

**ANTİKANSER ÖZELLİKTE YENİ İLAÇ TAŞIYICI  
SİSTEMLERİN FORMÜLASYON  
ÇALIŞMALARI**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Mohammed Saad Naji ALI**

**Eskişehir 2020**

**ANTİKANSER ÖZELLİKTE YENİ İLAÇ TAŞIYICI  
SİSTEMLERİN FORMÜLASYON  
ÇALIŞMALARI**

**Mohammed Saad Naji ALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Ebru BAŞARAN**

**Eskişehir  
Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Ağustos 2020**

## **JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI**

MOHAMMED SAAD NAJI ALI'nin "Antikanser Özellikte Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Çalışmaları " başlıklı tezi 13/08/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

| <b>Unvanı Adı Soyadı</b> |                            | <b>İmza</b> |
|--------------------------|----------------------------|-------------|
| Üye (Tez Danışmanı) :    | Doç.Dr. Ebru BAŞARAN       | .....       |
| Üye :                    | Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN     | .....       |
| Üye :                    | Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL | .....       |

**Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

### ANTİKANSER ÖZELLİKTE YENİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI

Mohammed Saad Naji ALI

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Doç. Dr. Ebru BAŞARAN

Kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya genelinde en çok ölüme neden olan hastalık olarak bilinmektedir. Letrozol (LTZ), etkin antikanser özellik taşıyan selektif non-steroidal bir aromataz inhibitörüdür. Sudaki düşük çözünürlüğü ve oldukça fazla yan etkiye sahip olması kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle tez çalışmamızda antikanser olarak kullanılmak üzere LTZ'nin terapötik etkinliğini artırmak ve yan etkileri en aza indirmek amacıyla yeni ilaç taşıyıcı sistemler oluşturulması amaçlanmıştır. Çalışmada Eudragit® RS 100 ve Kollidon® SR polimer olarak seçilmiştir. LTZ içeren polimerik nanopartiküller püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında morfolojik özellikler, partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı (PDI), zeta potansiyel değerlerinin belirlenmesi ve *in vitro* salım çalışmaları ile ortaya konmuştur. Ayrıca nanopartiküllerin yapısal özellikleri DSC, FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR analizleri ile belirlenmiştir. Hazırlanan formülasyonların kararlılık çalışmaları üç ay süresince 5 ± 3°C, 25°C ± 2°C (%60 ± %5 RN), 40°C ± 2°C (%75 ± %5 RN) olmak üzere üç farklı ortamda değerlendirilmiştir. Çalışmaların sonucunda hazırlanan sistemlerin 24 saate kadar uzatılmış salım gerçekleştirebildiği ve kararlılıklarını üç farklı ortamda saklama süresi boyunca korudukları sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Letrozol, Polimerik nanopartiküller, Kanser tedavisi, Eudragit® RS100, Kollidon® SR

## ABSTRACT

### FORMULATION STUDIES OF NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR ANTICANCER ACTIVITY

Mohammed Saad Naji ALI

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2020

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru BAŞARAN

Cancer is known as the most death-causing disease worldwide after cardiovascular diseases. Letrozole (LTZ) is a selective non-steroidal aromatase inhibitor with effective anticancer properties. Its low solubility in water and having lots of side effects limit its pharmaceutical use. For this reason, the aim of our thesis was, formulation of novel drug delivery systems in order to increase the therapeutic effect of LTZ while minimizing the side effects with efficient anticancer activity. In the study, Eudragit® RS 100 and Kollidon® SR were selected as polymers. Polymeric nanoparticles containing LTZ were prepared using spray drying method. Morphological analyses like particle size, particle size distribution (Pdl), zeta potential values and *in vitro* release studies had been conducted within the scope of the characterization studies of the prepared nanoparticles. In addition, the structural properties of nanoparticles were determined by DSC, FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR analyses. Stability of the prepared formulations were evaluated in three different environments as  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $60\% \pm 5\% \text{ RN}$ ),  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $75\% \pm 5\% \text{ RN}$ ) for three months. As the result of the studies, it was concluded that the formulations prepared could sustain extended release up to 24 hours and maintain their stability in three different environments during the storage period.

**Keywords:** Letrozole, Polymeric nanoparticles, Cancer treatment, Eudragit® RS100, Kollidon® SR.

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarım Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a, Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Doktor Öğretim Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Doktor Öğretim Üyesi Behiye ŞENEL'e, Doktor Öğretim Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU'na, Doktor Öğretim Üyesi Ahmet Alper ÖZTÜRK'e bana yüksek lisans eğitimim boyunca kazandırdıkları ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Araş. Gör. Kadir AYKAÇ'a, Araş. Gör. Kemal Can DEMİRKİLİNÇ'a ve Araş. Gör. Sinan ÖZER'e teşekkür ederim.

Son olarak beni bugünlere getiren ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan, maddi manevi her türlü imkanı sağlayan, her koşulda yanımda olarak beni destekleyen ve yüreklendiren, anlayışlı ve fedakar aileme teşekkür ederim.

## ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

MOHAMMED SAAD NAJİ ALİ

## İÇİNDEKİLER

|                                                                | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------|--------------|
| BAŞLIK SAYFASI .....                                           | i            |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....                                    | ii           |
| ÖZET .....                                                     | iii          |
| ABSTRACT .....                                                 | iv           |
| ÖNSÖZ .....                                                    | v            |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ .....              | vi           |
| İÇİNDEKİLER .....                                              | vii          |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                        | xiii         |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                          | xv           |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                           | xvii         |
| 1. GİRİŞ.....                                                  | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                         | 3            |
| 2.1. Kanser.....                                               | 3            |
| 2.1.1. Kanser insidansı ve tedavisi .....                      | 4            |
| 2.2. Letrozol .....                                            | 6            |
| 2.2.1. Tanım.....                                              | 6            |
| 2.2.2. Letrozol'ün farmakolojik özellikleri .....              | 6            |
| 2.2.3. Letrozol'ün yaygın yan etkileri.....                    | 7            |
| 2.2.4. Letrozol'ün fizikokimyasal özellikleri .....            | 7            |
| 2.2.5. Letrozol yüklü nanopartikül ile yapılan çalışmalar..... | 8            |
| 2.3. Partiküler ilaç taşıyıcı sistemler.....                   | 10           |
| 2.4. Nanoteknoloji .....                                       | 11           |
| 2.4.1. Tanım .....                                             | 11           |



|                                                                                              | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.2. Kullanılan Cihazlar .....                                                               | 25           |
| 4. YÖNTEMLER .....                                                                           | 26           |
| 4.1. Çalışılacak maddeler ile yapılan çalışmalar .....                                       | 26           |
| 4.1.1. Letrozol ile yapılan çalışmalar .....                                                 | 26           |
| 4.1.1.1. Termal analiz .....                                                                 | 26           |
| 4.1.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....                                         | 26           |
| 4.1.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi .....                                             | 26           |
| 4.1.1.4. Letrozol'un yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile<br>analitik miktar tayini ..... | 26           |
| 4.1.1.4.1. Doğrusallık .....                                                                 | 26           |
| 4.1.1.4.2. Kesinlik .....                                                                    | 27           |
| 4.1.1.4.3. Doğruluk .....                                                                    | 27           |
| 4.1.1.4.4. Duyarlılık .....                                                                  | 28           |
| 4.1.1.4.5. Seçicilik .....                                                                   | 28           |
| 4.1.2. Eudragit® RS 100 ile yapılan çalışmalar .....                                         | 29           |
| 4.1.2.1. Termal analiz .....                                                                 | 29           |
| 4.1.2.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....                                         | 29           |
| 4.1.2.3. Nükleer manyetik rezonans analizi .....                                             | 29           |
| 4.1.3. Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar .....                                             | 29           |
| 4.1.3.1. Termal analiz .....                                                                 | 29           |
| 4.1.3.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....                                         | 29           |
| 4.1.3.3. Nükleer manyetik rezonans analizi .....                                             | 29           |
| 4.2. Nanopartikül formülasyonlarına ait çalışmalar .....                                     | 30           |
| 4.2.1. Formülasyonların hazırlanışı .....                                                    | 30           |

|                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.2.2. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları .....</b>        | <b>30</b> |
| <b>4.2.2.1. Partikül şekli analizleri .....</b>                                                  | <b>30</b> |
| <b>4.2.2.2. Partikül büyüklüğü ve parçacık büyüklüğü dağılımı analizleri .....</b>               | <b>30</b> |
| <b>4.2.2.3. Zeta potansiyel analizleri .....</b>                                                 | <b>31</b> |
| <b>4.2.2.4. Termal analiz .....</b>                                                              | <b>31</b> |
| <b>4.2.2.5. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....</b>                                      | <b>31</b> |
| <b>4.2.2.6. Nükleer manyetik rezonans analizi .....</b>                                          | <b>31</b> |
| <b>4.2.2.7. Miktar tayini .....</b>                                                              | <b>31</b> |
| <b>4.2.2.8. Nanopartikül formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmaları .....</b>              | <b>32</b> |
| <b>4.2.2.9. Nanopartikül formülasyonlarının in vitro salım kinetiklerinin belirlenmesi .....</b> | <b>32</b> |
| <b>4.2.3. Nanopartikül formülasyonlarına ait stabilite çalışmaları .....</b>                     | <b>32</b> |
| <b>5. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>                                                             | <b>33</b> |
| <b>5.1. Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar .....</b>                                    | <b>33</b> |
| <b>5.1.1. Letrozol ile yapılan çalışmalar .....</b>                                              | <b>33</b> |
| <b>5.1.1.1. Termal analiz .....</b>                                                              | <b>33</b> |
| <b>5.1.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....</b>                                      | <b>33</b> |
| <b>5.1.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi .....</b>                                          | <b>34</b> |
| <b>5.1.1.4. Letrozol'un yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik miktar tayini .....</b> | <b>35</b> |

|                                                                | <u>Sayfa</u> |
|----------------------------------------------------------------|--------------|
| 5.1.1.4.1. Doğrusallık .....                                   | 35           |
| 5.1.1.4.2. Kesinlik .....                                      | 35           |
| 5.1.1.4.3. Doğruluk .....                                      | 36           |
| 5.1.1.4.4. Duyarlılık .....                                    | 37           |
| 5.1.1.4.5. Seçicilik .....                                     | 37           |
| 5.1.2. Eudragit® RS ile yapılan çalışmalar .....               | 40           |
| 5.1.2.1. Termal analiz .....                                   | 40           |
| 5.1.2.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....           | 40           |
| 5.1.2.3. Nükleer manyetik rezonans analizi .....               | 41           |
| 5.1.3. Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar .....               | 42           |
| 5.1.3.1. Termal analiz .....                                   | 42           |
| 5.1.3.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....           | 42           |
| 5.1.3.3. Nükleer manyetik rezonans analizi .....               | 43           |
| 5.2. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon |              |
| Çalışmaları .....                                              | 44           |
| 5.2.1. Nanopartiküllerin hazırlanışı .....                     | 44           |
| 5.2.2. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin       |              |
| karakterizasyon çalışmaları .....                              | 45           |
| 5.2.2.1. Partikül şekli analizleri .....                       | 45           |
| 5.2.2.2. Parçacık büyüklüğü ve parçacık büyüklüğü              |              |
| dağılımı analizleri .....                                      | 48           |
| 5.2.2.3. Zeta potansiyel analizleri .....                      | 48           |
| 5.2.2.4. Termal analiz .....                                   | 49           |
| 5.2.2.5. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....           | 52           |

|                                                                                               | <u>Sayfa</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 5.2.2.6. Nükleer manyetik rezonans analizi .....                                              | 56           |
| 5.2.2.7. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin<br>etkin madde miktar tayini ..... | 60           |
| 5.2.3. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin<br>karakterizasyon çalışmaları .....     | 61           |
| 5.2.3.1. Partikül şekli analizleri .....                                                      | 61           |
| 5.2.3.2. Parçacık büyüklüğü ve parçacık büyüklüğü<br>dağılımı analizleri .....                | 65           |
| 5.2.3.3. Zeta potansiyel analizleri .....                                                     | 65           |
| 5.2.3.4. Termal analiz .....                                                                  | 66           |
| 5.2.3.5. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi .....                                          | 69           |
| 5.2.3.6. Nükleer manyetik rezonans analizi .....                                              | 73           |
| 5.2.3.7. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin<br>etkin madde miktar tayini .....     | 77           |
| 5.2.3.8. İn vitro salım çalışması .....                                                       | 77           |
| 5.2.3.9. Salım kinetik modelinin değerlendirilmesi.....                                       | 79           |
| 5.2.4. Formülasyonların stabilite Çalışmaları .....                                           | 81           |
| 6. SONUÇ .....                                                                                | 86           |
| KAYNAKÇA .....                                                                                | 87           |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                      |              |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                           | <u>Sayfa</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Çizelge 2.1.</b> Nanoteknolojinin tarihsel gelişimi .....                                                                                                                                                                              | 13           |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Letrozol'ün analitik miktar tayininde kullanılan<br>HPLC çalışma şartları .....                                                                                                                                       | 27           |
| <b>Çizelge 5.1.</b> Kesinlik çalışmasına ait HPLC analiz sonuçları .....                                                                                                                                                                  | 36           |
| <b>Çizelge 5.2.</b> Doğruluk çalışmasına ait HPLC analiz sonuçları .....                                                                                                                                                                  | 37           |
| <b>Çizelge 5.3.</b> Hazırlanan polimerik nanopartiküllerin formülasyon bileşenleri .....                                                                                                                                                  | 44           |
| <b>Çizelge 5.4.</b> Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül<br>büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI) ve zeta potansiyel<br>analiz sonuçları .....                                                                | 48           |
| <b>Çizelge 5.5.</b> Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerde etkin madde<br>miktar tayini analiz sonuçları .....                                                                                                                 | 60           |
| <b>Çizelge 5.6.</b> Kollidon® SR nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü (PB),<br>Polidisperslik indisi (PdI) ve zeta potansiyel analiz sonuçları .....                                                                                    | 65           |
| <b>Çizelge 5.7.</b> Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde<br>miktar tayini analiz sonuçları .....                                                                                                                     | 77           |
| <b>Çizelge 5.8.</b> Hazırlanan formülasyonların <i>in vitro</i> salım kinetik modellere<br>uyum analiz sonuçları .....                                                                                                                    | 80           |
| <b>Çizelge 5.9.</b> 5°C±3°C'de saklanan formülasyonların stabilite çalışmaları sonucunda<br>elde edilen partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI),<br>Zeta Potansiyel (ZP) ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları ..... | 83           |

|                                                                                                                                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Çizelge 5.10.</b> 25°C±2°C (%60 ± %5 RN)’de saklanan formülasyonların stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (Pdl), Zeta Potansiyel (ZP) ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları ..... | <b>84</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

|                                                                                                                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Çizelge 5.11.</b> 40°C ± 2°C (%75 ± %5 RN)’de saklanan formülasyonların stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (Pdl), Zeta Potansiyel (ZP) ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları ..... | <b>85</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                      | <u>Sayfa</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Şekil 2.1. Letrozol'ün kimyasal yapısı .....                                                                                         | 8            |
| Şekil 2.2. Bazı nano ölçekli yapılar .....                                                                                           | 11           |
| Şekil 2.3. Kanser tedavisinde kullanılan kontrollü salım sağlayan nano boyutlu<br>ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler .....            | 14           |
| Şekil 2.4. Nanoparpartikül taşıyıcı ilaçlarla pasif tümör hedefleme .....                                                            | 15           |
| Şekil 2.5. Nanopartiküller çeşitli şekilleri .....                                                                                   | 16           |
| Şekil 2.6. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan başlıca<br>yöntemler .....                                       | 18           |
| Şekil 5.1. Letrozol'e ait DSC termogramı .....                                                                                       | 33           |
| Şekil 5.2. Letrozol'e ait FT-IR analiz spektrumu .....                                                                               | 34           |
| Şekil 5.3. Letrozol'e ait <sup>1</sup> H-NMR analiz spektrumu .....                                                                  | 34           |
| Şekil 5.4. LTZ'ün miktar tayininde kullanılan standart eğri .....                                                                    | 35           |
| Şekil 5.5. HPLC seçicilik analizi kromatogramları .....                                                                              | 38           |
| Şekil 5.6. Eudragit® RS 100'nin DSC analizine ait termogram .....                                                                    | 40           |
| Şekil 5.7. Eudragit® RS 100'e ait FT-IR spektrumu .....                                                                              | 40           |
| Şekil 5.8. Eudragit® RS 100'nin <sup>1</sup> H-NMR analiz spektrumu .....                                                            | 41           |
| Şekil 5.9. Kollidon® SR'nin DSC analizine ait termogram .....                                                                        | 42           |
| Şekil 5.10. Kollidon® SR'nin FT-IR analiz spektrumu .....                                                                            | 43           |
| Şekil 5.11. Kollidon® SR'nin <sup>1</sup> H-NMR analiz spektrumu .....                                                               | 43           |
| Şekil 5.12. Saf etkin maddenin ve Eudragit® RS 100 ile hazırlanan<br>formülasyonların SEM görüntüleri .....                          | 45           |
| Şekil 5.13. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan<br>saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar ..... | 50           |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 5.14.</b> Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları .....       | 53 |
| <b>Şekil 5.15.</b> Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin <sup>1</sup> H-NMR analiz spektrumları .....    | 57 |
| <b>Şekil 5.16.</b> Saf etkin madde, fiziksel karışım, etkin madde içeren ve plasebo Kollidon® SR formülasyonunun SEM görüntüleri. .... | 62 |
| <b>Şekil 5.17.</b> Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar .....   | 66 |
| <b>Şekil 5.18.</b> Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları .....          | 69 |
| <b>Şekil 5.19.</b> Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin <sup>1</sup> H-NMR analiz spektrumları .....        | 73 |
| <b>Şekil 5.20.</b> Hazırlanan nanopartiküllere yüklenen etkin maddenin <i>in vitro</i> salım profilleri .....                          | 78 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                    |                                                                                     |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| AIC                | : Akaike bilgi kriteri                                                              |
| DSC                | : Diferansiyel taramalı kalorimetri                                                 |
| D-DMSO             | : Dötoro-dimetil sülfoksit                                                          |
| ERS 100            | : Eudragit® RS 100                                                                  |
| FT-IR              | : Fourier dönüşümlü kızılötesi analizleri                                           |
| <sup>1</sup> H-NMR | : Nükleer manyetik rezonans analizleri                                              |
| HPLC               | : Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi                                               |
| LOD                | : Saptama sınırı                                                                    |
| LOQ                | : Tayin sınırı                                                                      |
| LTZ                | : Letrozol                                                                          |
| KSR                | : Kollidon® SR                                                                      |
| MK1                | : Kollidon® SR ile hazırlanan ve %10 letrozol içeren nanopartikül formülasyonu      |
| MK2                | : Kollidon® SR ile hazırlanan ve %15 letrozol içeren nanopartikül formülasyonu      |
| MK3                | : Kollidon® SR ile hazırlanan ve %20 letrozol içeren nanopartikül formülasyonu      |
| MK-PL              | : Kolidon SR ile hazırlanan etkin madde içermeyen plasebo nanopartikül formülasyonu |
| ML1                | : Eudragit® RS 100 hazırlanan ve %10 letrozol içeren nanopartikül formülasyonu      |

|       |                                                                                           |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| ML2   | : Eudragit® RS 100 hazırlanan ve %15 letrozol içeren nanopartikül formülasyonu            |
| ML3   | : Eudragit® RS 100 hazırlanan ve %20 letrozol içeren nanopartikül formülasyonu            |
| ML-PL | : Eudragit® RS 100 ile hazırlanan etkin madde içermeyen plasebo nanopartikül formülasyonu |
| MSC   | : Model seçim kriteri                                                                     |
| PB    | : Partikül büyüklüğü                                                                      |
| PdI   | : Polidisperslik indisi                                                                   |
| PLA   | : Poli-L-laktik asit                                                                      |
| PLGA  | : Poli laktik-glikolik asit                                                               |
| SEM   | : Taramalı elektron mikroskobu                                                            |
| SH    | : Standart hata                                                                           |
| UV    | : Ultra viyole (mor ötesi)                                                                |
| ZP    | : Zeta potansiyel                                                                         |

## 1. Giriş

Konvansiyonel ilaç şekillerinin sık ve tekrarlanan dozda kullanılmaları nedeniyle etkin maddenin kullanılan dozun toksik düzeyin üstüne çıkması durumunda karşımıza istenmeyen yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için kontrollü salım sistemleri geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Kontrollü salım sistemleri, hedefe yönelik bir tedavi sunması, kontrollü uzatılmış bir ilaç salımı sağlaması, hasta uyuncunun sağlaması ve dozlama aralığının uzatılması gibi üstünlükleri taşıması nedeniyle etkin bir tedavi yöntemine olanak sağlamaktadır. Etkin maddenin dozlama aralığının uzatılmasıyla yan etkileri en aza indirilebilmektedir.

