e) PBS'e ait kromatogramlar	42
4. 4. a) Boş PCL nanopartiküllerinin b) Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüleri	46
4. 5. pH 7.4 PBS çözeltisinde Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin in vitro salım profilleri	47
4.6. a) Boş PCL nanopartiküllerin b) Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin zamana karşı partikül büyüklüğü değerleri	47
4. 7. a) Boş PCL nanopartiküllerin b) Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin zamana karşı PDI değerleri	48
4.8. a) Boş PCL nanopartiküllerin b) Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin zamana karşı zeta potansiyel değerleri	48
4. 9. a) Boş kitosan jel b) Met-PCL NP içeren CS jel formülasyonuna ait akış eğrisi	52
4. 10. Boş CS jel formülasyonuna ait SEM görüntüleri	54
4. 11. Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonuna ait SEM görüntüleri	55
4. 12. Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel ve serbest metformin HCl içeren CS jel formülasyonundan in vitro Met salım profili	56

4. 13. a) 24 saat b) 48 saat inkübasyon sonucu L929 hücrelerinde Boş-PCL-NP, Boş- PCL-NP-CS jel, Boş-CS jel ve kontrol grubu için MTT analiz sonuçları	57
4. 14. a) 48 saat b) 72 saat inkübasyon sonucu B16F10 hücrelerinde Metformin çözeltisi, Met-PCL NP ve Met-PCL-NP-CS jel formülasyonlarının in vitro sitotoksitesisi	59
4. 15. Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jel için zamana karşı % kümülatif salım	60
4. 16. Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jel için zamana karşı deriden geçen etkin madde miktarı	60
4. 17. a) Met-PCL-NP-CS jel b) Met-CS jel için 24 saat sonunda deriye penetrasyon ve permeasyon sonuçları	61

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2. 1. Melanomanın topikal yolla tedavisinde nanopartiküler sistemlerle yapılan bazı çalışmalar	17
2. 2. Metformin HCL İçeren Nanotaşıyıcı Sistemler	19
4. 1. Metformin HCL'nin HPLC ile miktar tayinininde elde edilen lineer regresyon verileri	37
4. 2. Metformin HCL'nin geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayısı değerleri	38
4. 3. Metformin HCL'nin tekrar edilebilirlik sonuçları	39
4. 4. Metformin HCL'nin tekrar elde edilebilirlik sonuçları	39
4. 5. Metformin HCL'ye ait günler arası farklılık sonuçları	40
4. 6. Boş PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri	43
4. 7. Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri	44
4. 8. Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği değerleri	45
4. 9. Formülasyon çalışmaları	49
4. 10. Boş kitosan jel formülasyonlarına ait viskozite ölçüm sonuçları	49
4. 11. Farklı konsantrasyonda asetik asit kullanılarak oluşturulan boş kitosan jel formülasyonlarına ait pH değerleri	50
4. 12. Boş CS jel formülasyonu için farklı sıcaklıklarda viskozite ölçüm değerleri	51
4. 13. Metformin HCL yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonu için farklı sıcaklıklarda viskozite ölçüm değerleri	51
4. 14. Boş CS jel ve Met-PCL NP içeren CS jel formülasyonlarına ait yayılabilirlik sonuçları	53
4. 15. Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jelden Metformin salımına ait permeasyon parametreleri	62

1. GİRİŞ

Melanoma tüm cilt kanserlerinin %4'ünü oluşturmalarına rağmen, ölüm oranı oldukça yüksek olan bir kanser türüdür. Tüm cilt kanseri kaynaklı ölümlerin %75'ini melanoma oluşturmaktadır (1). Melanoma, cildi ışıktan koruyan bir pigment olan melanin pigmenti salgılayan melanosit hücrelerinin malign dönüşümü sonucu oluşur. Melanoma; göz, gastrointestinal kanal, genital bölge, sinüsler ve meninklerin pigment üreten hücrelerinden oluşabildiği gibi en çok ciltte, ultraviyole ışınları nedeniyle görülmektedir (2).

Melanomanın en önemli tedavi seçeneklerinden biri kemoterapi olup çeşitli kemoterapi kombinasyonları melanoma tedavisinde denenmiştir. Ancak hayatta kalma oranlarında bir iyileşme olmamıştır. Kemoterapi ilaçlarına direnç geliştiği ve bu direncin sebebinin apoptoza direnç olduğu düşünülmektedir. Kemoterapi melanoma tedavisinde ek seçeneklerle birlikte tercih edilmektedir ve palyatif tedavide etkinliğini korumaktadır (3). Radyoterapi, kanser hücrelerinin radyasyonla yıkımı temeline dayanır. Radyoterapide görülen yan etkiler hastaların tedavi uyuncunu azaltmaktadır. Ek olarak, radyoterapi melanoma tedavisinde nadiren tek başına kullanılır. Çoğunlukla, kemoterapiye destek tedavi olarak tercih edilmektedir (4). Fotodinamik terapi, tümörde lokalize olan ve ışıkla etki eden (photosensitizer) bir ajanın sistemik ya da lokal olarak uygulanması ile sağlanır. Girişimsel olmayan bir yöntem olması ve düşük kümülatif sistemik yan etki riski nedeniyle tercih edilen bu yöntemin, non-melanoma kanser türleri, lenfoma ve vitiligo ve psöriazis gibi diğer bazı cilt hastalıklarında etkinliği kanıtlanmıştır. Melanoma tedavisinde fotodinamik terapinin etkisini arttırmaya yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (5). Gen terapisi melanoma tedavisinde yenilikçi bir alternatif tedavidir. Gen terapisi ile zarar görmüş genler sağlıklı kopyaları ile değiştirilerek genetik defektlerin düzeltilmesi amaçlanır. Melanoma tedavisinde de gen terapisi kullanılmakla birlikte gen terapisinin onkojenik riskler/genotoksisite açısından iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu alandaki çalışmalar potansiyel riskleri elimine etmeye yönelik olarak devam etmektedir (6).

İlaçların topikal yolla uygulanması oral ve parenteral uygulamalarda görülen yan etkileri azaltır. İlaçlar parenteral yolla verildiğinde vasküler komplikasyonlar, lokal dokuların zarar görmesi, ağrı ve acı gibi yan etkiler görülebilir. Girişimsel

olmayan bir yöntem olan topikal uygulamada ağrı olmazken, hasta için uygulama kolaylığı da sunulmaktadır. Topikal uygulama ile, oral uygulamada karşılaşılan ve ilaçların biyoyararlanımını önemli ölçüde etkileyen karaciğerde ilk geçiş etkisinden kaçılmaktadır. Ayrıca ilacın cilde verilmesinin optimize edilmesiyle etkide artış da sağlanır. Ek olarak topikal uygulama ile kontrollü salım da sağlanabilmektedir (7, 8). Melanoma tedavisinde onay almış topikal bir tedavi henüz bulunmamaktadır. Melanoma tedavisi için hazırlanacak topikal bir formülasyon yaklaşımı yenilikçi özellikte olacaktır.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması topikal uygulama için araştırmaların yeni odak noktasıdır. Nanopartiküler sistemlerle hem hidrofilik hem hidrofobik moleküllerin enkapsülasyonu sağlanabilir. İlaçların nanopartiküllere enkapsülasyonu sayesinde ilacın uygulama bölgesinde kontrollü salımı sağlanır. Nanopartiküllere enkapsülasyon ile etkin maddenin stabilitesi de artırılabilir (9, 10). Ek olarak nanopartiküler sistemler derinin katmanları arasında kademeli ilaç taşınmasını sağlayabilir. Nanopartiküler sistemler ile deriden geçişin saç folikülleri yoluyla olduğu literatürde belirtilmiştir. Saç foliküllerinde ilaçların derinin üst katmanlarına kıyasla daha uzun süre depolanabildiği de çalışmalarla gösterilmiştir (11, 12). Derinin alt katmanlarındaki keratinositler, stratum korneumna kıyasla daha küçüktür. Bu da ilaçların deri altından dağılımını kolaylaştırabilir.

Biyoparçalanır polimerler nanopartiküllerin hazırlanmasında sık tercih edilirler. Bu tezde biyoparçalanabilir bir polimer olan polikaprolakton (PCL) kullanılacaktır. Polikaprolakton ilaçların kontrollü salımına imkan veren biyoyoumluluğu yüksek bir polimerdir (13). Topikal uygulamalarda da polikaprolakton sıklıkta tercih edilmektedir (14).

Bilinen ruhsatlı ilaçların farklı endikasyonlarda etkilerinin araştırılması, ilaç üretim maliyetleri ve süreleri düşünüldüğünde yeni tedavi yaklaşımlarının belirlenmesinde etkili bir yöntemdir.

Metformin HCL suda çözünürlüğü yüksek olan biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre sınıf III bir antidiyabetik ilaçtır (15). Suda çözünürlüğü yüksek ilaçların deriye penetrasyonu zayıf olmaktadır (16). Metforminin nanopartiküler sistemlerle uygulanması ile hem stratum korneumdan geçişi hem de

foliküler geçiş mekanizması ile kıl foliküllerinden deriye penetrasyonunun arttırılması hedeflenmektedir. Nanopartikül dispersiyonunun pozitif yüklü kitosan jel içinde taşınması sağlanarak, ilacın stratum korneumdaki negatif yüklü deri lipitleriyle daha iyi etkileşmesi amaçlanmıştır.

Metformin yüklü polikaprolakton (PCL) nanopartiküllerin topikal uygulamada melanoma üzerine etkisi henüz araştırılmamıştır. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmanın amacı melanomanın topikal tedavisinde ümit vaat edici sistemler olan nanopartiküllerin tasarlanıp ilaç yüklü olarak hazırlanması ve taşıyıcı olarak biyoadeziv kitosan jel içinde verilmesi, karakterizasyonlarının yapılması, salım özelliklerinin değerlendirilmesi ve ex vivo çalışmalarının yapılarak deriden penetrasyon ve permeasyon özelliklerinin incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Melanoma

Melanoma, cilt, göz, iç kulak ve leptomeninkslerde bulunabilen pigment üreten hücreler olan melanositlerin malign dönüşümü sonucu oluşan bir kanser türüdür. Melanoma çoğunlukla spontan olarak gelişirken, genetik mutasyonlar sonucu oluştuğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Melanomanın cilt kanserleri arasında görülme oranı düşük olmakla birlikte cilt kanserlerinde en agresif yayılım gösteren türdür. Cilt kanserlerinde görülen ölümlerin %75'i melanoma kaynaklıdır. Metastatik melanoma hastalarında sağkalım oranı 5 yılın altındadır (8, 17).

Melanoma vakalarının görülme sıklığı son yıllarda artmış olsa da, yeni geliştirilen tedavi yöntemleri sayesinde hastalığın mortalitesi azalmıştır. Ancak birçok kanser türünde geçerli olduğu gibi, melanomada da erken tedavi sağkalım oranını arttırmaktadır. Tedavi yöntemlerinin yanı sıra teşhis ve doğru evreleme de oldukça önemlidir. Kanser evresinin tespitinde yeni yöntemler üzerine çalışılmaktadır.

2.1.1. Risk Faktörleri

Kutanöz melanom için belirlenmiş risk faktörleri arasında güneşe maruziyet ve ardından gelen güneş yanıkları ile ultraviyole radyasyon, kapalı alanda bronzlaşma (özellikle 35 yaşından önce), melanositik veya displastik nevüs varlığı, kişisel bir kutanöz melanom öyküsü, ailede kutanöz melanoma öyküsü ve fenotipik özellikler yer alır. Sarı saç, açık göz rengi ve açık ten rengi, çil oluşumuna yatkınlık ve obezite de melanoma için risk faktörleridir (18, 19).

Melanoma hastalarının küçük bir kısmında gen mutasyonları görülmektedir. Birden fazla melanoma geçiren hastalarda, bir aile üyesinde birden fazla melanoma olan veya ailede pankreas kanseri olan bir bireyde kalıtsal olarak bir gen mutasyonu olabilir. Bununla birlikte, gen mutasyonları için testler artık mevcut olmasına rağmen, bu testler için şu ana kadar klinik fayda gösterilmediği için önerilmemektedir (18, 20).

2.1.2. Melanoma Türleri

Yüzeyel Yayılan Melanoma

Yüzeyel yayılan melanoma çoğunlukla Avrupa toplumlarında görülmektedir. Lezyonlar büyük oranda güneşle teması fazla olan gövde ve bacaklarda ortaya çıkmaktadır. En yaygın melanoma türüdür ve çoğu melanoma vakasının yaklaşık %70-80'ini oluşturur. Yüzeyel yayılan melanoma, derinin üst tabakasında (epidermis) başlar ve yavaşça büyüyebilir. Renkli veya kahverengi lezyonlar, sınırları düzensizleşebilen ve zamanla yayılan bir nodül veya yamalar şeklinde görülebilir.

Akral Lentijinöz Melanoma

Bu melanoma türü, avuç içi, ayak tabanı veya tırnak yataklarında ortaya çıkar. En sık siyah tenli insanlarda ve Asyalılarda görülür. Akrolentijinal melanom, genellikle koyu renkte veya siyah bir lezyon olarak başlar ve zamanla büyüyebilir.

Lentigo Maligna Melanoma

Lentigo Maligna melanoma çoğunlukla güneşe maruz kalan yaşlı hastalarda görülmektedir. Hastalık biriken UV hasarına bağlı olarak çoğunlukla yüz bölgesinde görülür. Lentigo maligna, yavaş büyüme gösteren düzensiz sınırlara sahip büyük bir lezyon veya yama şeklinde başlar. Zamanla derinin daha derin tabakalarına yayılabilir ve daha agresif bir melanomaya dönüşebilir.

Nodüler Melanoma

Nodüler melanomanın güneşle teması fazla olan baş, boyun ve ön kol bölgelerinde görüldüğü bildirilmiştir. Nodüler melanoma, diğer melanoma türlerine göre daha agresif bir şekilde büyüme eğilimindedir. Genellikle koyu renkte veya siyah bir nodül olarak başlar ve hızla deriye yayılabilir. Sıklıkla kanayabilen veya kabuk bağlayabilen bir lezyon olarak belirebilir.

Mukozal Melanoma

Mukozal melanoma nadir görülen bir melanoma türüdür ve deri melanomlarından daha agresif bir seyir gösterebilir. Genellikle mukozal yüzeylerde koyu renkli veya siyah bir lezyon veya tümör olarak başlar. Mukozal melanomanın başlıca görüldüğü bölgeler arasında ağız boşluğu, burun boşluğu, anüs, vajina, penis ve rektum yer alır.

2.1.3. Melanomada Tedavi Yöntemleri

- **Cerrahi Yöntem**

Melanoma tedavisinde cerrahi yöntem önemli bir rol oynar. Cerrahi yöntem, melanomanın erken evrelerindeki tümörün çıkarılması veya ileri evrelerdeki tümörlerin cerrahi olarak çıkarılması için kullanılan bir yöntemdir. Cerrahi yöntem, melanoma tanısı konulduktan sonra en yaygın olarak uygulanan tedavi seçeneklerinden biridir.

Melanomada cerrahi yöntem ile, tümörün tamamen çıkarılması ve kanserin yayılmasının önlenmesi amaçlanır. Cerrahi yöntem, tümörün boyutu, kalınlık, derinlik ve yayılma durumuna bağlı olarak farklı şekillerde uygulanabilir. Bazı yaygın cerrahi prosedürler şunları içerir:

Geniş Lokal Eksize: Bu prosedür, melanomanın etrafındaki sağlıklı deri dokusuyla birlikte bir kısmının çıkarılmasını içerir. Ameliyat, tümörün çevresindeki sağlıklı dokunun tamamen alınmasını ve kanserin geri dönme riskini azaltmayı hedefler.

Deri Grefti: Melanomanın büyük bir bölgeyi etkilediği durumlarda, deri grefti kullanılabilir. Bu prosedürde, tümörün çıkarıldığı alanın üzerine deri grefti yerleştirilir. Greft, başka bir vücut bölgesinden alınabilir veya yapay deri kullanılabilir.

Lenf Düğümü Biyopsisi: Melanomanın lenf düğümlerine yayıldığı durumlarda, lenf düğümlerinin alınması ve incelenmesi amacıyla lenf düğümü biyopsisi yapılabilir. Bu, kanserin yayılma durumunun belirlenmesi ve tedavi planının oluşturulmasında önemli bir adımdır.

Radyo Cerrahi: İleri evre melanomlarda, cerrahi olarak çıkarılması zor veya mümkün olmayan tümörlerin tedavisinde radyo cerrahi kullanılabilir. Radyo cerrahi, yüksek dozda ışınların odaklanmış bir şekilde tümöre uygulanmasıyla tümör hücrelerinin tahrip edilmesini hedefler.

Cerrahi müdahale genellikle melanoma tedavisinde önemli bir adımdır, ancak her durum için tedavi planı bireysel olarak değerlendirilir. Tümörün evresi, derinliği, yayılma durumu ve hastanın genel sağlık durumu göz önünde bulundurularak cerrahi müdahaleye karar verilir.

- **İmmünoterapi**

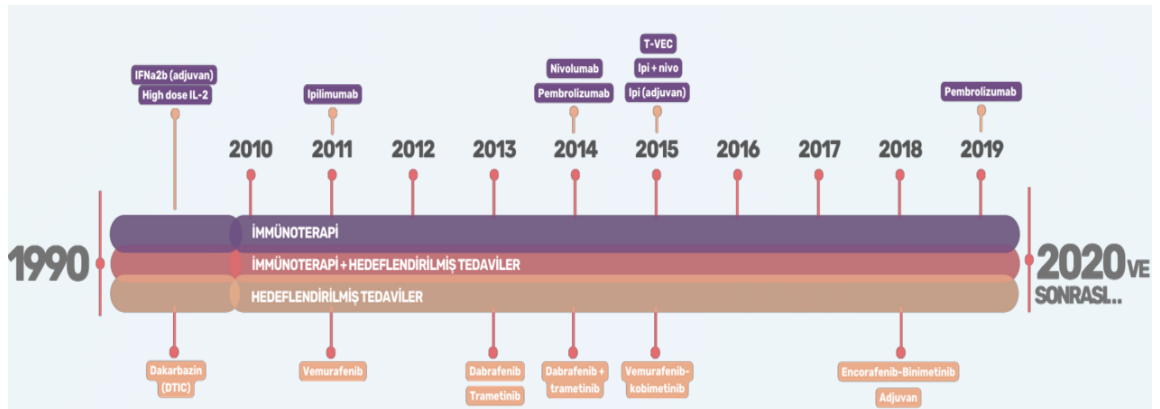
Kanser immünoterapisinde tümör hücrelerine karşı immün yanıtın stimülasyonu ya da aktivasyonu yoluyla kanserin yok edilmesi amaçlanmaktadır. İmmünoterapi kapsamında, ileri evre (metastatik) malign melanomlu hastalar için, immün check point inhibitörleri ile tedaviler uygulanmaktadır. İmmünoterapi önceki standart tedavilerle karşılaştırıldığında umut verici bir tedavi seçeneği olup ileri evre melanoma görülen hastalarda kalıcı tam yanıtlar meydana getirdiği görülmüştür. Ancak melanoma tedavisinde immünoterapiye yanıt veren hastalarda dahi, immün kontrol noktası inhibitörü başarı oranı genellikle <%50'dir. İmmünoterapiye karşı birincil ve kazanılmış direnç yaygındır ve bu da tedavinin başarı oranını düşürmektedir.

Melanoma tedavisinde immün check point inhibitörü ilaçlar, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasını ve onlara saldırmasını teşvik etmek için kullanılan bir tedavi yaklaşımıdır. İmmün check point inhibitörleri, bağışıklık sisteminin düzenlemesinden sorumlu olan proteinlerin aktivitesini hedef alarak çalışır. En çok kullanılan immün check point inhibitörleri Programlanmış Hücre Ölümü Protein 1 (PD-1) inhibitörleri ve Sitotoksik T Lenfosit Antijen 4 (CTLA-4) inhibitörleridir.

Programlanmış Hücre Ölümü Protein 1 (PD-1) inhibitörleri, bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanımasını ve etkili bir şekilde saldırmasını teşvik eder. PD-1, bağışıklık hücrelerinde bulunan bir reseptördür ve kanser hücrelerinin bağışıklık tepkisinden kaçmasına yardımcı olur. PD-1 inhibitörleri, PD-1 reseptörünü hedef

arak kanser hücrelerine bağlanmasını engeller ve bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerine saldırmasını artırır. Pembrolizumab ve nivolumab, melanoma tedavisinde yaygın olarak kullanılan PD-1 inhibitörleridir (21).

Sitotoksik T Lenfosit Antijen 4 (CTLA-4) inhibitörleri, bağışıklık sistemini aktive eden bir mekanizmayı hedef alır. CTLA-4, bağışıklık hücrelerinde bulunan bir reseptördür ve bağışıklık tepkisini düzenler. CTLA-4 inhibitörleri, CTLA-4 reseptörünü hedef alarak bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu artırır ve bağışıklık sistemini kanser hücrelerine karşı daha etkili hale getirir. Ipilimumab, melanoma tedavisinde kullanılan bir CTLA-4 inhibitörüdür.



Şekil 1. 1. Melanoma tedavisinde FDA tarafından onaylanmış ilaçlar (2).

- **Hedefe yönelik tedavi**

Melanomada bulunan moleküler mücadele etmek için hedeflendirilmiş tedaviler geliştirilmiştir. Bunlardan en ümit verici olanları, sırasıyla 2011 ve 2013 yıllarında metastatik ve cerrahi müdahaleye uygun olmayan BRAF mutasyonlu melanomaların tedavisi için onaylanan BRAF inhibitörleri, vemurafenib ve dabrafenib'i içerir. Bununla birlikte, bu ilaçlar BRAF mutasyonlu hastaların yaklaşık yarısı için oldukça etkili olsa da, hastaların çoğunluğunda nispeten kısa bir süre içinde ikincil direnç geliştiği görülmüştür. Bu ikincil direncin geliştiği bazı mekanizmalar bulunmuş ve daha kalıcı bir etki için yeni ilaçlar ve yeni ilaç kombinasyonları araştırılmaya devam edilmektedir. BRAF inhibitörlerine yanıt verme olasılığı yüksek olan hasta gruplarını belirlemede kullanılacak biyobelirteçler üzerine de son yıllarda çalışmalar yapılmaktadır (1, 22).

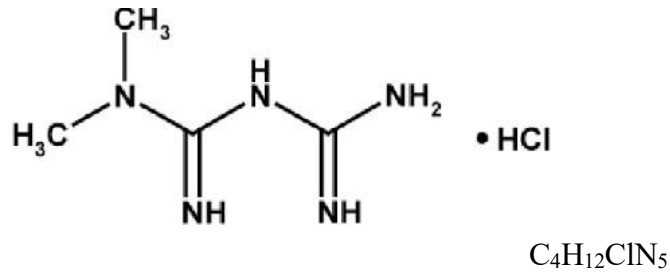
- **Kemoterapi**

Kemoterapi, melanoma tedavisinde genellikle ikinci veya üçüncü sırada tercih edilen yöntemdir. İlk tercih edilen tedaviler genellikle cerrahi yöntem, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi gibi diğer yöntemlerdir. Bununla birlikte, bazı durumlarda kemoterapi, özellikle ilerlemiş evrelerde ve metastatik melanomada kullanılabilir.

Melanoma tedavisinde kullanılan FDA onaylı tek kemoterapi ajanı Dakarbazin'dir. DNA'daki *O6-* ve *N7-guanin* pozisyonlarının alkilleyici bir ajanı olarak işlev gören ve hücre ölümü ve apoptoza yol açan DNA çift sarmal kırılmalarına neden olan bir monoterapi ilacıdır. Dakarbazin evre IV metastatik malign melanoma hastalarına önerilmektedir. Çalışmalar, dakarbazin için umut verici sonuçlar göstermiştir. Şu anda birçok çalışmada, karmustin, tamoksifen ve sisplatin içeren Dartmouth rejimini kullanan diğer ajanlara ek olarak dakarbazin kullanılmaktadır (23, 24).

2.2. Metformin

2.2.1. Metforminin Fizikokimyasal Özellikleri



Şekil 2. 1. Metformin HCL'nin kimyasal formülü

Metformin hidroklorür acı bir tada sahip beyaz, higroskopik kristal bir tozdur. Kimyasal olarak 1,1 dimetil-biguanid hidroklorürdür ve diğer biguanidlere benzer bir etki mekanizmasına sahiptir (Şekil 1.2.). Suda ve %95 alkolde çözünür; eter veya kloroformda pratik olarak çözünmez.

Metformin hidroklorür, oda sıcaklığında nispeten stabildir. Sıcaklık 60°C'ye çıkarıldığında önemsiz ayrışma gözlenir. Bununla birlikte metformin, erime noktasına yakın sıcaklıklarda (200°C) aminler de dahil olmak üzere birçok ürünü oluşturmak üzere ayrılmaya başlar. Metforminin oksidasyonu pH'a bağlıdır. Asidik ortamda %99'u bozunmamış olarak gözlenirken; nötr ortamda bu oran %88; ve alkali solüsyonda %71 olarak bulunmuştur.

2.2.2. Farmakolojik ve Farmakokinetik Özellikleri

Metformin, hepatik glikoz üretimini (glikoneogenez) ve glikozun bağırsaklarda emilimini azaltıp periferik glikoz alımını ve kullanımını artırır. Bu sayede insülin duyarlılığını artırarak kan glikoz seviyelerini düşürür. Metforminin mitokondriyal kompleks I aktivitesini inhibe ettiği iyi bilinmektedir ve o zamandan beri genel olarak güçlü antidiyabetik etkilerinin bu mekanizma yoluyla ortaya çıktığı öne sürülmüştür.

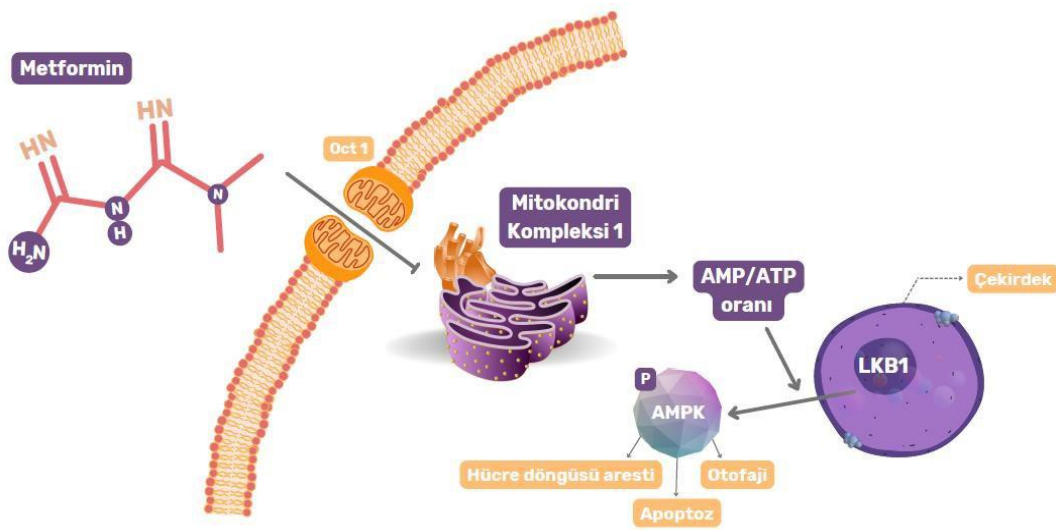
Oral alımı takiben, organik katyon taşıyıcı-1 (OCT1), metforminin hepatositlere (karaciğer hücreleri) alınmasından sorumludur. Metformin pozitif yüklü olduğundan, mitokondriyal iç zarın yanı sıra plazma zarı boyunca hücrelerde ve mitokondride birikir. Metformin, mitokondriyal kompleks I'i inhibe ederek, sitoplazmik ADP:ATP ve AMP:ATP oranlarında artışa yol açan mitokondriyal ATP üretimini engeller. Bu değişiklikler, glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan bir enzim olan AMP ile aktive olan protein kinazı (AMPK) aktive eder. Bu mekanizmanın yanı sıra AMPK, diğer aktivatörleri içeren bir lizozomal mekanizma ile aktive edilebilir. Bu işlemi takiben AMP:ATP oranındaki artışlar fruktoz-1,6-bifosfat enzimini de inhibe ederek glukoneogenezin inhibisyonuna neden olurken adenilat siklazı da inhibe ederek kullanılan ATP'nin bir türevi olan siklik adenosin monofosfat (cAMP) üretimini azaltır. Aktive edilmiş AMPK, asetil-CoA karboksilaz enziminin iki izoformunu fosforile eder, böylece yağ sentezini inhibe eder ve yağ oksidasyonuna yol açar, hepatik lipid depolarını azaltır ve karaciğerin insüline duyarlılığını artırır.

Yukarıdaki yola ek olarak, metforminin etki mekanizması başka yollarla da açıklanabilir ve kesin etki mekanizması son yıllarda kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır.

Metformin, suda yüksek çözünürlüğe sahip olup, hücre membranlarına düşük geçirgenliğe sahiptir. Bu nedenle, Metformin biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre Sınıf III ilaç olarak sınıflandırılabilir (15).

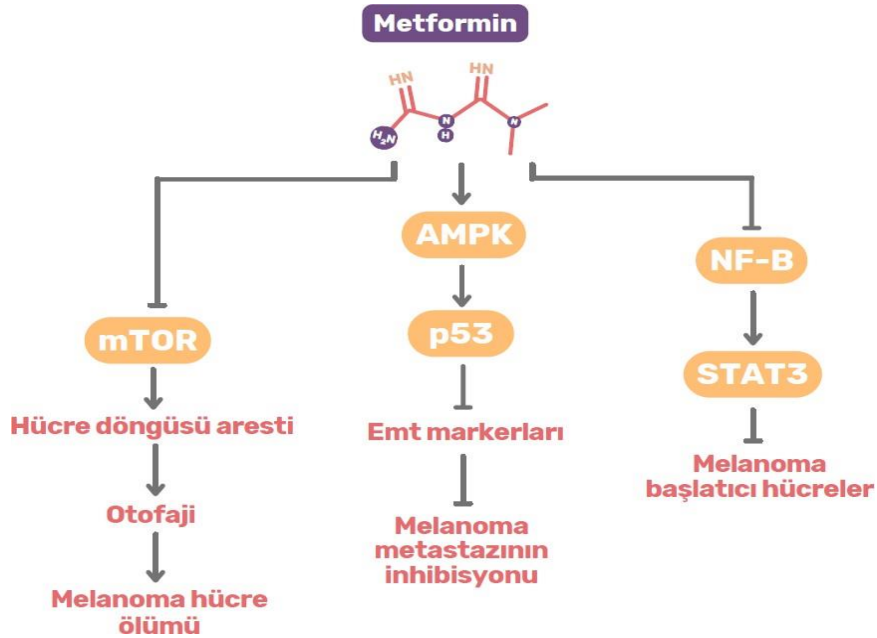
2.3. Metforminin Melanomada Kullanımı

Metformin, tip 2 diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır; çeşitli mekanizmalar yoluyla serum glukoz seviyesini düşürür. Melanoma, özellikle glikoz metabolizmasına güçlü bir şekilde bağımlıdır ve birkaç epidemiyolojik çalışma, metformin kullanımı ile daha düşük cilt kanseri riski arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Bununla ilgili olarak, bir araştırma metforminin SCC hücreleri (A431 hücre hattı) ile ksenogreftlenmiş farelerde tümör büyümesini inhibe ettiğini ortaya çıkarmış; etkinin mTOR ve NF- κ B sinyal yollarının inhibisyonundan kaynaklandığı görülmüştür(25). Benzer şekilde, Tomic ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada metforminin in vitro olarak melanom hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve in vivo olarak hücre döngüsü arresti yoluyla tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (26).



Şekil 2. 2. Metforminin kanser hücrelerine etkileri (27).

Yapılan diğer çalışmalarda metforminin anti-melanom özelliklerinin açıklanması için protein TRIB3 ekspresyonunun azalması, miRNA ekspresyonunun upregülasyonu ve tümör mikroçevresinde immün yanıtın indüklenmesi dahil olmak üzere çeşitli moleküler mekanizmalar önerilmiştir. Ayrıca metformin, p53 tümör baskılayıcı proteini ve AMPK'yi aktive ederek in vitro ve in vivo metastaz gelişimini engellemiştir. Metformin, bir metastatik melanoma hücresi modelinde MEK inhibitörü olan binimetinib'in anti- proliferatif etkilerini arttırmıştır (26). Moleküler mekanizma, P-ERK aşağı regülasyonunu ve AMPK upregülasyonunu içerir. Bu klinik öncesi kanıtlar nedeniyle, çeşitli klinik araştırmalar yapılmıştır. Metforminin cilt kanserinde terapötik etkilerini araştıran en az beş klinik çalışma devam etmektedir (NCT01638676, NCT01840007, NCT02143050, NCT03311308 ve NCT04114136). Metformin bu çalışmalarda adjuvan olarak kullanılmıştır (27, 28).



Şekil 2. 3. Metforminin melanoma üzerine etkileri (27).

2.4. Derinin Yapısı ve Anatomisi

Deri insan vücudundaki en büyük organdır ve organizmayı dışarıdan gelebilecek fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı korur. Derinin toplam yüzey alanı yaklaşık 1,5-2 m²'dir. Aynı zamanda ısı ve su kaybını önleyerek vücudun dış ortam koşullarına adaptasyonunu sağlar. Derinin kalınlığı bölgeye göre 0.5-3 mm arasında değişir, pH değeri ise 4-7 arasındadır (28).

İnsan derisi dıştan içe doğru sırası ile epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere farklı özelliklere sahip 3 kısımdan oluşmaktadır (29).

- **Epidermis**

Epidermis, derinin en dışında yer alan, çevre ile doğrudan temas eden çok katlı bir tabakadır. Skuamöz ve keratinize bir epitelden oluşmaktadır. Derinin en ince tabakası olup kan damarı içermemektedir. Canlılığını devam ettirebilmek için dermisten difüzyon yoluyla beslenir. Esas işlevi insan vücudu ile dış ortam arasında bariyer görevi görmektir. Kalınlığı vücut bölgelerine göre değişiklik göstermektedir, göz kapağında epidermis kalınlığı 0,06 mm iken avuç içi ve ayak tabanında bu kalınlık 0,8 mm'ye ulaşmaktadır (30).

Epidermis dıştan içe doğru 5 tabakadan oluşmaktadır:

- 1- Stratum korneum (epidermisin dış kısmı).
- 2- Stratum lucidum,
- 3- Stratum granulosum,
- 4- Stratum spinosum,
- 5- Stratum basale (epidermisin iç kısmı) (31)

Stratum korneum;

Epidermisin en dış tabakasıdır, içi keratinle dolu ölü hücreler olan keratinositlerden oluşmaktadır. Keratinositler hücreler arası lipit tabakaya gömülü şekilde bulunmaktadır ve bu yapısından dolayı tuğla-harç modeli olarak adlandırılmıştır. Bu yapı sayesinde derinin bariyer fonksiyonunda önemli bir yere sahiptir. Stratum korneum yapısı,

%75-80 protein, %5-15 lipit ve %5-10 tanımlanmamış yapılardan oluşmaktadır. Hücre

zarf proteinlerinin çözünlüğü düşüktür ve kimyasal etkenlere karşı dirençlidir. Bu tabakadaki lipit miktarı ve cinsi ise vücut bölgesine göre değişkenlik gösterir. Permeabilitenin stratum korneumdaki lipit miktarına göre değiştiği kabul edilir. Bu özellik stratum korneuma seçici geçirgenlik sağlar (32).

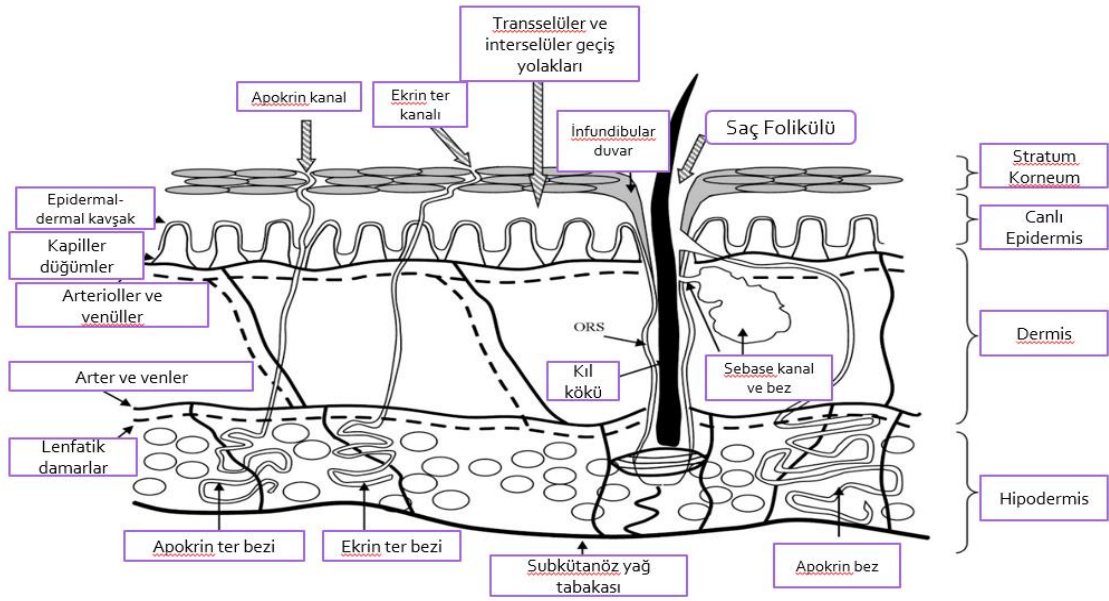
- **Dermis**

Epidermis ve subkutan yağ doku (hipodermis) arasında yer alan derinin en kalın tabakasıdır. Deriye sağlamlık ve esneklik sağlayan kolajen fibriller ve elastik bağ doku bu tabakada yer alır. Papiller ve retiküler dermis olmak üzere iki bölümden oluşur. Papiller dermis daha incedir. Kan damarları ve bağ dokusu bu bölgede yoğun olarak bulunur. Bu kan damarları sayesinde derinin dermis ve epidermis tabakaları beslenir. Yine bu bölgedeki kan dolaşımı sayesinde vücut sıcaklığı düzenlenir.

Ek olarak fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar, lenfositler, melanositler ve derinin diğer yapıları (kıl, ter ve yağ bezleri) ile sınırlar de dermiş tabakasının bileşenlerindedir. Dermiste bulunan sinir uçları dokunma, sıcaklık, basınç ve ağrı gibi uyarınları tespit ederken, toksinleri ve diğer istenmeyen moleküllerin atımını da sağlamaktadır. Hidrofilik özelliği daha yüksek olup hidrofilik moleküllerin geçişi kolayken, lipofilik moleküllerin geçişi daha zordur (33-35).

- **Hipodermis**

Derinin en alt tabakası olup yağ dokusu ile gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır. Deriyi daha derin dokulara bağlayarak arada köprü görevi görür. Depoladığı yağ doku sayesinde vücut sıcaklığını korur ve dışarıdan gelen mekanik travmalara karşı bariyer görevi görür. Göz kapağı gibi bazı vücut bölgelerinde ise bulunmamaktadır (36).



Şekil 2. 4. Derinin Yapısı (37).

2.4.1. Topikal Tedavi

İlaçların deri yoluyla uygulanması ile hem lokal etki hem de sistemik etki sağlanabilmektedir. Girişimsel bir yöntem olmaması nedeniyle de topikal tedavi uygulaması kolay ve hasta uyuncunun iyi olduğu bir uygulama yoludur. Geniş yüzey alanına sahip olması ilaç uygulanması için uygun bir ortam yaratsa da, ilaçların stratum kerneum tabakasını geçip deride hedeflenen bölgelere ulaşması zordur. Deriden ilaç geçişini açıklayan çalışmaların sayısı son yıllarda artmış olmasına rağmen, ilaç geçiş mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Deriden ilaç uygulanmalarında ilacın uygulandığı bölgeye bağlı olarak cilt morfolojisi de değiştiğinden farklı sonuçlarla karşılaşılabilmektedir. Bunun yanı sıra kişiler arası cilt özelliğindeki farklılıklar da ilacın etkisini değiştirebilir.

İlaçların deriden geçişi doğrudan epidermis tabakasından ilaç geçişi (transepidermal) yolu ile olur. Bunun yanı sıra kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri aracılığıyla da ilaç geçişi gerçekleşmektedir (transappendeal yol) (38).

2.5. Melanomada Topikal Tedavi Yaklaşımları

Melanoma tedavi edilmesi oldukça zor bir cilt kanseridir. Melanoma tedavisinde ilaçların topikal uygulanması, ilaçların sistemik yan etkilerin azaltılması ve

hedef bölgede etki sağlanması gibi üstünlükler sunmaktadır. Son yıllarda melanoma tedavisinde topikal uygulamalar üzerine yapılan çalışmaların sayısı artış göstermektedir. Her ne kadar cerrahi yöntem melanomada ilk tercih edilen yöntem olsa da, metastatik melanoma hastaları gibi bazı hastalarda cerrahi yöntem uygulanmamaktadır. Bunun yanı sıra hastalar tarafından da cerrahi müdahalenin tercih edilmediği durumlar söz konusu olabilmektedir. Topikal tedavi seçeneklerinin daha çok kanser öncesi lezyonlarda ya da metastatik kanser vakalarında kombinasyon tedavisi olarak kullanımı öngörülmüştür (39).

Melanoma tedavisinde henüz kullanımı onaylanmış topikal uygulanan bir ilaç bulunmamaktadır. Cerrahi müdahale yapılamayan ya da cerrahi müdahale sonrası tedavi alan hastaların bir kısmına endikasyon dışı olarak topikal imikimod tedavisi uygulanmaktadır. İmikimod, genital siğiller, aktinik keratoz ve yüzeysel bazal hücreli karsinom tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından kullanımı onaylanmış bir Toll benzeri reseptör agonistidir. Özellikle lentigo maligna melanoma ve melanoma metastazlarında endikasyon dışı olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılmış birçok çalışma imikimodun hastalarda etkin ve güvenli olduğunu göstermiştir (40). Ancak mevcut çalışmalardaki tedavi rejimleri birbirinden oldukça farklıdır. Aynı zamanda tedavi sonrası gözlem süresi 18 ay ile sınırlıdır. Tedavi sonrası hastaların %25'inde hastalığın devam ettiği görülmüştür. Buna ek olarak, tedavi pahalıdır ve uygulama bölgesinde geniş bölgeye uygulandığında inflamasyon riski de mevcuttur. Bu nedenle uygulama öncesi hekim tarafından iyi bir değerlendirme yapılması gerekmektedir (41, 42).

Melanomanın topikal yolla tedavisinde nanopartiküler sistemler üzerine de araştırmalar yapılmaya devam edilmektedir. Tablo 2.1'de melanomanın topikal tedavisine yönelik farklı etkin maddelerle hazırlanmış nanopartiküler sistemlerle yapılan bazı çalışmalar gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. Melanomanın topikal yolla tedavisinde nanopartiküler sistemlerle yapılan bazı çalışmalar

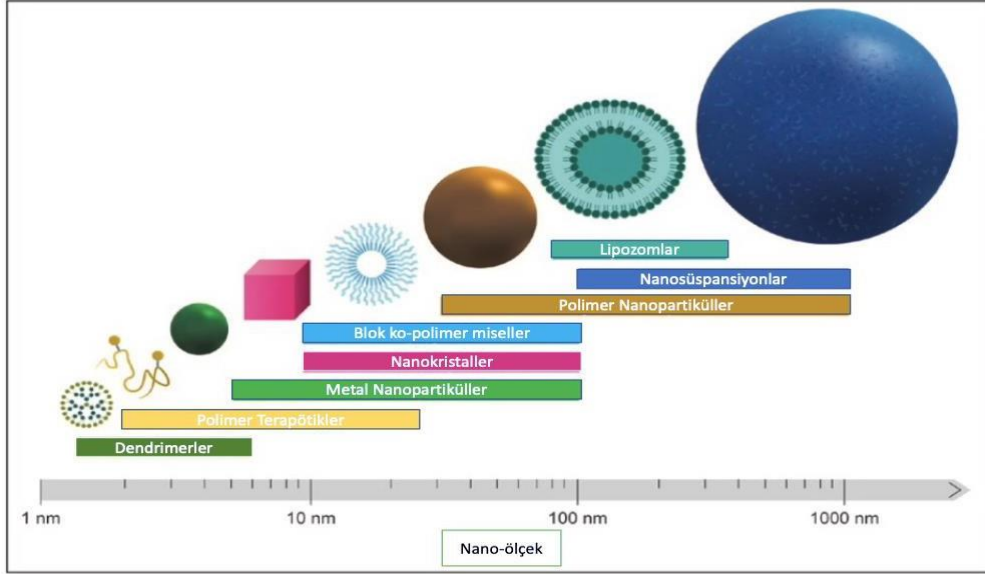
Formülasyon Tipi	Etkin Madde	Uygulama Yolu	Referans
Polimerik NP	Dakarbazin	Topikal	(43)
Katı lipid NP	Metformin	Topikal	(44)
Lipozom	Vemurafenib	Topikal	(45)
Altın NP	İmatinib mezilat	Topikal	(46)
Nanoemülsiyon	Dakarbazin	Topikal	(47)
Hidrojel	Paklitaksel	Topikal	(48)
Lipozomal termojel	Niklozamid	Topikal	(49)

2.6. Nanoteknoloji Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Modern ilaç tedavisi günümüzde etkin maddenin daha spesifik ve belirli bir şekilde etki göstermesi istenen bölgeye taşınması yönünde değişim göstermektedir. Nanoteknoloji terimi genel olarak 1-100 nm aralığındaki yapıları ifade etmekle birlikte, ilaç taşıyıcı sistemlerde nanoteknoloji terimi 1000 nm altı çapa sahip yapıları kapsamaktadır. Nanoteknolojik sistemlere olan ilgi, konvansiyonel tedavilerin etkisiz kaldığı alanlarda özellikle artış göstermiştir (50).

İlaçların hedef bölgeye taşınması uzun yıllar boyunca araştırmacıları zorlayan bir adım olmuştur. Pek çok konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemde istenen etkinin sağlanamaması, seçiciliğin az olması, kısa kalış zamanı ve zayıf biyodağılım gibi sorunlarla karşılaşılmaktadır. Nanoteknoloji bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerle ilaçların hedeflenen etki bölgesine taşınması sağlanarak terapötik etkinliğin artırılması ve yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır.

Partikül boyutunun küçülmesi nano boyutlu ilaçlara pek çok üstünlük kazandırsa da, nano boyutla birlikte fizikokimyasal özelliklerde görülen değişiklikler birtakım toksisite risklerini de beraberinde getirmektedir. Farklı partikül büyüklüğü ve morfolojiye sahip pek çok nanoteknoloji bazlı formülasyon üzerine araştırmalar yapılmaya devam etmektedir (Şekil 2.5.).



Şekil 2. 5. Nanoilaçların biyolojik çevreleri ile etkileşimlerini etkileyebilecek farklı yüzey yapıları (51).

İlacın fizikokimyasal özelliklerindeki farklılıklar ilacın farmakokinetiğinde değişikliklere neden olmakta, absorpsiyon, dağılım, eliminasyon ve metabolizma özellikleri değişen ilaçlar biyolojik bariyerleri daha iyi geçebilmektedir. İlacın etkisinde artışa yol açan bu etki, bazı durumlarda ise ilacın istenmeyen organ ve dokularda birikmesi ile toksik etkilerde ve yan etki riskinde artış da görülebilmektedir (52).

Potansiyel ilaç taşıyıcı sistemler olarak araştırılmakta olan pek çok sistem mevcuttur. Bunlardan bazıları; polimerik nanopartiküller, katı lipit nanopartiküller, metal nanopartiküller, nanojeller, miseller, nanokristaller, lipozomlar, dendrimerler, nanofiberler ve nanotüplerdir.

Son yıllarda çeşitli endikasyonlarda kullanılmak üzere Metformin HCL içeren nanotaşıyıcı sistemler ile çok sayıda bilimsel araştırma yapılmıştır. Bu sistemlere bazı örnekler Tablo 2.2'de sunulmuştur.

Tablo 2. 2. Metformin HCL İçeren Nanotaşıyıcı Sistemler

Formülasyon Tipi	Uygulama Yolu	Endikasyon	Referans
Katı lipit NP	Oral	Kolon Kanseri	(53)
Polimerik NP	Oral	Diyabet	(54)
Polimerik NP	Oral	Polikistik böbrek hastalığı	(55)
Polimerik NP	Topikal	Melanoma	(56)
Nanoemülsiyon	Oral	Diyabetik nefropati	(57)
Mikroiğne	Transdermal	Diyabet	(58)
Hidrojel	Topikal	Yara iyileşmesi	(59)
Lipozom	Oral	Meme kanseri	(60)
Lipozom	Topikal	Melanoma	(61)
Etozom	Topikal	Cilt kanseri	(62)

2.6.1. Nanopartiküller

Nanopartiküller konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerde görülen kısıtlamaların üstesinden gelmek amacıyla geliştirilmiştir. Nanopartiküllerin partikül boyutu 10-1000 nm arasında değişmektedir. Nanopartiküler sistemlerde etkin maddenin polimerik yapıya hapsedilmesi ya da etkin maddenin matris yapıda homojen dağılması sağlanır.

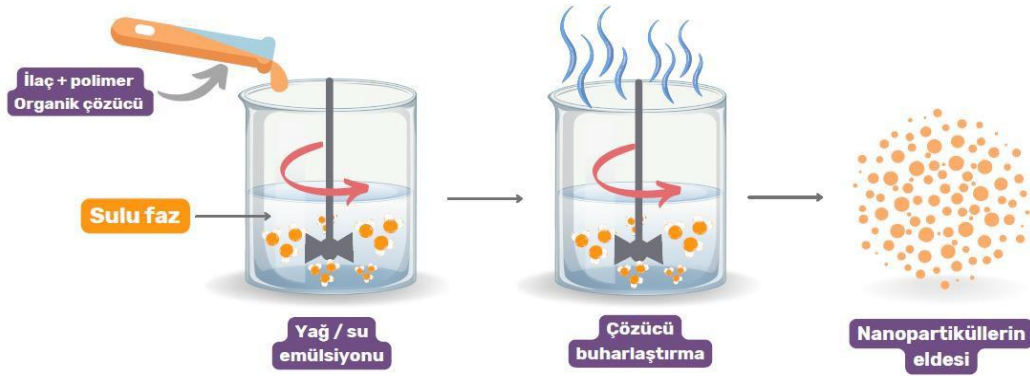
Nanopartiküllerle hastalık ve hastaya özgü olarak değişebilen sistemik, mikroçevresel ve hücrel biyolojik engellerin aşılması amaçlanmaktadır. Nanopartiküler sistemler ile etkin maddenin stabilitesi ve hedef bölgeye taşınması artırılabilir. Bu sistemler ilaçların kontrollü salımını da sağlamaktadır.

2.6.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartiküller pek çok farklı yöntemle hazırlanabilmektedir. Hazırlama yöntemi ve kullanılan materyaller değiştirilerek istenen boyut ve özelliğe sahip nanopartiküller tasarlanabilir.