Nanoteknoloji yirmi birinci yüzyıl için tıp ve eczacılık alanında umut verici bir bir bilim dalı olarak kabul edilmektedir. Eczacılık alanındaki uygulanan nanobilim, "Farmasötik nanoteknoloji" olarak adlandırılmaktadır. Farmasötik nanoteknoloji; nanopartiküller, lipozomlar, dendrimerler, polimerik miseller, nanoküreler, niozomlar ve karbon nanotüpler gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemleriyle, hastalıklara etkin teşhis ve tedavi imkanı vermektedir.

Nanopartiküller, 1 ile 100 nm arasında değişen boyutlara sahip küçük malzemelerdir. Özelliklerine, şekillerine veya boyutlarına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılabilirler. Nanopartiküller, yüksek yüzey alanı ve nano boyutlarından dolayı benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Nanopartiküller, kontrollü salım sistemlerinde en iyi ilaç taşıyıcı sistemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Kontrollü salım sistemlerine dayalı tasarlanan etkin madde yüklü nanopartiküller, onkoloji, oftalmoloji, kardiyoloji, endokrinoloji, immunoloji ve gen hedeflendirme tedavi sistemi gibi birçok alan ile ilgili çalışmaları bulunmaktadır.

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan bir hastalık olarak bilinmektedir. Kanser görülme oranı, dünya genelinde gün geçtikçe büyümeye devam etmekte ve bireylerde, ailelerde, topluluklarda ve sağlık sistemlerinde büyük fiziksel, duygusal ve finansal baskılara neden olmaktadır (WHO, 2017). 2018 yılında dünya genelinde 9.5 milyon kansere bağlı ölüm ve 18.1 milyon yeni kanser vakası belirlenmiştir ve bu rakamlar sürekli olarak artmaktadır. Mevcut kanser tedavileri cerrahi

müdahale, kemoterapi ve radyasyon terapisi veya bu seçeneklerin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır (IARC, 2018).

Konvansiyonel kemoterapi ilaçları, hızlı bir şekilde çoğalan ve bölünen kanser hücrelerinin çoğalmalarını durdurma ve yok etme için DNA sentezi ve mitozu üzerine müdahale ederek etki göstermektedir. Ayrıca kullanılan ajanlar seçici olmadıkları için sağlıklı ve normal dokulara zarar verir ve bu durum kanser hastalarının yüksek ölüm oranlarının arkasındaki en önemli nedenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bunun dışında, bu ilaçların tümör dokularına biyoerişebilirliği göreceli olarak zayıf olduğundan daha sık ve yüksek dozlarda kullanılmaları gerekebilir ve bunun sonucunda normal ve sağlıklı hücrelerde toksisitenin ve çoklu ilaç direncinin artmasına neden olmaktadır (Senapati vd., 2018). Bu nedenle, sağlıklı dokulara zarar vermeden sadece kanserli hücreleri hedef alabilen ve kontrollü salım sağlayan kemoterapötiklerin geliştirilmesine ve kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ilaçlar sayesinde hem terapötik etkinliğin artırılması hem de istenmeyen yan etkilerin azaltılması mümkün olacaktır.

Letrozol (LTZ), postmenopozal kadınlarda hormona duyarlı meme kanserini tedavi etmek amacıyla kullanılan üçüncü generasyonlu selektif non-steroidal bir aromataz inhibitörüdür (Mondal vd., 2008). LTZ, ayrıca endometriyum, over ve bazı kanser türleri terapötiklerinde kullanılabilmesi için halen araştırılmaktadır.

Sunulan bu tez çalışmasının amacı, anti kanser ajanı olan LTZ'ün terapötik etkinliğini artırmak ve yan etkileri azaltmak amacıyla Eudragit® RS 100 ve Kollidon® SR polimerleri ile enkapsüle edilmiş nanopartiküllerin hazırlanmasıdır. Geliştirilen nanopartiküllerin, morfolojik özellikleri, partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı, zeta potansiyel değerlerinin belirlenmesi, stabilite ve *in vitro* salım çalışmaları incelenmiştir. Ayrıca nanopartiküllerin yapısal özellikleri DSC, FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR analizleri ile araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla karakterize edilen, sonucu bazı türler için ölümlü biten ve bu nedenle de tedavisi için en çok araştırma yapılan ve çok çeşitli yöntemler denenilen bir hastalıktır (Ölgen vd., 2002). Meme kanseri, lenfoma, cilt kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri dahil olmak üzere 100'den fazla kanser türü bulunmaktadır (Ahmedin vd., 2011).

Kanser hem iç hem de dış faktörlerden kaynaklanabilmektedir. Dış faktörler arasında, bulaşıcı organizmalar, sağlıklı beslenme, pestisitler, çevresel toksinler ve tütün ürünlerinin tüketimi yer alırken, iç faktörler arasında ise kalıtsal genetik mutasyonlar, bağışıklık koşulları ve hormonlar yer almaktadır (Mitra vd., 2017).

Kalıtım yoluyla kanser ortaya çıkma olasılığı çevresel faktörlere göre çok daha azdır. Genlerin, bazı hastalıklara karşı yatkınlığa neden olup olmadıkları konusundaki araştırmalar halen devam etmektedir. Normalde tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerdeki bir bozukluğun, kalıtsal olarak aktarılması ve sigara gibi bir karsinojenin ilave katkısı ile bireyler kansere yatkın bir hale gelebilmektedirler. Meme ve yumurtalık kanseri gibi bazı kanser türlerinde, kanserin kalıtsal geçişine ait bazı genler tespit edilmiştir (Yokuş ve Çakır, 2012).

Kromozomlar üzerinde bulunan genler sıkıca paketlenmiş durumda olup bu genlerin üzerindeki fiziksel veya kimyasal değişimler doğrudan hücrenin işlevini etkileyebilmektedir. Her ne kadar gende meydana gelen bir hasara bağlı olarak DNA tamir sistemleri genin işlevini yeniden kazandırmaya çalışsa da her zaman başarı sağlanamamaktadır. Bu durumda genlerin ürünü olan proteinlerin eksik veya hatalı üretilmesi hücre işlevlerinde bozulmaya yol açmaktadır (Baykara 2016).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tümörlerin; vücudun immün sistemini aktive etmeden proliferen olan, kendi enerji metabolizmasını oluşturduğu, bir tümör mikroortamı yaratarak normal görünen bir hücre repertuarı oluşturduğu belirlenmiştir. Tedaviye yönelik atılacak adımlar öncesinde tümörün davranış paterninin anlaşılması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Atasoy ve Başaran, 2019).

### 2.1.1. Kanser insidansı ve tedavisi

Kanser, bulaşıcı olmayan ve 21. yüzyılda dünya genelinde ölüme neden olan kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (Bray vd., 2018). Küresel olarak kanser vakaları her gün artmakta ve ülkelere, toplumlara ve sağlık sistemlere yük olmaktadır. Özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde sağlık sistemlerinin, sürekli büyüyen kanser insidansının yönetilmesi için gerekli imkanlara sahip olmadıkları düşünülmektedir. Bunun sonucunda, dünya genelinde çok sayıda kanser hastası zamanında, yüksek kaliteli tanı ve tedaviye erişememekte ve kanser hastaları arasında ölüm oranlarının artmasına neden olmaktadır (WHO, 2017). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), istatistiklerine göre 2018'de dünya genelinde 18.1 milyon yeni kanser vakası ve 9.5 milyon kansere bağlı ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir. Dünyada her 5 erkekten biri ve her 6 kadından biri hayatı boyunca kansere maruz kalabilmektedir (IARC, 2018).

Akciğer, meme ve kolorektal kanserleri insidans açısından ilk üç kanser türüdür ve dünya çapında mortalite yükünün üçte birinden sorumludur. Akciğer ve meme kanserleri, yeni vaka sayısı açısından dünya çapında önde gelen kanser türleridir; bu türlerin her biri için, 2018'de yaklaşık olarak 2.1 milyon tanı konduğu tahmin edilmektedir. Bu rakamlar iki kanser türü için toplam kanser insidans yükünün yaklaşık %23.2'i teşkil eder. Kolorektal kanser 1.8 milyon vaka sayısı ile toplam insidansın % 10.2'si teşkil ederek en sık karşılaşılan üçüncü kanser türüdür. Prostat kanseri dördüncü (1.3 milyon vaka,% 7.1) ve mide kanseri beşinci (1.0 milyon vaka, % 5.7) sırada yer almaktadırlar (IARC, 2018; DeSantis vd., 2016).

Kanser tedavisi tümörün histolojik yapısına, metastazına ve hastalık aşamasına göre belirlenmektedir. Kanser tedavisi hastaları tedavi etme, hastalığı kontrol altında tutma veya palyatif olarak hastanın yaşam süresini uzatmak ve yaşam kalitesini arttırmak amacıyla yapılmaktadır (Üstündağ, 2013). Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan yaklaşımlar, cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, hormon terapisi, hedeflenmiş terapiler ve gen terapisi gibi biyolojik terapilerin tek başına veya kombinasyon şeklinde kullanıldığı yaklaşımlardan oluşmaktadır (Baykara, 2016)

Antikanser ajanların farmakolojik olarak kansere karşı gösterdiği düşük etkinlik ve kanserin karmaşıklığı nedeniyle tedavi edilmesi en zor hastalıklardan biri olarak kabul edilmekte ve bu nedenle ilerlemiş kanser vakaları için tam etkin bir tedavi yöntemi ortaya konamamaktadır. (Baykara 2016; Pan vd., 2019). Kemoterapi bugüne kadar yaygın olarak kullanılmış ve klinik pratikte en etkili ve başarılı tedavi yöntemi olarak kabul edilmiştir. Kemoterapinin ana ilkesi hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeksizin tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Kemoterapötik ilaçların kanser hücrelerine karşı seçicilikleri azdır. Çünkü malign hücre ile normal insan hücresi arasında kalitatif bakımdan fazla fark yoktur. Fark daha çok kantitatif yöndedir. Bu nedenle Kemoterapötik ilaçlar kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, normal hücreleri de yok edebilmektedir (Akgün ve Nebioğlu 2006; Steichen vd., 2013). Kemoterapötik ajanların ayrıca çoğu zayıf çözünürlük özellikli ve bu nedenle düşük biyoyararlanıma sahiptir (Rodzinski vd., 2016). Kemoterapötik kullanımlarına bağlı olan başka bir sorun ise, kontrollü salım ve hedeflenmiş bir tedavi olmaması, etkin bir tedavi için yüksek dozlara ihtiyaç duyulması ve bunun sonucunda toksisitenin artmasıdır. Konvansiyonel kemoterapi ile kanser hücrelerini tamamen yok etmek genellikle mümkün olamamakta ve tedavi süresince ilaca direnç gelişmesi ile sonuçlanabilmektedir. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için kontrollü salım ve spesifik hedefleme sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Shirakura 2015; Rodzinski vd., 2016; Pan vd., 2019).

## **2.2. Letrozol**

### **2.2.1. Tanımı**

LTZ, özellikle hormona bağılı meme kanserlerinin tedavisinde kullanılan bir anti-kanser maddedir (Annapurna vd., 2019). LTZ, selektif nonsteroidal aromataz inhibitörlerinin üçüncü jenerasyonunda yer almaktadır. LTZ, postmenopozal kadınlarda östrojen sentezini etkili bir şekilde inhibe eder ve genellikle pozitif hormon reseptörüne bağılı meme kanseri adjuvan tedavisinde kullanılmaktadır. (Shuling vd., 2019). LTZ ayrıca metastatik ve lokal ileri meme kanseri, pozitif hormon reseptörü postmenopozal durumdaki kadın hastalarda ilk basamak tedavide kullanılmaktadır. Tamoksifen tedavisinden sonra relaps ya da progresyon gösteren meme kanserli postmenopozal kadınların tedavisinde LTZ kullanılmaktadır (http-1). Bunun dışında LTZ ve diğer aromataz inhibitörlerinin over kanseri tedavisi için yürütülen çalışmaları ve denemeleri olumlu sonuçlar vermiştir. Ancak günümüzde bu amaç için yaygın olarak kullanılan bir aromataz inhibitörü bulunmamaktadır (Heinzelmann-Schwarz vd., 2018). LTZ antikanser özelliği dışında ovulasyon indikasyonu için kullanılabilir (Kar, 2013).

LTZ ilk kez 1998 yılında, postmenopozal kadınlarda pozitif hormon reseptörüne bağılı veya bilinmeyen meme kanserleri tedavisi için ikinci tedavi planı olarak Amerika Birleşik Devletleri, Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. 2000 yılında ise pozitif hormona bağılı ve bilinmeyen, lokal veya metastatik meme kanseri tedavisi için LTZ'ün ilk ticari şekilleri FDA'ya sunulmuştur (Cohen vd., 2002). LTZ, ilk kez Novartis tarafından Femara® ticari adıyla piyasaya sunulmuştur (Vosooghi vd., 2014; http-1).

### **2.2.2. Letrozol'ün farmakolojik özellikleri**

Aromataz enzimi, sitokrom P450 enzim kompleksi süper ailesinin bir mikrozomal üyesidir. Aromataz enzimi, 19C'lu androjenlerin aromatik 18C'lu östrojenik steroidlere dönüştürülmesinde birbirini izleyen üç hidroksilasyon reaksiyon basamağı katalize ederek östrojenlerin sentezlenmesini sağlamaktadır. Östrojen sentezini engellemek için aromataz inhibitörlerinin ajanları kullanılmaktadır. Üç kuşak olarak aromataz inhibitörleri bulunmaktadır. Birinci kuşakta aminoglutetimid yer alırken ikinci kuşakta fadrozol ve formestan yer almaktadır. Üçüncü kuşakta ise, anastrozol, LTZ ve eksemestan olmak üzere toplam üç etken madde yer almaktadır. Anastrozol ve LTZ nonsteroidal

olurken eksemestan ise steroidal bir ajandır. Birinci kuşak ve ikinci kuşak aromataz inhibitörleri düşük etkinliği ve ağır yan etkilerinden dolayı kullanımdan kaldırılmıştır. LTZ ve anastrozol geri dönüşümlü, güçlü ve selektif aromataz inhibitörleridir (Holzer vd., 2006; Requena vd., 2008).

LTZ, androjenlerin periferik dokulardan östrojenlere dönüşümünü engeller ve tüm dokularda östrojen biyosentezinin azalmasına neden olmaktadır. Gastrointestinal sistemden kolayca ve tamamen emilmektedir. Karaciğerde sitokrom P-450 izoenzimleri (CYP3A4 ve CYP2A6) tarafından farmakolojik olarak metabolize edilerek inaktif bir karbinol metabolitine dönüşür ve daha sonra glukoronit olarak idrarla atılır (Haynes vd., 2003; Buzdar vd., 2006). LTZ'ün terminal eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 2 gündür ve günlük 2.5 mg dozlamadan sonra kararlı plazma konsantrasyonuna 2-6 hafta içinde ulaşılır. LTZ büyük bir dağılım hacmine (yaklaşık 1.9 L / kg) sahiptir ve proteinlere zayıf bir şekilde bağlanmaktadır (Al-Shehri vd., 2019).

Üçüncü kuşak aromataz inhibitörlerinin, pozitif hormon reseptörüne (HR+) bağlı meme kanserinin ilerlemesini geciktirme açısından tamoksifen'den daha üstün oldukları kanıtlanmıştır (Barnadas vd., 2011). Bazı çalışmalara göre ise, LTZ, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak terapötik potansiyelleri diğer aromataz inhibitörlerine göre yüksektir (Nantasenamat vd., 2013). Buna göre LTZ hem diğer aromataz inhibitörlerine göre hem de temoksifene göre üstünlükler taşımaktadır.

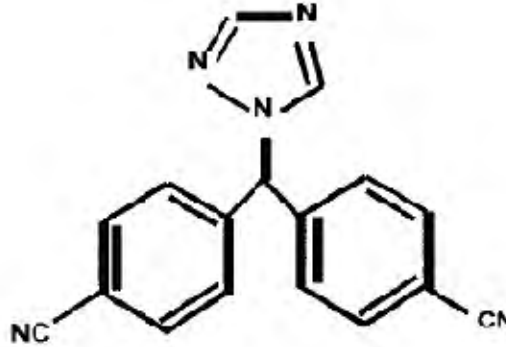
### **2.2.3. Letrozol'ün yaygın yan etkileri**

LTZ, birçok yan etkilere neden olan bir etken maddedir. Yaygın olarak oluşturduğu bazı yan etkileri arasında; sıcak basmaları, yüzde veya göğüste sıcaklık veya kızarıklık, baş ağrısı, baş dönmesi, halsizlik, kemik ağrısı, kas veya eklem ağrısı, kilo alımı, terleme, kandaki kolesterolün artması, ağız ve dudakların enflamasyonu, saç kaybı, yüksek kan basıncı, ishal ve hazımsızlık şeklinde sıralanabilmektedir (http-2).

### **2.2.4. Letrozol'ün fizikokimyasal özellikleri**

LTZ, beyaz ila sarımsı kristal ve pratik olarak kokusuz bir tozudur. Diklorometan ve metanolda serbestçe çözünürken etanolde hafifçe çözünür ve suda hemen hemen çözünmez. Molekül ağırlığı 285.31, ampirik formülü  $C_{17}H_{11}N_5$  ve erime derecesi  $184^{\circ}C$ -

185°C' aralığındadır. LTZ, kimyasal olarak 4,4'-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethylene)bis-benzonitril, şeklinde isimlendirilmektedir (Şekil 2.1) (Buzdar vd., 2006; Bhatnagar, 2014).



*Şekil 2.1. Letrozol kimyasal yapısı (Buzdar vd., 2006).*

#### **2.2.5. Letrozol yüklü nanopartiküller ile yapılan çalışmalar**

Nerella vd, yaptığı çalışmada, LTZ içeren katı lipid nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında sıcak homojenizasyon ve ardından ultrasonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Katı lipid dolgusu olarak Trimiristin maddesi kullanılmış, yüzey etkin madde olarak soya fosfatidil kolin ve Tween 80 karışımı kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda *in vitro* salım profili ile 24 saatlik süre boyunca uzatılmış salım sağlandığını gösterilmiştir (Nerella vd., 2014).