- **Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi**

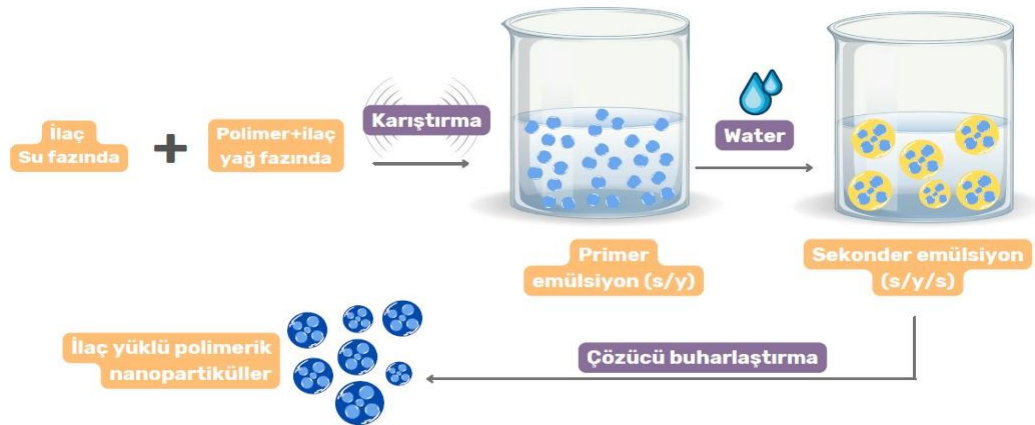
Nanopartikül hazırlanmasında en çok kullanılan yöntemlerden biri emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemidir. İlaç ve polimer uygun bir çözücü içerisinde çözündürülür. Emülsiyon oluştuktan sonra çözücü buharlaştırılarak nanopartiküller elde edilir (Şekil 2.6.). Üretim sırasında polimer ve ilaç konsantrasyonu, emülsiyon oranı, karıştırma hızı, emülsiyon ortamının özellikleri ve buharlaştırma koşulları optimize edilerek istenen partikül boyutu, dağılımı ve morfolojiye sahip nanopartiküller elde edilebilir (63).



Şekil 2. 6. Emülsiyon oluşturma / çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi (64).

- **Çift Emülsiyon Yöntemi**

Çift emülsiyon yöntemi hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların enkapsüle edilebildiği bir üretim yöntemidir. Bu yöntemde, homojenizasyon iki adımda gerçekleştirilir. İlk adımda, suda çözünebilen ilaçlar iç sulu faza (W1), polimer/lipofilik ilaçlar yağ fazına (O) eklenir. Bu işlemten sonra oluşan karışım uygun karıştırma ile homojenize edilerek birincil emülsiyon (W1/O) oluşturulur. Daha sonra, birincil emülsiyon uygun bir stabilizatör içeren dış sulu faz ile emülsifiye edilerek çift emülsiyon (W1/O/W2) oluşturulur. Çift emülsiyon oluşumunu takiben organik çözücü buharlaştırılarak nanopartikül dispersiyonu elde edilir (Şekil 2.7.) (65).



Şekil 2. 7. Çift emülsiyon yönteminin şematik gösterimi (66)

- **Süperkritik Sıvı Teknolojisi**

Süperkritik sıvılar kritik sıcaklık ve basınç altında gaz ve sıvı fazları arasında bir geçiş durumunda olan maddelerdir. Bu yöntemde polimer ve ilacın karbondioksit gibi güvenli bir çözücünde çözünmesi sağlanır. Sonrasında basınç değişimi ile çözücü gaz hale geçer ve nanopartiküllerin oluşumu sağlanmış olur. Bu yöntem kullanılan maddelerin toksik olmaması, yeniden kullanılabilir olması gibi nedenlerle çevreye zarar vermeyen ‘yeşil’ olarak tanımlanmış bir yöntemdir (65).

- **Nanopresipitasyon Yöntemi**

Nanopresipitasyon yönteminde polimer suyla karışabilen organik bir çözücünde çözündürülüp sıvı faza eklenir. Organik çözücünün sulu faza difüze olmasıyla polimer sulu ortamda çöker ve nanopartikül oluşumu spontane olarak gerçekleşir. Kolloidal süspansiyon stabilitesini sağlamak amacıyla çoğunlukla sürfaktanlar ilave edilir. Nanopresipitasyon yönteminde partikül büyüklüğü dağılımı belirli ve uygun özellikte nanopartiküller elde edilir (Şekil 2.8.). Basit ve ekonomik bir üretim yöntemidir.

deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. Biyobozunurluk, biyolojik uyumluluk, yüksek biyoyararlanabilirlik, zengin modifikasyon olanakları gibi özellikleri nedeniyle farmasötik ve tıbbi alanlarda geniş bir uygulama yelpazesi sunmaktadır. Kitosan, özellikle yara iyileşmesi, ilaç taşıyıcı sistemler, gen tedavisi, doku mühendisliği gibi birçok alanda kullanım potansiyeli taşımaktadır (69).

Kitosan, polimer zincirinde bulunan amino grupları sayesinde katyonik bir özelliğe sahiptir. Bu özelliği sayesinde negatif yüklü yüzeylere bağlanabilir ve etkileşim kurabilir. Kitosanın katyonik özelliği, mikroorganizmaların hücre zarı gibi negatif yüklü yüzeylerine bağlanarak antimikrobiyal etki göstermesine katkı sağlar (70). Ayrıca kitosan katyonik özelliği sayesinde deri yüzeyindeki negatif yüklü yapılarla etkileşerek deriden geçişi kolaylaştırabilir (71).

Deasetilasyon derecesi, kitosanın özellikleri için kritik bir parametredir. Önceki araştırmalar, yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosanın daha güçlü biyolojik etkiler sergilediğini ve suda çözünürlüğünün arttığını bildirmiştir. Bu durum molekül içinde daha yüksek bir amino grubu konsantrasyonunu göstermesinden kaynaklanır ve fonksiyonel amin grubunun protonlanması, kitosanın biyolojik etkilerini gösterebilmesi ve suda çözünmesi için önemlidir. Deasetilasyon derecesi kitosanın moleküler ağırlığını ve viskozitesini de etkileyebilir. Deasetilasyon derecesi arttıkça kitosanın moleküler ağırlığı ve viskozitesi genellikle azalır. Bu özellik, kitosanın farklı uygulamalarda reolojik ve akışkanlık özelliklerini belirlemede önemlidir (72).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde	Tedarikçi	Ülke
Asetonitril	Sigma Aldrich	ABD
Asetik Asit	Isolab	Almanya
Diklorometan	J.T. Baker	ABD
Dimetil Sülfoksit	Sigma Aldrich	ABD
Formik asit	Merck	ABD
Kitosan (<i>düşük molekül ağırlıklı, deasetilasyon derecesi (%75-85)</i>)	Sigma Aldrich	ABD
Metformin Hidroklorür	Sigma Aldrich	ABD
MTT (metil-tiyazol-tetrazolyum)	Sigma Aldrich	ABD
Pluronik F68	Sigma Aldrich	ABD
Polikaprolakton	Sigma Aldrich	ABD
Polivinil alkol	Sigma Aldrich	ABD
Protasan UP CL213	Novamatrix	Norveç
Sodyum Hidroksit	Riedel-de Haën	Almanya

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz / Ekipman	Model veya Tip
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent 1100 Series DAD ve floresans detektörlü, HP Agilent 1050 Series UV detektörlü
Dinamik Işık Saçılımı Spektrometresi	Malvern Zetasizer Nano ZS, Zetasizer Nanoseries-ZS, Malvern Ins.
Yüksek Devirli Mikrosantrifüj	Hermle Z323K
Termostatlı Yatay Çalkalayıcı Su Banyosu	Memmert
Ultra Saf Su Sistemi	Millipore Milli-Q systems
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Variomag Multipoint HP
UV Spektrofotometre	Shimadzu 160-A
Viskozimetre	Brookefield DV2R-RV
pHmetre	Sartorius

3.2. Yöntem ve Deneyler

3.2.1. Metformin Hidroklorür'ün HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve

Analitik Yöntem Validasyonu

Agilent 1100 HPLC aletinde Metformin Hidroklorür maddesi için geliştirilmiş olan metodun özellikleri şu şekildedir:

Mobil faz :	Asetonitril:Su (50:50 h/h, %0,5 formik asit)
Mobil faz akış hızı :	1 mL/dk
Sabit faz :	Chromasil C18 K olon (250 x 4.6 mm)
Enjeksiyon hacmi :	10 µL
Dedektör :	DAD dedektör 235 nm
Kolon sıcaklığı :	25 °C
Analiz süresi :	8 dakika

Kalibrasyon

Metformin HCL'nin mobil fazda hazırlanmış olan 200 µg/mL stok çözeltisinden hareketle 7 farklı konsantrasyonda (1,5, 3, 6, 12,5, 25, 50, 100 µg/mL) 6 seri çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,22 µm PTFE filtreden geçirilerek HPLC yöntemi ile analiz yapılmıştır. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

3.2.2. Analitik yöntem validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak olan maddenin miktar tayin yönteminin amaçlanan uygulama bakımından geçerliliğini göstermek için yapılması öngörülen işlemlerden oluşan bir prosedürdür. Geliştirilen analitik yöntemin değerlendirilmesinde kullanılan kriterler sıralanmıştır.

Doğrusallık

200 µg/mL konsantrasyonda metformin HCL'nin mobil faz içerisinde

hazırlanan stok çözeltisinden hareketle 7 farklı konsantrasyonda (1.5, 3, 6, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) 6 seri çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,22 µm PTFE filtreden geçirilerek HPLC yöntemi ile analiz yapılmıştır. Konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu denklemi elde edilmiş ve r^2 değeri hesaplanarak doğrusallık gösterilmiştir.

Doğruluk

Belirlenen analitik yöntemin doğruluğunu gösterebilmek amacıyla düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda (3, 12,5, 100 µg/mL) olmak üzere 3 konsantrasyon seçilmiştir. Seçilen konsantrasyon noktalarında yapılan analizlerle metformin HCL'nin % geri kazanım değerleri hesaplanarak ortalama (X), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (%VK) değerleri belirlenmiştir. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması yöntemin doğruluğunun göstergesidir.

Kesinlik

Kesinlik kullanılan analitik yöntemin farklı ölçümlerde birbirine ne kadar yakın sonuçlar verdiğinin bir göstergesidir. Kesinlik; varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak belirlenir. Yöntemin kesinliğini belirleyebilmek amacıyla tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik ve günler arası farklılık parametreleri incelenmiştir.

Tekrar Edilebilirlik

Hazırlanan 200 µg/mL metformin HCL stok çözeltisinden hareketle, 12,5 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin 6 kez ard arda HPLC ile analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması amaçlanmıştır.

Tekrar Elde Edilebilirlik

Kullanılan yöntemin tekrar elde edilebilirliğini belirlemek amacıyla 200 µg/mL stok çözeltiden hareketle 12,5 µg/mL konsantrasyonunda 6 adet çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler HPLC ile analiz edilmiş ve ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması amaçlanmıştır.

Günler Arası Farklılık

12,5 µg/mL konsantrasyonda çözeltiler 3 gün arda arda hazırlanarak HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması amaçlanmıştır.

Duyarlılık

Geliştirilen analitik yöntem için tanıma sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri belirlenmiştir. Çalışmada kalibrasyon doğrusundaki minimum konsantrasyon değeri olan 1,5 µg/mL için sinyal/gürültü oranına göre LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Tanıma sınırı için sinyal/gürültü oranınının 3.3, alt tayin sınırı için ise 10 olduğu değer belirlenmiştir.

Özgünlük

Kullanılan analitik yöntemin metformin HCL tanınmasına özgü olduğunu belirleyebilmek için; formülasyondaki diğer maddelerin metformin HCL ile bir girişim yapıp yapmadığına bakılmış ve HPLC analizi ile yöntemin özgünlüğü test edilmiştir.

Stabilite

Analiz süresince metformin HCL'nin stabil olduğunu göstermek amacıyla 12,5 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözelti ile 24 saat sonunda bozunmadan kalan miktar ölçülmüştür.

3.2.3. Boş Polikaprolakton (PCL) Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Boş polikaprolakton nanopartikülleri çift emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. 1 mL %1 (a/h) Pluronic F-68 çözeltisi, farklı konsantrasyonlarda (%0,5 ve %1) PCL içeren 5 mL diklorometan (DCM) çözeltisine damla damla enjektörle eklenmiş, buz banyosu altında ultraturaks kullanılarak 13 000 rpm'de 5 dakika emülsifiye edilmiştir. Oluşan primer emülsiyon %0,1 (a/h) PVA içeren 20 mL (%1 a/h) PF68 çözeltisinde buz banyosu altında 13000 rpm'de 5 dakika ultraturaks kullanılarak karıştırılmış ve S/Y/S emülsiyonu oluşturulmuştur. Nanopartiküllerin oluşumu için rotavaporda 40 °C'de 20 dakika organik çözücünün uçması sağlanmıştır.

Çalışmalar PVA eklenmeden de gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Formülasyon çalışmaları

Metformin HCl yüklü Polikaprolakton Nanopartiküllerin Hazırlanması

Boş PCL nanopartiküllerle yapılan çalışmaları takiben PVA miktarı (PVA içeren ve PVA içermeyen) ve PCL yüzdesi (%0.5, %0.75, %1 olacak şekilde) için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çift emülsiyon tekniği kullanılarak Metformin HCl yüklü PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır. 2,5 mg metformin HCL ve 10 mg PF68 (%1, a/h) 1 mL ultrasaf suya eklenmiş ve manyetik karıştırıcı ile 500 rpm'de 20 dk süreyle karıştırılmıştır. Oluşan çözelti farklı yüzdelerde (%0.5, %0,75 ve %1) (a/h) PCL içeren 5 mL DCM çözeltilisine enjektörle damla damla eklenmiş ve ultraturaks ile 13 000 rpm'de 5 dakika buz banyosu altında karıştırılmıştır. Oluşan primer emülsiyon %0,1 (a/h) PVA içeren/içermeyen 20 mL %1 (a/h) PF68 sulu çözeltilisine enjektörle damla damla eklenmiş ve ultraturaks ile 13 000 rpm'de 5 dakika buz banyosu altında karıştırılarak S/Y/S emülsiyonu oluşturulmuştur. Nanopartiküllerin oluşumu için rotavoporda 40 °C'de 20 dakika organik çözücünün uçması sağlanmıştır.

Formülasyon çalışmaları kapsamında elde edilen sonuçlara göre optimum formülasyonda PVA eklenmemiş ve PCL oranı %1 olarak belirlenmiştir.

Metformin HCl yüklü polikaprolakton nanopartiküllerin hazırlanmasında, 2,5 mg metformin HCL ve 10 mg PF68 (%1 a/h) 1 mL ultrasaf suya eklenmiş ve manyetik karıştırıcı ile 500 rpm'de 20 dk süreyle karıştırılmıştır. Oluşan çözelti %1 (a/h) PCL içeren 5 mL DCM çözeltilisine enjektörle damla damla eklenmiş ve ultraturaks ile 13 000 rpm'de 5 dakika buz banyosu altında karıştırılmıştır. Oluşan primer emülsiyon 20 mL %1 (a/h) PF68 sulu çözeltilisine enjektörle damla damla eklenmiş ve ultraturaks ile 13 000 rpm'de 5 dakika buz banyosu altında karıştırılarak S/Y/S emülsiyonu oluşturulmuştur. Nanopartiküllerin oluşumu için rotavoporda 40 °C'de 20 dakika organik çözücünün uçması sağlanmıştır.

3.2.5. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu

Partikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Boş PCL nanopartikülleri ve Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Malvern Zetasizer Nano ZS kullanılarak 25 °C sıcaklıkta tayin edilmiştir. Ölçümler 3 defa tekrarlanmıştır.

Enkapsülasyon Etkinliği

Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği tayini için santrifüj yöntemi (indirekt yöntem) kullanılmıştır. Nanopartiküller 40 dakika 15 000 rpm'de ultrasantrifüjleme işlemine tabi tutularak süpernatant ayrılmış, 0.22 µm filtreden geçirilerek serbest metformin miktarı önceden valide edilmiş HPLC yöntemi (Bölüm 3.2.1) ile analiz edilmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği, Eşitlik (1) kullanılarak elde edilmiştir.

$$\text{Eşitlik (1)} = \text{Enkapsülasyon Etkinliği (EE)}$$

$$\text{EE (\%)} = \frac{(\text{Başlangıçtaki Metformin miktarı} - \text{Serbest Metformin miktarı}) \times 100}{\text{Başlangıçtaki Metformin miktarı}}$$

İN Vitro Salım Çalışmaları

İN vitro salım deneyleri için diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla diyaliz membran MWCO:12 kDa kullanılmıştır. Deneyler pH 7.4'te gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı olarak PBS kullanılmıştır. Taze hazırlanan 5 mL nanopartikül dispersiyonu diyaliz membrana ilave edilmiş, diyaliz membran 25 mL PBS içeren behere yerleştirilerek 37°C'de 100 rpm hızda çalışan yatay çalkalayıcılı su banyosuna yerleştirilerek salım deneyi gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan örnek alınmış, sink koşulları sağlamak amacıyla yerine aynı miktarda taze PBS eklenmiştir. Alınan örnekler, HPLC yöntemiyle analiz edilmiştir. Salım çalışması 3 seri halinde 24 saatlik zaman diliminde belirlenen zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 ve 24 saat) yapılmıştır.

Nanopartiküllerin Mikroskopla Görüntülenmesi

Boş PCL nanopartikül ve metformin HCl yüklü PCL nanopartikül formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile görüntüleme yapılmıştır. Örnekler metal levhalar üzerine tespit edilmiştir ve yüzey yükünü en aza indirmek için altın-palladyum alaşımı ile 100 °A kalınlığında kaplanmıştır. FIB-SEM (GAIA3 +Oxford XMax 150 EDS) aleti ile, 30 kV hızlandırılmış voltajda SEM görüntüleri elde edilmiştir.

Fiziksel Stabilite

Boş PCL nanopartikül ve Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri Malvern Zetasizer Nano ZS kullanılarak 0, 1, 7, 14, 30 ve 90. günde 25 °C 'de ölçüm yapılarak tayin edilmiştir. Nanopartiküller +4 °C'de buzdolabında saklanmış ve ölçümler 3 defa tekrarlanmıştır.

3.2.6. Boş Kitosan (CS) Jel ve Metformin HCl Yüklü PCL Nanopartikül İçeren Kitosan (CS) Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmaları kapsamında; kitosan tipi (Protasan UP CL213 ve düşük molekül ağırlıklı kitosan) ve asetik asit yüzdesi (%1, %1,5 ve %2 h/h) çalışılmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda asetik asit (%1, %1,5 ve %2 h/h) jel oluşması için gereken su miktarına eklenmiştir. Daha sonra kitosan asetik asit-su karışımına ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. Jel içinde oluşan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Asetik asit eklenmeden de aynı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Formülasyon pH'sının ayarlanması amacı ile farklı molaritelerde (0,5, 1, 2M) sodyum hidroksit (NaOH) ilavesi yapılmıştır. Tüm deneyler oda sıcaklığında üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda optimum jel formülasyonunda kullanılan asetik asit yüzdesi ve kitosan tipi belirlenerek Metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonları hazırlanmıştır. Bu amaçla asetik asit (%1, h/h) (50 µL), jel oluşması için gereken nanopartikül dispersiyonu içerisine (1.95 mL) eklenmiştir

(73). Daha sonra kitosan (%3, a/h) (düşük molekül ağırlıklı, %75-85 deasetilasyon derecesine sahip) bu çözeltiye ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. Jel içinde oluşan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Boş Kitosan Jel ve Metformin Yüklü PCL Nanopartikül İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu

Görünüş

Hazırlanan jel formülasyonları organoleptik özellik, renk, berraklık, saydamlık ve partikül içerip içermemesi açısından görsel olarak incelenmiştir

pH Tayini

Hazırlanan jel formülasyonlarının pH değeri Sartorius PP-20 pH ölçer kullanılarak tayin edilmiştir. Bu amaçla 1 g jel formülasyonu 25 mL saf suda çözündürülerek, elektrot 30 dakika süreyle sabit bir okuma elde edilene kadar formülasyon içerisinde bekletilerek ölçüm yapılmıştır (n=3).

Viskozite tayini

Hazırlanan jel formülasyonlarının viskozite tayini için 25 °C, 30 °C, 35 °C sıcaklıklarda, dijital Brookfield Brookefield DV2R-RV viskozimetre kullanılarak farklı kayma hızlarında cP cinsinden ölçüm yapılmıştır. Ölçümlerde CP-52 spindle kullanılmıştır. Ölçüm sırasında torque değerinin 10-100 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Jellerin akış özellikleri kayma gerilimine karşı kayma hızı grafiği oluşturularak belirlenmiştir.

Yayılabirlik Testi

Yayılabirlik testi için, 0.5 g jel formülasyonu bir cam plaka üzerinde önceden işaretlenmiş 2 cm çapında bir dairesel alana yayılarak üzerine başka bir cam plaka yerleştirilmiştir. Üstteki cam plaka üzerine 500 g ağırlık koyularak 5 dakika bekletilmiştir. Yayılan jelin daire çapı ölçülmüş ve yayılım aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

% Alana göre yayılım = $(A2/A1) \times 100$

A1= İlk dairenin çapı (2 cm)

A2= Yayılımdan sonra dairenin çapı

Mikroskoplara Görüntüleme

Hazırlanan jel formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile görüntüleme yapılmıştır. Örnekler metal levhalar üzerine tespit edilmiştir ve yüzey yükünü en aza indirmek için altın-palladyum alaşımı ile 100 °A kalınlığında kaplanmıştır. FIB-SEM (GAIA3 +Oxford XMax 150 EDS) aleti ile, 30 kV hızlandırılmış voltajda SEM görüntüleri elde edilmiştir.

İn Vitro Salım çalışmaları

Metformin HCl yüklü PCL nanopartikülleri içeren CS jel formülasyonlarının in vitro salım profilinin belirlenmesinde Franz difüzyon hücresi kullanılmıştır. pH 7,4 fosfat tamponu (PBS) çözeltisi, salım ortamı olarak kullanılmıştır. Franz difüzyon hücresinin donör ve reseptör kompartmanları arasına yerleştirilen diyaliz membran içine 1 mL Metformin HCl içeren CS jel ve Metformin HCl yüklü PCL nanopartikülleri içeren CS jel formülasyonları eklenmiştir. Reseptör kompartmana 10 mL PBS çözeltisi eklenmiştir. Franz difüzyon hücreleri $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sıcaklığa ayarlanmış su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve 100 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Örnek alma saatleri olarak 30 dk, 1, 2 ,3 ,4 ,6 ,8 ,12, 24. saatler belirlenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında ortamdan 0,5 ml örnek alınarak yerine aynı miktarda taze PBS eklenmiş ve sink koşul sağlanmıştır. Alınan örnekler 0,45 µm'lik selüloz filtrelerinden süzölmüş ve HPLC ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Sitotoksitesite çalışmaları

Deriye topikal uygulanmak amacıyla geliştirilen metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonunun, hücre kültürü çalışmaları ile sitotoksitesitesi ve antikanser etkinliği incelenmiştir.

Boş PCL nanopartikül formülasyonunun L929 fare fibroblast hücreleri

üzerinde sitotoksik etkisi MTT (metil-tiyazol-tetrazolyum) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntem, USP'de kayıtlı standart toksisite tayin yöntemidir (41). 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına, her bir kuyucuğa 15×10^3 hücre ekildikten sonra farklı dilüsyonlarda (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32) boş PCL nanopartikül formülasyonları ilave edilmiş, 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 saat süreyle bekletilmiştir. Bu süre sonunda her bir kuyucuğa 5 mg/mL konsantrasyonda MTT çözeltisi eklenerek 4 saat beklenmiş, oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO çözeltisi eklenerek çözündürülmüş ve 570 nm'de mikroplate okuyucuyla (SpectraMAX İD3, Molecular Devices) 570 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür. Hücre canlılığı, kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

Metformin HCl'nin sitotoksitesinin incelenmesi için B16F10 hücreleri üzerinde LD₅₀ değeri hesaplanmıştır. Bu amaçla metformin HCl'nin ultrasaf su içerisinde hazırlanan stok çözeltisinden hareketle farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin konsantrasyonları 360, 180, 90, 45, 22,5 ve 11,25 µg/mL olacak şekilde hazırlanarak hücre yaşayabilirlikleri tespit edilmiştir.

Metformin yüklü nanopartikül formülasyonlarının antikanser etkinliği MTT yöntemi kullanılarak B16F10 insan melanoma hücre hattında yapılmıştır. İlk olarak hücrelerin 96 kuyucuklu hücre kültür plaklarına her bir kuyucuğa 15×10^3 hücre besiyeri içinde ekilmiştir. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda (360, 180, 90, 45, 22,5, 11,25 µg/mL) metformin HCl içerecek şekilde metformin çözeltisi, metformin HCl yüklü PCL nanopartikülleri ve metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonları ilave edilerek 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her bir kuyucuğa 5 mg/mL konsantrasyonda MTT çözeltisi eklenerek 4 saat beklenmiş, oluşan formazan kristalleri 100 µL DMSO çözeltisi eklenerek çözündürülmüş ve mikroplate okuyucuyla (SpectraMAX İD3, Molecular Devices) 570 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak DMEM ile inkübe edilen hücreler kullanılmıştır. Kantitatif değerlendirme, % yaşayabilirlik değerleri hesaplanarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.9. Ex Vivo Çalışmalar

Nanopartikül formülasyonundan metforminin deri penetrasyonu, 37 °C sıcaklıkta çalışılmasını sağlayan ceketli Franz difüzyon hücresi kullanılarak incelenmiştir. Reseptör kompartmana sink koşulları sağlayacak hacimde PBS (pH 7.4) eklenerek manyetik karıştırıcı altında 300 rpm'de karıştırılmıştır. Antalya'da bir domuz kesimhanesinden temin edilmiş dermatom edilmiş domuz derisi (stratum korneum donör kompartmanda yukarı, dermal tabaka reseptör kompartmana gelecek şekilde) donör ve reseptör kompartman arasına yerleştirilerek metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel ve serbest metformin HCl içeren CS jel cildin epidermal yüzeyine (donör kompartmana) uygulanmış ve 24 saat sonunda difüzyon hücresinin örnekleme portundan çekilerek 0.45 µm filtreden süzölmüş ve HPLC ile analiz edilerek deriden geçen ilaç miktarı hesaplanmıştır. 37 °C'de tutulan eşit hacimde taze fosfat tamponu, her örneklemeden sonra sink koşulları korumak adına reseptör kompartmana eklenmiştir.