Saboktakin vd.'lerinin yaptığı çalışmada, LTZ yüklü biyobozunur nanopartikül hazırlanmış ve karakterizasyonları yapılmıştır. Çalışmada emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, LTZ içeren nanopartiküllerin salım süresi önemli ölçüde artmış ve meme kanseri tedavisi için daha fazla araştırma potansiyeli taşımıştır (Saboktakin vd., 2010).

Mondal vd.'lerinin yaptığı çalışmada, LTZ yüklü biyobozunur nanopartikülleri tasarlanmıştır. Çalışmada biyolojik olarak parçalanabilen poli (d, l-laktit-ko glikolit) polimeri seçilmiştir. Nanopartiküllerin hazırlama yöntemi olarak nano çöktürme yöntemi kullanılmıştır (Mondal vd., 2008).

Dey vd, yaptıkları çalışmada, meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere LTZ yüklü biyobozunur nanopartikül ilaç taşıyıcı sistem hazırlanmasında ve değerlendirmesinde çalışmıştır. Dey, LTZ yüklü nanopartikülleri hazırlamak için poli

(laktit-ko-glikolit) (PLGA) polimeri kullanmıştır. Çözücü ve yüzey etken madde olarak metilen klorür ve polivinil alkol kullanılmıştır. Formülasyon, emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller üzerinde, partikül boyutu, zeta potansiyeli, kızılötesi çalışmaları, ilaç yükleme etkinliği ve *in vitro* salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin, ortalama boyutu 64 nm ile 255 nm arasında, ilaç yükleme verimliliği ise (% 68 ile % 82) olarak bulunmuştur. İlacın yüzdesinin partikül büyüklüğü ve salım profilini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir (p <0.05). LTZ yüklü poli (laktit-ko-glikolit) nanopartiküllerin salımı önemli ölçüde artmış ve meme kanseri tedavisi için daha fazla araştırmalara ihtiyaç duyulmuştur (Dey vd., 2009).

Gomathi vd.'lerinin yaptığı çalışmada, antikanser özellik taşıyan LTZ, çapraz bağlama maddesi sodyum tripolifosfat ve kitosan polimeri kullanılarak nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin yapısal özellikleri ve karakteristik özellikleri incelenmiştir. (Gomathi vd., 2017).

### 2.3. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kontrollü salım bilimi, 1940'ların ve 1950'lerin başlarına kadar uzanmaktadır. 1950'lerde, deniz antifoulantlarının kontrollü salım ürünleri ilk geliştirilen kontrollü salımlı ürünleri olarak kabul edilmektedir (Rajesh 2016). 1950-1980 yılları arasında kontrollü oral ve transdermal salım sistemleri geliştirilmesine ve kontrollü salım mekanizmalarının oluşturulmasına odaklanılmıştır. 1980-2010 yılları arasında uzatılmış salım sağlayan formülasyonların, sıfır dereceli salım sistemlerinin ve nanoteknolojiye dayalı salım sistemlerinin geliştirilmesine önem verilmiştir (Park 2015).

Son yıllarda, salım üstünlüklerine bağlı olarak yeni ilaç geliştirilmesinde, pazarlanmasında ve tanınmasındaki ortaya çıkan yüksek maliyetler ve komplikasyonların üstesinden gelebilmek için kontrollü salımlı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine daha fazla önem verilmiştir (Deepu vd., 2014; Jethara, 2015).

Kontrollü ilaç salım sistemleri, dolaşımda uzun bir süre boyunca öngörülebilir ve tekrar edilebilir kinetiklerde kontrollü ilaç salımını sağlamak için tasarlanmıştır (Vikas vd., 2011). İlacın geleneksel dozaj formunda kullanımları sık ve tekrarlanan dozda söz konusudur. Sisteme salımı gerçekleşen etkin maddenin yeter miktarın altına düşmesi veya toksik düzeyin üstüne çıkması halinde istenmeyen durumlar söz konusu olabilir (Tüylek, 2017). Bu istenmeyen sorunların üstesinden gelebilmek için kontrollü ilaç salım sistemlerinin kullanımlarına yönelinmektedir. Kontrollü ilaç salım sistemleri, dozlama aralığının azaltılması, hastanın terapötik uyuncunun sağlanması, advers ve istenmeyen yan etkilerin minimum düzeye indirilmesi, spesifik ve hedefe yönelik tedavi sağlanması gibi önemli üstünlükler sergilemektedir.

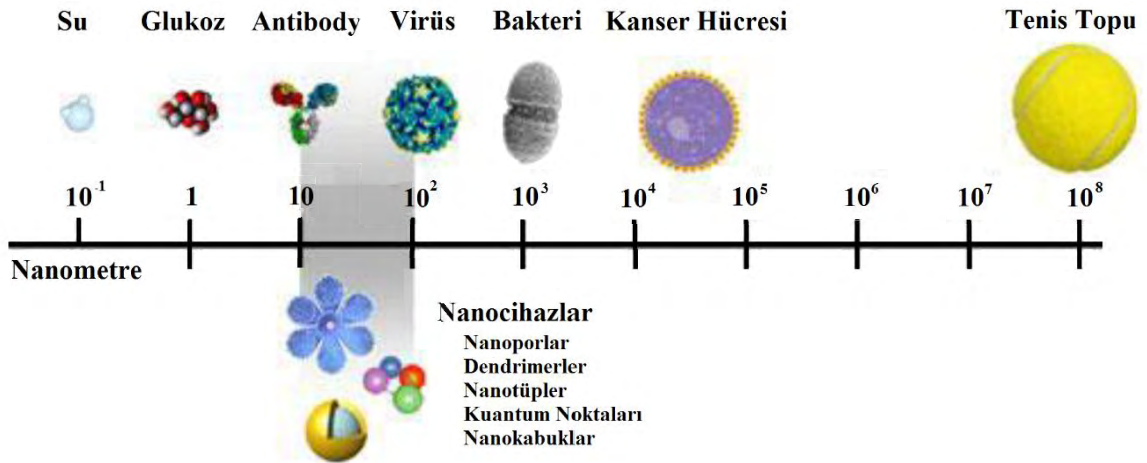
Kontrollü ilaç salım teknolojisi, insan sağlığına katkıda bulunan multidisiplinli bilimsel yaklaşımları içeren en önemli ve en hızlı gelişen alanlardan biridir. Kemoterapötik ilaçlar, immünosupresanlar, antienflamatuar ajanlar, antibiyotikler, opioid antagonistler, steroidler, hormonlar, anestezikler ve aşılar dahil olmak üzere çeşitli ilaç sınıfları kontrollü salım ilaç uygulamalarından faydalanabilmektedir. Kontrollü salım sistemleri, ilacın arzu edilen şekilde ulaşmasını, en uygun zaman boyunca ve en uygun dozajda durmasını sağlamaktadır (Shiwei, 2007).

## 2.5. Nanoteknoloji

### 2.4.1. Tanım

“Nano” terimi eski Yunanca "nannos" kelimesinden gelir ve “cüce” anlamına gelmektedir. “Nano” bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri olarak tanımlanmaktadır (Turgut vd., 2015). Günümüzde nano sözcüğü birçok modern bilimlere için popüler bir etiket haline gelmiş ve son zamanlarda nanometre, nano ölçekli, nanobilim, nanoteknoloji, nanoyapı, nanotüp ve nanorobot gibi terimler artık sözlüklerde görülmeye başlamıştır. Bunun dışında henüz geniş bir şekilde tanınmayan birçok “Nano” ön ekli kelimeler, bilimsel yayınlarda kullanılmaktadır. Bunlar arasında nanoelektronik, nanokristal, nanoanten, nanokatmanlar, nanofiber, nanomıknatıs, nanogözenekli, nanolitografi, nanomodelleme, nanokapsülleme vb, bulunmaktadır (Buzea vd., 2007).

Nanoteknoloji, yaklaşık olarak 1 ila 100 nm boyutundaki son derece küçük yapıların, tasarımı, sentezi, karakterizasyonu, kontrolü ve uygulamaları ile ilgilenen bilimdir (Nikalje, 2017). Nanoteknoloji, maddeyi atom ve molekülleri seviyesinde manipüle etme ve kontrol etme yeteneğine sahip olan bir bilimdir. Nano-ölçekte malzemelerin özellikleri makroskopik ölçekten tamamen farklı olup nano-ölçeğe yaklaştıkça birçok özel ve yararlı olay ve yeni özellikler ortaya çıkar. Maddeyi nanometre seviyesinde manipüle ederek ve ortaya çıkan farklı ve değişik özellikleri, kullanarak yeni teknolojik nano-ölçekte aygıt ve malzemeler üretilmesi mümkün olmuştur (TÜBİTAK, 2004).



Şekil 2.2. Bazı nano ölçekli yapılar (Nikalje, 2017)

#### 2.4.2. Tarihçe

Nanoteknoloji öneminin ilk ortaya çıkışı 1950'lerin sonlarına denk gelmektedir. Amerikan Nobel Ödül'ü sahibi fizikçi Richard P. Feynman, 29 aralık 1959'da Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde yapmış olduğu konuşmaya dayanarak nanoteknoloji vizyonu ve önemi hakkında bilgi veren ilk kişi olarak birçok nanobilim alanındaki araştırmacı tarafından kabul edilmektedir. Feynman, “aşağıda çok yer var” başlığı altında yaptığı konuşmasında malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilebilmesi için öngörülme ve başarılma olasılıkları hakkında bahsetmiştir. Feynman, ayrıca minyatürize edilmiş enstürümanlar ile nano yapıların ölçülebileceğini ve farklı amaçlar için kullanılabilmeleri hakkında tahminlerini ve düşüncelerini ortaya koymuştur. Feynman'ın tarihi konuşmasında kısaca, bir şeyleri küçük boyutlarda manipüle etme ve kontrol etmenin mümkün olduğunu vurgulamıştır (Ochekpe vd., 2009; Hulla vd., 2015).

Richard P. Feynman, nanoteknolojinin vizyonunu ortaya koymuş, ancak nanoteknoloji terimini kullanmamıştır. Feynman'ın tarihi konuşmasından yaklaşık 15 yıl sonra, Japon bilim adamı Dr. Norio Taniguchi, nanometre üzerinde meydana gelen yarı iletkenlik prosesleri tanımlamak için “nanoteknoloji” terimini ilk kullanan kişi olarak kabul edilmiştir (Hulla vd., 2015).

Nanoteknoloji, esas olarak malzemelerin veya cihazların bir atom veya molekül boyutunda işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve deformasyonundan söz etmektedir. Buna bağlı olarak bilim adamları on yıllarca nanopartiküllerle çalışmışlar, ancak partiküllerin boyutunu küçülttükçe inceleme ve görme sorunu ile karşılaşmışlardır. Buna bağlı olarak çalışmaların etkinliği ve verimliliği sınırlı kalmıştır. 1981'de Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından Taramalı Tünelleme Mikroskobu'nun icat edilmesi ve daha sonra 1986'de Gerd Binnig, Calvin Quate ve Christoph Gerber tarafından Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun icat edilmesiyle, nanoteknolojinin gerçek ve altın dönemi başlamıştır (Schaming ve Remita 2015). Nanoteknolojinin gelişme süreci Çizelge 2.1.de kısaca özetlenmektedir.

**Çizelge 2.1.** Nanoteknolojinin tarihsel gelişimi (Nikalje, 2017).

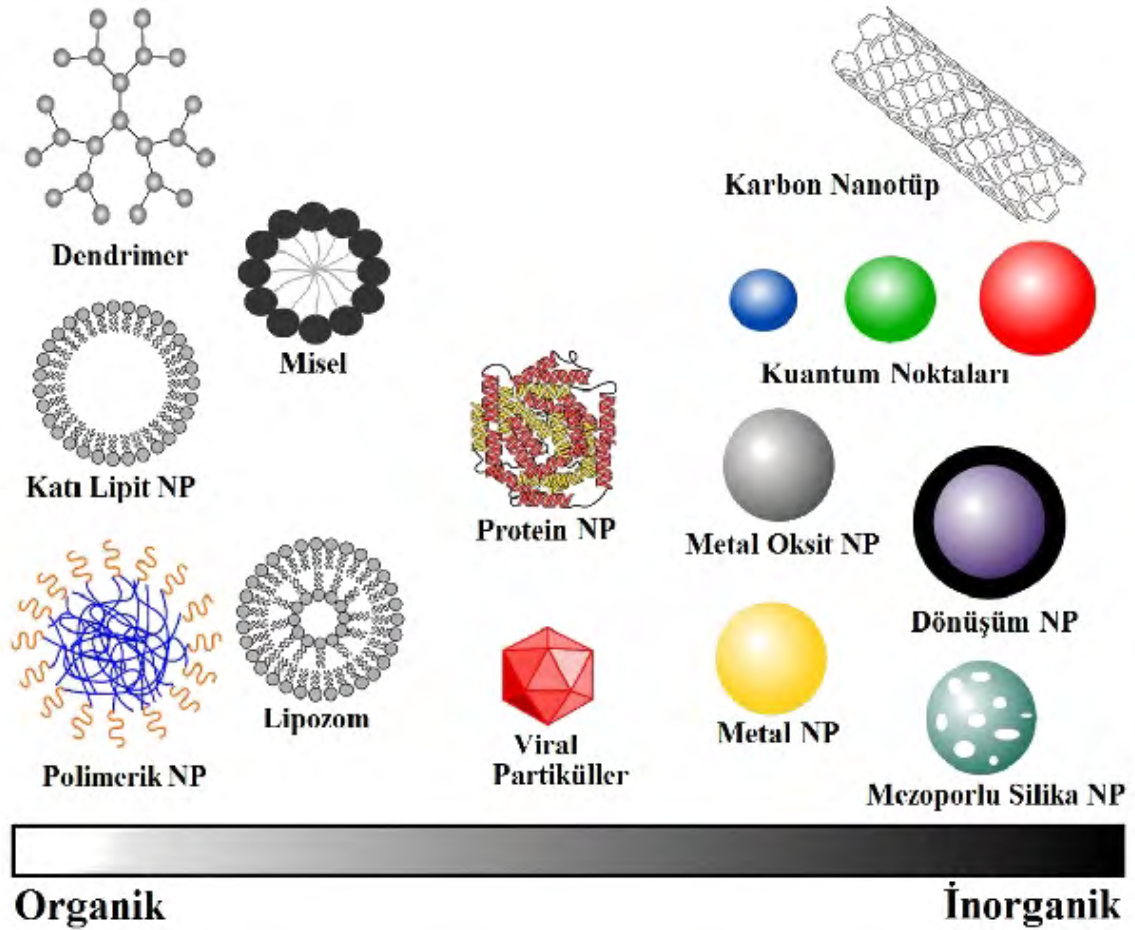
| Tarih     | Nanoteknolojide gelişme                                                                                                                                                       |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1959      | R. Feynman tarafından nanoteknolojinin vizyonunun ortaya koyması                                                                                                              |
| 1974      | Nanoteknoloji teriminin Taniguchi tarafından ilk kez kullanılması                                                                                                             |
| 1981      | (IBM) Taramalı Tünelleme Mikroskobu'nun icadı                                                                                                                                 |
| 1985      | Buckminster fulleren keşfi                                                                                                                                                    |
| 1986      | Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun icadı                                                                                                                                            |
| 1991      | Karbon nanotüpünün keşfedilmesi                                                                                                                                               |
| 1999      | R. Freitas tarafından ilk "Nano Tıp" kitabının yayınlanması                                                                                                                   |
| 2000      | Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'nin başlatılması                                                                                                                                |
| 2001      | Nanometre ölçekli elektronik cihazların teorisini geliştirmek ve karbon nanotüplerin ve nanotellerin sentezi ve karakterizasyonu için Nanoteknolojide Feynman Ödülü verilmesi |
| 2004      | İleri nanoteknoloji konusunda ilk politika konferansı yapılması.<br>İlk nano mekanik sistemlerin merkezinin kurulması                                                         |
| 2005-2010 | Robotik, 3D ağ ve kullanım sırasında durumlarını değiştiren aktif nano ürünler gibi 3D Nanosistemler hazırlanması.                                                            |
| 2011      | Moleküler nanoteknoloji dönemi başlaması                                                                                                                                      |

#### 2.4.3. Nanoteknoloji ve kanser tedavisi

Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yaklaşımlar kanser tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerdir. Cerrahi yöntemler, kanserli dokunun rezeksiyonundan ibarettir. Organ kaybı, kanserin tekrarlama riski ve tüm kanser tiplerine uygulanamaması bu yöntemin sakıncaları arasında yer alır. Radyoterapi yönteminde ise, kanser hücreleri özgün frekans bandında ve özgün şiddette radyasyon ile yakılmaktadır. Kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerin de zarar görmesi, radyasyon dağılımının tüm kanser hücrelerine eşit yoğunlukta olmaması ve radyasyona maruz kalan dokuda fonksiyon kaybı oluşması gibi sakıncalar ile karşılaşılabilir. Kemoterapide ise kanser hücreleri üzerinde toksik etkisi bulunan ilaçlar ile öldürülmesi, kanser hücrelerinin çoğalmasını sağlayan mekanizmaların ortadan kaldırılması ile hedeflenmektedir. Ancak kemoterapötik ilaçlar tümör hücreleri üzerinde etki ettikleri gibi sağlıklı dokular üzerinde de etki göstermektedir (Oylar ve Tekin 2011).

Nanoteknoloji, tıp dahil olmak üzere çeşitli araştırma alanlarında önemli ilgi görmüştür. Nanoteknoloji, kanser tedavisinde hem kanserin teşhisi hem de tedavisinde umut verici potansiyel uygulamalara sahiptir. Son çalışmalarda, çeşitli nanopartiküllerin hedeflenen kanser dokusuna verilen ilacın salımının geliştirilmesiyle ilacın yan etkilerinin minimum düzeye azaltıldığı gösterilmiştir (Kumari ve Kondapi 2016).

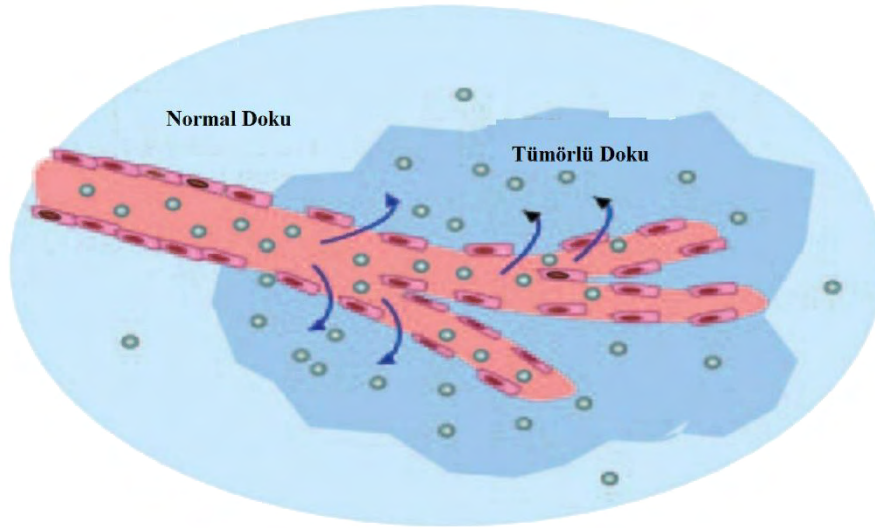
Antikanser maddeleri içeren nanotaşıyıcı sistemler, tümör hücresi çoğalması ve hayatta kalmasından sorumlu olan özgün moleküllerin işlevine müdahale ederek kanserin büyümesini engellemektedir. Antikanser içeren nanotaşıyıcı sistemler, sağlıklı dokulara zarar vermeden sadece kanser patogenezinin sorumlu olan moleküller üzerinde etki gösteririr. Bunun dışında, ilaç verimliliği konusunda canlı araçlar nano ölçeklendirmeye kadar tasarlanabilmektedir. İlaç hedeflemesinde aktif ve pasif olmak üzere iki tür hedeflemeden bahsedilebilir (Wang vd., 2008; Atasoy ve Başaran 2019).