24 saat sonunda stratum korneum üzerindeki formülasyon alınmış, 20 kez bant sıyırma ile (2x2 cm- Scotch Book bant) stratum korneum alttaki dokudan ayrılmıştır. Bantlar mobil faz içerisinde 12 saat ekstrakte edilmiş ve süre sonunda alınan örnekler 0.45 µm filtreden süzülerek HPLC ile analizi yapılmıştır. Kalan deri örneği küçük parçalara ayrılıp 12 saat mobil faz ile ekstrakte edilmiş ve süre sonunda alınan örnekler 0.45 µm filtreden süzölüp HPLC ile analizi yapılmıştır. Elde edilen konsantrasyondan hareketle başlangıçtaki metformin miktarına oranlanarak deride kalan met miktarı hesaplanmıştır.

Salım çalışması sonucunda Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jel için akı değeri (Js) ve permeasyon katsayısı (Kp) hesaplanmıştır. Akı deriden geçen kümülatif metformin miktarının zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilmiştir. Permeabilite katsayısı ise Eşitlik 2'de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır.

Eşitlik 2;

$$K_p = J_s / C_d$$

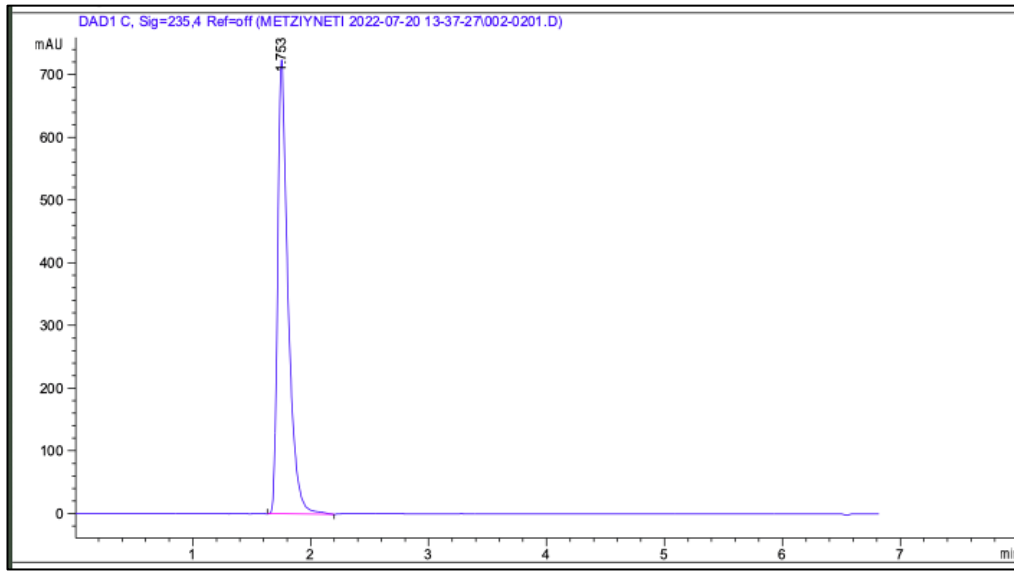
Js: Akı

Cd: Donör kompartmana ilave edilen Met miktarı

4. BULGULAR

4.1. Metformin HCL'nin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve Validasyonu

Metformin HCL'nin HPLC ile in vitro miktar tayini Bölüm 3.2.1'de belirtilen koşullar altında yapılmıştır. Metformin HCL piki 235 nm'de yapılan seçici deteksiyon sonucu 1,75. dakikada saf olarak elde edilmiştir (Şekil 4.1.).



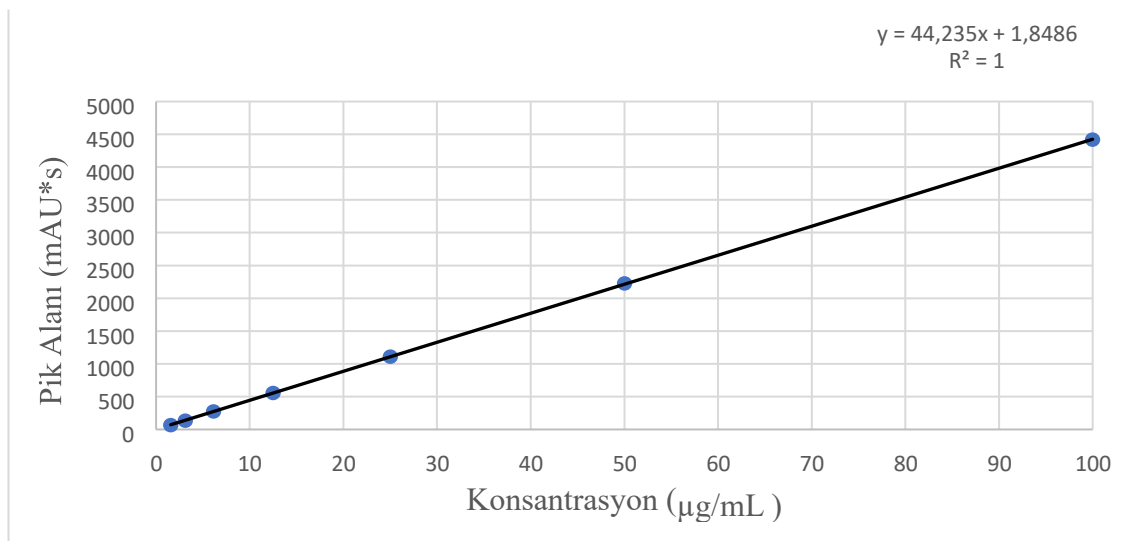
Şekil 4. 1. Metformin HCL'ye (100 µg/mL) ait HPLC kromatogramı.

4.1.1. Kalibrasyon

Metformin HCL'nin kalibrasyon doğrusu Bölüm 3.2.1.2.'de belirtildiği gibi hazırlanan ve her birinde 1,5, 3, 6, 12.5, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda Met HCL olan çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve denklemi, hazırlanan çözeltilerin enjeksiyonundan sonra HPLC yöntemi ile çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek doğrusal regresyon ile bulunmuştur. Met HCL'nin HPLC ile miktar tayininde doğrusal regresyon verileri Tablo 4.1.'de gösterilmekte olup kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.2.'de yer almaktadır.

Tablo 4. 1. Metformin HCL'nin HPLC ile miktar tayinininde elde edilen lineer regresyon verileri.

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı	1,5 µg/mL- 100 µg/mL
Eğim	44,235
İntersept	1,8486
Korelasyon Katsayısı (r ²)	1,00



Şekil 4. 2. Metforminin HCL'nin kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6).

4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Doğrusallık

Yöntemin doğrusallık analizi için gerekli çözeltiler Bölüm 3.2.2.'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. 200 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltiden hareketle 1,5, 3, 6, 12,5, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplanmış ve kalibrasyon doğrusu denklemi elde edilmiştir. Denklem doğrusallığını belirleyen tanımlayıcılık katsayısı (r²) değeri 1 bulunmuş ve yöntemin doğrusal olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2).

Doğruluk

Belirlenen analitik yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla, kalibrasyon sınırları içindeki düşük, orta ve yüksek olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda (3, 12,5 ve 100 µg/mL) 6 seri çözelti hazırlanarak HPLC analizi yapılmıştır. Ölçüm sonucunda Met HCL'nin geri kazanım değerleri ve bu değerlere ait X, SS ve VK hesaplanmıştır. Varyasyon katsayıları bütün konsantrasyonlar için %2'den küçük bulunmuştur (Tablo 3.2).

Tablo 4. 2. Metformin HCL'nin geri kazanım yüzdeleri ve varyasyon katsayısı değerleri.

Konsantrasyon Örnek	% Geri Kazanım		
	3 µg/mL	12,5 µg/mL	100 µg/mL
1	96,62	101,81	99,96
2	100,17	100,02	100,30
3	98,21	99,69	98,84
4	98,21	100,29	100,97
5	96,18	100,34	100,08
6	95,31	100,18	98,83
X	97,45	100,39	99,83
SS	1,90	0,73	0,84
VK	1,95	0,73	0,84

Kesinlik

- **Tekrar Edilebilirlik**

Kullanılan yöntemin tekrar edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla 200 µg/mL stok çözeltiden seyreltilerek 12,5 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltinin 6 kez ardı ardına HPLC analizi yapılmıştır. Varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur (Tablo 4.3.).

Tablo 4. 3. Metformin HCL'nin tekrar edilebilirlik sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm SS$	VK
1	12,74	12,56 \pm 0,73	0,72
2	12,52		
3	12,48		
4	12,55		
5	12,56		
6	12,54		

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Kullanılan yöntemin tekrar elde edilebilirliğini değerlendirmek amacıyla 200 $\mu\text{g/mL}$ stok çözülden seyreltilerek 12,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda 6 adet çözelti hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Tablo 4. 4. Metformin HCL'nin tekrar elde edilebilirlik sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	$X \pm SS$	VK
1	12,73	12,50 \pm 0,16	1,29
2	12,51		
3	12,47		
4	12,54		
5	12,55		
6	12,23		

Günler Arası Farklılık

Günler arası farklılık parametresinin değerlendirilmesi amacıyla, 12,5 µg/mL konsantrasyonda 3 gün ardı ardına çözeltiler hazırlanmış ve HPLC ile analizi yapılmıştır ve X, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. Varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur (Tablo 4.5).

Tablo 4. 5. Metformin HCL'ye ait günler arası farklılık sonuçları.

Örnek	Konsantrasyon (µg/mL)	X ± SS	VK
1	12,65	12,43 ± 0,21	1,72
2	12,22		
3	12,42		

Duyarlılık (Tanıma Sınırı (LOD) ve Alt Tayin Sınırı (LOQ)

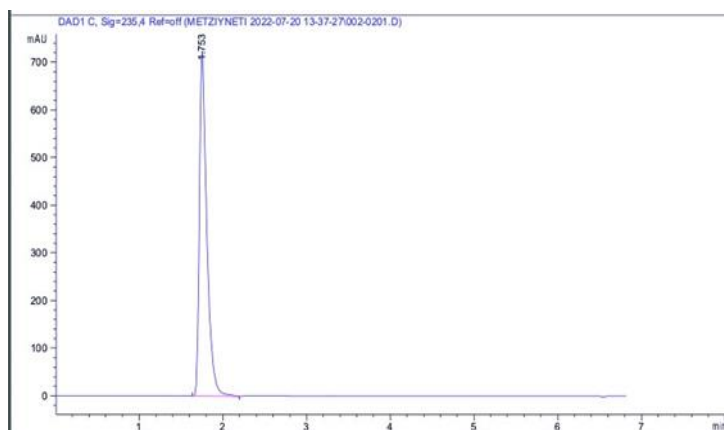
Değerlerinin Hesaplanması)

Metformin HCL'nin HPLC ile miktar tayininde kullanılan yöntemin duyarlılığı Bölüm 3.2.4.4'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Tanıma sınırı 0,072 µg/mL ve alt tayin sınırı 0,21 µg/mL olarak belirlenmiştir.

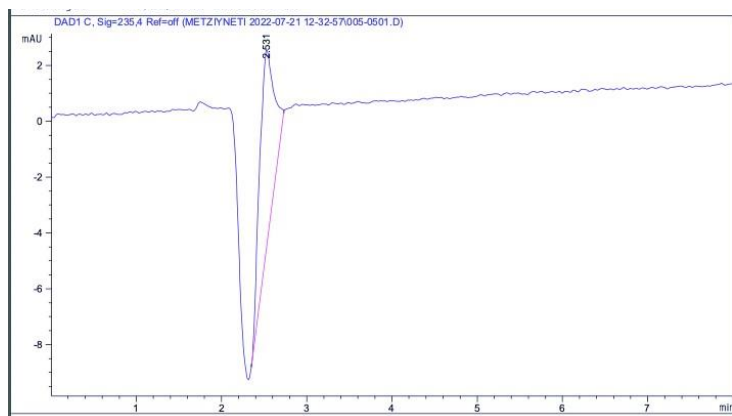
Özgünlük

Kullanılan yöntemin metformin HCL'nin tanınmasına özgü olduğunu belirlemek amacıyla Bölüm 3.2.2.'de belirtilen şekilde formülasyondaki yardımcı maddelere ait HPLC kromatogramları elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Elde edilen sonuçlara göre kullanılan yöntemin metformin HCL'nin HPLC ile tayini için özgün bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

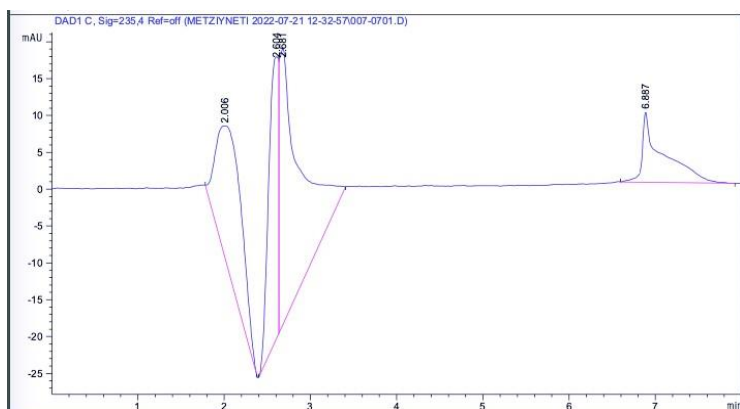
a)



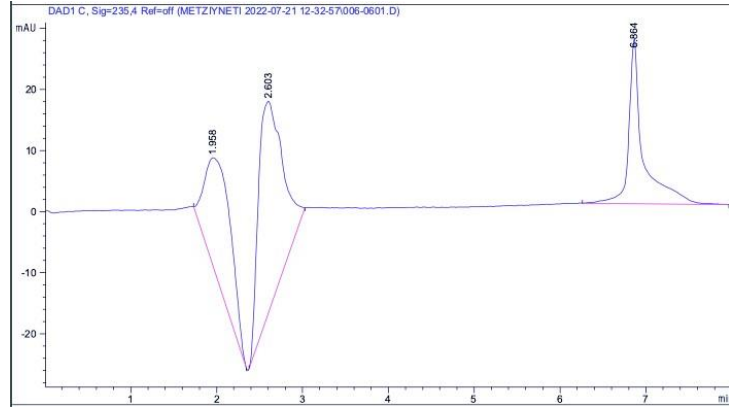
b)



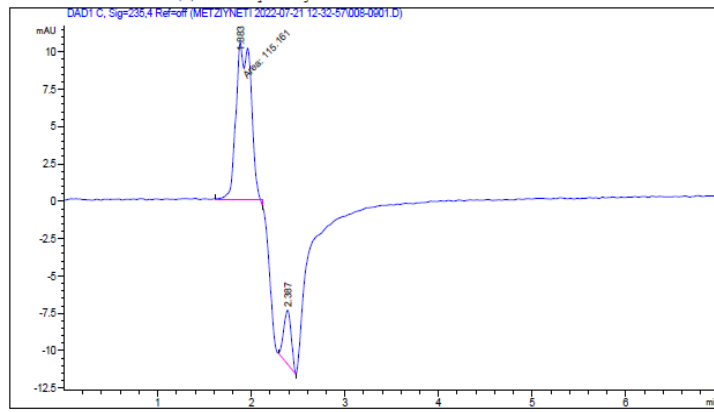
c)



d)



e)



Şekil 4. 3. Metformin ve diğer maddelerin HPLC spektrumlarının karşılaştırması. a) Metformin HCL b)PCL c) PF68 d) DCM e) PBS'e ait kromatogramlar

Stabilite

12,5 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan metformin HCL çözeltisinin 24 saat sonra tekrar analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda başlangıç konsantrasyonunun %96,7 si ($\pm 0,29$) ortamda tayin edilmiş ve metformin HCL'nin stabil olduğu görülmüştür. Tez çalışmamız kapsamında kullanılan HPLC yöntemi ile herhangi bir bozunma ürününe ait pike rastlanmamıştır.

4.2. Formülasyon Çalışmaları

4.2.1. Boş PCL Nanopartiküllerin Hazırlanması

Çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanan boş PCL nanopartiküllerine ait partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri Tablo 4.6.'da verilmiştir. Boş PCL nanopartiküllerin hazırlanmasında iki farklı polimer konsantrasyonu (%0,5 ve %1) ve PVA yüzdesi (%0,1 ve PVA içermeyen) kullanılmıştır. İki formülasyon için de partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değerleri çalışma için uygun bulunmuş, sonrasında nanopartiküllere etkin madde yüklenerek formülasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 4. 6. Boş PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri (n=3).

PVA (%)	PCL (%)	Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite indeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
0,1	0,5	224 \pm 14	0,23 \pm 0,02	-8,6 \pm 0,5
-	1	157 \pm 5	0,2 \pm 0,01	-17,2 \pm 2,1

4.2.2. Metformin HCl yüklü PCL Nanopartiküllerin Hazırlanması

Formülasyon çalışmaları kapsamında polimer konsantrasyonu, sürfaktan varlığı ve yüzdesi ve karıştırma hızı değişken olarak seçilmiştir. Polimer konsantrasyonunun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeline etkisini görmek amacıyla; % 0,5, %0,75 ve %1 konsantrasyonda PCL kullanılarak Met yüklü PCL

nanopartiküller hazırlanmıştır. Polimer konsantrasyonu %0,5'ten %0,75'e çıkarıldığında elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde artış gözlenmiş, polimer konsantrasyonu %1 olarak kullanıldığında partikül büyüklüğü ve PDI değerleri azalmıştır (Tablo 4.2.).

Bu nedenle enkapsülasyon etkinliği çalışmaları için; % 0,5 ve %1 PCL konsantrasyonu ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları seçilmiştir.

Tablo 4. 7. Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri (n=3).

PVA (%)	PCL (%)	Karıştırma Hızı (rpm)	Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite indeksi	Zeta Potansiyel (mV)
0,1	0,5	13000	268 ± 7	0,30 ± 0,14	-2,5 ± 1
0,1	0,5	11000	244 ± 10	0,27 ± 0,03	-1,3 ± 0,1
0,1	0,75	13000	339 ± 11	0,37 ± 0,01	-1,4 ± 0,2
0,1	1	13000	255 ± 13	0,24 ± 0,02	-1,3 ± 0,5
-	1	13000	180 ± 10	0,17 ± 0,07	-11,4 ± 2,3

%0,1 (a/h) PVA ve %0,5 konsantrasyonda PCL kullanılarak hazırlanan metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği düşük bulunmuştur (%9). Polimer konsantrasyonu %1'e yükseltildiğinde enkapsülasyon etkinliği %14'e yükselmiştir.

Daha sonra PVA varlığının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla formülasyonlar hazırlanmış ve PVA içermeyen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği %28 bulunmuştur. PVA içermeyen %1 PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve PDI değerleri de azalmış, zeta potansiyeli değerinde negatif yönde artış görülmüştür (Tablo 4.8.). Optimum nanopartikül formülasyonu olarak %28 enkapsülasyon etkinliğine sahip PVA içermeyen %1 PCL içeren nanopartiküller seçilmiştir.

Tablo 4. 8. Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği değerleri (n=3).

PVA (%)	PCL (%)	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
0,1	0,5	268 ± 72	0,30 ± 0,13	-2,5 ± 1	9
0,1	1	255 ± 13	0,24 ± 0,02	-1,3 ± 0,5	14
-	1	180 ± 10	0,17 ± 0,07	-11,4 ± 2,3	28

4.3. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu

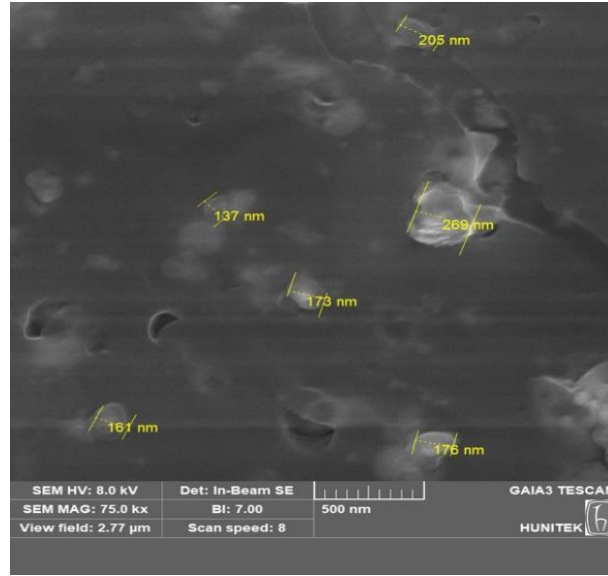
4.3.1. Nanopartikül Formülasyonlarının Mikroskopa Görüntülemesi

Boş polikaprolakton nanopartikülleri ve metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerin yüzey özellikleri FIB-SEM taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiş ve Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.

a)



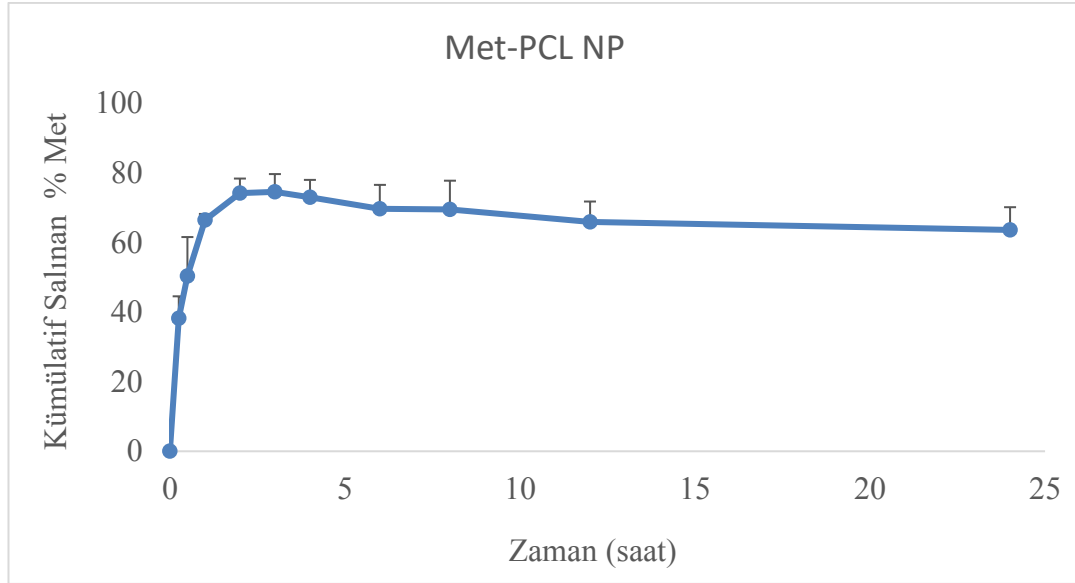
b)



Şekil 4. 4. a) Boş PCL nanopartiküllerinin b) Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (x8 000 büyütmede).

4.3.2. İn Vitro Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışması 3 seri halinde 24 saatlik zaman diliminde belirlenen zaman aralıklarında (0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 ve 24 saat) yapılmıştır. Salım sonuçlarına bakıldığında; patlama etkisini takiben yavaş ilaç salımı görülmüştür. 24 saatin sonunda ortalama kümülatif salım değeri % 63,6 olarak bulunmuştur. Nanopartikül dispersiyonunun salım süresince stabilitesini koruduğu görülmüştür.

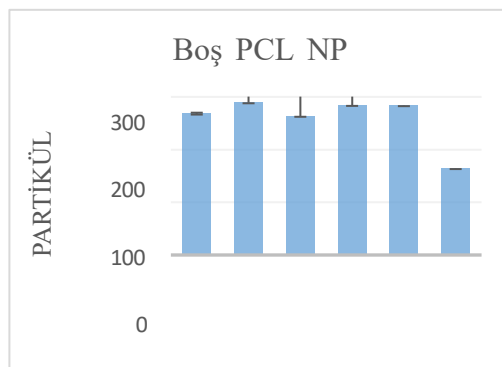


Şekil 4. 5. pH 7.4 PBS çözeltisinde Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin in vitro salım profilleri (n=3) ± SS.

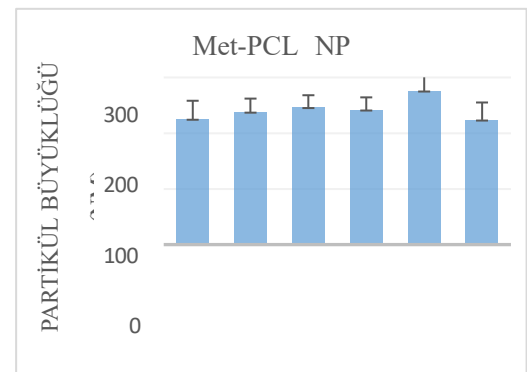
4.3.3. Fiziksel Stabilité

Boş ve Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin 3 ay süreyle partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri ölçülerek fiziksel olarak stabil oldukları görülmüştür. Nanopartiküller +4 °C sıcaklıkta buzdolabında saklanmış, 0, 1, 7, 14, 30 ve 90. günlerde ölçüm yapılmıştır.

a)

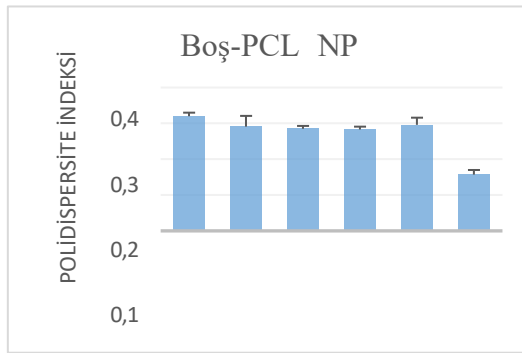


b)

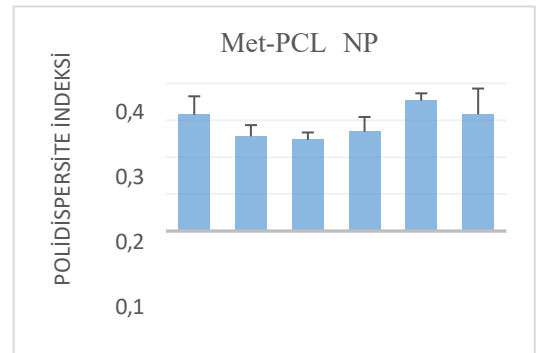


Şekil 4. 6. a) Boş PCL nanopartiküllerin b) Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin zamana karşı partikül büyüklüğü değerleri (n=3).

a)

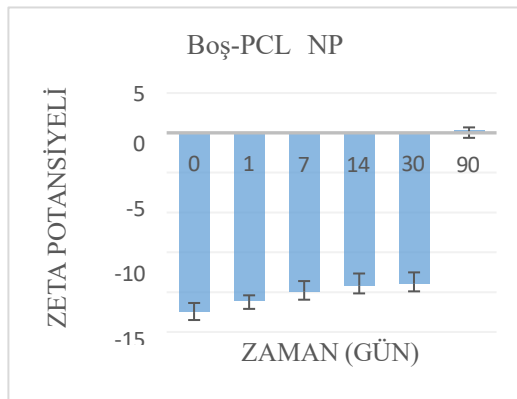


b)

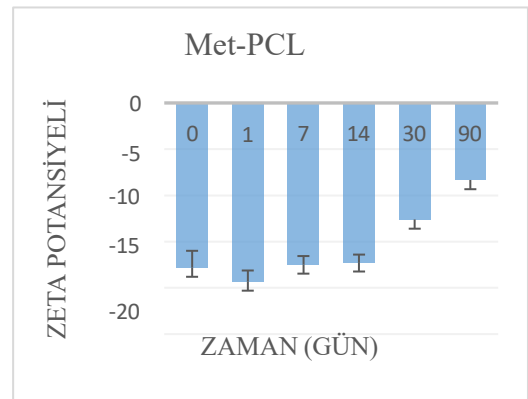


Şekil 4. 7. a) Boş PCL nanopartiküllerin b) Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin zamana karşı PDI değerleri (n=3).

a)



b)



Şekil 4. 8. a) Boş PCL nanopartiküllerin b) Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin zamana karşı zeta potansiyel değerleri (n=3).

4.4. Boş Kitosan (CS) Jel ve Metformin Yüklü PCL Nanopartikül İçeren

Kitosan Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve Optimizasyonu

Boş CS jel hazırlanmasında, iki farklı kitosan (Protasan UP CL213 ve düşük molekül ağırlıklı kitosan) kullanılmış ve çalışmalar sonuçlar Tablo 4.9'da sunulmuştur.

Kullanılan kitosan tipi ve asetik asit miktarının jelleşmede ve jelin viskozitesinde etkili olduğu görülmüştür. Asetik asit eklenmeyen formülasyonlarda jel oluşumu meydana gelmemiştir. Asetik asit miktarı arttıkça jelin viskozitesi de artmıştır. Protasan UP CL213 ile hazırlanan formülasyonlarda asetik asit ilavesiyle

viskozitede istenen oranda artış sağlanamadığından, çalışmalara düşük molekül ağırlıklı kitosan ile devam edilmiştir.

Formülasyonlara pH ayarlamak amacı ile farklı konsantrasyonlarda NaOH (0.5 M, 1 M ve 2M) ilave edilmiş ancak NaOH ilavesinin jel yapısını bozduğu görülmüştür. Bu nedenle formülasyonlarda kullanılan asetik asit miktarı değiştirilerek deriyeye uygulanabilir pH aralığında (pH 4,5-6) jel oluşumu sağlanmıştır (42). pH ölçüm sonuçları Tablo 4.11’de sunulmuştur.

Tablo 4. 9. Formülasyon çalışmaları.

<i>Polimer tipi</i>	<i>Polimer konsantrasyonu (%)</i>	<i>Asetik Asit (%) (h/h)</i>	<i>NaOH</i>
<i>Protasan UP CL213</i>	1	-	-
<i>Protasan UP CL213</i>	2	-	-
<i>Protasan UP CL213</i>	3	-	-
<i>Protasan UP CL213</i>	4	-	-
<i>Protasan UP CL213</i>	3	2	-
<i>Kitosan</i>	3	-	-
<i>Kitosan</i>	3	1	-
<i>Kitosan</i>	3	1,5	-
<i>Kitosan</i>	3	1,5	+
<i>Kitosan</i>	3	2	-
<i>Kitosan</i>	3	2	+
<i>Kitosan</i>	4	-	-
<i>Kitosan</i>	4	1	-

Tablo 4. 10. Boş kitosan jel formülasyonlarına ait viskozite ölçüm sonuçları (n=3).

<i>Polimer tipi ve konsantrasyonu</i>	<i>Asetik Asit % (h/h)</i>	<i>Kayma Hızı (rpm)</i>	<i>Viskozite (25 °C, cP)</i>
<i>Protasan UP CL213 %1</i>	-	100	8,9
<i>Protasan UP CL213 %2</i>	-	100	26,8
<i>Protasan UP CL213 %3</i>	-	100	64
<i>Protasan UP CL213 %4</i>	-	100	68,8
<i>Protasan UP CL213 %3</i>	2	100	90,6
<i>Kitosan %3</i>	-	100	191,8
<i>Kitosan %3</i>	1	10	2158,7
<i>Kitosan %3</i>	1,5	10	935,6
<i>Kitosan %4</i>	-	100	448,5
<i>Kitosan %4</i>	1	10	4851,9

Viskozite ölçümü sonucunda %3 konsantrasyonda düşük molekül ağırlıklı kitosanla oluşturulan jel (%1, %1,5 ve %2 asetik asit ilavesiyle) formülasyonlarının pH ölçümleri yapılmıştır (Tablo 4.11.). Elde edilen sonuçlar ışığında; optimum formülasyon olarak % 1 (h/h) asetik asit ve %3 kitosan içeren jel formülasyonu seçilmiştir. Tüm deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. 11. Farklı konsantrasyonda asetik asit kullanılarak oluşturulan boş kitosan jel formülasyonlarına ait pH değerleri (n=3, ±SS).

<i>Polimer</i>	<i>Asetik Asit</i> <i>% (h/h)</i>	<i>pH</i>
<i>Kitosan %3</i>	1	5,00 ± 0,04
<i>Kitosan %3</i>	1,5	4,55 ± 0,04
<i>Kitosan %3</i>	2	4,35 ± 0,06

Metformin yüklü PCL nanopartikül içeren kitosan jel formülasyonlarının hazırlanması

%1 (h/h) oranında asetik asit, jel oluşması için gereken nanopartikül dispersiyonu içerisine eklenmiştir. Daha sonra kitosan (%3, a/h) (düşük molekül ağırlıklı, %75-85 deasetilasyon derecesine sahip) lave edilerek 500 rpm'de 30 dk karıştırılmıştır. Jel içinde oluşan hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için oda sıcaklığında 4 saat bekletilmiş ve metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonu elde edilmiştir. Çalışmalar 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Boş Kitosan Jel ve Metformin Yüklü PCL Nanopartikül İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu

Görünüş

Boş CS jel ve Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonları renk, berraklık, saydamlık ve partikül bulundurup bulundurmaması açısından görsel olarak incelenmiştir. Boş kitosan jel formülasyonları açık sarı renkli ve berraktır. Metformin yüklü PCL NP içeren kitosan jel formülasyonları beyazımsı, mat ve saydam görünümlüdür. Formülasyonlarda gözle görülür partikül ve kumlanmaya

rastlanmamıştır.

pH Tayini

Boş CS jel ve Metformin yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonlarının pH değeri Sartorius PP-20 pH ölçer kullanılarak tayin edilmiştir. Boş kitosan jelin pH değeri $5,00 \pm 0,04$, Metformin yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonunun pH'ı $4,89 \pm 0,05$ olarak ölçülmüştür ($n=3, \pm SS$).

Viskozite tayini

Hazırlanan boş CS jel ve Met yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonlarının viskozite tayini için üç farklı sıcaklıkta (25°C , 30°C , 35°C), dijital Brookfield viskozimetre kullanılarak cP cinsinden ölçüm yapılmıştır. Hem boş CS jel hem de Met yüklü NP içeren CS jel formülasyonlarına ait viskozite değerlerinin sıcaklık artışı ile azaldığı görülmüştür.

Tablo 4. 12. Boş CS jel formülasyonu için farklı sıcaklıklarda viskozite ölçüm değerleri ($n=3, \pm SS$).

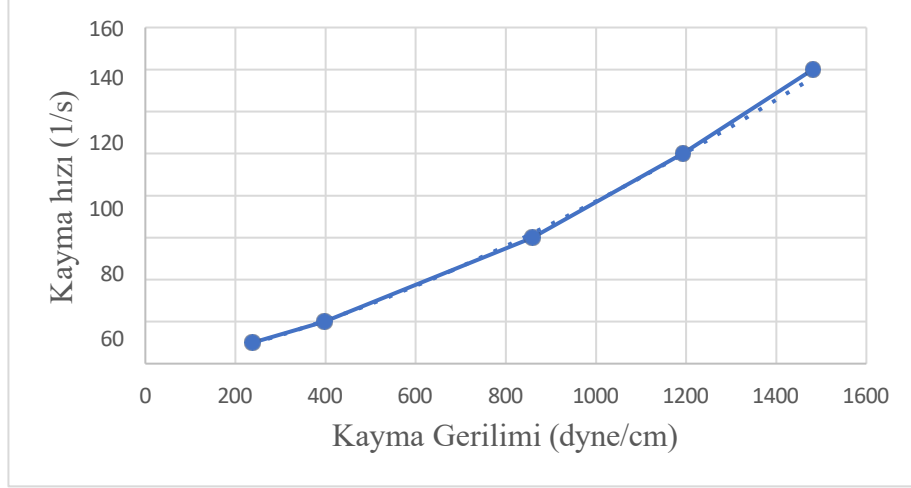
<i>Kayma Hızı (rpm)</i>	<i>25 °C</i>	<i>30 °C</i>	<i>35 °C</i>
5	2626± 356,7	1992 ± 59,2	1689 ± 70,8
10	2159±267,8	1666 ± 39,9	1428 ± 43,2
30	1483±71,1	1215 ± 21,8	1052 ± 21,0
50	1224±38,1	1029 ± 17,1	894 ± 18,4
70	1087±32,7	917 ± 18,2	799 ± 14,3

Tablo 4. 13. Metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonu için farklı sıcaklıklarda viskozite ölçüm değerleri ($n=3, \pm SS$).

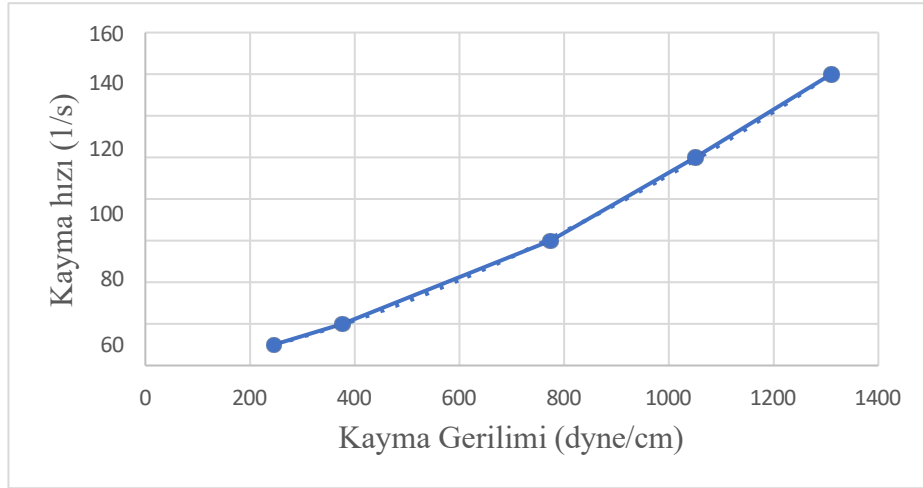
<i>Kayma Hızı (rpm)</i>	<i>25 °C</i>	<i>30 °C</i>	<i>35 °C</i>
5	2626± 356,7	1992 ± 59,2	1689 ± 70,8
10	2159±267,8	1666 ± 39,9	1428 ± 43,2
30	1483±71,1	1215 ± 21,8	1052 ± 21,0
50	1224±38,1	1029 ± 17,1	894 ± 18,4
70	1087±32,7	917 ± 18,2	799 ± 14,3

Farklı kayma hızlarına (0-150 rpm) karşı Met HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonu için akış grafiği elde edilmiştir. Boş CS jel ve Met HCl-PCL NP içeren CS jel formülasyonları psödoplastik akış tipi göstermiştir (Şekil 4.9.).

a)



b)



Şekil 4. 9 a) Boş kitosan jel b) Met-PCL NP içeren CS jel formülasyonuna ait akış eğrisi.

Yayılabilirlik Testi

Boş CS jel ve Met HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonlarının % yayılabilirlik sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir.

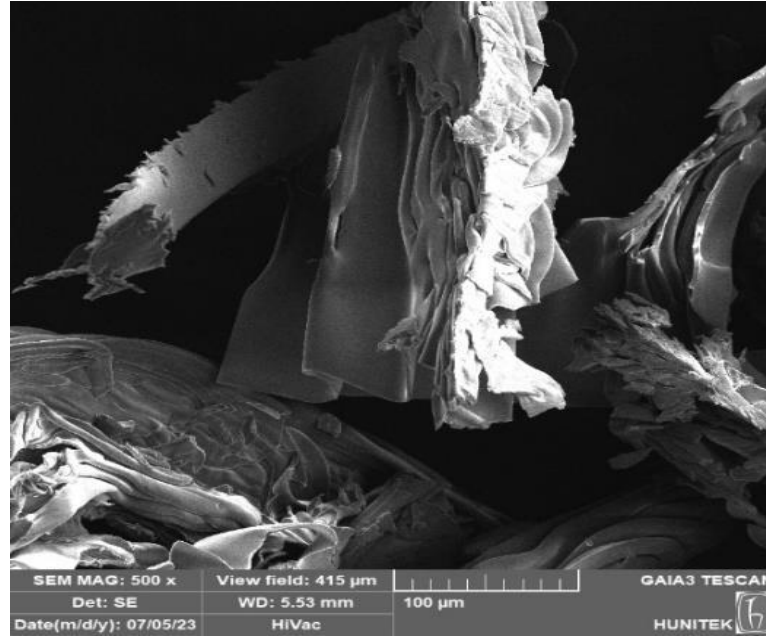
Tablo 4. 14. Boş CS jel ve Met-PCL NP içeren CS jel formülasyonlarına ait yayılabilirlik sonuçları (n=3, \pm SS).

% Alana Göre Yayılım	
Boş CS jel	406,7 \pm 12,6
Met PCL NP içeren CS jel	392 \pm 6,4

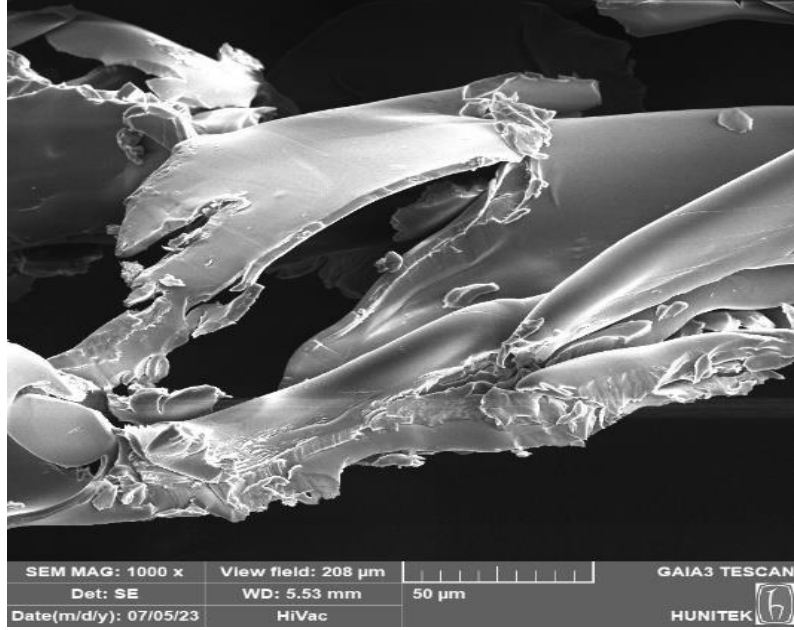
Mikroskoplara Görüntüleme

Boş CS jel ve Met HCl yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonlarına ait SEM görüntüleri Şekil 4.10. ve Şekil 4.11’de verilmiştir.

a)

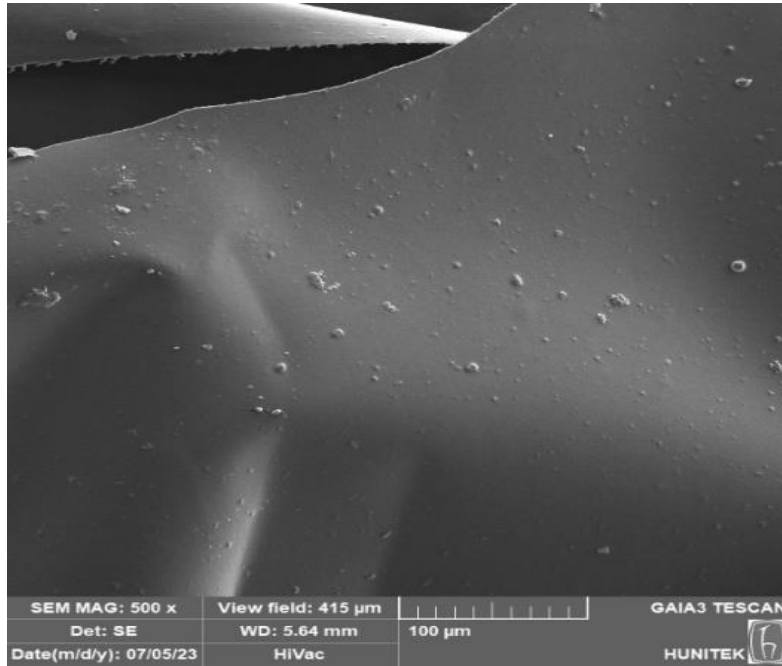


b)

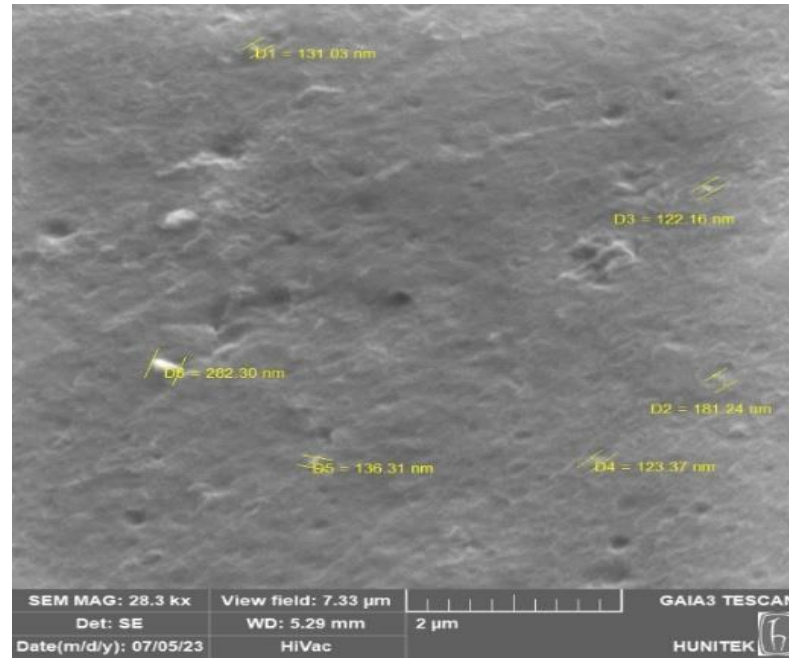


Şekil 4. 10.Boş CS jel formülasyonuna ait SEM görüntüleri (a) x500 ve b) x1000 büyütmede).

a)



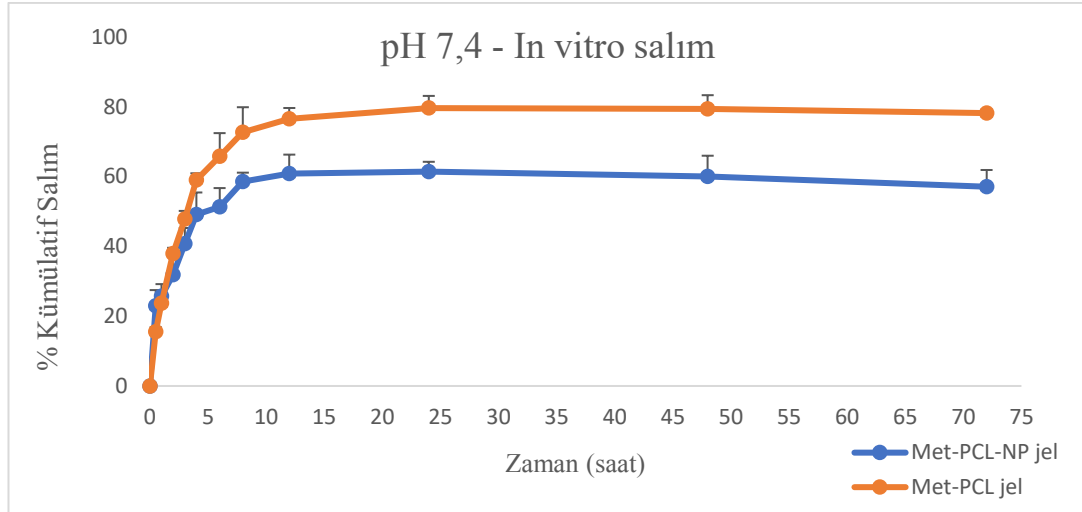
b)



Şekil 4. 11. Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonuna ait SEM görüntüleri (a) x500 ve b) x28 000 büyütmede)

İn Vitro Salım Çalışmaları

Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel ve serbest metformin HCl içeren CS jel formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları Franz Diffüzyon hücreleri kullanılarak pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisinde gerçekleştirilmiştir (n=3). İlk 6 saatin sonunda Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonundan ilacın %51,3'ü, serbest metformin HCl içeren CS jel formülasyonundan ise ilacın % 59,1'i salınmıştır. İlaç salımı 24 saatten sonra sabit kalmıştır. 72 saat sonunda Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonundan salım % 57,1 ve serbest metformin HCl içeren CS jel formülasyonundan salım % 78,2 olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 12. Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel ve serbest metformin HCl içeren CS jel formülasyonundan in vitro Met salım profili (n=3, ± SS).

4.5. Sitotoksosite Çalışmaları

L929 Hücrelerinde Boş PCL Nanopartikülleri, Boş PCL Nanopartikül içeren CS Jel ve Boş CS Jel Formülasyonlarının Sitotoksosite Değerlendirmesi

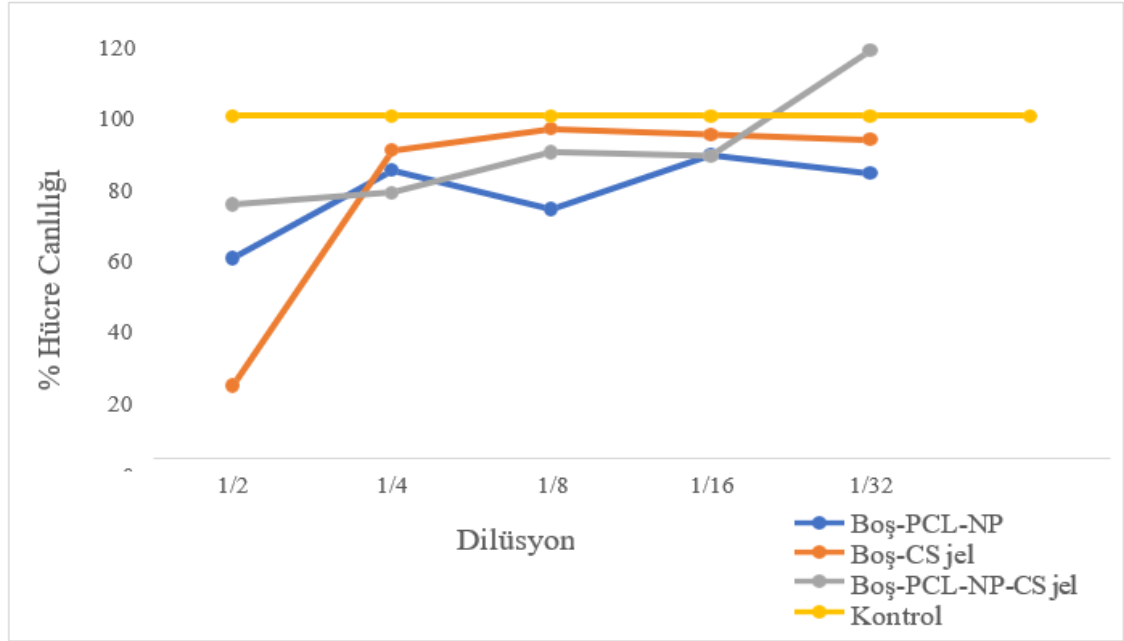
Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin güvenliliğinin değerlendirilmesi amacıyla; boş PCL nanopartikül formülasyonu, boş CS jel ve boş PCL NP içeren CS jel formülasyonlarının sitotoksitesi L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde MTT analizi ile gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak DMEM kullanılmıştır. Şekil 4.13'de 24 saat ve 48 saatte boş PCL nanopartikül, boş PCL nanopartikül içeren CS jel ve boş CS jel uygulanan L929 hücrelerinin yaşayabilirliği gösterilmiştir.