**Şekil 2.3:** Kanser tedavisinde kullanılan kontrollü salım sağlayan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler (Atasoy ve Başaran 2019).

#### 2.4.3.1. Nanotaşıyıcılarla pasif tümör hedefleme

Pasif tümör hedefleme, antikanser ilaçların hastanın vücudundaki kanserli bölgelerin içine veya çevresinde nasıl toplanabileceğini açıklayan yöntemlerden biridir. Pasif tümör hedeflemede nanotaşıyıcılar, ilaçların geçirgenliğini ve hedef bölgede tutulmasını arttırmaktadır (Şekil 2.4). Çok küçük boyutlu nanopartiküller kan damarlarının endotel duvarında bulunan tümör dokularına kolayca nüfuz etmesini sağlamaktadır. Tahribata uğrayan lenfatikler ve kan vasküler sistemi, nanopartiküllerin tümör hücrelerinin içinde birikmesine izin vermektedir. Böylece tümör hücrelerinde ilaç konsantrasyonunu artmasına neden olmaktadır (Wang vd., 2008). Değer yandan tümör olmayan bölgeye ve sağlıklı vasküler sisteme, nanoparçacıkların nüfuz etmesine izin vermez ve bunun sonucunda normal ve sağlıklı hücrelerin korumasına sebep olmaktadır (Bergmann vd., 2017).



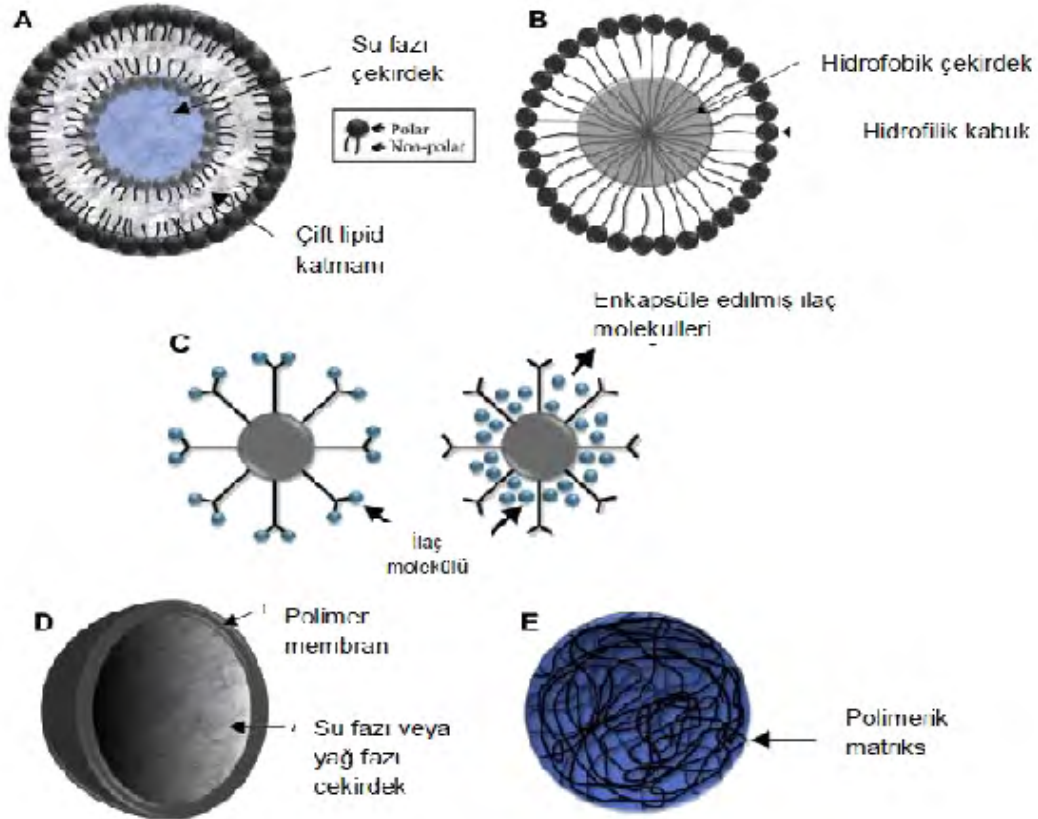
Şekil 2.4. Nanoparpartikül taşıyıcı ilaçlarla tümörlü dokuya pasif hedefleme (Wang vd., 2008).

#### 2.4.3.2. Nanotaşıyıcılarla aktif tümör hedefleme

Aktif tümör hedeflemede, ilaçlar, belirlenen belirli bir tümörün özgün antijenlerine monoklonal antikorlar yardımıyla doğrudan bağlanmaktadır. Aktif hedeflemede nanopartiküller, kanserli hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak kanser hücrelerini nanopartikülleri içlerine almaya teşvik ederler. Sonuç olarak aktif ve pasif hedefleme, terapötik oranı arttırmakta ve ilacın yan etkileri azaltmasında yardımcı olmaktadır (Bergmann vd., 2017).

## 2.5. Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 1  $\mu\text{m}$ 'den daha küçük boyutta olan doğal veya sentetik polimerler, lipidler, fosfolipitler gibi çeşitli biyolojik olarak bozunabilir malzemelerden oluşan küçük parçacıklardır (Gültekin ve Değim, 2013). Nanopartiküller, terapötik ajanların hedefli bölgeye uygulanması ve kontrollü veya uzatılmış salım sağlanması için tasarlanabilmektedir (Kumar vd., 2017). Nanopartiküller, etkin madde dozlama sıklığını azaltarak ilacın yan etkilerinin en aza indirilmesinde önemli bir potansiyel etki göstermektedir. Son zamanlarda, nanopartiküllerin gösterdiği yüksek etkinlik ve taşıdığı tedavi potansiyeli nedeniyle birçok araştırmacıyı cezbetmiştir (Patravale ve Mandawgade, 2008). Nanopartiküller kapsamında en çok kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında miseller, lipozomlar, dendrimerler, nanoküreler ve nanokapsüller bulunmaktadır. Şekil 2.5. bazı nanopartikül taşıyıcı sistemleri göstermektedir.



**Şekil 2.5.** Nanopartiküller: (A) lipozom, (B) misel, (C) fonksiyonelleştirilmiş (solda) ve ilaç enkapsüle edilmiş dendrimerler (sağda), (D) nanoküre ve (E) nanokapsül (Demir ve Çapan 2013)

### 2.5.1. Polimerik nanopartiküller

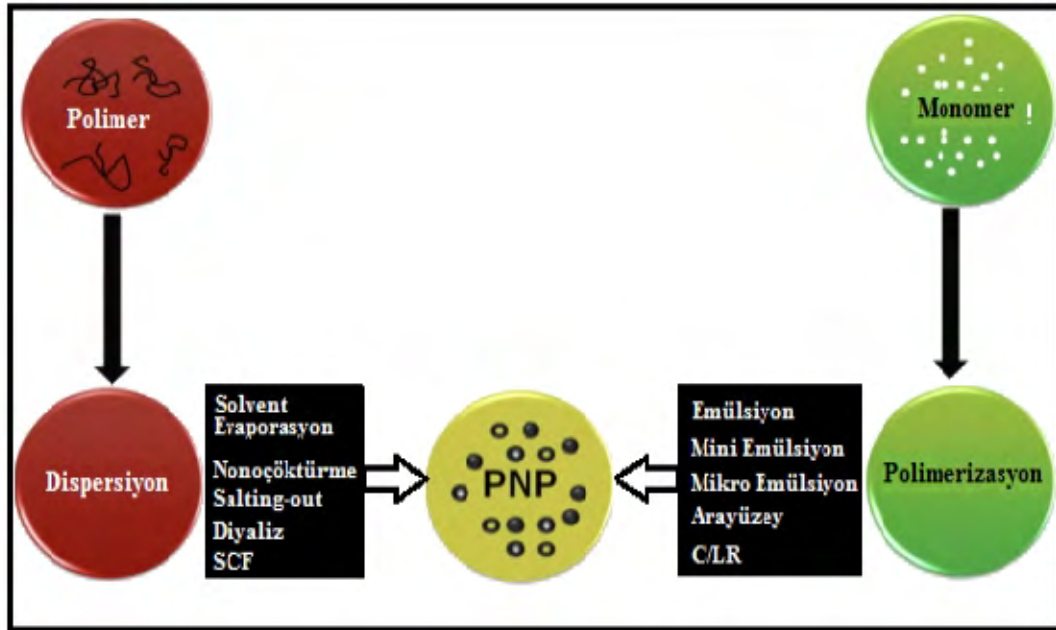
Polimerik nanopartiküller, ilacın yüklenmesi, çözünmesi, kapsüllenmesi veya bir nanopartikül matrisine bağlanması için 10-1000 nm arasındaki biyolojik olarak uyumlu olan ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden hazırlanan nanotaşıyıcı sistemlerdir (Soppimath vd., 2001; Nagavarma vd., 2012). Polimerik nanopartiküller, kolayca biyoparçalanabilme özellikleri sayesinde ilaç salımında kullanılan en büyük nanomalzeme kategorisidir. Polimerik nanopartiküllerin, salım profilleri, moleküler ağırlıkları, yüzey hidrofiliği / yükü ve serbest fonksiyonel gruplarının değiştirilmesiyle kolayca ayarlanabilir (Yang 2015). Polimerik nanopartiküller, yalnızca ilacın toksisitesini azaltmakla kalmamakta, aynı zamanda normal dokuları çevreleyen antikanser maddelerin sudaki çözünürlüğünü de artırabilmektedir (Louage vd., 2015; Banik vd., 2016). Nanopartiküllerin polimerik yapıları, etkin maddenin hedeflendirilmesinde uzatılmış ve kontrollü salım sağlanmasında yardımcı olmaktadır. Hedeflenen bölgeye verilenden sonra günler hatta haftalar süren etkin madde salımına imkan verirler. (Derman vd., 2013).

Polimerik nanopartiküllerin taşıdığı üstünlükler arasında;

- Çeşitli yöntemlerle ucuz ve kolay imal edilebilme
- Uçucu farmasötik ajanların stabilitesinde artış
- Verimlilik ve etkililik açısından oral ve intravenöz konvansiyonel uygulama yöntemlerine göre belirgin iyileşme
- İstenilen bölgeye daha yüksek konsantrasyonda farmasötik madde taşınma imkanı
- İlaç salımının değiştirilmesi ne imkan sağlamaları
- Uzun salımlı kanser ilaçları, aşılar, kontraseptifler ve hedefli antibiyotiklerin için ideal taşıyıcı sistemler oluşturmaları
- Doku mühendisliği gibi ilaç salımıyla ilgili diğer faaliyetlere kolayca dahil edilebilmeleri sayılabilmektedir (Selvakumaran ve Muhamad, 2014).

### 2.5.1.2. Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri

Polimerik nanopartiküller, uygulama amaçlarına ve ilacın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli yöntemlerle sentezlenebilmektedir (Crucho ve Barros 2017). Polimerik nanopartiküller, genellikle monomerlerin polimerizasyonu veya önceden oluşturulmuş polimerlerin işlenmesiyle hazırlanmaktadır. Uygun bir yöntem seçilmesi, belirli bir uygulamada istenen özelliklere sahip polimerik nanopartiküllerin elde edilmesi için hayati bir rol oynamaktadır (Canfarotta vd., 2013; Crucho ve Barros, 2017). Polimerik nanopartiküllerin önceden oluşturulmuş polimerlerden hazırlanması için çözücü buharlaştırma yöntemi, tuzla çöktürme yöntemi, diyaliz, nanoçöktürme yöntemi ve süperkritik akışkan teknoloji yöntemi en çok kullanılan yöntemlerdir (Rao ve Geckeler, 2011). Ayrıca polimerik nanopartiküller mikroemülsiyon, mini-emülsiyon, yüzey etkin madde içermeyen emülsiyon ve yüzeyler arası polimerizasyon gibi çeşitli polimerizasyon yöntemleri kullanılarak monomerlerin polimerizasyonu ile doğrudan hazırlanabilmektedir (Vauthier ve Bouchemal, 2009). Monomerlerin polimerizasyonu ve hazır polimerlerin dispersiyonu ile nanopartikül oluşturma yöntemleri Şekil 2.6.da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan başlıca yöntemler (Derman vd., 2013).

#### **2.5.1.2.1. Çözücü buharlaştırma yöntemi**

Çözücü buharlaştırma yöntemi, polimerik nanopartikülleri hazırlamak için geliştirilen ilk yöntemdir (Derman vd., 2013). Bu yöntemde, polimer çözeltileri uçucu çözücüler içinde hazırlanıp emülsiyonlar haline getirilmektedir. Geçmişte, diklorometan ve kloroform çözücüler yaygın olarak kullanılırken yeni çalışmalarda toksikolojik açıdan profili daha iyi olan etil asetat daha çok tercih edilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011). Çözücü buharlaştırma yöntemi, mevcut literatürdeki önceden hazırlanmış polimerlerden polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için en yaygın kullanılan yöntemdir. Geleneksel yöntemlerde, emülsiyonların oluşumu için tekli emülsiyon (yağ/su) veya çift emülsiyon (yağ/su/yağ) olmak üzere iki ana yöntem uygulanabilmektedir. Emülsiyon, polimer çözücüsünün buharlaştırılması sonucunda nanopartikül süspansiyonuna dönüştürülmektedir (Kumari, 2019). Bu yöntemler, yüksek hızda homojenizasyon veya ultrasonifikasyon ile gerçekleştirilmektedir. Çözücü, oda sıcaklığında devamlı olarak manyetik karıştırıcı altında karıştırılarak ve düşük basınç altında uçurulmaktadır. Çözücü buharlaştırıldıktan sonra, katılaşmış nanopartiküller yıkanıp santrifüj ile toplanabilir, ardından uzun süreli depolama için dondurularak kurutulabilmektedir (Pinto Reis vd., 2006).

#### **2.5.1.2.2. Emülsifikasyon / çözücü difüzyon yöntemi**

Emülsifikasyon-çözücü difüzyon yöntemi, Leroux vd, tarafından ilk kez tanımlanmıştır (Mahapatro ve Singh, 2011). Bu yöntemde polimer diklorometan veya kloroform gibi bir organik çözücü içinde çözündürülmektedir. Etkin madde ise polimer çözeltileri içerisinde çözündürülür veya disperse edilir ve bu karışım jelatin, poli(vinilalkol), polisorb-80, poloksamer-188 gibi çeşitli sürfaktan/emülsifiye ajanı kullanılarak yağ/su emülsiyonu elde etmek amacıyla sulu faz içerisinde emülsifiye edilmektedir. Stabil emülsiyon oluştuktan sonra organik çözücü basınç altında veya sürekli karıştırma ile buharlaştırılır. Suda çözünen ilaç yüklü nanopartikülleri hazırlamak için (su/yağ/su) yöntemi kullanılmaktadır (Mahapatro ve Singh, 2011; Demir ve Çapan, 2013). Emülsifikasyon-çözücü difüzyon yöntemi, yüksek kapsülleme verimliliği, homojenizasyon gerekmemesi, yüksek tekrar üretilebilirliği, ölçeklendirme kolaylığı, hazırlama kolaylığı ve dar boyut dağılımı gibi birçok üstünlükler taşımaktadır (Tyagi ve

Pandey, 2016). Suda çözünürlük konsantrasyonu arttıkça daha küçük parçacıklı nanopartiküllerin boyutlarına ulaşılabilir (Mahapatro ve Singh, 2011).

#### **2.5.1.2.3. Tuzla çöktürme (Salting out) yöntemi**

Bu yöntemin prensibi, polimer ve etkin madde çözücü içinde çözündürüldükten sonra salting-out ajanı ve kolloidal stabilizatörü içeren bir çözelti içerisinde karıştırılarak emülsiyon haline getirilmektedir. Salting-out ajanı olarak magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve magnezyum asetat gibi elektrolitler kullanılabilir. Çözeltide kullanılacak çözücü su ile karışabilirliği iyi olması gerektiği için bu özelliği taşıyan aseton daha çok kullanılmaktadır (Vauthier ve Bouchemal, 2009). Bu işlemde, tuzlama maddeleri kapsüllenmiş ilaç nanopartiküllerinin üretiminde önemli bir rol oynamaktadır. Tuzlar başlangıçta organik fazın sulu çözeltiye karışabilirliğini engelleyerek emülsiyon oluşturulmasında rol oynamaktadır. Daha sonra, ters tuzlama etkisi ile ilacın polimer matrisine yapışmasına yardımcı olarak enkapsülasyon gerçekleşmesini sağlamaktadır. Yöntemin en önemli üstünlükleri; yüksek miktarda polimer ve etkin maddenin bir araya getirilmesi, genel olarak mükemmel verimler elde edilmesi ve işlemin kolay bir şekilde yürütülmesi gibi üstünlükler taşımaktadır (Quintanar guerrero vd., 2008; Muthu 2009).

#### **2.5.1.2.4. Nano çöktürme yöntemi**

Çözücü değişimi, olarak da adlandırılan nanoçöktürme yöntemi Fessi vd. tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Nano çöktürme yöntemi, hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların kapsüllenmesi için kullanılabilir. Bunun dışında, kolay, karmaşık olmayan ve az enerji tüketen bir hazırlama yöntemidir. Nano çöktürme yöntemi, nanokürelerin üretiminde uygulanan en basit ve en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Yöntemin çalışma prensibi olarak, lipofilik çözeltideki, suyla karışabilen, yarı polar çözücünün yer değişimi sonucu polimerin arayüzeyde birikmesidir (Shirakura 2015; Hornig vd., 2009). Nanoçöktürme yöntemi, nanoparçacıklardaki ilaç yükleme verimliliğini arttırmak veya nanopartiküllerin ortalama partikül boyutunu azaltmak için yardımcı olabilmektedir (Vauthier ve Bouchemal 2009; Yadav ve Sawant, 2010 ).

#### **2.5.1.2.5. Diyaliz yöntemi**

Diyaliz yöntemi, dar dağılıma sahip küçük polimerik nanopartikülleri hazırlamak için başarıyla uygulanan bir yöntemdir (Mahalingam ve Krishnamoorthy, 2015).

Önceden hazırlanmış polimerler ve ilaç organik bir çözücü içinde çözündürülür ve uygun bir molekül ağırlığına sahip diyaliz tüplerine yerleştirilir. Çözücünün diyaliz sonucu yer değiştirmesi ve polimerin çözünürlüğünü kaybetmesi sonucunda nanopartiküller oluşmaktadır (Amoabediny vd., 2018; Crucho ve Barros, 2017; Tang vd., 2016).

#### **2.5.1.2.6. Süperkritik sıvı teknolojisi**

Süperkritik haldeki bir madde, süperkritik sıvı olarak tanımlanmaktadır. Süperkritik sıvı teknolojisinde, konvansiyonel yöntemlerde kullanılan toksik çözücülere veya sürfaktanlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Bunun için süperkritik sıvı yöntemi, çevreye karşı daha güvenli bir yöntem ve saf nanopartiküllerin hazırlanması için tercih edilen alternatif bir yöntemdir. Sıcaklığın kolay regülasyonu, basınç kontrolü, yüksek saflık derecesinde nanopartiküllerin elde edilmesi ve çözücünün minimum dereceye indirilmesi yöntemin taşıdığı bazı üstünlüklerdir (Patel vd., 2017). Yöntemin prensibi; polimer ve etkin madde süperkritik akışkan içinde çözünür. Daha sonra özel bir cihaz yardımıyla çözelti püskürtülür, çözeltinin çözücülüğü azaltılarak nanopartiküllerin çökmesi sağlanır (Nalbantoğlu vd., 2016).

#### **2.5.1.2.7. Püskürterek kurutma yöntemi**

Püskürterek kurutma; sıvı fazdan kararlı nanopartiküllerin üretilmesi için kullanılan tek aşamalı bir yöntemdir. Önceden hazırlanmış polimer ve ilaç su içinde çözündürülür ve çözücü püskürtülerek partiküller toplanır (Mahalingam ve Krishnamoorthy 2015). İşlem; atomizasyon, damlacıkların sıcak gaz ile muamelesi ve katılaştırılan tozun ayrılarak toplanması olmak üzere temelde üç adımda tamamlanmaktadır. Nano boyutlu püskürterek kurutma teknolojisi ise çığır açan bir yenilik olup çözeltilerden nano boyutlarda partikül eldesini sağlamaktadır (Demir ve Değim, 2016)

#### **2.5.1.2.8. Konvansiyonel emülsiyon polimerizasyon yöntemi**

Bu konvansiyonel sistemde, ortam; yüzey etken madde, su, suda düşük çözünürlüğü olan bir monomer ve suda çözünen bir başlatıcı bileşenlerden oluşmaktadır. Kolloidal stabilizatörler olarak elektrosterik, elektrostatik, sterik veya her ikisinde kullanılabilir. Sürekli sulu fazda çözünen monomer molekülü, serbest radikal ya da iyon olabilen bir başlatıcı molekül ile çarpıştığında başlatma ortaya çıkmaktadır.

Alternatif olarak, yüksek enerjili ışınım yardımıyla monomer molekölü başlatıcı bir radikal haline dönüştürülebilmektedir. Katı parçacıkların oluşumu ve faz ayrımı, polimerizasyon reaksiyonunun sonlandırılmasından önce veya sonra meydana gelmektedir (Patel vd., 2017; Pan vd., 2019).

#### **2.5.1.2.9. Mikroemülsiyon polimerizasyon yöntemi**

Mikroemülsiyon polimerizasyonu, nano boyutlu polimer parçacıkların hazırlanması için yeni ve etkili dikkat çeken bir yöntemdir. Emülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyonu benzer görünse de, her iki yöntem yüksek molar kütleli koloidal polimer parçacıkları üretebilir ancak kinetik olarak karşılaştırıldığında tamamen farklıdır. Mikroemülsiyon polimerizasyonunda, şişirilmiş miseller içeren termodinamik olarak kararlı bir mikroemülsiyonun sulu fazına tipik olarak suda çözünen bir başlatıcı eklenmektedir (Rao ve Geckeler 2011).

#### **2.5.1.2.10. Mini-emülsiyon polimerizasyon yöntemi**

Su, monomer karışımı, yüzey etkin madde, yardımcı stabilizatör ve başlatıcı ajan içeren bir sistemdir. Emülsiyon polimerizasyonundan temel farkı düşük moleköl ağırlıklı bileşiklerden yardımcı stabilizatörlerden yararlanması ve yüksek parçalama cihazlarına (ultrason vb.) gereksinim duymasındır (Müderrişoğlu ve Çomoğlu., 2010).

#### **2.5.1.2.11. Yüzeyler arası polimerizasyon yöntemi**

Yüzeyler arası polimerizasyon yöntemi, iki faz arasındaki arayüzeyde ultra ince fonksiyonel katmanların, kapsüllerin, partiküllerin veya polimer iplikçiklerinin sentezlenmesine izin veren bir yöntemdir. Genellikle, polimerizasyon, birbiriyle karışmayan iki sıvı içinde çözünen iki reaktif monomerlerin arasındaki bir polikondenzasyon reaksiyonudur. Alternatif olarak, fazlardan sadece bir tanesi bir reaksiyon başlatıcıyı veya bir katalizörü (örneğin, aşırı oksitleyici ajan ) içermesi veya kendisi reaktif bir monomer olmasıdır. Bazı çalışmalarda, arayüzde bir fotopolimerizasyon için ultraviyole ışını kullanılmaktadır. Her durumda, monomer başlatıcıların iki fazda ayrılması, lokalize bir reaksiyon ve bir polimer oluşumuna neden olmaktadır (Raaijmakers ve Benes 2016).

### 2.5.1.3. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

İlaç taşıyıcı olarak kullanılacak nanopartiküllerin karakterizasyonu klinik açıdan çeşitli özellikler değerlendirilmelidir. Bu özellikler arasında partikül boyutu, partikül boyut dağılımı, zeta potansiyel değerleri, partikül morfolojisi, yüzey özellikleri, yapısal özellikleri ve çözünürlük özellikleri gibi önemli karakterizasyonlar yer almaktadır (Nalbantoğlu vd., 2016; Dağlıoğlu ve Yılmaz, 2018).

Partiküllerin büyüklüğü; ilaç salımı, nanopartiküllerin fiziksel stabilitesini ve *in vivo* dağılımını etkilemektedir. Nanopartiküllerin yüzey yükü ise, polimer dispersiyonunun fiziksel stabilitesini ve yeniden dağılılabirliğini ve *in vivo* performansını etkilemektedir (Katmıs vd., 2018).

Nanopartikül bazı karakterizasyon çalışmalarında genellikle taramalı elektron mikroskopisi (SEM), transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ve atomik kuvvet mikroskopisi gibi gelişmiş mikroskopik teknikler kullanılarak boyutları, morfolojisi ve yüzey yükleri ile karakterize edilmektedir (Pal vd., 2011). Bunlar dışında, nanopartiküllerin karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan teknikler ve cihazlar; boyut dışlama kromatografisi, sıvı kromatografisi, ultrafiltrasyon-santrifüjleme, dinamik ve statik ışık saçılımı, elektroforetik mobilite ve potansiyometre kullanılabilmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin yapısal özellikleri araştırılmasında X ışını kırınımı (XRD), diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC), fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FT-IR) ve nükleer manyetik rezonans ( $^1\text{H}$ -NMR) gibi teknikler kullanılarak analizleri gerçekleştirilmektedir (Guterres vd., 2007).

### **3. GEREÇLER**

#### **3.1. Kullanılan Maddeler**

|                          |                                 |
|--------------------------|---------------------------------|
| Aseton                   | : Merck, Almanya                |
| Asetonitril              | : Merck, Almanya                |
| Diyaliz membran          | : Sigma, Almanya                |
| Dötorokloroform          | : Merck, Almanya                |
| Etanol                   | : Merck, Almanya                |
| Eudragit® RS 100         | : Röhm Pharma, Almanya          |
| Kalsiyum klorür dihidrat | : Merck, Almanya                |
| Kollidon® SR             | : Basf Pharmaceuticals, Almanya |
| Letrozol                 | : Sigma, Almanya                |
| Metanol                  | : Merck, Almanya                |
| Potasyum klorür          | : Merck, Almanya                |
| Sodyum bikarbonat        | : Merck, Almanya                |
| Sodyum klorür            | : Riedel de Haën, Almanya       |

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

|                                               |                                                     |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Buzdolabı                                     | : Arçelik No Frost, Türkiye                         |
| Diferansiyel Taramalı Kalorimetri             | : Shimadzu DSC-60, Japonya                          |
| Distile su cihazı                             | : MilliQ Milipore, Fransa                           |
| Etüv                                          | : Elektro-mag M 5040BD, Türkiye                     |
| Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometresi | : Perkin Elmer Spektrum 2000, İngiltere             |
| Hassas Terazi                                 | : Ohaus, İsviçre                                    |
| Manyetik Isıtıcı                              | : Heidolph MR 3001K, Almanya<br>IKA®-Werke, Almanya |
| Mekanik Karıştırıcı                           | : Heidolph RZR2051 Electronic, Almanya              |
| Nükleer Manyetik Rezonans Spektrofotometresi  | : Ultra Shield CP MAS NMR, Bruker, Almanya          |
| Parçacık Büyüklüğü Analiz Cihazı              | : Zetasizer Nano Series, İngiltere                  |
| pH Metre                                      | : WTW Profi Lab pH 597, Weilheim, Almanya           |
| Püskürterek Kurutma Cihazı                    | : Büchi B-90, İsviçre                               |
| Taramalı Elektron Mikroskobu                  | : Carl Zeiss SUPRA 50VP, Almanya                    |
| Ultrasonik Banyo                              | : Elma T470/H, Almanya                              |
| Vorteks karıştırıcı                           | : Jeitech VM96B, Kore                               |
| Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi           | : Shimadzu 20-A, Japonya                            |
| Zeta Potansiyel Analiz Cihazı                 | : Zetasizer Nano Series, İngiltere                  |

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

#### 4.1.1. Letrozol ile Yapılan Çalışmalar

##### 4.1.1.1. *Termal analiz*

LTZ'ün termal analizi diferansiyel taramalı kalorimetri cihazı (DSC; DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI, ABD) kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 10°C.dk<sup>-1</sup> sıcaklık artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

##### 4.1.1.2. *Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi*

LTZ'ün fourier FT-IR analizi (Schimadzu IR Prestige, Japonya) cihazı kullanılarak, 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında analiz edilmiştir.

##### 4.1.1.3. *Nükleer manyetik rezonans analizi*

LTZ'ün yapısal özellikleri, <sup>1</sup>H-NMR analiz cihazında (Ultra-Shield™ CPMAS, NMR, Bruker, Rheinstetten, Almanya) 25°C'de, çözücü olarak döterokloroform kullanılarak incelenmiştir.

##### 4.1.1.4. *LTZ'ün yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik miktar tayini*

LTZ'ün analitik miktar tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC; Shimadzu 20 A, Tokyo, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlerde kullanılan çalışma şartları Çizelge 4.1.'de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçların güvenilirliğinin sağlanması amacı ile validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (ICH Q2A, 2005).

##### 4.1.1.4.1. *Doğrusallık*

Doğrusallık, numunedeki analitin konsantrasyonu ile doğru orantılı olan deney sonuçlarını kullanılan yöntem ile elde etme yeteneğidir. Doğrusallığın belirlenmesi için en az 5 farklı derişim noktası ile çalışılmalıdır (ICH Q2A, 2005). LTZ'ün HPLC yönteminde kullanılacak standart eğrilerinin belirlenmesi amacıyla, 5 mg etkin madde 50 ml metanol içinde çözündürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Gerekli seyreltmeler yapılarak 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µg.mL<sup>-1</sup> LTZ konsantrasyonları içerecek

şekilde hazırlanmıştır (n=6). Çözeltilerden elde edilen pik alanları kullanılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

**Çizelge 4.1.** *Letrozol'un analitik miktar tayininde kullanılan HPLC çalışma şartları*

|                             |                                                                                                                        |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Cihaz</b>                | Shimadzu-20 A                                                                                                          |
| <b>Kolon</b>                | Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (Kolon Çapı: 6.0 mm, Kolon Uzunluğu: 15.0 cm) (Partikül Çapı : 5 µm, partikül Boyutu: 100Å) |
| <b>Kolon Sıcaklığı</b>      | 25°C                                                                                                                   |
| <b>Çözücü Sistemi</b>       | Asetonitril:Distile Su [50:50, h/h]                                                                                    |
| <b>Dedektör</b>             | Shimadzu Fotodiyot Dizisi                                                                                              |
| <b>Çalışılan Dalga Boyu</b> | 240 nm                                                                                                                 |
| <b>Akış Hızı</b>            | 1.5 mL.dk <sup>-1</sup>                                                                                                |
| <b>Enjeksiyon Hacmi</b>     | 20 µL                                                                                                                  |

#### **4.1.1.4.2. Kesinlik**

Kesinlik, aynı şartlar altında aynı numunenin çoklu örneklemesinden elde edilen sonuçların ölçüm arasında dağılma derecesini ifade eder. Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile belirlenir (ICH Q2A, 2005).

Tekrarlanabilirlik, kesinlik parametresini kısa bir zaman aralığında aynı çalışma koşulları altında ifadeder. Tekrarlanabilirliği tespit etmek için, aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin alan ölçümü tekrarlanır. Bu işlem 3 farklı derişim ile gerçekleştirilmiştir (n=3).

Kesinlik çalışmasında, LTZ'nin 3 farklı derişimde (20 µg.mL<sup>-1</sup>, 50 µg.mL<sup>-1</sup>, 80 µg.mL<sup>-1</sup>) çözeltileri hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir (n=3). İşlem aynı şartlar altında üç farklı günde tekrarlanmış ve 3 günde elde edilen test sonuçları ile yöntemin gün-içi ve günler-arası tekraredilebilirlik değerleri hesaplanmıştır.

#### **4.1.1.4.3. Doğruluk**

Analitik yöntem validasyonunda doğruluk parametresi, analitik yöntem ile elde edilen test sonuçlarının asıl değere yakınlığını ifade etmektedir. Genel olarak belirlenen aralığın içinde yer alan 3 farklı konsantrasyon, en az üçer örnek olmak üzere ölçüm yapılır. Sonuçlar %verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak hesaplanmaktadır (ICH Q2A, 2005).

Doğruluk çalışmasında, 3 farklı konsantrasyonda (20 µg.mL<sup>-1</sup>, 50 µg.mL<sup>-1</sup>, 80 µg.mL<sup>-1</sup>) LTZ içeren çözelti hazırlanmıştır. Her farklı derişim için 6 kez ölçüm yapılmıştır.

#### 4.1.1.4.4. Duyarlılık

Analitik yöntemde duyarlılık, numunede saptanabilen ancak kesin bir değer olarak verilemeyen en düşük analit miktarıdır. Saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) hesaplanarak değerlendirilmektedir (Garcia vd., 2011).

LOD, analizi yapılan maddenin kalitatif olarak tespit edilebildiği en düşük derişimdir. Bu değer, görsel değerlendirme, veya sinyal-gürültü oranı ve elde edilen cevap ile eğimin standart sapması kullanılarak bulunmaktadır (ICH Q2A, 2005).

LOD değeri ICH klavuzunda yer alan eşitlik (4.1) ile hesaplanır.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{m} \quad (4.1)$$

Denklem (4.1)'deki  $\sigma$ , y eksenini kesim noktasının standart sapmasını, m ise korelasyon denkleminin eğimini gösterir (ICH Q2A, 2005).

LOQ, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile belirlenebildiği en düşük derişim olarak tanımlanmaktadır. LOD değerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler, LOQ için de uygulanabilir.

LOQ değeri ICH klavuzunda yer alan eşitlik (4.2) ile hesaplanabilir.

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m} \quad (4.2)$$

Eşitlik (4.2)'de yer alan  $\sigma$  y eksenini kesim noktasının standart sapması ve m değeri de korelasyon eşitliğinin eğimidir (ICH Q2A, 2005).

#### 4.1.1.4.5. Seçicilik

Seçicilik, karışım içerisindeki tek bir maddenin, diğer maddelerin varlığında, derişiminin tam ve doğru olarak belirlenebileceğini gösteren en önemli analitik parametrelerden biridir. Çalışmada, LTZ içermeyen boş formülasyonlar (placebo) ile

LTZ içeren formülasyonlar analiz edilerek sistemin seçiciliği etkin madde içermeyen formülasyon bileşenleri kullanılarak incelenmiştir.

#### **4.1.2. Eudragit® RS 100 ile yapılan çalışmalar**

##### **4.1.2.1. Termal analiz**

Tam tartımı alınan Eudragit® RS 100, basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış alüminyum örnek kabında, 10°C.dk<sup>-1</sup> sıcaklık artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı DSC cihazı kullanılarak analiz edilmiştir.

##### **4.1.2.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi**

Eudragit® RS 100'ün FT-IR analizi 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

##### **4.1.2.3. Nükleer manyetik rezonans analizi**

Eudragit® RS 100'ün yapısal özellikleri, <sup>1</sup>H-NMR analizi ile 25°C ± 2°C'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak incelenmiştir.

#### **4.1.3. Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar**

##### **4.1.3.1. Termal analiz**

Kollidon® SR tam tartım alınarak DSC cihazı ile basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış alüminyum örnek kabında, 10°C.dk<sup>-1</sup> sıcaklık artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı analizi gerçekleştirilmiştir.

##### **4.1.3.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi**

Kollidon® SR'nin FT-IR analizi 4000-500 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

##### **4.1.3.3. Nükleer manyetik rezonans analizi**

Kollidon® SR'nin yapısal özellikleri, <sup>1</sup>H-NMR analizi ile 25°C ± 2°C'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak incelenmiştir.

## 4.2. Nanopartikül Formülasyonlarına Ait Çalışmalar

### 4.2.1. Formülasyonların hazırlanışı

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında püskürterek kurutma yöntemi kullanılmıştır (Yenilmez vd., 2011; Başaran vd., 2014; Başaran vd., 2015). Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonun hazırlanmasında çözücü olarak aseton ve metanol (36:4 h:h) çözücü karışımı seçilmiştir. Eudragit® RS100'ün belirlenen miktarları (2 g) çözücü içinde çözündürüldükten sonra LTZ'ün farklı konsantrasyonlardaki miktarları (%10, %15 ve %20) çözeltilere ilave edilmiştir. Çözeltiler homojen ve şeffaf karışımlara getirildikten sonra püskürterek kurutma cihazı (Büchi-B90, Nano Spray Dryer, İsviçre) yardımıyla kurutulmuş ve toz halde oluşan nanopartikülleri toplanmıştır.

Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında çözücü olarak metanol (250 mL) kullanılmıştır. Kollidon® SR formülasyonunda kullanılan LTZ konsantrasyonları ve gerçekleşen hazırlama aşamaları Eudragit® RS 100 formülasyonun çalışmasında kullanılan LTZ konsantrasyonları ve uygulanan hazırlama aşamalarında olduğu gibi Kollidon®SR formülasyonu ile tekrarlanmıştır.

Her iki formülasyon için toplanan nanopartiküller karakterizasyon çalışmaları gerçekleşinceye kadar ağız sıkıcı kapalı kaplarda oda sıcaklığında saklanmıştır. Formülasyonlar daha sonra stabilite çalışmaları süresince 5°C ± 3°C, 25°C ± 2°C (%60 ± %5 RN), 40°C ± 2°C (%75 ± %5 RN) stabilite kabinlerinde saklanmıştır.

Tüm formülasyon çalışmalarında püskürterek kurutma cihazı için basınç 35 bar, sıcaklık derecesi ise 105°C ± 5°C olarak belirlenmiştir.

### 4.2.2. Polimerik nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları

#### 4.2.2.1. Partikül şekli analizleri

Nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin ve şekillerinin belirlenmesi amacı ile SEM (Carl Zeiss SUPRA 50VP, Oberkochen, Almanya) kullanılmıştır.

#### 4.2.2.2. Partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı analizleri

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı (polidisperslik indisi; PDI) için, partiküllerin distile suda dispersiyonları hazırlanmış ve

zeta potansiyel analiz cihazı (Malvern Nano ZS; Zetasizer Nano Series, Worcestershire, İngiltere) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler üç kez tekrarlanmıştır.

#### **4.2.2.3. Zeta potansiyel analizleri**

Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin belirlenmesi amacı ile partiküllerin distile suda dispersiyonları hazırlanmış ve zeta potansiyel analiz cihazı (Malvern Nano ZS; Zetasizer Nano Series, Worcestershire, İngiltere) kullanılarak veriler elde edilmiştir. Analizler üç kez tekrarlanmıştır.