24 saatin sonunda; boş PCL nanopartikül formülasyonu için dilüsyon aralığı 1/2'den 1/32'ye düştüğünde hücre canlılığı %20'den %83'e yükselmiştir. Boş CS jel için dilüsyon aralığı 1/2'den 1/32'ye düştüğünde hücre canlılığı %20'den %93'e çıkmıştır. Boş PCL nanopartikül yüklü CS jel formülasyonu için de her dilüsyon için hücre canlılığı %90'ın üzerindedir. Bütün formülasyonlar için yüksek dilüsyonlarda hücre canlılığı %90'ın üzerinde olup boş PCL nanopartikül, boş PCL nanopartikül içeren CS jel ve boş CS jelin düşük sitotoksosite gösterdiği görülmüştür.

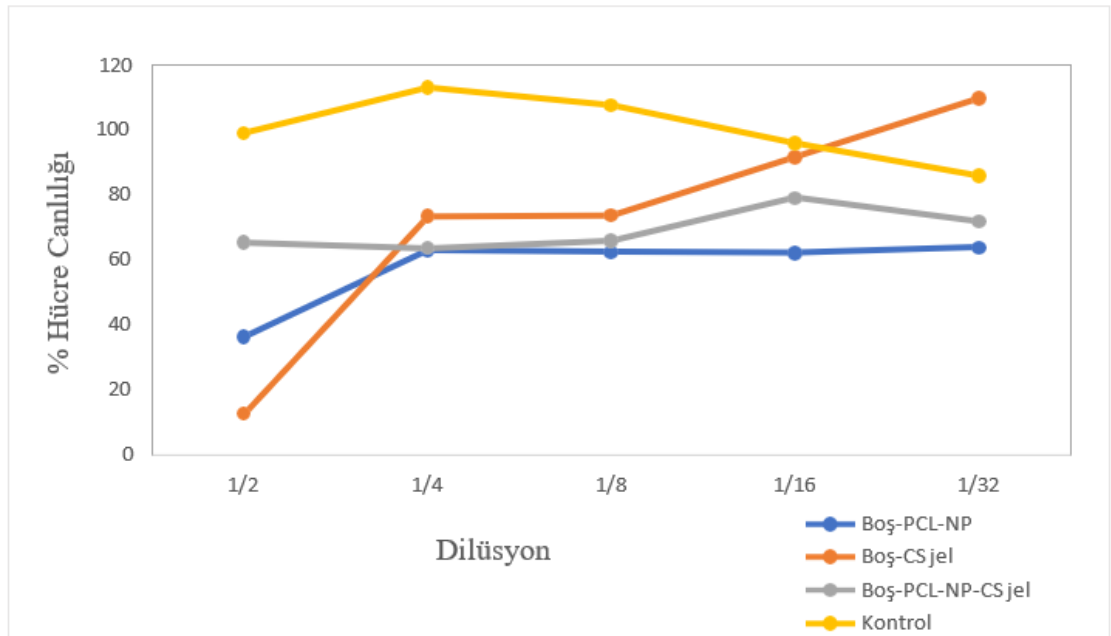
Ayrıca L929 hücrelerinde 24 saat ve 48 saat sonunda sağkalım oranı açısından anlamlı bir fark görülmemiş olup inkübasyon zamanının artması hücre yaşayabilirliği üzerinde etkili bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında hazırlanan boş

nanopartikül ve jel formülasyonlarının L929 hücrelerinde toksik olmadığı ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak güvenilir oldukları sonucuna varılmıştır.

a)



b)



Şekil 4. 13. a) 24 saat b) 48 saat inkübasyon sonucu L929 hücrelerinde Boş-PCL-NP, Boş- PCL-NP-CS jel, Boş-CS jel ve kontrol grubu için MTT analiz sonuçları (n=3, ±SD).

B16F10 hücrelerinde Metformin HCl Yüklü PCL Nanopartikülleri ve Metformin HCl Yüklü PCL Nanopartikülleri içeren CS Jel Formülasyonlarının Antikanser Etkinliği

Metformin HCl yüklü PCL nanopartikülleri ve Metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonlarının in vitro sitotoksitesi B16F10 fare melanoma hücre hattında değerlendirilmiştir. Hücreler metformin HCl çözeltisi, boş PCL nanopartikül, metformin HCl yüklü PCL nanopartikül ve metformin HCl yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonları ile 48 saat inkübe edilmiş ve MTT yöntemi ile analiz edilmiştir.

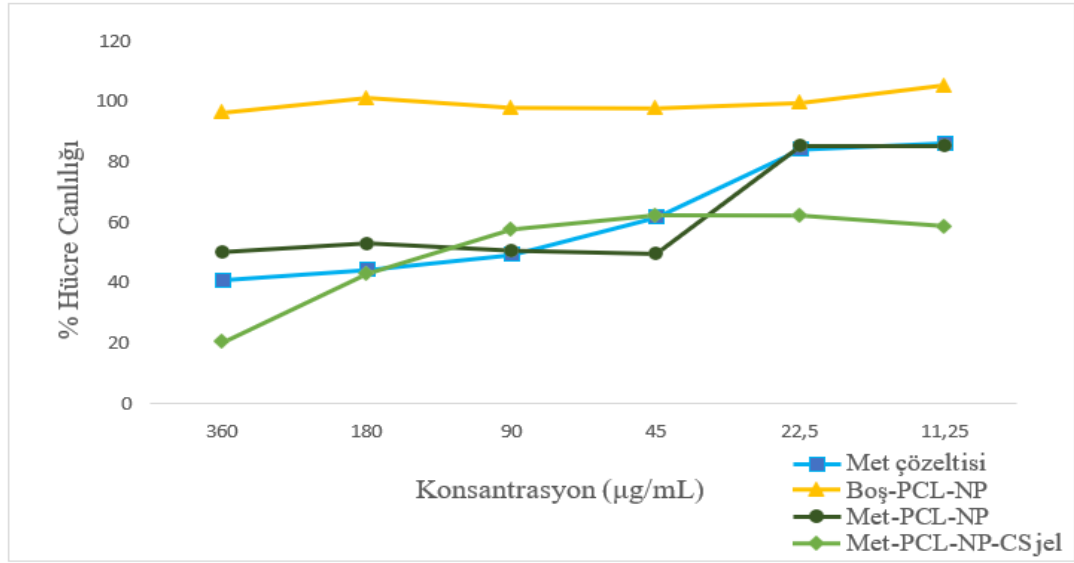
Şekil 4.14'de görüldüğü üzere boş PCL nanopartikül uygulanan B16F10 hücrelerinde 48 saatte tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı %100'e yakın olup sitotoksite göstermemiştir. 48 saat analiz sonunda, hem Metformin yüklü PCL nanopartikülleri hem de Metformin yüklü PCL nanopartikülleri içeren CS jel formülasyonu hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe (yaklaşık %50) yol açmıştır.

Metformin yüklü nanopartikül jel için 11,25 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı %58,5 iken, aynı konsantrasyonda metformin çözeltisi ile %85,3 hücre canlılığı görülmüştür.

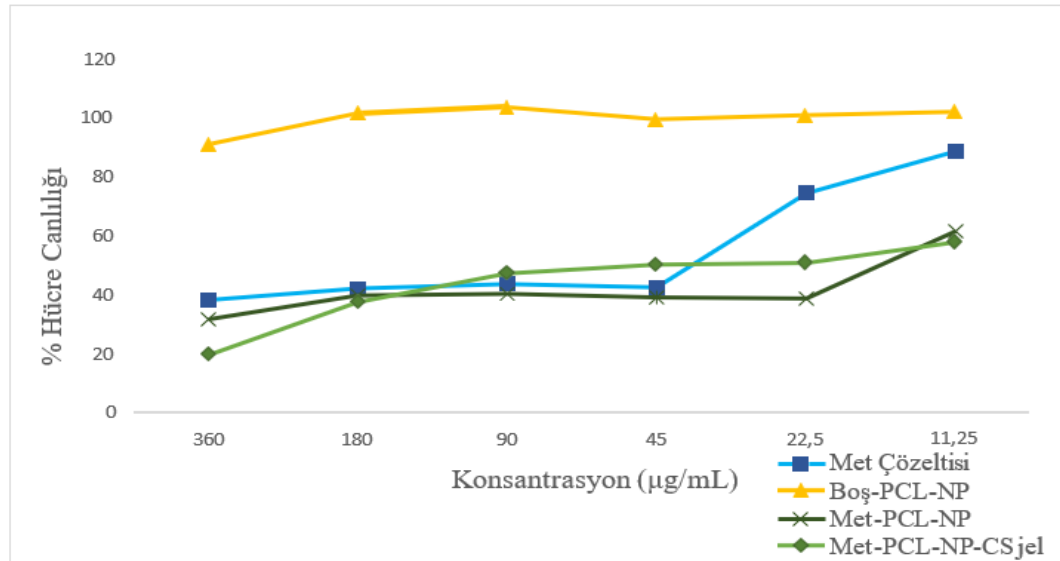
Şekil 4.13'te görüldüğü üzere boş PCL nanopartikül uygulanan B16F10 hücrelerinde 72 saatte tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı %95'in üzerinde olup sitotoksite göstermemiştir. 72 saat analiz sonunda, hem Metformin yüklü PCL nanopartikülleri hem de Metformin yüklü PCL nanopartikülleri içeren CS jel formülasyonu hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe (sırasıyla yaklaşık %38 ve % 50) yol açmıştır.

Metforminin sitotoksitesinin incelenmesi için B16F10 hücreleri üzerinde LD50 değeri hesaplanmıştır. 48 saatin sonunda metformin HCl içeren ilaç çözeltisinin LD50 değeri 32,70 µg/mL, Met-PCL-NP formülasyonunun LD50 değeri 25,77 µg/mL olarak hesaplanmıştır. 72 saatin sonunda yapılan hesaplamalarda, metformin HCl içeren ilaç çözeltisinin LD50 değeri 23,49 µg/mL, Met-PCL-NP formülasyonunun LD50 değeri 8,95 µg/mL olarak bulunmuştur.

a)



b)

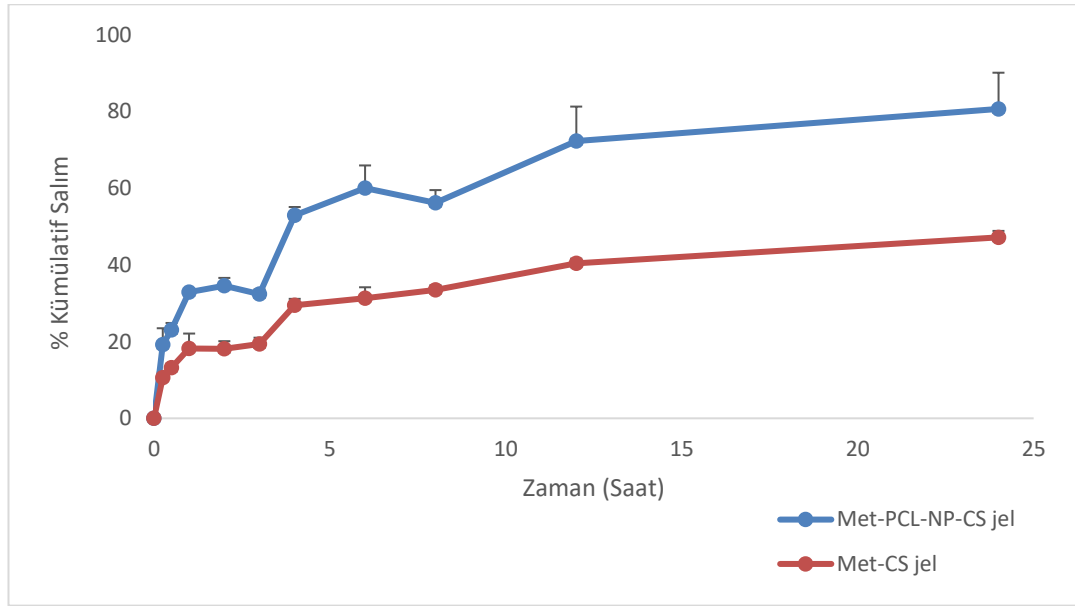


Şekil 4. 14. a) 48 saat b) 72 saat inkübasyon sonucu B16F10 hücrelerinde Metformin çözeltisi, Met-PCL NP ve Met-PCL-NP-CS jel formülasyonlarının in vitro sitotoksitesisi (n=3, ±SD).

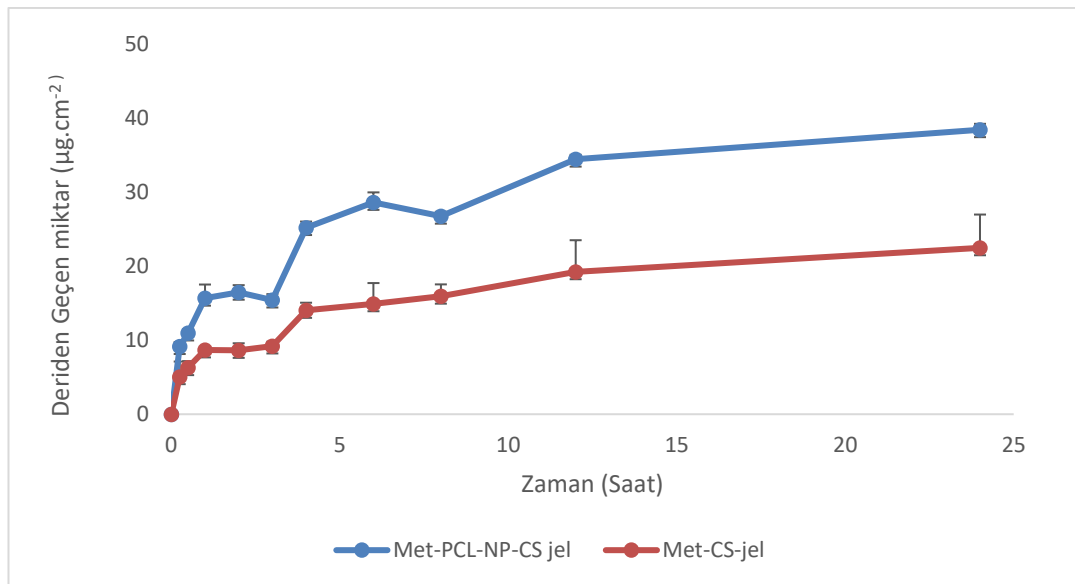
4.6. Ex Vivo Çalışmalar

Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jel formülasyonlarının deriden geçiş çalışmaları domuz sırt derisi kullanılarak Bölüm 3.2.9'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

24 saat süreyle salım ortamına Met-PCL-NP-CS jelden salım % 80 iken Met-CS jelden salım yaklaşık % 47 olmuştur (Şekil 4.15.). Deriden 1 cm²'den 24 saat sonunda geçen madde miktarı Met-PCL-NP-CS jel için 38 µg iken, Met-CS jel için yaklaşık 22 µg olmuştur (Şekil 4.16.).



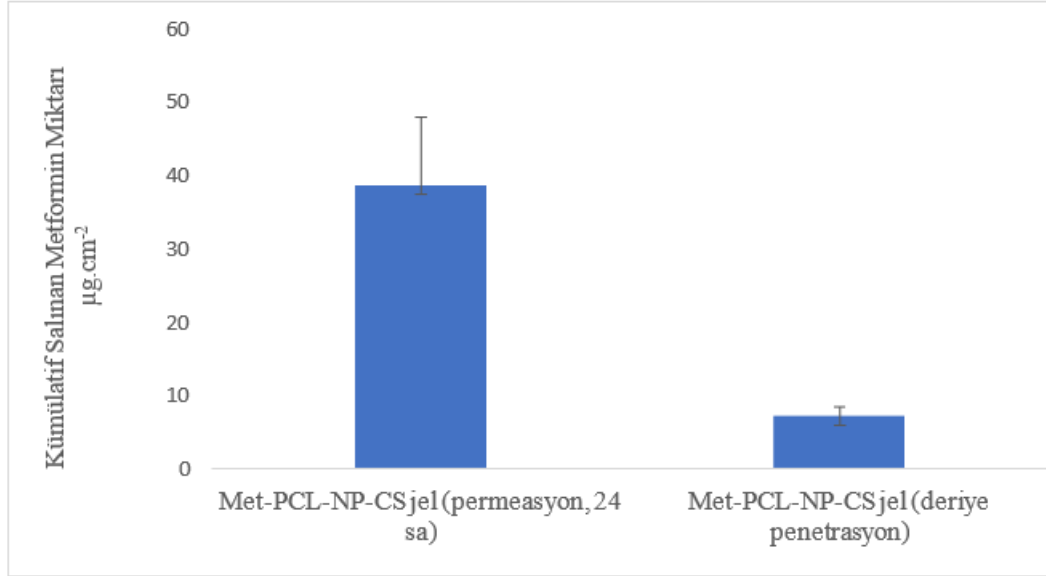
Şekil 4. 15. Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jel için zamana karşı % kümülatif salım (n=3, ± SS).



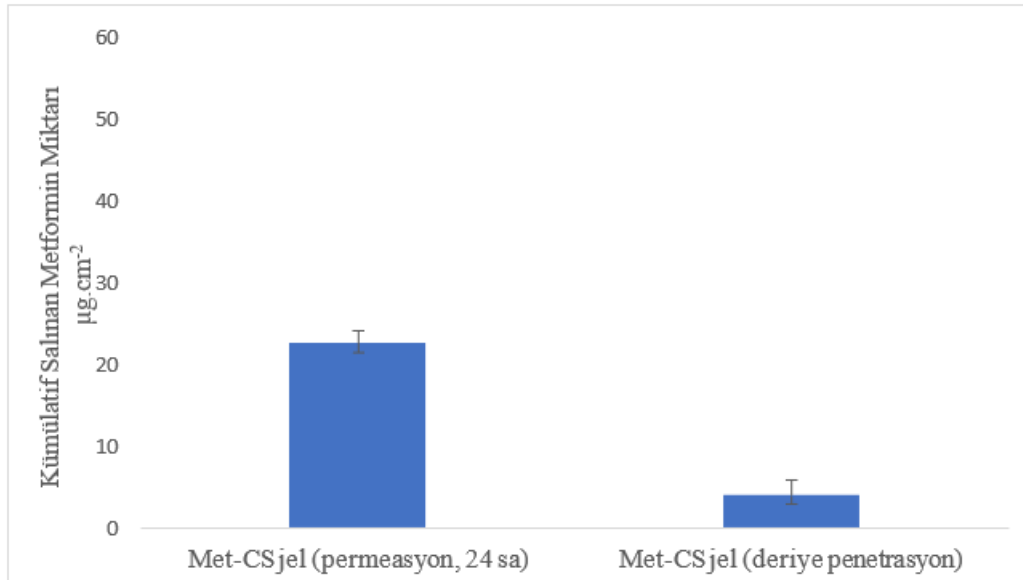
Şekil 4. 16. Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jel için zamana karşı deriden geçen etkin madde miktarı (n=3, ± SS).

24 saatin sonunda deride tutulan metformin miktarı Met-PCL-NP-CS jel için 7 , Met-CS jel için 3,9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17.)

a)



b)



Şekil 4. 17. a) Met-PCL-NP-CS jel b) Met-CS jel için 24 saat sonunda deriye penetrasyon ve permeasyon sonuçları (n=3, \pm SS).

Tablo 4.15'te Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jelden metformin salımına ait permeabilite katsayısı, akı ve kümülatif salınan met miktarı görülmektedir. Met-PCL-NP-CS jel salımında permeabilite katsayısı ve akı değerleri Met-CS jele kıyasla daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 4. 15. Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jelden Metformin salımına ait permeasyon parametreleri (n=3, \pm SS).

	Permeabilite Katsayısı (cm.sa ⁻¹)	Akı (μ g.sa ⁻¹ .cm ⁻²)	24 saatin sonunda geçen Met miktarı (μ g.cm ⁻²)
Met-PCL-NP-CS jel	0,010 \pm 0,003	1,22 \pm 0,39	38,41 \pm 7,95
Met-CS jel	0,008 \pm 0,002	0,95 \pm 0,31	22,47 \pm 3,93

5. TARTIŞMA

5.1. Metformin HCl'nin HPLC ile İn Vitro Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Metformin HCl'nin in vitro miktar tayini Bölüm 3.2.1'de belirtilen koşullar altında HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Metformin HCl piki 235 nm'de yapılan seçici deteksiyon sonucu 1,75. dakikada saf olarak elde edilmiştir. Metformin HCl'ye ait kromatogram Şekil 4.1'de verilmiştir.

Kalibrasyon doğrusunu oluşturmak için 1,5-100 µg/mL aralığında çalışılmıştır. Kullanılan yöntem Bölüm 3.2.1'de açıklanmıştır. Yapılan regresyon analizi sonucunda Şekil 4.2'de görüldüğü üzere HPLC ile elde edilen pik alanları ve konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişki saptanmıştır. Kalibrasyon doğrusunun r^2 değeri 1 bulunmuştur. Kullanılacak analitik yöntemin salım çalışmaları ve ex vivo çalışmalarda görülebilecek düşük miktarlardaki etkin maddeyi de tayin edebilmesi önemlidir. Nanopartikül içindeki etkin madde miktarı ile yapılan hesaplar, bulunan aralığın ilerleyen çalışmalarda miktar tayini için uygun olduğunu göstermiştir.

Kullanılan analitik yöntem için gerçekleştirilen doğruluk çalışmaları Bölüm 3.2.2.'de açıklanmıştır. Doğruluk çalışması için seçilen 3 konsantrasyon (3, 12,5, 100 µg/mL) için de HPLC analizleri gerçekleştirilmiş ve % geri kazanımlar hesaplanmıştır. % geri kazanım sonuçlarına göre ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır. Üç konsantrasyon için de varyasyon katsayısı %2'nin altında bulunmuştur. Sonuçlar kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermektedir (74).

Kullanılan analitik yöntemin kesinliğinin belirlenebilmesi için tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası farklılık değerleri hesaplanmıştır (Bölüm 3.2.2). Çalışmalar 12,5 µg/mL konsantrasyonda gerçekleştirilmiş ve ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Çalışmaların sonucunda Tablo 4.3.-4.4.-4.5'te görüldüğü üzere varyasyon katsayısı değerleri %2'nin altında bulunmuş ve yöntemin kesinliği gösterilmiştir.

Çalışma kapsamında yapılan duyarlılık çalışması Bölüm 3.2.2.'de açıklanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucu tanıma sınırı 0,072 µg/mL ve alt tayin sınırı 0,21 µg/mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlar yöntemin duyarlılığının tez çalışması için

uygun olduğunu göstermiştir.

Özgünlük çalışmaları kapsamında etkin madde ve çalışmada kullanılan yardımcı maddelerin kromatogramları elde edilmiş ve metformin HCL için çalışmanın uygun olduğu görülmüştür.

Metformin HCL'nin stabilite çalışması Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş, 12,5 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltinin 24 saat sonunda %96,7'si ortamda tayin edilmiştir. Ek olarak herhangi bir bozunma ürününe ait pik oluşmamıştır.

5.2. Metformin HCL Yüklü PCL Nanopartikülleri İçin Yapılan Formülasyon Çalışmaları

Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin hazırlanmasında çift emülsiyon tekniği kullanılmıştır. Çift emülsiyon tekniği hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçların enkapsülasyonunun sağlanmasında kullanılan etkili bir yöntemdir (44). Metformin HCL hidrofilik bir etkin maddedir. Literatürde çift emülsiyon tekniği çok sayıda hidrofilik ilacın enkapsülasyonunda kullanılmış ve bu yöntemle düşük partikül boyutu, uygun partikül boyutu dağılımı ve yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir (65, 75, 76). Bu nedenle çift emülsiyon yöntemi elde edilen veriler ışığında tez çalışması için uygun bulunmuştur.

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında polimer olarak polikaprolakton kullanılmıştır. Polikaprolakton biyobozunur olması, biyoyumluluğu ve kontrollü ilaç salımına imkan vermesi nedeniyle pek çok ilaç taşıyıcı sistemde polimer olarak tercih edilmektedir. Polikaprolakton topikal uygulamaya da uygun bir polimer olup, literatürde topikal uygulama için PCL ile hazırlanmış pek çok ilaç taşıyıcı sistem mevcuttur (77-79). Polikaprolakton nanopartiküllerin deriye uygulanmasına yönelik yapılan bir çalışmada partikül boyutuna bağlı olarak PCL nanopartiküllerin 2 saat içerisinde epidermise penetre olduğu, takip eden 24 saat sonunda da dermise penetre olduğu gösterilmiştir (80). PCL birçok ilaçla uyumlu olması ve yavaş degradasyonuna bağlı kontrollü salım sağlaması nedeniyle çift emülsiyon yönteminin uygulandığı pek çok çalışmada polimer olarak tercih edilmiştir (65).