#### **4.2.2.4. Termal analizler**

Formülasyonların termal analizleri, DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla sıkıca kapatılmış alüminyum örnek kabında,  $10^{\circ}\text{C}.\text{dk}^{-1}$  sıcaklık artışı ile,  $30^{\circ}\text{C} - 300^{\circ}\text{C}$  aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir. Saf etkin maddeye ve saf polimerlere ait termogramlar referans olarak kullanılarak formülasyonların analiz sonuçları değerlendirilmiştir.

#### **4.2.2.5. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi**

Formülasyonların FT-IR analizleri,  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Saf etkin maddenin ve saf polimerlerin FT-IR spektrumları, formülasyonların analiz sonuçlarının incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

#### **4.2.2.6. Nükleer manyetik rezonans analizleri**

Formülasyonların yapısal özellikleri, moleküller arası veya molekül içi olası değişimleri,  $^1\text{H-NMR}$  analizi ile,  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak analiz edilmiştir. Saf etkin maddenin ve saf polimerlerin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumları, formülasyonların analiz sonuçlarının incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

#### **4.2.2.7. Miktar tayini**

Nanopartiküllere yüklenen LTZ'ün miktarı Çizelge 4.1'de yer alan analiz şartları kullanılarak HPLC yöntemi ile incelenmiştir (Kumar Jana vd., 2014). Her bir formülasyon için tam 5 mg nanopartikül tartılarak, 5 mL metanolda ağzı sıkıca kapalı tüplerde çözündürülmüştür. Oluşan berrak çözelti gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra

HPLC ile analiz edilerek partiküllerde bulunan toplam etkin madde miktarı belirlenmiştir. Analizler her bir formülasyon için üç kez tekrarlanmıştır.

#### **4.2.2.8. Nanopartikül formülasyonlarına ait in vitro salım çalışmaları**

Nanopartiküllere yüklenen LTZ'ün salım profilleri  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 150 rpm karıştırma hızında diyaliz membran içinde analiz edilmiştir. Önceden belirlenen zaman aralıklarında 24 saat süre ile örnekler alınıp HPLC ile analiz edilerek salım profilleri oluşturulmuştur. Analizler 3 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.2.2.9. Nanopartikül formülasyonlarının in vitro salım kinetiklerinin belirlenmesi**

Nanopartiküllere yüklenen LTZ'ün salım değerleri kullanılarak partiküllerden salımı en iyi ifade edecek kinetik modelin belirlenmesi amacı ile DDSolver programı kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır (Zuo vd., 2014).

#### **4.2.3. Nanopartikül formülasyonlarına ait stabilite çalışmaları**

Hazırlanan nanopartiküllerin stabilite çalışmaları kapsamında formülasyonlar  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (%60  $\pm$  %5 RN),  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (%75  $\pm$  %5 RN) stabilite kabinlerine yerleştirilmiştir (ICH Q1A, 2003). Formülasyonların stabilite analizleri belirli aralıklarda (0. zaman, 1. ay, 3. ay) gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların stabiliteleri çalışmalarında partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel ve etkin madde miktar tayini analizleri yapılarak incelenmiştir.

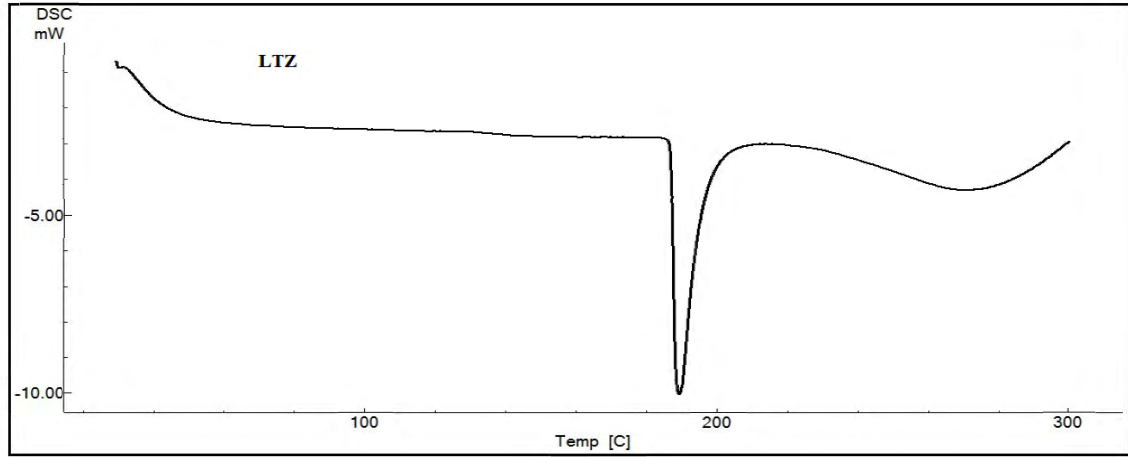
## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. Çalışılacak Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

#### 5.1.1. Letrozol ile yapılan çalışmalar

##### 5.1.1.1. Termal analiz

LTZ'e ait DSC termogramı Şekil 5.1.'de sunulmuştur.

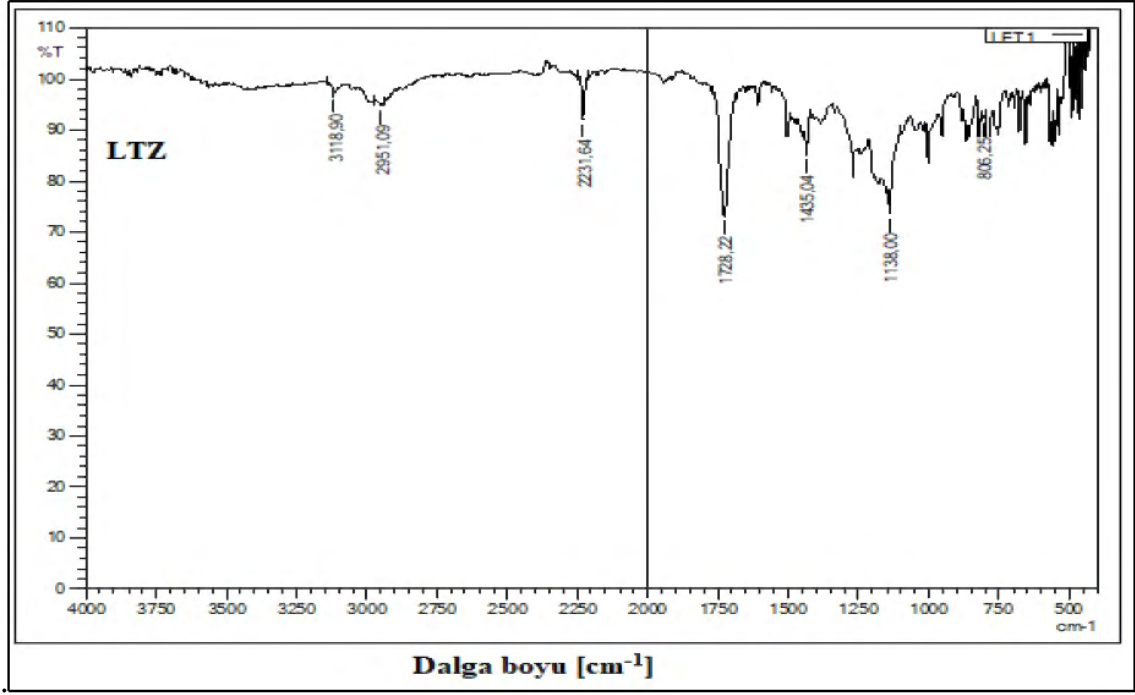


Şekil 5.1. Letrozol'e ait DSC termogramı

LTZ'ün, DSC analiz cihazı ile 30-300 °C aralığında gerçekleştirilen termal analizinde, erime sıcaklığının yaklaşık olarak 185°C'de başladığı bulunmuştur. Saf LTZ'e ait bulunan DSC sonuçları diğer çalışmaların sonuçları ile paralel olarak sonuç vermiştir (Maniyar vd., 2019). Saf etkin maddeye ait DSC analiz termogramı hazırlanan formülasyonların analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

##### 5.1.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

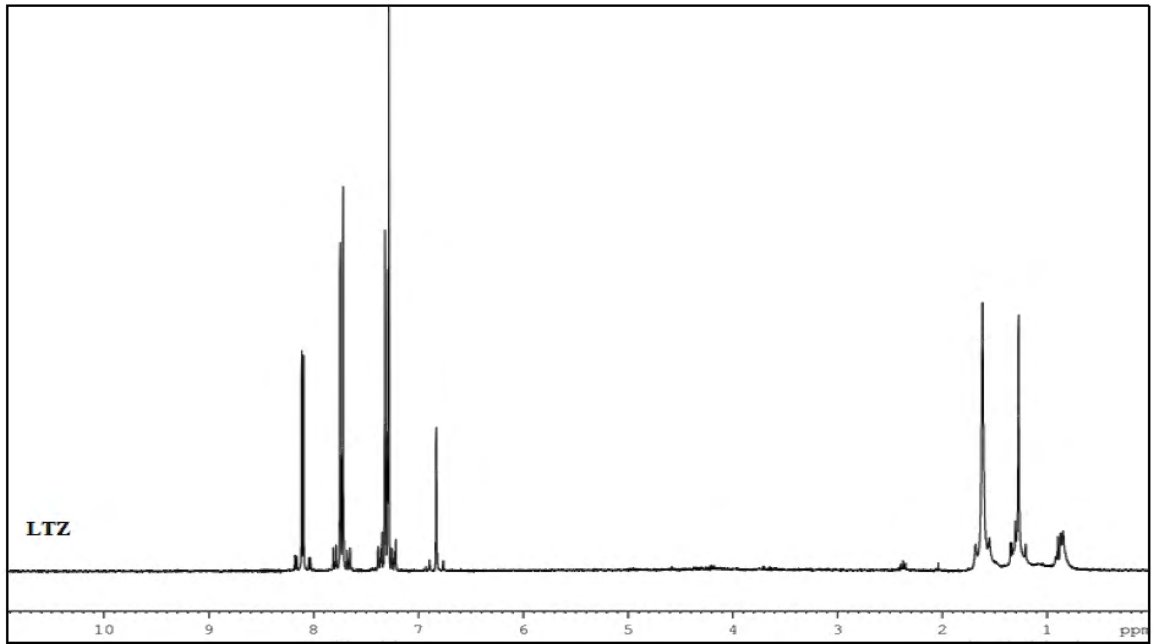
LTZ'ye ait FT-IR analiz spektrumu Şekil 5.2'de sunulmuştur. Saf LTZ'ye ait FT-IR spektrumu incelendiğinde 1138  $\text{cm}^{-1}$ 'de N-C amin , 1436.04  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H alkan metil, 1600-1475  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=C aromatik, 1690-1640  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=N, 1728.22 $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H zayıf aromatik, 2231.64  $\text{cm}^{-1}$ 'de C≡N zayıf nitril, 2951.09  $\text{cm}^{-1}$ 'de N-H amin tuzu ve 3118.90  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H orta şiddetli alkan grublarına ait pikler kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar önceden yapılan çalışmaların sonuçları ile paralel sonuçlar vermiştir (Dey vd., 2009; Maniyar vd., 2019; Sheoran vd., 2020). Saf LTZ'ye ait elde edilen FT-IR spektrumu formülasyon çalışmalarında yapısal değişikliklerin incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.2. Letrozol'e ait FT-IR analiz spektrumu

#### 5.1.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

LTZ'e ait  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumu Şekil 5.3.'de sunulmuştur.



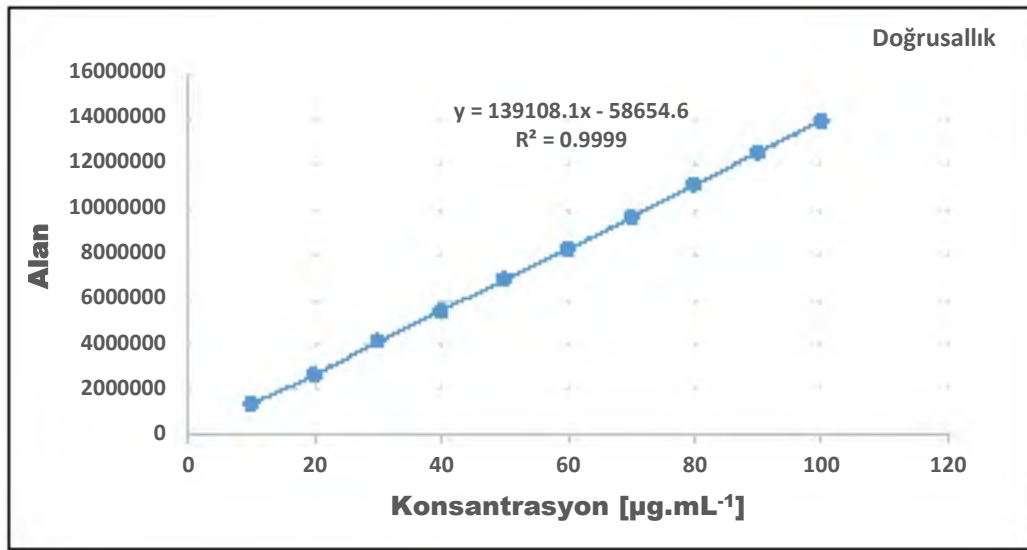
Şekil 5.3. Letrozol'e ait  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumu

Saf etkin maddeye ait  $^1\text{H}$ -NMR analiz sonuçları, hazırlanan formülasyonların analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

#### 5.1.1.4. Letrozol'ün yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analitik miktar tayini

##### 5.1.1.4.1. Doğrusallık

LTZ metanolde 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonlarda olacak şekilde 10 farklı konsantrasyonda 6 kalibrasyon serisi hazırlanmıştır. Konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları kullanılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Çalışmanın sonucunda  $r^2$  0.9999 olarak bulunmuş ve elde edilen verilere göre analitik yöntemin doğrusallığı kanıtlanmıştır. Çalışmanın sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 5.4'de verilmiştir.



Şekil 5.4. LTZ'ün miktar tayininde kullanılan standart eğri (Ort±SH; n=6)

##### 5.1.1.4.2. Kesinlik

LTZ'ün 20, 50, 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda 3 farklı çözeltisi metanol kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için 3 kez analiz gerçekleştirilmiştir (n=6). Birinci günde yapılan analizlerin aynı miktarları ve aynı şartları altında ikinci ve üçüncü günde analizi tekrarlanmıştır. Elde edilen deney sonuçları doğrusallık çalışmasında elde edilen denklemleri kullanılarak yöntemin kesinliği araştırılmıştır. Kesinlik çalışmasında elde edilen sonuçlar Çizelge 5.1'de sunulmuştur.

**Çizelge 5.1. Kesinlik çalışmasına ait HPLC analiz sonuçları**

| Konsantrasyon ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Birinci gün   | İkinci gün    | Üçüncü gün    |
|-----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 20                                      | 19.48         | 20.03         | 19.62         |
|                                         | 19.41         | 19.46         | 20.30         |
|                                         | 19.53         | 19.90         | 20.23         |
| Ortalama                                | 19.47         | 19.80         | 20.05         |
| Standart Sapma                          | 0.0578        | 0.3008        | 0.3739        |
| Varyasyon Katsayısı                     | <b>0.2970</b> | <b>1.5190</b> | <b>1.8647</b> |
| %95 Güven Aralığı                       | 0.1437        | 0.7471        | 0.9288        |
| 50                                      | 49.60         | 49.92         | 49.70         |
|                                         | 49.20         | 50.21         | 48.52         |
|                                         | 50.05         | 49.82         | 50.15         |
| Ortalama                                | 49.62         | 49.99         | 49.46         |
| Standart Sapma                          | 0.4239        | 0.2047        | 0.8409        |
| Varyasyon Katsayısı                     | <b>0.8544</b> | <b>0.4094</b> | <b>1.7002</b> |
| %95 Güven Aralığı                       | 1.0531        | 0.5084        | 2.0889        |
| 80                                      | 79.26         | 79.82         | 79.71         |
|                                         | 79.17         | 79.2          | 79.81         |
|                                         | 79.82         | 79.74         | 80.12         |
| Ortalama                                | 79.42         | 79.59         | 79.88         |
| Standart Sapma                          | 0.3561        | 0.3351        | 0.2165        |
| Varyasyon Katsayısı                     | <b>0.4484</b> | <b>0.4211</b> | <b>0.2711</b> |
| %95 Güven Aralığı                       | 0.8846        | 0.8325        | 0.5379        |

Kesinlik çalışmasında kabul edilebilirlik sınırı varyasyon katsayısının %2'den düşük olmasıdır (ICH Q2A, 2005). Çalışmanın sonucunda elde edilen değerlerin kesinliği hem gün içi hem de günler arası olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen değerler kesinlik değerlerinin kabul edilebilen sınırlar içerisinde bulunmuş ve yöntemin kesinliğini doğrulanmıştır.

#### 5.1.1.4.3. Doğruluk

Doğruluk çalışmasında elde edilen sonuçların doğrusallık çalışmalarında elde edilen eşitlik yardımıyla LTZ konsantrasyonları hesaplanmıştır. Teorik konsantrasyonlar ile bulunan değerler karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu %geri kazanım olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.2'de sunulmuştur.

Doğruluk çalışamalarında % geri kazanım verilerinin kabul edilebilirlik sınırı  $\pm\%2$  olarak belirtilmektedir (ICH Q2A, 2005). Çalışmamızda elde edilen doğruluk % geri kazanım değerlerinin tümü %98-%102 aralığında değerler olarak kabul edilen sınırlar arasında kalmış ve yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır (Çizelge 5.2).