Çalışmamızda nanopartikül hazırlanırken partikül büyüklüğünü küçültmek ve daha homojen bir partikül büyüklüğü dağılımı elde edebilmek için homojenizatör

kullanılmıştır (81).

PVA nanopartikül formülasyonlarında sürfaktan ve stabilizör olarak kullanılmaktadır. PVA konsantrasyonunun dış sulu fazın viskozitesini arttırarak ilacın sıvı faza kaçmasını önlediği ve daha düşük partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği sağladığı literatürde mevcuttur (65). Benzer şekilde Pluronic F68 de nanopartikül oluşumu ve ilaçların enkapsülasyonunda etkili bir sürfaktandır.

Metformin HCl suda çözünürlüğü yüksek bir etkin madde olduğundan etkin madde sulu faza kaçma eğilimi göstermektedir (82). %0,1 (a/h) PVA ve %0,5 konsantrasyonda PCL kullanılarak hazırlanan metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği düşük bulunmuştur (%9). Polimer konsantrasyonu %1'e yükseltildiğinde enkapsülasyon etkinliği %14'e yükselmiştir.

Literatürde PF68'in sulu dış fazdaki konsantrasyonundaki artışın partikül boyutu ve polidispersite indeksini küçülttüğünü ve enkapsülasyon etkinliğinin arttığını ve PVA'ya kıyasla daha iyi bir stabilizör olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (83, 84). Bu nedenle PVA varlığının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla formülasyonlar hazırlanmış ve PVA içermeyen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği %27,5 bulunmuştur. Optimum nanopartikül formülasyonu olarak %27,5 enkapsülasyon etkinliğine sahip PVA içermeyen %1 PCL nanopartikülleri seçilmiştir.

Nanopartikül hazırlanmasında organik çözücü olarak diklorometan (DCM) kullanılmıştır. Uçuculuğunun yüksek olması ve ortamdan kolayca uzaklaştırılması nedeniyle diklorometan tercih edilmiştir. Çalışmamızda rotavapor kullanılarak diklorometanın uçurulması sağlanmıştır.

Metformin ısıya duyarlı bir etkin maddedir. Bu nedenle etkin maddenin karıştırma işlemi sırasında oluşan yüksek ısıdan etkilenmemesi için çalışmalar buz banyosu altında gerçekleştirilmiştir. Buz banyosunun nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyelini etkilemediği gösterilmiştir (85).

5.3. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu

5.3.1. Morfolojik Özellikler

Boş PCL nanopartikülleri ve Met HCl yüklü PCL nanopartikül formülasyonlarının yüzey özellikleri SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Nanopartiküllerin küresel yapıda ve pürüzsüz olduğu, ayrıca SEM görüntülerinde ölçülen partikül büyüklüklerinin, karakterizasyon çalışmaları kapsamında yapılan partikül büyüklüğü ölçümleriyle uyumlu olduğu (Şekil 4.4 ve Tablo 4.8.) görülmüştür. Etkin madde yüklenmesi nanopartiküllerin yapısında değişikliğe yol açmamıştır.

5.3.2. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı

İlaçların topikal uygulanmasında deriden emilimin gerçekleşmesi için partikül büyüklüğü önemli parametrelerden biridir. Literatürde partikül büyüklüğü küçüldükçe ilaçların deriden emiliminin arttığını gösteren yayınlar mevcuttur (86-88). Yapılan çeşitli çalışmalar, 300 nm altında partikül büyüklüğünün deriden emilim için uygun olduğunu bildirmiştir (89-92). Tez kapsamında hazırlanan boş PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 157 ± 5 nm, metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ise 180 ± 10 nm bulunmuştur. Belirtilen değerler topikal uygulama için uygundur.

Çalışmamız kapsamında formülasyonda farklı konsantrasyonda polimer ve sürfaktan varlığı ile nanopartiküller hazırlanmıştır. Polimer konsantrasyonunun partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeline olan etkisini görmek için %0,5, %0,75 ve %1 polimer içeren nanopartiküller hazırlanmıştır. Çalışmamızda %0,75 polimer oranında partikül büyüklüğü ve PDI'de artış görülmüş, polimer oranı %1'e yükseldiğinde partikül büyüklüğü ve PDI değerleri küçülmüştür. Bu durumun nedeni polimer miktarı arttığında nanopartiküllerin daha fazla ilaç molekülünü enkapsüle ederek, ilacın nanopartikül yüzeyine adsorbsiyonunun ve bu sebeple de partikül boyutunun artışı engellemenisi olarak gösterilebilir (93).

Çift emülsiyon yönteminde dış fazın yoğunluğu etkin maddenin dış faza kaçmasını önleyerek enkapsülasyon etkinliğini artırıp, partikül boyutu ve polidispersite indeksine de etki eden bir parametredir. Bu amaçla çalışmada çift

emülsiyon yönteminde sıklıkla tercih edilen sürfaktanlar olan PVA ve Pluronic 68 içeriklerinin partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi incelenmiştir. Sürfaktan ve stabilizör olarak dış sulu fazda %0,1 PVA ve %1 PF68 içeren %1 PCL içeren metformin yüklü PCL nanopartiküllerde partikül boyutu ve polidispersite indeksi sırasıyla $255,1 \pm 13,15$ nm ve $0,240 \pm 0,02$ iken, dış sulu fazda PVA içermeyip %1 PF68 içeren PCL nanopartiküllerde partikül boyutu $179,6 \pm 10,15$, polidispersite indeksi ise $0,17 \pm 0,07$ olmuştur. Sonuçlar literatürdeki çalışmalarla uyumludur (83).

Daha küçük partikül boyutu ve PDI ve daha yüksek enkapsülasyon etkinliği (%27) nedeniyle optimum formülasyon olarak PVA içermeyen % 1 PCL nanopartiküllerle çalışmalara devam edilmiştir. Partikül boyutu homojen dağılım ($0,17 \pm 0,07$) göstermektedir ve partikül boyutu ($179,6 \pm 10,15$) deriden emilim için uygundur.

5.3.3. Zeta Potansiyel

Zeta potansiyeli koloidal formülasyonlarının stabilitesini gösteren parametrelerden biridir. Tez çalışmasında hazırlanan optimum nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri -10 ile -20 mV arasında değişmektedir (Tablo 4.7. - Tablo 4.8.). Literatürde -30 ile +30 mV arasındaki zeta potansiyeli değerlerinin genel olarak iyi stabilite göstergesi olduğu belirtilmiştir (94).

Deriden emilimi etkileyen faktörler arasında zeta potansiyelin etkisini inceleyen çalışmalar literatürde mevcuttur. Katyonik nano taşıyıcıların derinin alt katmanlarına ulaşabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (95-98). Buna karşın negatif zeta potansiyeye sahip formülasyonların deriye permeabilitesinin pozitif zeta potansiyeye sahip formülasyonlara göre daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar da yapılmıştır (99, 100). Melatonin içeren negatif ve pozitif yüklü lipozomlar üzerine yapılan bir çalışmada, *in vitro* and *in vivo* penetrasyon çalışmaları sonucunda negatif yüklü lipozomlardan ilaç salımının, pozitif yüklülere kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu sonucu, negatif yüklü lipozomların, pozitif yüklülere göre negatif yüklü hücrelerarası lipitlerle (karboksilik ve fosfat gruplarına bağlı olarak) daha az etkileşime girmeleri ve böylece dermise ve kıl foliküllerinin alt kısmına daha hızlı difüze olabilmeleri ile açıklamışlardır(99). Honeywell-Nguyan ve Bouwstra, bir

formülasyondan ilaç molekülünün salım hızı ve oranının, ilacın veziküle afinitesi ve stratum korneum lipitlerindeki çözünürlüğü ile ilişkilendirmiştir (101). Ferulik asit ile yapılan bir çalışmada nötral pH da ferulik asitin negatif yüklenmesine bağlı olarak pozitif yüklü bir taşıyıcı ile dermal uygulamanın, deri permeasyonu açısından üstünlük sağladığı görülmüştür (102). Bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda metformin etkin maddesinin (pKa= 12.4) pH 7.4'de pozitif yüklü olması ve hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının negatif yüzey yüküne sahip olması ilacın afinitesini artırarak, derinin alt tabakalarına daha yüksek miktarda metformin ulaşmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca negatif yüklü nanopartiküller sistem sayesinde negatif yüklü interselüler lipitler ile daha az etkileşime girerek, derinin ve kıl foliküllerinin alt tabakasına daha hızlı difüze olması böyle daha yüksek oranda ve hızda kana karışmasına katkı sağlayacağı da düşünülebilir.

Tez çalışmamız kapsamında hazırlanan Met-PCL-NP zeta potansiyeli $-11,4 \pm 2,26$ bulunmuştur. Sonuçlar literatürle uyumludur (103-105).

5.3.4. İn Vitro Salım

Met-PCL-NP dispersiyonundan pH 7,4'te yapılan salım çalışmasında, nanopartikül dispersiyonunun ilk 2 saat içerisinde ilk patlama etkisi nedeniyle hızlı salım gösterdiği gözlenmiştir. Metformin HCl hidrofilik yapıya sahip bir etkin madde olduğundan sulu faza yüksek afinite göstermektedir. Nanopartikül dispersiyonundaki serbest metformin hızlı bir salım özelliği göstererek ilk patlama etkisine yol açabilir. Buna ek olarak nanopartiküllerin partikül boyutunun küçük olması da yüzey alanını arttırmakta ve yüzeye adsorbe olan etkin maddenin hızlı salınmasını sağlamaktadır.

Nanopartikül dispersiyonundan kümülatif salınan ilaç miktarı yaklaşık %64'tür. Sonucun PCL'nin yavaş salım özelliği gösteren bir polimer olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sonuç literatürdeki çalışmalarla uyumludur (103-106).

Küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin derinin alt katmanlarında ve kıl köklerinde biriktiği yönünde çalışmalar mevcuttur (107). Saç foliküllerinin 10 güne kadar depolama etkisinin olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (108, 109). Nanopartiküller derinin rezervuar özelliği sayesinde uygulama bölgesinde

depolanarak, PCL'nin yavaş salım özelliği ile etkin maddenin kontrollü salımını sağlamaktadır.

5.3.5. Nanopartiküllerin Stabilitesi

Boş ve Metformin HCl yüklü PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri Malvern Zetasizer Nano ZS kullanılarak 0, 1, 7, 14, 30 ve 90. günde 25°C sıcaklıkta ölçüm yapılarak tayin edilmiştir. Hem Boş-PCL-NP hem de Met-PCL-NP formülasyonlarının 30 gün boyunca partikül boyutu ve PDI değerlerinin korunduğu görülmüştür (Şekil 4.6.-Şekil 4.7.). 90. gün yapılan ölçümde boş PCL-NP formülasyonlarının partikül boyutu ve PDI değerleri daha düşük bulunmuştur. Met-PCL-NP formülasyonlarının 90 gün boyunca partikül boyutu ve PDI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Hem boş-PCL-NP hem de Met-PCL-NP formülasyonlarının zeta potansiyeli ölçümlerinde 30 gün boyunca anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. 90. gün yapılan ölçümlerde her iki formülasyon için de zeta potansiyel değerleri pozitif yönde anlamlı bir düşüş göstermiştir. Bu durum nanopartiküllerin stabilitesinde düşüş olabileceğini göstermektedir. Boş-PCL-NP formülasyonlarında bu durum partikül boyutu ve PDI ölçümleriyle de uyumludur. Met-PCL-NP formülasyonlarında partikül boyutu ve PDI anlamlı düşüş göstermemiştir. Met-PCL-NP formülasyonunun Boş-PCL-NP'ye kıyasla fiziksel stabilitesinin daha iyi olduğu söylenebilir.

5.4. Metformin HCl Yüklü PCL Nanopartikül içeren CS Jel Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Hazırlanan Met-PCL-NP formülasyonunun deriye uygulanabilmesi için uygun bir taşıyıcı jel formülasyonu hazırlanarak formülasyonların viskozite ve pH ölçümleri yapılmıştır. Boş CS jel hazırlanmasında, iki farklı kitosan (Protasan UP CL213 ve düşük molekül ağırlıklı kitosan) kullanılmıştır.

Kullanılan kitosan tipi ve asetik asit miktarının jelleşmede ve jelin viskozitesinde etkili olduğu görülmüştür. Asetik asit eklenmeyen formülasyonlarda jel oluşumu meydana gelmemiştir.

Viskozite, jel formülasyonlarından ilacın salım özelliğine etki eden parametrelerden biridir. Yüksek viskoziteye sahip jellerde deride kalış süresinin artmasına karşın etkin madde salımı yavaş olmaktadır (110). Asetik asit miktarı arttıkça jelin viskozitesi de artmıştır. Protasan UP CL213 ile hazırlanan formülasyonlarda asetik asit ilavesiyle viskozitede istenen oranda artış sağlanamadığından, çalışmalara düşük molekül ağırlıklı kitosan ile devam edilmiştir.

İnsan deri pH'sı hafif asidik özellik göstermektedir. Deriye uygulanacak preparatların pH değerlerinin deri pH'sı ile uyumlu olması gerekmektedir (43). Formülasyonlara pH ayarlamak amacı ile farklı konsantrasyonlarda NaOH (0.5 M, 1 M ve 2M) ilave edilmiş ancak NaOH ilavesinin jel yapısını etkilediği görülmüştür. Bu nedenle uygun viskoziteye sahip formülasyonlarda kullanılan asetik asit miktarı değiştirilerek deriye uygulanabilir pH aralığında (pH 4,5-6) jel oluşumu sağlanmıştır (51). Hazırlanan optimum jel formülasyonunun 25 °C, 30 °C, 35 °C'de viskozite ölçümleri yapılmıştır. Boş CS jel ve Met-NP-CS jel formülasyonların viskoziteleri sıcaklık arttıkça azalmıştır. Farklı kayma hızlarına (0-150 rpm) karşı Met yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonu için akış grafiği elde edilmiş ve boş CS jel ve Met-PCL-NP CS jel formülasyonların psödoplastik akış tipi gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.9.). Psödoplastik akış ile herhangi bir kuvvet uygulanmadığında jelin yapısını koruması, buna karşın kuvvet uygulandığında (uygulama sırasında ya da uygulama bölgesinde yayılırken) viskozitesinin azalması, bu sayede de uygulama kolaylığı sağlayacağı beklenmektedir (111). Buna ek olarak, uygulama sırasında jel viskozitesindeki azalmanın ilacın jelden salımını da arttırabileceği literatürde yer almaktadır (112).

Jel formülasyonlarının yayılabilirliği cam plaka ile ölçülmüştür. Boş CS jel ve Met-PCL-NP-CS-Jel formülasyonlarının yaklaşık %400 oranında yayılım gösterdiği ve deriye uygulanabilir özellikte olduğu görülmüştür.

Boş CS jel ve Met-PCL-NP-CS jel formülasyonlarının SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir (Şekil 4.10.). Met-PCL-NP lerin jel yüzeyinde küresel özelliğini koruduğu ve SEM görüntülerinde ölçülen partikül büyüklüklerinin, karakterizasyon çalışmaları kapsamında yapılan partikül büyüklüğü ölçümleriyle uyumlu olduğu (Tablo 4.7.) görülmüştür.

Kitosan, biyolojik dokularla uyumluluğu, biyoparcalanabilir olması, antimikrobiyal özellikleri, stabilitesi ve kolay modifiye edilebilmesi gibi özellikleri nedeniyle taşıyıcı polimer olarak tercih edilmiştir (113). Bunun yanı sıra katyonik özelliğiye derideki anyonik yapılarla elektrostatik etkileşiminin ilacın biyoadhezyonunu arttırdığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Biyoadhezyonun artmasıyla, ilacın deriyle olan etkileşimi artarak deriye daha iyi tutunması sağlanmaktadır (113, 114).

5.4.1. Metformin HCL Yüklü PCL Nanopartikül içeren Kitosan Jel ve Serbest Metformin HCL İçeren Kitosan Jelden İn Vitro Salım Çalışmaları

Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel ve serbest metformin HCl içeren CS jel formülasyonlarının in vitro salım analizi Franz Difüzyon hücreleri kullanılarak pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisinde gerçekleştirilmiştir (n=3). İlk 6 saatin sonunda Metformin HCl yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonundan ilacın %51,3'ü, serbest metformin içeren CS jel formülasyonundan ise ilacın % 59,1'i salınmıştır. İlaç salımı 24 saatten sonra sabit kalmıştır. 72 saat sonunda Metformin yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonundan salım % 57,1 ve serbest metformin içeren jel formülasyonundan salım % 78,2 olarak bulunmuştur. Metformin HCL'nin suda çözünürlüğü yüksek olduğundan, serbest metformin içeren kitosan jel formülasyonundan kümülatif salım, Metformin yüklü PCL NP içeren CS jel formülasyonuna nazaran daha fazla gerçekleşmiştir. PCL'nin etkin maddenin uzun sürede kontrollü salımına olanak veren bir polimer olması da, Met-PCL- NP-CS jel salımının Met-CS jele kıyasla daha yavaş olmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Met-PCL-NP-CS jel'den 24 saatte gerçekleşen salım % 57 iken Met-PCL-NP'lerden salım 24 saatin sonunda % 64 salım gerçekleşmiştir. Nanopartikül dispersiyonunun kitosan jel ile taşınması ile ilacın daha yavaş ve kontrollü salımı sağlanmıştır.

5.5. Sitotoksisite Çalışmaları

5.5.1. L929 Hücrelerinde Boş PCL Nanopartikülleri, Boş PCL Nanopartikül İçeren Kitosan Jel ve Boş Kitosan Jel Formülasyonlarının Sitotoksisite Değerlendirmesi

Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin güvenliliğinin değerlendirilmesi amacıyla; bölüm 3.2.6.'da belirtilen şekilde boş PCL nanopartikül formülasyonu, boş CS jel formülasyonu ve boş PCL NP içeren CS jel formülasyonlarının sitotoksisitesi L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde MTT analizi ile 24 ve 48 saat sürelerle gerçekleştirilmiştir. L929 hücre hattı Amerikan Farmakopesi (USP 28) tarafından polimerik sistemlerin in vitro toksisite değerlendirilmesi için standart hücre hattı olarak önerilmektedir (115).

Boş PCL NP ve boş CS jel formülasyonlarının L929 hücrelerine sitotoksik etkisinin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği görülmüştür. 24 saatin sonunda; boş PCL nanopartikül formülasyonu için dilüsyon aralığı 1/2'den 1/32'ye düştüğünde hücre canlılığı %20'den %83'e yükselmiştir. Boş CS jel için dilüsyon aralığı 1/2'den 1/32'ye düştüğünde hücre canlılığı %20'den %93'e çıkmıştır (Şekil 4.13). Kitosan genel olarak biyouyumlu kabul edilen bir polimerdir. Kitosan jelin 1/2 dilüsyonu ile görülen sitotoksisitenin jel formülasyonunun hücrelere mekanik baskı uygulaması nedeniyle olabileceği literatürde belirtilmiştir (116).

Boş PCL nanopartikül yüklü CS jel formülasyonu için 24 saat sonunda tüm dilüsyonlarda hücre canlılığı %90'ın üzerindedir. Bütün formülasyonlar için yüksek dilüsyonlarda hücre canlılığı %90'ın üzerinde olup boş PCL nanopartikül, boş PCL nanopartikül içeren CS jel ve boş CS jelin düşük sitotoksisite gösterdiği görülmüştür.

Ayrıca L929 hücrelerinde 24 saat ve 48 saat sonunda sağkalım oranı açısından anlamlı bir fark görülmemiş olup inkübasyon zamanının artması hücre yaşayabilirliği üzerinde etkili bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar ışığında hazırlanan boş nanopartikül ve jel formülasyonlarının L929 hücrelerinde toksik olmadığı ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak güvenilir oldukları sonucuna varılmıştır.

5.5.2. B16F10 hücrelerinde Metformin Yüklü PCL Nanopartikülleri ve Metformin Yüklü PCL Nanopartikülleri İçeren Kitosan Jel Formülasyonlarının Antikanser Etkinliği

Metformin yüklü PCL nanopartikülleri ve Metformin yüklü PCL nanopartikül içeren CS jel formülasyonlarının in vitro sitotoksitesisi B16F10 fare melanoma hücre hattında MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Boş PCL nanopartikül uygulanan B16F10 hücrelerinde 48 saat sonunda tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı %100'e yakın olup sitotoksitesite göstermemiştir (Şekil 4.14.). 48 saat sonunda, hem Metformin yüklü PCL nanopartikülleri hem de Metformin yüklü PCL nanopartikülleri içeren CS jel formülasyonu hücre canlılığında anlamlı bir düşüğe (yaklaşık %50) yol açmıştır.

Met-PCL-NP jel için 11,25 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı %58,5 iken, aynı konsantrasyonda metformin çözeltisi ile %85,3 hücre canlılığı görülmüştür. Bu sonuç Met-PCL-NP jel formülasyonunun 48 saatte met çözeltisine kıyasla daha düşük dozda daha etkili olduğunu göstermektedir.

Boş PCL nanopartikül uygulanan B16F10 hücrelerinde 72 saatte tüm konsantrasyonlarda hücre canlılığı %95'in üzerinde olup sitotoksitesite göstermemiştir (Şekil 4.14.). 72 saatin sonunda, hem Metformin yüklü PCL nanopartikülleri hem de Met-PCL-NP-CS jel formülasyonu ile hücre canlılığındaki düşüşün (sırasıyla yaklaşık %38 ve % 50) anlamlı olduğu görülmüştür.

Metforminin sitotoksitesisinin incelenmesi için B16F10 hücreleri üzerinde 48 saat ve 72 saat için LD50 değerleri hesaplanmıştır. 48 saatin sonunda metformin içeren ilaç çözeltisinin LD50 değeri 32,70 µg/mL, Met-PCL-NP formülasyonunun LD50 değeri 25,77 µg/mL olarak hesaplanmıştır. 72 saatin sonunda yapılan hesaplamalarda, metformin içeren ilaç çözeltisinin LD50 değeri 23,49 µg/mL, Met-PCL-NP formülasyonunun LD50 değeri 8,955 µg/mL olarak bulunmuştur.

72 saatin sonunda hem Met-PCL-NP hem de Met-PCL-NP-CS jel formülasyonu 48 saate kıyasla daha sitotoksik etki göstermiştir. Bu durumun PCL'nin ilacın yavaş salımını sağlaması nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

5.6. Ex Vivo Çalışmalar

Met-PCL-NP-CS jel ve Met-CS jel formülasyonlarının deriden geçiş çalışmaları domuz sırt derisi kullanılarak Bölüm 3.2.7’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

24 saat süreyle salım ortamına Met-PCL-NP-CS jelden salım %80 iken Met-CS jelden salım yaklaşık %47 olmuştur (Şekil 4.15.) Deriden 1 cm²’den 24 saat sonunda geçen madde miktarı Met-PCL-NP-CS jel için 38 µg iken, Met-CS jel için yaklaşık 22 µg’dır (Şekil 4.16.). Met-PCL-NP-CS jel formülasyonunda permeasyonun Met-CS jele kıyasla fazla olmasının sebebinin etkin maddenin nanopartiküllere enkapsülasyonu sayesinde partikül boyutuna bağlı olabileceği düşünülmektedir (117). Etkin maddenin permeasyonunun Higuchi modeline uygun olarak, difüzyon yoluyla olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar literatürle de benzerlik göstermektedir (118). Ek olarak her iki formülasyonda da 24 saat süresince salım değerlerine bakıldığında kitosan jelin ilacın kontrollü salımını sağladığı görülmektedir. Kitosan topikal uygulanan pek çok formülasyonda tercih edilen bir polimerdir (88). Kitosanın epidermisteki sıkı kavşak proteinleriyle etkileşimi sonucu deriye penetrasyonu arttırdığı bildirilmiştir (119). Ayrıca kitosanın katyonik yapısı sayesinde hücredeki negatif yüklü dokular ve hücre yüzeyi ile etkileşimi sayesinde deriye penetrasyonu iyi olmaktadır (71). Çalışmamızda da formülasyonların kitosan jel içinde deriye uygulanmasının etkin maddenin deriden permeasyonu ve deriye penetrasyonunu arttırdığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, PCL da nanoboyutu ve hidrofobik yapısı nedeniyle deri lipitleri ile etkileşime girerek deride boşluklar oluşturup etkin maddenin deriden geçişini arttırabilir (118).

24 saatin sonunda deride tutulan metformin miktarı Met-PCL-NP-CS jel için 7 µg.cm⁻² iken, Met-CS jel için 3,9 µg.cm⁻² olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.17). Bu sonuçlar Met-PCL-NP-CS jel formülasyonunun serbest metformin içeren kitosan jele kıyasla cit katmanlarına daha iyi nüfuz ettiğini göstermiştir. Bu etki nanopartiküllerin küçük partikül boyutu sayesinde deri katmanlarına daha kolay geçiş yapması ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra ilaçların kıl köklerinde boyuta bağlı olarak birikmesi yoluyla da deride kalabildiği gösterilmiştir (120-122). Sonuçlar literatürle uyumludur (44).

6. SONUÇ

Melanomanın topikal yolla tedavisinde kullanım amacıyla metformin HCl yüklü polikaprolakton nanopartikül içeren kitosan jel hazırlanmış, metformin HCl'nin nanopartiküllere enkapsülasyonu ile tedavi etkinliği arttırılmış, metforminin deriye penetrasyonunda da artış sağlanmıştır.