**Çizelge 5.2. Doğruluk çalışmasına ait HPLC analiz sonuçları**

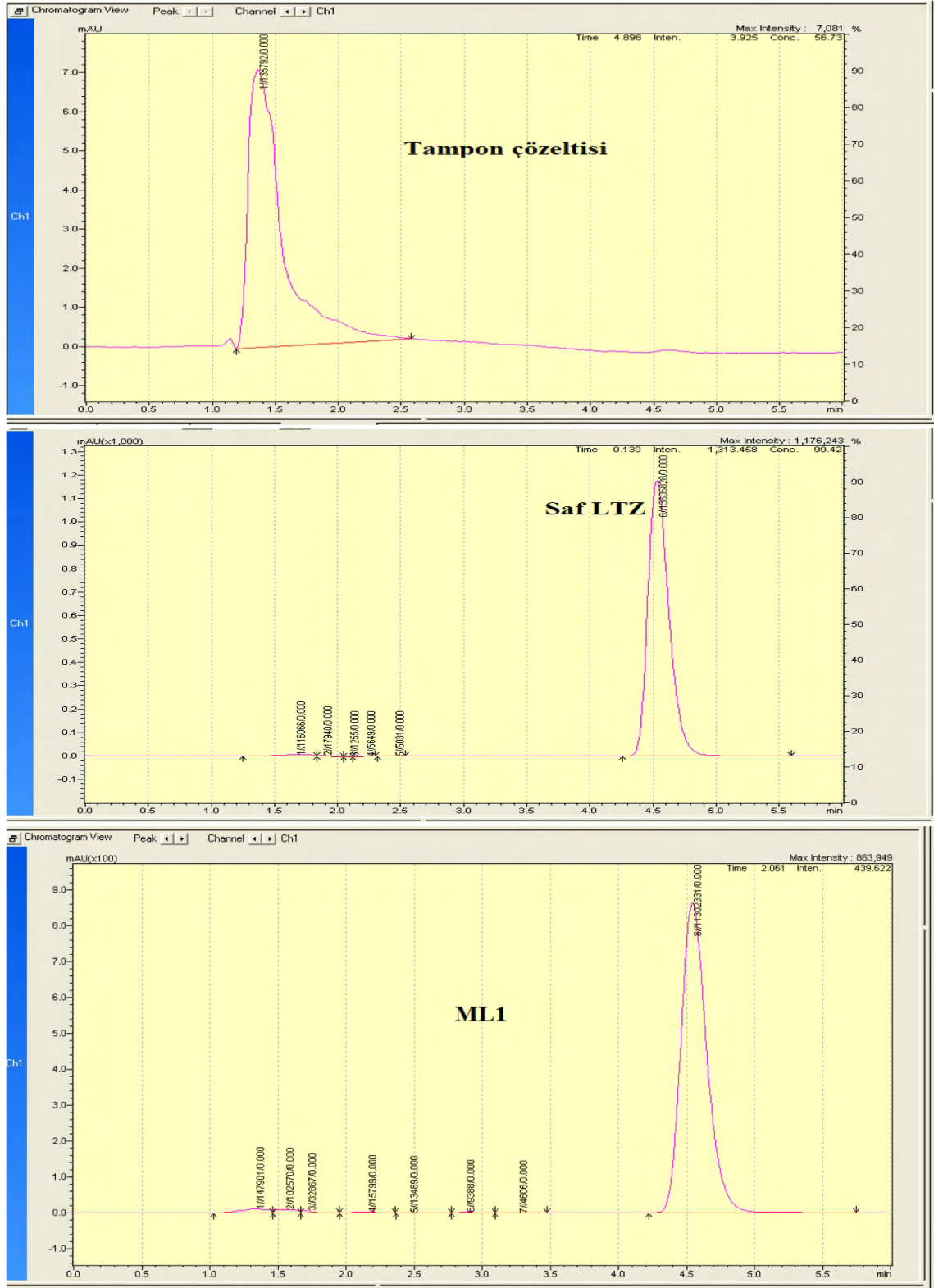
| Konsantrasyon ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | 20             | 50             | 80             |
|-----------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>Bulunan konsantrasyonlar</b>         | 19.67          | 49.24          | 78.44          |
|                                         | 19.96          | 49.82          | 78.36          |
|                                         | 19.51          | 48.59          | 78.38          |
|                                         | 19.40          | 48.90          | 78.56          |
|                                         | 19.75          | 48.83          | 79.00          |
|                                         | 19.39          | 49.97          | 79.90          |
| <b>Geri kazanımlar %</b>                | 98.34          | 98.48          | 98.06          |
|                                         | 99.78          | 99.64          | 97.96          |
|                                         | 97.55          | 97.19          | 97.98          |
|                                         | 97.00          | 97.81          | 98.20          |
|                                         | 98.77          | 97.67          | 98.75          |
|                                         | 96.95          | 99.94          | 99.87          |
| <b>Ortalama</b>                         | <b>98.0646</b> | <b>98.4532</b> | <b>98.4681</b> |
| <b>Standart Sapma</b>                   | 1.1113         | 1.1171         | 0.7473         |
| <b>Varyasyon Katsayısı</b>              | 1.9354         | 1.5468         | 1.5319         |
| <b>%95 Güven Aralığı</b>                | 1.1662         | 1.1723         | 0.7843         |

#### **5.1.1.4.4. Duyarlılık**

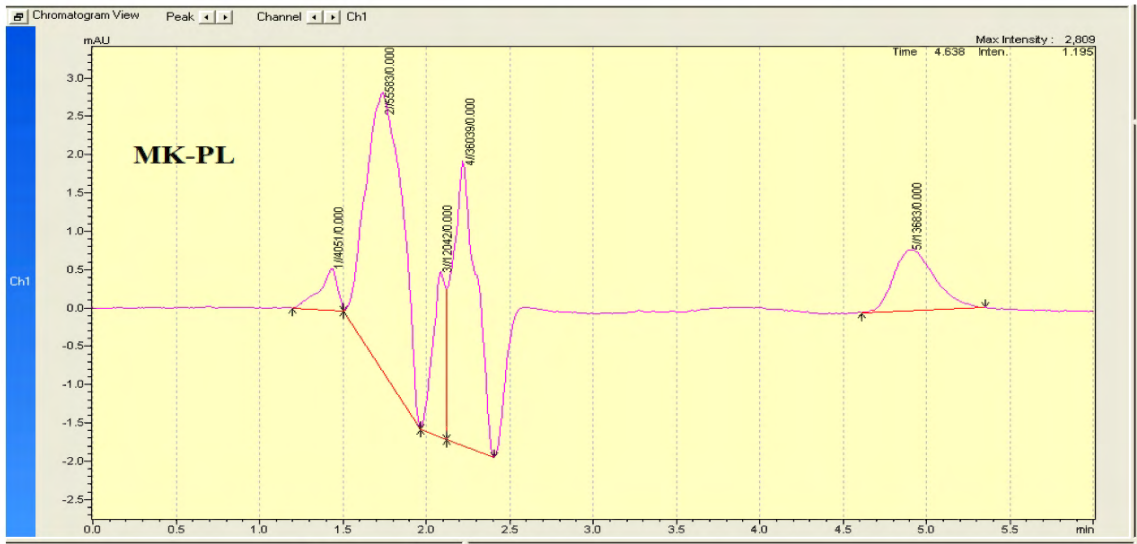
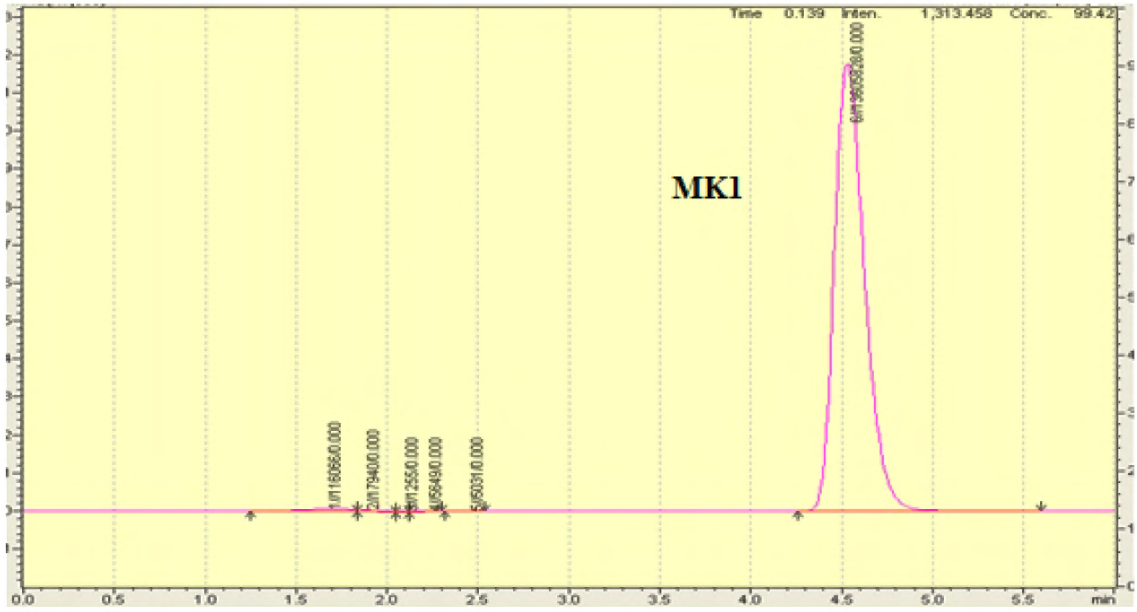
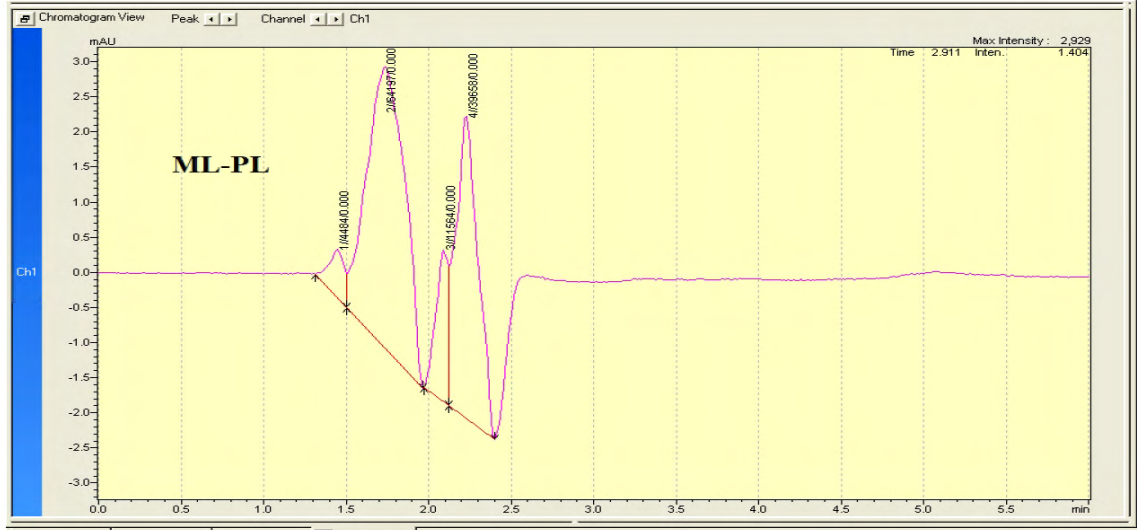
Duyarlılık çalışmalarında Eşitlik 4.1. kullanılarak LOD değeri hesaplanmıştır. Çalışmanın sonucund LOD değeri  $0.80 \mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. LOQ değeri ise Eşitlik 4.2. yardımıyla hesaplanmış ve  $2.42 \mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Doğrusallık çalışmasında belirlenen en düşük konsantrasyon olan  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'den oldukça düşük olan bu değerler yöntemin belirlenen aralıkta güvenilir sonuçlar vereceğini göstermiştir.

#### **5.1.1.4.5. Seçicilik**

LTZ'ün miktar tayin analizi için belirlenen HPLC yöntemine ait seçicilik çalışması sonucunda; kullanılan yöntem ile LTZ miktarının başarı ile analiz edileceği kullanılan çözücüler ve etkin madde içermeyen plasebo formülasyonlar ile karşılaştırmalı olarak çalışılarak ortaya konulmuştur. Çalışmanın sonucunda LTZ'ün seçiciliği ispatlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların HPLC seçicilik analiz kromatogramları Şekil 5.5.'te sunulmuştur.



Şekil 5.5. HPLC seçicilik analizi kromatogramları

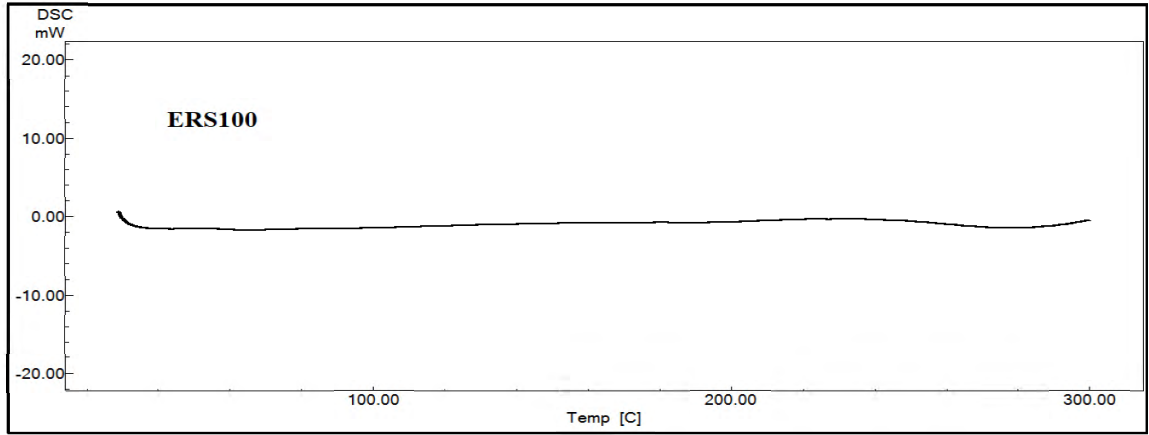


Şekil 5.5. (Devam) HPLC seçicilik analizi kromatogramları

### 5.1.2. Eudragit® RS 100 ile yapılan çalışmalar

#### 5.1.2.1. Termal analiz

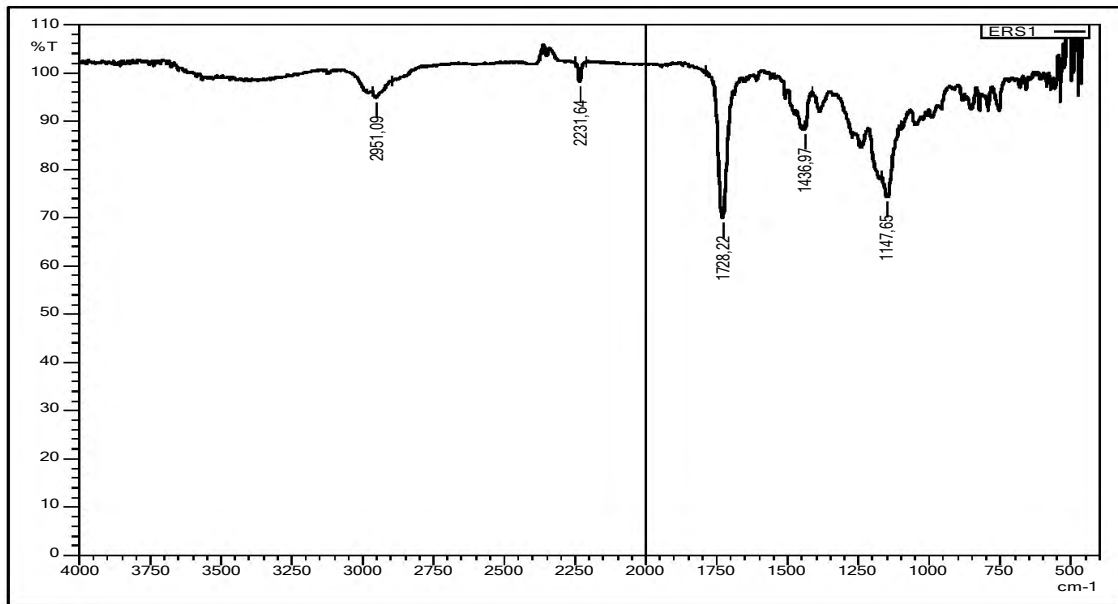
Eudragit® RS 100'ün DSC ile 30-300°C aralığında yapılan termal analizinde, polimerin amorf yapısına bağlı olarak herhangi bir erime pikine rastlanmamıştır. Eudragit® RS 100'e ait DSC termogramın maddenin amorf yapıda olduğunu göstermesi diğer çalışmalarda elde edilen analiz sonuçları ile doğrulanmaktadır (Pignatello vd., 2001; Trapani vd., 2007). Eudragit® RS 100'e ait termogram Şekil 5.6.'de sunulmuştur.



Şekil 5.6. Eudragit® RS 100'ün DSC analizine ait termogram

#### 5.1.2.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Eudragit® RS 100'e ait FT-IR analiz spektrumu Şekil 5.7'de sunulmuştur.

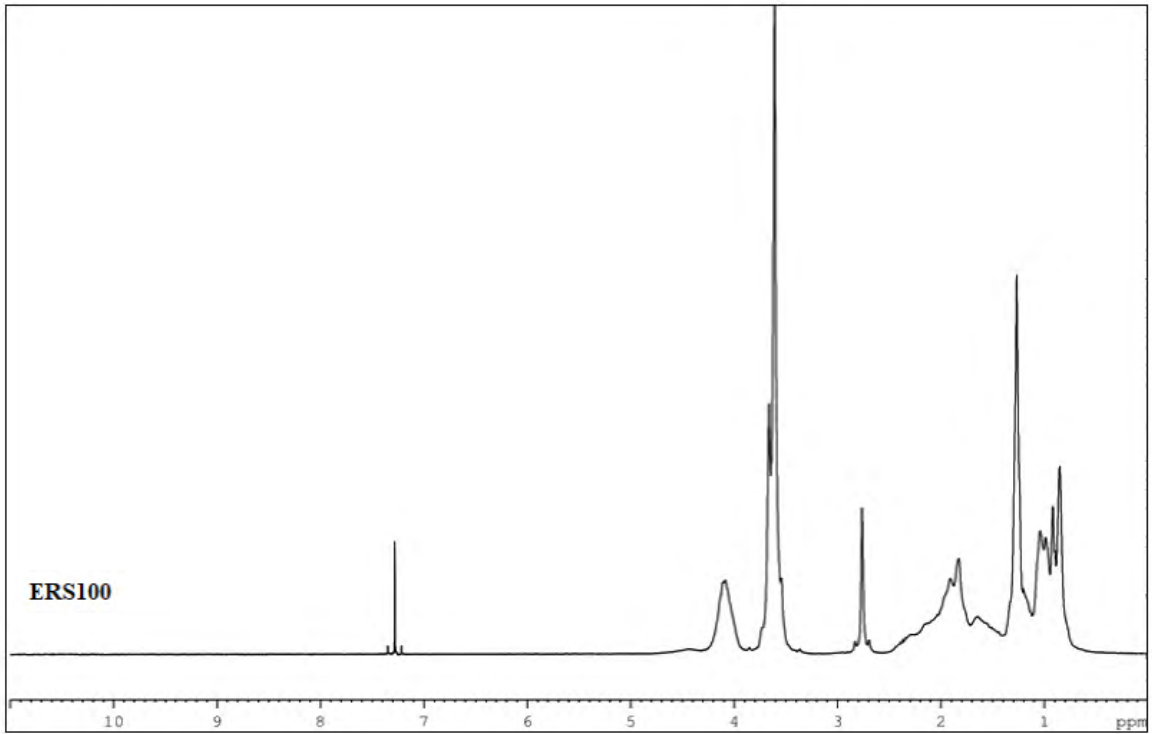


Şekil 5.7. Eudragit® RS 100'e ait FT-IR spektrumu

Saf eudragit® RS 100'e ait FT-IR spektrumu incelendiğinde 1147.65cm<sup>-1</sup>'de C-O, 1436.97cm<sup>-1</sup>'de CH<sub>3</sub>, 1728.22 cm<sup>-1</sup>'de (C=O) ve 2951.09 cm<sup>-1</sup>'de N-H amin tuzu gruplarına ait pikler kaydedilmiştir (Jain & Singh, 2010). Kaydedilen sinyaller ile önceki çalışmaların sonuçlarına yakın sonuçlar elde edilmiştir (Lopedota vd., 2009; Pradeep ve Sreeganesan, 2015). Saf Eudragit® RS 100'e ait FT-IR spektrumu formülasyonların olası yapısal değişikliklerinin incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

#### 5.1.2.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

Eudragit® RS 100'e ait <sup>1</sup>H-NMR analiz spektrumu Şekil 5.8'da sunulmuştur.