- Hidrofilik bir etkin madde olan metformin HCl'nin, PCL nanopartiküllere enkapsüle edilebilmesi için çift emülsiyon yöntemi kullanılmıştır.
- Elde edilen nanopartiküllerin in vitro karakterizasyon çalışmaları kapsamında partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değerleri ölçülmüştür. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 180 nm civarında olup partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları nanopartiküllerin tekdüze olduğunu göstermiştir. Partikül boyutu deriye uygulama için 30 gün boyunca nanopartiküllerin stabilitesini koruduğu görülmüştür. Yapılan in vitro salım çalışmasında nanopartiküllerle ilk patlama etkisini takiben yavaş ve kontrollü bir salım özelliği gösterdiği görülmüştür.
- Metformin HCL yüklü PCL nanopartiküllerin deriye uygulanmasını kolaylaştırmak için taşıyıcı olarak kitosan jel hazırlanmıştır. Jel formülasyonlarının viskozite ve pH ölçümleri yapılmış, deriye uygulanabilir özellikte oldukları görülmüştür. SEM görüntüsü ile, nanopartiküllerin jel yüzeyinde küresel yapıda ve belirlenen partikül büyüklüğüne sahip oldukları görülmüştür.
- Hazırlanan nanopartikül ve jel formülasyonları ile sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Met-PCL-NP-CS jel formülasyonunun B16F10 hücrelerinde metformin jele kıyasla daha düşük dozda etkili olduğu bulunmuştur.
- Yapılan ex vivo çalışmalarla metformin HCL'nin PCL nanopartiküllere enkapsülasyonu ve taşıyıcı kitosan jel içinde uygulanmasının, etkin maddenin deriden permeasyonunu arttırdığı, ayrıca deriye daha iyi penetrasyonunu sağladığı gösterilmiştir.

Melanoma tedavisi en güç olan kanser türlerindedir. Metastaz yeteneğinin yüksek olması ve konvansiyonel tedaviye direnç gelişmesi nedeniyle mevcut tedavilerin başarı oranı düşüktür. Tez çalışmamızda terapötik madde olarak melanomada antikanser etkinliği olduğu literatür çalışmalarında gösterilmiş biguanidin türevi bir antidiyabetik olan metformin HCl seçilmiştir. Çalışmamızda

etkin maddenin lokal olarak patolojik bölgeye uygulanabilmesi ve metformin HCl'nin nanopartiküllere yüklenmesiyle topikal uygulama sonrası biyoyararlanımın artırılması amaçlanmıştır. Topikal uygulamalarda derinin en üst tabakası olan stratum korneumun aşılması oldukça zor olmakta ve tedaviyi sınırlamaktadır. Tez çalışmamızda etkin madde nanopartikül içine hapsedilerek partikül boyutu küçültülmüş ve deriye penetrasyonu artırılmıştır. Topikal uygulama sayesinde sistemik yan etkilerin de engellenmesi sağlanacağından tedavide hasta uyuncunun artması beklenmektedir. Yapılan in vitro karakterizasyon çalışmaları ve ex vivo çalışmalar sonucunda melanomanın topikal yolla tedavisinde Met yüklü PCL nanopartikül içeren kitosan jel formülasyonunun umut vaat eden sistemler olduğu sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*. 2019;20(11):1366-79.
2. Jenkins RW, Fisher DE. Treatment of Advanced Melanoma in 2020 and Beyond. *J Invest Dermatol*. 2021;141(1):23-31.
3. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*. 2018;7:35-49.
4. Silva C, Martinho N, Aniceto N, Reis C. Challenges and Progresses in Nanotechnology for Melanoma Prevention and Treatment. 2015. p. 453–70.
5. Huang YY, Vecchio D, Avci P, Yin R, Garcia-Diaz M, Hamblin MR. Melanoma resistance to photodynamic therapy: new insights. *Biol Chem*. 2013;394(2):239-50.
6. Menezes ME, Talukdar S, Wechman SL, Das SK, Emdad L, Sarkar D, et al. Prospects of Gene Therapy to Treat Melanoma. *Adv Cancer Res*. 2018;138:213-37.
7. Heenatigala Palliyage G, Singh S, Ashby CR, Tiwari AK, Chauhan H. Pharmaceutical Topical Delivery of Poorly Soluble Polyphenols: Potential Role in Prevention and Treatment of Melanoma. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2019 2019/07//; 20(6):[250 p.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/31297635>
<https://doi.org/10.1208/s12249-019-1457-1>.
8. Singh S, Zafar A, Khan S, Naseem I. Towards therapeutic advances in melanoma management: An overview. *Life Sciences*. 2017;174:50-8.
9. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 2001;70(1):1-20.
10. Ponnappan N, Chugh A. Nanoparticle-Mediated Delivery of Therapeutic Drugs. *Pharmaceutical Medicine*. 2015;29(3):155-67.
11. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016;240:77-92.
12. Madawi EA, Al Jayoush AR, Rawas-Qalaji M, Thu HE, Khan S, Sohail M, et al. Polymeric Nanoparticles as Tunable Nanocarriers for Targeted Delivery of Drugs to Skin Tissues for Treatment of Topical Skin Diseases. *Pharmaceutics*. 2023;15(2):657.
13. Guarino V, Gentile G, Sorrentino L, Ambrosio L. Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. p. 1-36.
14. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. 2007;2:117739280700200002.
15. Cheng C-L, Yu LX, Lee H-L, Yang C-Y, Lue C-S, Chou C-H. Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2004;22(4):297-304.
16. Bolzinger M-A, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2012;17(3):156-65.
17. Curti BD, Faries MB. Recent Advances in the Treatment of Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(23):2229-40.
18. Jitian Mihulecea CR, Rotaru M. Review: The Key Factors to Melanomagenesis. *Life (Basel)*. 2023;13(1).

19. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. *Medical Sciences*. 2021;9(4):63.
20. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, et al. Melanoma. *The Lancet*. 2018;392(10151):971-84.
21. Patrinely JR, Jr., Dewan AK, Johnson DB. The Role of Anti-PD-1/PD-L1 in the Treatment of Skin Cancer. *BioDrugs*. 2020;34(4):495-503.
22. Mangana J, Levesque MP, Karpova MB, Dummer R. Sorafenib in melanoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2012;21(4):557-68.
23. Wang H, Tran TT, Duong KT, Nguyen T, Le UM. Options of Therapeutics and Novel Delivery Systems of Drugs for the Treatment of Melanoma. *Molecular Pharmaceutics*. 2022;19(12):4487-505.
24. FDA Should Make Its Plans to Issue and Revise Guidance on Nonbiological Complex Drugs US Government Accountability Office [updated December,2017].
25. Lei Y, Yi Y, Liu Y, Liu X, Keller ET, Qian CN, et al. Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer*. 2017;36(1):17.
26. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis*. 2011;2(9):e199.
27. Cerezo M, Tomic T, Ballotti R, Rocchi S. Is it time to test biguanide metformin in the treatment of melanoma? *Pigment Cell & Melanoma Research*. 2015;28(1):8-20.
28. Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Skin Research and Technology*. 2018;24(2):165-74.
29. Yadav N, Parveen S, Chakravarty S, Banerjee M. Skin Anatomy and Morphology. In: Dwivedi A, Agarwal N, Ray L, Tripathi AK, editors. *Skin Aging & Cancer: Ambient UV-R Exposure*. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 1-10.
30. Williams A. *Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice: Pharmaceutical Press*; 2003.
31. Tomala A, Gocerler H, Gebeshuber I. Bridging Nano- and Microtribology in Mechanical and Biomolecular Layers. *Scanning Probe Microscopy in Nanoscience and Nanotechnology 3, NanoScience and Technology* ISBN 978-3-642-25413-0 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013, p 431. 2013:431.
32. Murdan S. *Transdermal and Topical Drug Delivery. From Theory to Clinical Practice. Pharmacy Education*. 2004;4.
33. Haque T, Rahman KM, Thurston DE, Hadgraft J, Lane ME. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. *Eur J Pharm Sci*. 2015;77:279-89.
34. N'Da DD. Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. *Molecules*. 2014;19(12):20780-807.
35. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*. 2009;37(5):223-6.
36. Haque T, Rahman KM, Thurston DE, Hadgraft J, Lane ME. Topical therapies for skin cancer and actinic keratosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;77:279-89.
37. Larrañeta E, McCrudden MTC, Courtenay AJ, Donnelly RF. Microneedles: A New Frontier in Nanomedicine Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2016;33(5):1055-73.
38. Ng KW, Lau WM. *Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration*. 2015. p. 3-11.
39. Cullen JK, Simmons JL, Parsons PG, Boyle GM. Topical treatments for skin cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2020;153:54-64.

40. Scarfi F, Patrizi A, Veronesi G, Lambertini M, Tartari F, Mussi M, et al. The role of topical imiquimod in melanoma cutaneous metastases: A critical review of the literature. *Dermatologic Therapy*. 2020;33(6):e14165.
41. Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, Curiel-Lewandrowski C, Elder DE, Gershenwald JE, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(1):208-50.
42. Saindane D, Bhattacharya S, Shah R, Prajapati BG. The recent development of topical nanoparticles for annihilating skin cancer. *All Life*. 2022;15(1):843-69.
43. Hafeez A, Kazmi I. Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. *Scientific Reports*. 2017;7(1):16517.
44. Rostamkalei SS, Akbari J, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Nokhodchi A. Topical gel of Metformin solid lipid nanoparticles: A hopeful promise as a dermal delivery system. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;175:150-7.
45. Zou L, Ding W, Zhang Y, Cheng S, Li F, Ruan R, et al. Peptide-modified vemurafenib-loaded liposomes for targeted inhibition of melanoma via the skin. *Biomaterials*. 2018;182:1-12.
46. Labala S, Mandapalli PK, Kurumaddali A, Venuganti VVK. Layer-by-Layer Polymer Coated Gold Nanoparticles for Topical Delivery of Imatinib Mesylate To Treat Melanoma. *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(3):878-88.
47. Tagne J-B, Kakumanu S, Nicolosi RJ. Nanoemulsion Preparations of the Anticancer Drug Dacarbazine Significantly Increase Its Efficacy in a Xenograft Mouse Melanoma Model. *Molecular Pharmaceutics*. 2008;5(6):1055-63.
48. Jiang T, Wang T, Li T, Ma Y, Shen S, He B, et al. Enhanced Transdermal Drug Delivery by Transfersome-Embedded Oligopeptide Hydrogel for Topical Chemotherapy of Melanoma. *ACS Nano*. 2018;12(10):9693-701.
49. Shah S, Famta P, Fernandes V, Bagasariya D, Charankumar K, Kumar Khatri D, et al. Quality by design steered development of Niclosamide loaded liposomal thermogel for Melanoma: In vitro and Ex vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2022;180:119-36.
50. Aminu N, Bello I, Umar NM, Tanko N, Aminu A, Audu MM. The influence of nanoparticulate drug delivery systems in drug therapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;60:101961.
51. Hertig JB, Shah VP, Flühmann B, Mühlebach S, Stemer G, Surugue J, et al. Tackling the challenges of nanomedicines: are we ready? *Am J Health Syst Pharm*. 2021;78(12):1047-56.
52. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Frontiers in Chemistry*. 2018;6(360).
53. Ngwuluka NC, Kotak DJ, Devarajan PV. Design and Characterization of Metformin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Colon Cancer. *AAPS PharmSciTech*. 2017;18(2):358-68.
54. Patiño-Herrera R, Louvier-Hernández JF, Escamilla-Silva EM, Chaumel J, Escobedo AGP, Pérez E. Prolonged release of metformin by SiO₂ nanoparticles pellets for type II diabetes control. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;131:1-8.
55. Wang J, Chin D, Poon C, Mancino V, Pham J, Li H, et al. Oral delivery of metformin by chitosan nanoparticles for polycystic kidney disease. *Journal of Controlled Release*. 2021;329:1198-209.
56. Ebrahimnejad P, Rezaei-roshan A, Babaei A, Khanali A, Aghajanshakeri S, Farmoudeh A, et al. Hyaluronic Acid-Coated Chitosan/Gelatin Nanoparticles as a New Strategy for Topical Delivery of Metformin in Melanoma. *BioMed Research International*. 2023;2023:3304105.
57. Hassan BN, alazzouni As, Fathalla AS. Ameliorative effect of Metformin Nano emulsion against induced diabetic nephropathy in rat model: microanatomy study. *Advances in Basic and Applied Sciences*. 2023;1(1):55-62.

58. Zeng Z, Jiang G, Liu T, Song G, Sun Y, Zhang X, et al. Fabrication of gelatin methacryloyl hydrogel microneedles for transdermal delivery of metformin in diabetic rats. *Bio-Design and Manufacturing*. 2021;4(4):902-11.
59. Tawfeek HM, Abou-Taleb DAE, Badary DM, Ibrahim M, Abdellatif AAH. Pharmaceutical, clinical, and immunohistochemical studies of metformin hydrochloride topical hydrogel for wound healing application. *Archives of Dermatological Research*. 2020;312(2):113-21.
60. Shukla SK, Kulkarni NS, Chan A, Parvathaneni V, Farrales P, Muth A, et al. Metformin-Encapsulated Liposome Delivery System: An Effective Treatment Approach against Breast Cancer. *Pharmaceutics*. 2019;11(11):559.
61. Magdy S, Fathalla Z, Alaaeldin E, Abdel-Aziz RTA, Mansour HF. Enhancement of antiproliferative potential of metformin against melanoma mice B16 cells using an optimized liposomal drug delivery system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2022;74(7):1027-39.
62. Mousa IA, Hammady TM, Gad S, Zaitone SA, El-Sherbiny M, Sayed OM. Formulation and Characterization of Metformin-Loaded Ethosomes for Topical Application to Experimentally Induced Skin Cancer in Mice. *Pharmaceutics*. 2022;15(6):657.
63. Jenjob R, Phakkeeree T, Seidi F, Theerasilp M, Crespy D. Emulsion Techniques for the Production of Pharmacological Nanoparticles. *Macromolecular Bioscience*. 2019;19(6):1900063.
64. Wang Y, Li P, Tran T, Zhang J, Kong L. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*. 2016;6:26.
65. Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;496(2):173-90.
66. Iqbal M, Valour J-P, Fessi H, Elaissari A. Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique. *Colloid and Polymer Science*. 2015;293(3):861-73.
67. Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*. 2020;25(16):3731.
68. Sami El-banna F, Mahfouz ME, Leporatti S, El-Kemary M, A. N. Hanafy N. Chitosan as a Natural Copolymer with Unique Properties for the Development of Hydrogels. *Applied Sciences*. 2019;9(11):2193.
69. Ravi Kumar MNV. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000;46(1):1-27.
70. Muzzarelli RA. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Mar Drugs*. 2010;8(2):292-312.
71. Contri RV, Fiel LA, Alnasif N, Pohlmann AR, Guterres SS, Schäfer-Korting M. Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. *International Journal of Pharmaceutics*. 2016;507(1):12-20.
72. Kou S, Peters LM, Mucalo MR. Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;169:85-94.
73. Sámano-Valencia C, Martínez-Castañón GA, Martínez-Gutiérrez F, Ruiz F, Toro-Vázquez JF, Morales-Rueda JA, et al. Characterization and Biocompatibility of Chitosan Gels with Silver and Gold Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*. 2014;2014:543419.
74. Shabir G. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. *Journal of validation technology*. 2004;10:314-24.

75. Leite JMdS, Santana LMD, Nadvorny D, Abreu BOd, Rebouças JdS, Formiga FR, et al. Nanoparticle design for hydrophilic drugs: Isoniazid biopolymeric nanostructure. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023;87:104754.
76. Gharieh A, Khoei S, Mahdavian AR. Emulsion and miniemulsion techniques in preparation of polymer nanoparticles with versatile characteristics. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2019;269:152-86.
77. Melo NFSd, Campos EVR, Franz-Montan M, Paula Ed, Silva CMGd, Maruyama CR, et al. Characterization of Articaine-Loaded Poly(ϵ -caprolactone) Nanocapsules and Solid Lipid Nanoparticles in Hydrogels for Topical Formulations. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018;18(6):4428-38.
78. Badri W, El Asbahani A, Miladi K, Baraket A, Agusti G, Nazari QA, et al. Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with indomethacin and Nigella Sativa L. essential oil for the topical treatment of inflammation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018.
79. Alavi M, Rai M. Topical delivery of growth factors and metal/metal oxide nanoparticles to infected wounds by polymeric nanoparticles: an overview. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2020;18(10):1021-32.
80. Frušić-Zlotkin M, Soroka Y, Tivony R, Larush L, Verkhovsky L, Brégégère FM, et al. Penetration and biological effects of topically applied cyclosporin A nanoparticles in a human skin organ culture inflammatory model. *Experimental Dermatology*. 2012;21(12):938-43.
81. Zhang J, Tang H, Liu Z, Chen B. Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:8483-93.
82. Gundogdu N, Cetin M. Chitosan-poly (lactide-co-glycolide) (CS-PLGA) nanoparticles containing metformin HCl: preparation and in vitro evaluation. *Pak J Pharm Sci*. 2014;27(6):1923-9.
83. Bhagav P, Upadhyay H, Chandran S. Brimonidine Tartrate–Eudragit Long-Acting Nanoparticles: Formulation, Optimization, In Vitro and In Vivo Evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(4):1087-101.
84. Martínez NY, Andrade PF, Durán N, Cavalitto S. Development of double emulsion nanoparticles for the encapsulation of bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;158:190-6.
85. Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso MJ, et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Release*. 1998;50(1-3):31-40.
86. Moribe K, Shibata M, Furuishi T, Higashi K, Tomono K, Yamamoto K. Effect of Particle Size on Skin Permeation and Retention of Piroxicam in Aqueous Suspension. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 2010;58:1096-9.
87. Mardhiah Adib Z, Ghanbarzadeh S, Kouhsoltani M, Yari Khosroshahi A, Hamishehkar H. The Effect of Particle Size on the Deposition of Solid Lipid Nanoparticles in Different Skin Layers: A Histological Study. *Adv Pharm Bull*. 2016;6(1):31-6.
88. Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Potential of Nanoparticles as Permeation Enhancers and Targeted Delivery Options for Skin: Advantages and Disadvantages. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:3271-89.
89. Eiras F, Amaral MH, Silva R, Martins E, Lobo JMS, Silva AC. Characterization and biocompatibility evaluation of cutaneous formulations containing lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;519(1):373-80.
90. Malta R, Loureiro JB, Costa P, Sousa E, Pinto M, Saraiva L, et al. Development of lipid nanoparticles containing the xanthone LEM2 for topical treatment of melanoma. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2021;61:102226.

91. Bibi N, ur Rehman A, Rana NF, Akhtar H, Khan MI, Faheem M, et al. Formulation and characterization of curcumin nanoparticles for skin cancer treatment. *Applied Nanoscience*. 2022;12(11):3421-36.
92. Labala S, Jose A, Venuganti VVK. Transcutaneous iontophoretic delivery of STAT3 siRNA using layer-by-layer chitosan coated gold nanoparticles to treat melanoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;146:188-97.
93. Mahmoud BS, McConville C. Development and Optimization of Irinotecan-Loaded PCL Nanoparticles and Their Cytotoxicity against Primary High-Grade Glioma Cells. *Pharmaceutics*. 2021;13(4):541.
94. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016;235:337-51.
95. Ta Q, Ting J, Harwood S, Browning N, Simm A, Ross K, et al. Chitosan nanoparticles for enhancing drugs and cosmetic components penetration through the skin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;160:105765.
96. Abuelella KE, Abd-Allah H, Soliman SM, Abdel-Mottaleb MMA. Skin targeting by chitosan/hyaluronate hybrid nanoparticles for the management of irritant contact dermatitis: In vivo therapeutic efficiency in mouse-ear dermatitis model. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;232:123458.
97. Zhang ZJ, Michniak-Kohn B. Flavosomes, novel deformable liposomes for the co-delivery of anti-inflammatory compounds to skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;585:119500.
98. Lin H, Xie Q, Huang X, Ban J, Wang B, Wei X, et al. Increased skin permeation efficiency of imperatorin via charged ultradeformable lipid vesicles for transdermal delivery. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:831-42.
99. Ogiso T, Yamaguchi T, Iwaki M, Tanino T, Miyake Y. Effect of Positively and Negatively Charged Liposomes on Skin Permeation of Drugs. *Journal of Drug Targeting*. 2001;9(1):49-59.
100. Chen M, Liu X, Fahr A. Skin penetration and deposition of carboxyfluorescein and temoporfin from different lipid vesicular systems: In vitro study with finite and infinite dosage application. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011;408(1):223-34.
101. Honeywell-Nguyen PL, Bouwstra JA. The in vitro transport of pergolide from surfactant-based elastic vesicles through human skin: a suggested mechanism of action. *J Control Release*. 2003;86(1):145-56.
102. Chen M, Liu X, Fahr A. Skin delivery of ferulic acid from different vesicular systems. *J Biomed Nanotechnol*. 2010;6(5):577-85.
103. Alex AT, Joseph A, Shavi G, Rao JV, Udupa N. Development and evaluation of carboplatin-loaded PCL nanoparticles for intranasal delivery. *Drug Delivery*. 2016;23(7):2144-53.
104. Ajiboye AL, Trivedi V, Mitchell JC. Preparation of polycaprolactone nanoparticles via supercritical carbon dioxide extraction of emulsions. *Drug Delivery and Translational Research*. 2018;8(6):1790-6.
105. Rosado C, Silva C, Reis CP. Hydrocortisone-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for atopic dermatitis treatment. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2013;18(3):710-8.
106. Ge H, Hu Y, Yang S, Jiang X, Yang C. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug-loaded ϵ -caprolactone/L-lactide copolymer nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*. 2000;75(7):874-82.
107. Gupta N, Gupta GD, Singh D. Localized topical drug delivery systems for skin cancer: Current approaches and future prospects. *Frontiers in Nanotechnology*. 2022;4.

108. Ossadnik M, Richter H, Teichmann A, Koch S, Schäfer U, Wepf R, et al. Investigation of differences in follicular penetration of particle-and nonparticle-containing emulsions by laser scanning microscopy. *Laser Physics*. 2006;16(5):747-50.
109. Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;71(2):173-80.
110. Jin X, Imran M, Mohammed Y. Topical Semisolid Products—Understanding the Impact of Metamorphosis on Skin Penetration and Physicochemical Properties. *Pharmaceutics*. 2022;14(11):2487.
111. Mekkawy A, Fathy M, El-Shanawany S. Formulation and in vitro evaluation of fluconazole topical gels. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;3(3):293-313.
112. Binder L, Mazál J, Petz R, Klang V, Valenta C. The role of viscosity on skin penetration from cellulose ether-based hydrogels. *Skin Research and Technology*. 2019;25(5):725-34.
113. Parhi R. Drug delivery applications of chitin and chitosan: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2020;18.
114. Giacone DV, Dartora VFMC, de Matos JKR, Passos JS, Miranda DAG, de Oliveira EA, et al. Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;165:1055-65.
115. Zange R, Li Y, Kissel T. Biocompatibility testing of ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic-co-glycolic acid) A blocks attached to a central poly(ethylene oxide) B block under in vitro conditions using different L929 mouse fibroblasts cell culture models. *J Control Release*. 1998;56(1-3):249-58.
116. Depan BP, Naik AA, Nair HA. Preparation and evaluation of chitosan based thermoreversible gels for intraperitoneal delivery of 5-fluorouracil (5-FU). *Acta Pharm*. 2013;63(4):479-91.
117. Salem HF, Nafady MM, Ali AA, Khalil NM, Elsis AA. Evaluation of Metformin Hydrochloride Tailoring Bilosomes as an Effective Transdermal Nanocarrier. *Int J Nanomedicine*. 2022;17:1185-201.
118. Magdy S, Alaaeldin E, Fathalla Z, Alaaeldin R, Elrehany M, Saber EA, et al. Metformin-loaded ethosomes with promoted anti-proliferative activity in melanoma cell line B16, and wound healing aptitude: Development, characterization and in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2022;621:121781.
119. Valenta C, Auner BG. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;58(2):279-89.
120. Pereira MN, Nogueira LL, Cunha-Filho M, Gratieri T, Gelfuso GM. Methodologies to Evaluate the Hair Follicle-Targeted Drug Delivery Provided by Nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2023;15(7).
121. Takeuchi I, Hida Y, Makino K. Minoxidil-encapsulated poly(L-lactide- co-glycolide) nanoparticles with hair follicle delivery properties prepared using W/O/W solvent evaporation and sonication. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2018;29:217-28.
122. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2004;99(1):53-62.

8. EKLER

EK-1. Turnitin Ekran Görüntüsü

MELANOMANIN TOPİKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK METFORMİN YÜKLÜ POLİKAPROLAKTON NANOPARTİKÜL İÇEREN JEL FORMÜLASYONU HAZIRLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ			
ORJİNALLİK RAPORU			
%	11	%	10
BENZERLİK ENDEKSİ		İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR
		%	1
		ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ	%
			2
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı		% 7
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı		% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi		% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı		<% 1
5	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi		<% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı		<% 1
7	dspace.kocaeli.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı		<% 1
8	www.ate1.org İnternet Kaynağı		<% 1

EK-2 Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ziyneti Eke
Ödev başlığı: MELANOMANIN TOPİKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK METF...
Gönderi Başlığı: MELANOMANIN TOPİKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK METF...
Dosya adı: Z_YNET.EKE_04.09_TEZ.pdf
Dosya boyutu: 1.86M
Sayfa sayısı: 99
Kelime sayısı: 20,338
Karakter sayısı: 136,517
Gönderim Tarihi: 04-Eyl-2023 12:00ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2157489971

T.C.
BACIETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MELANOMANIN TOPİKAL YOLLA TEDAVİSİNE YÖNELİK
METFORMİN YÜKLÜ POLİKAPROLAKTON
NANOPARTİKÜL İÇEREN JEL FORMÜLASYONU
HAZIRLANMASI VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Doç. Ziyneti EKE

Farmasöi Tıbbi Program
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ BAŞLIĞI
Doç. Dr. Nuri Erdem

ANKARA
2023