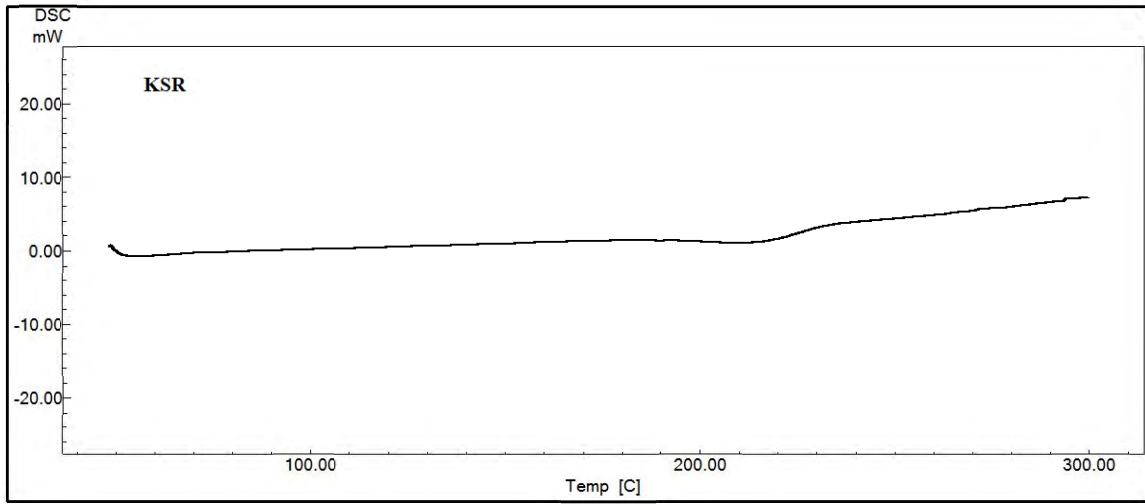
Şekil 5.8. Eudragit® RS 100'ün <sup>1</sup>H-NMR analiz spektrumu

<sup>1</sup>H-NMR analizi, hazırlanan nanopartiküllerde etken madde ile polimer arasındaki olası etkileşimlerin incelenmesinin yanı sıra bileşiklerin yapısal özelliklerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir (Adibkiaa vd., 2011). Saf Eudragit® RS 100'e ait <sup>1</sup>H-NMR analiz sonuçları diğer çalışmalardaki analiz sonuçları ile benzer sonuçlar vermiştir (Öztürk vd., 2017; Yenilmez 2017). Saf Eudragit® RS 100'e ait <sup>1</sup>H-NMR analiz spektrumları formülasyon çalışmalarında olası yapısal etkileşimlerin incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

### 5.1.3. Kollidon® SR ile yapılan çalışmalar

#### 5.1.3.1. Termal analiz

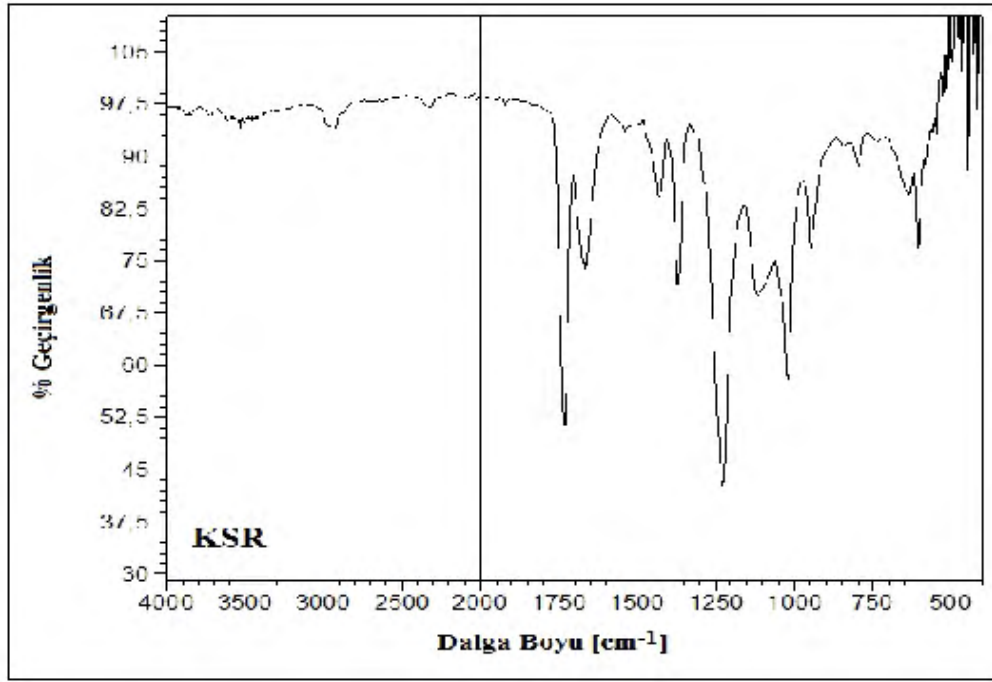
Kollidon® SR'nin DSC ile 30-300°C aralığında yapılan termal analizine ait termogram Şekil 5.9'da sunulmuştur. Analiz sonucunda elde edilen termogram incelendiğinde polimerin amorf yapısına bağlı olarak herhangi bir erime piki gözlenmemiştir (Pezzini vd., 2014). Saf Kollidon® SR'ye ait elde edilen termogram başka çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile paralel bulunmuştur (Yurtdaş Kırımlıoğlu ve Görgülü, 2019). Kollidon® SR'ye ait DSC termogramı formülasyonların analizlerinde oluşabilecek değişimlerin incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.9. Kollidon® SR'nin DSC analizine ait termogram

#### 5.1.3.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

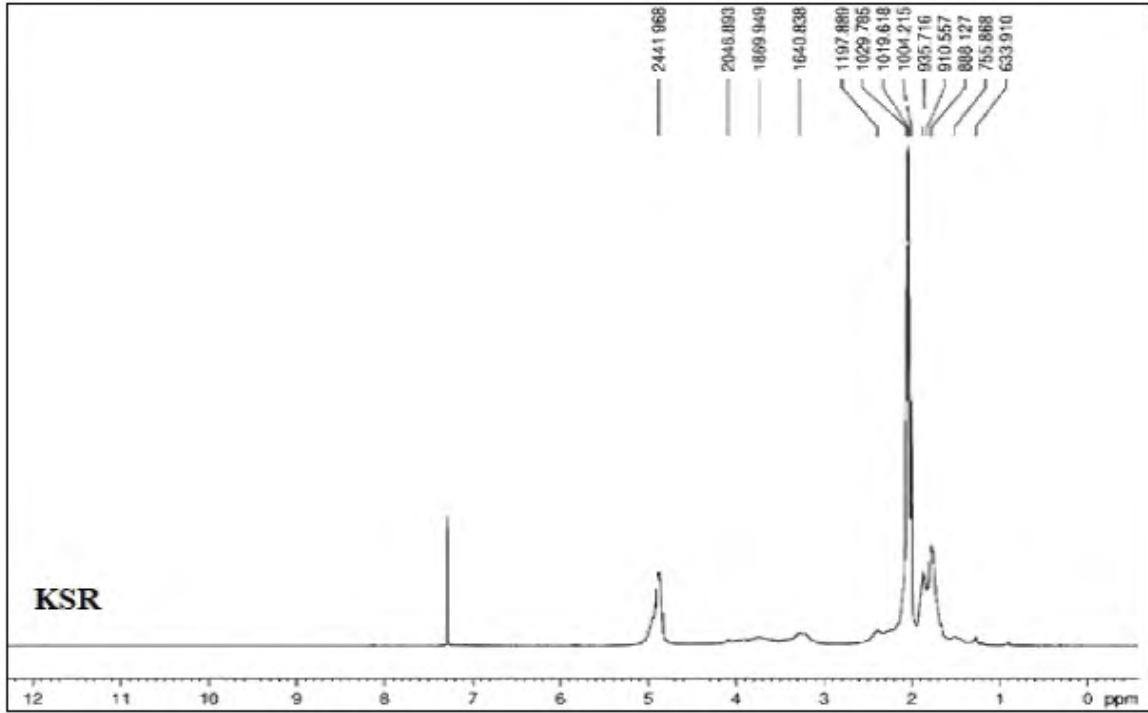
Kollidon® SR'ye ait FT-IR analiz spektrumu Şekil 5.10'de verilmiştir. Kollidon® SR'ye ait FT-IR spektrumu incelendiğinde 1020 cm<sup>-1</sup>'de N-C amin, 1232 cm<sup>-1</sup>'de C-O ve 1732 cm<sup>-1</sup>'de C=O gruplarına ait pikler kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile önceki çalışmaların sonuçlarına benzer sonuçlar elde edilmiştir (Choiri vd., 2019; Güven ve Yenilmez., 2019). Kollidon® SR'ye ait elde edilen FT-IR spektrumu formülasyonların analizlerinde oluşabilecek yapısal değişimlerin incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 5.10. Kollidon® SR'nin FT-IR analiz spektrumu

### 5.1.3.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

Kollidon® SR'ye ait  $^1\text{H}$ -NMR analizine ait spektrum Şekil 5.11'de sunulmuştur.



Şekil 5.11. Kollidon® SR'nin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumu

FT-IR ve <sup>1</sup>H-NMR analizleri günümüzde birçok endüstriyel laboratuvarında yaygın olarak kullanılan araçlardır. FT-IR ve <sup>1</sup>H-NMR analiz teknikleri bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri hakkında bilgi edinmek için basit ve verimli olarak kullanılan araçlardır (Chalmers ve Everall, 2006). Saf Kollidon® SR'ye ait elde edilen <sup>1</sup>H-NMR sonuçları değerlendirilmiş ve diğer çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Choiri vd., 2019; Güven ve Yenilmez., 2019). Elde edilen spektrumlar formülasyon çalışmalarında olası moleküler ve yapısal değişikliklerin incelenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

## 5.2. Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

### 5.2.1. Nanopartiküllerin hazırlanışı

Nanopartiküllerin hazırlanmasında Eudragit® RS 100 ve Kollidon® SR olmak üzere iki farklı polimer ile çalışılmıştır. Formülasyonların hazırlanmasında püskürterek kurutma yöntemi kullanılmış ve nanopartiküller başarı ile elde edilmiştir (X. Li vd., 2010; Arpagaus, 2012). Hazırlanan nanopartiküllerin formülasyon bileşenleri Çizelge 5.3.'de sunulmuştur.

**Çizelge 5.3.** Hazırlanan polimerik nanopartiküllerin formülasyon bileşenleri

| KOD   | Eudragit® RS100<br>(g) | Kollidon® SR<br>(g) | LTZ<br>(%) | Metanol<br>(mL) | Aseton<br>(mL) |
|-------|------------------------|---------------------|------------|-----------------|----------------|
| ML-PL | 2                      | -                   | -          | 4               | 36             |
| ML1   | 2                      | -                   | 10         | 4               | 36             |
| ML2   | 2                      | -                   | 15         | 4               | 36             |
| ML3   | 2                      | -                   | 20         | 4               | 36             |
| MK-PL | -                      | 2                   | -          | 250             | -              |
| MK1   | -                      | 2                   | 10         | 250             | -              |
| MK2   | -                      | 2                   | 15         | 250             | -              |
| MK3   | -                      | 2                   | 20         | 250             | -              |

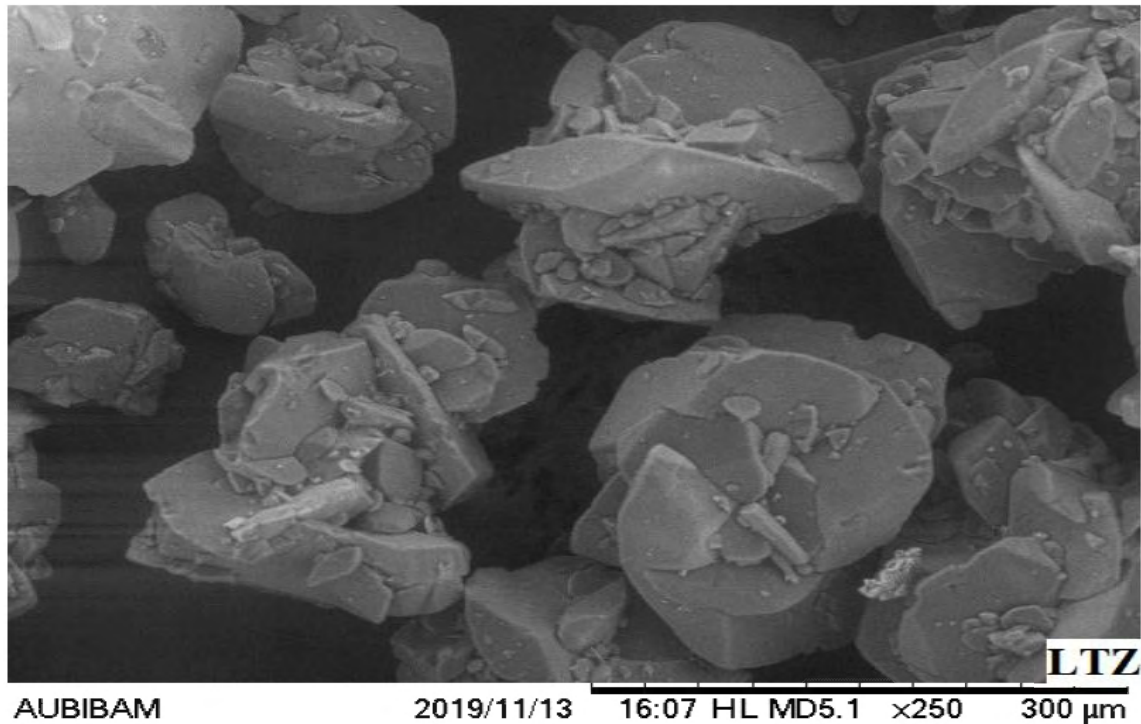
## 5.2.2. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları

### 5.2.2.1. Partikül şekli analizleri

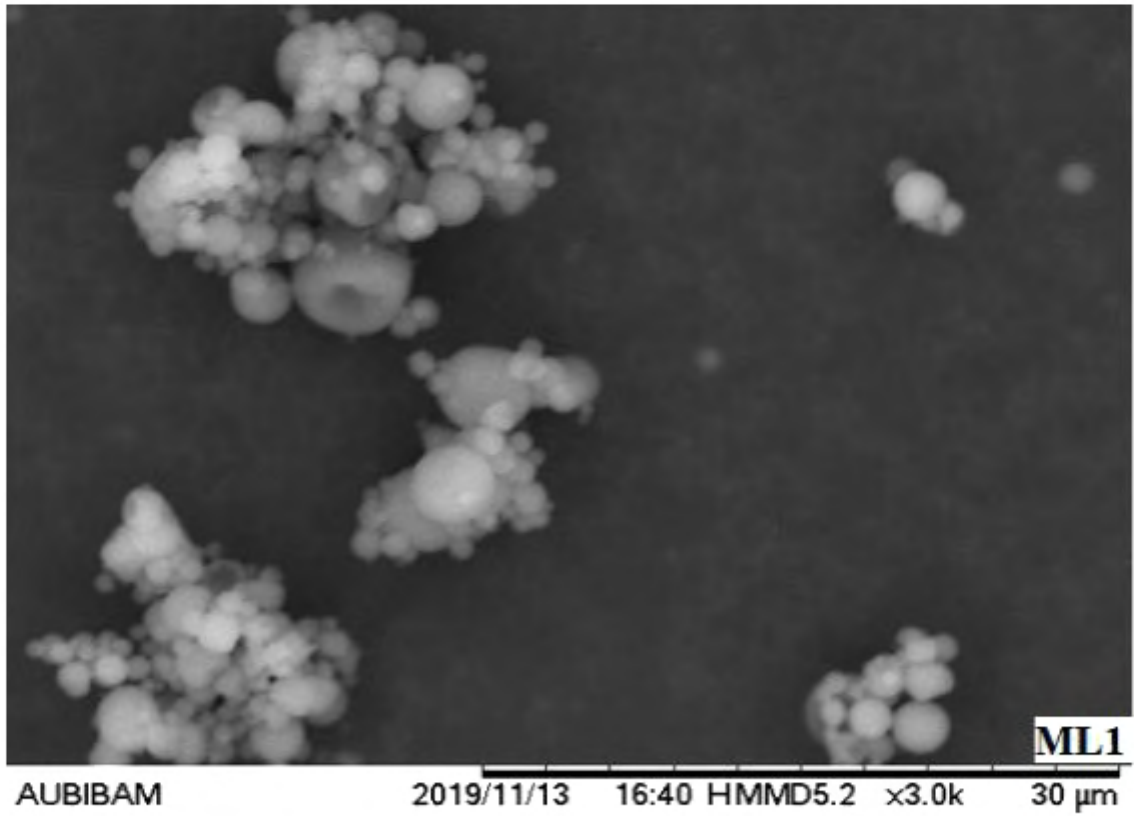
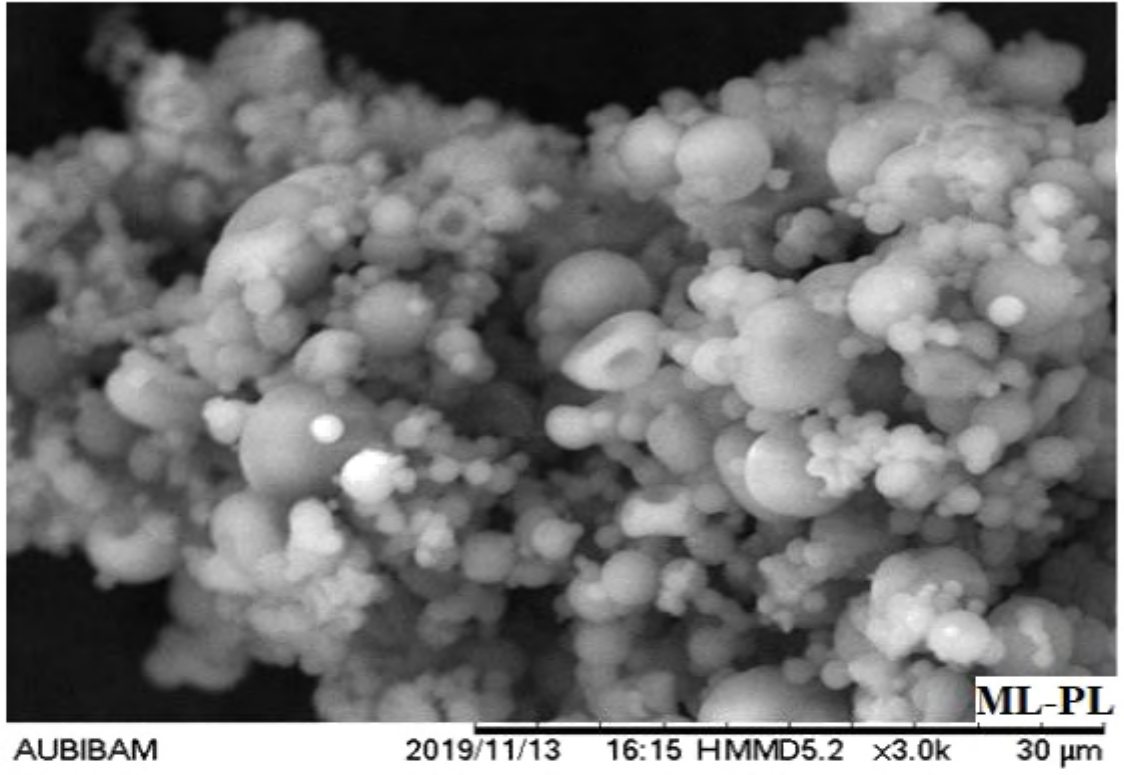
SEM, nanopartiküllerin yüzeysel özellikleri ve partikül büyüklüğü ve partikül büyüklük dağılımı hakkında görsel olarak bilgi verebilen yüksek teknolojiye sahip bir araç olarak nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini belirlemek amacı ile çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Joshi vd., 2008).

Tez çalışmaları kapsamında Eudragit® RS 100 ile formülasyonların morfolojik analizleri SEM kullanılarak elde edilen görüntüler Şekil 5.12.'de sunulmuştur.

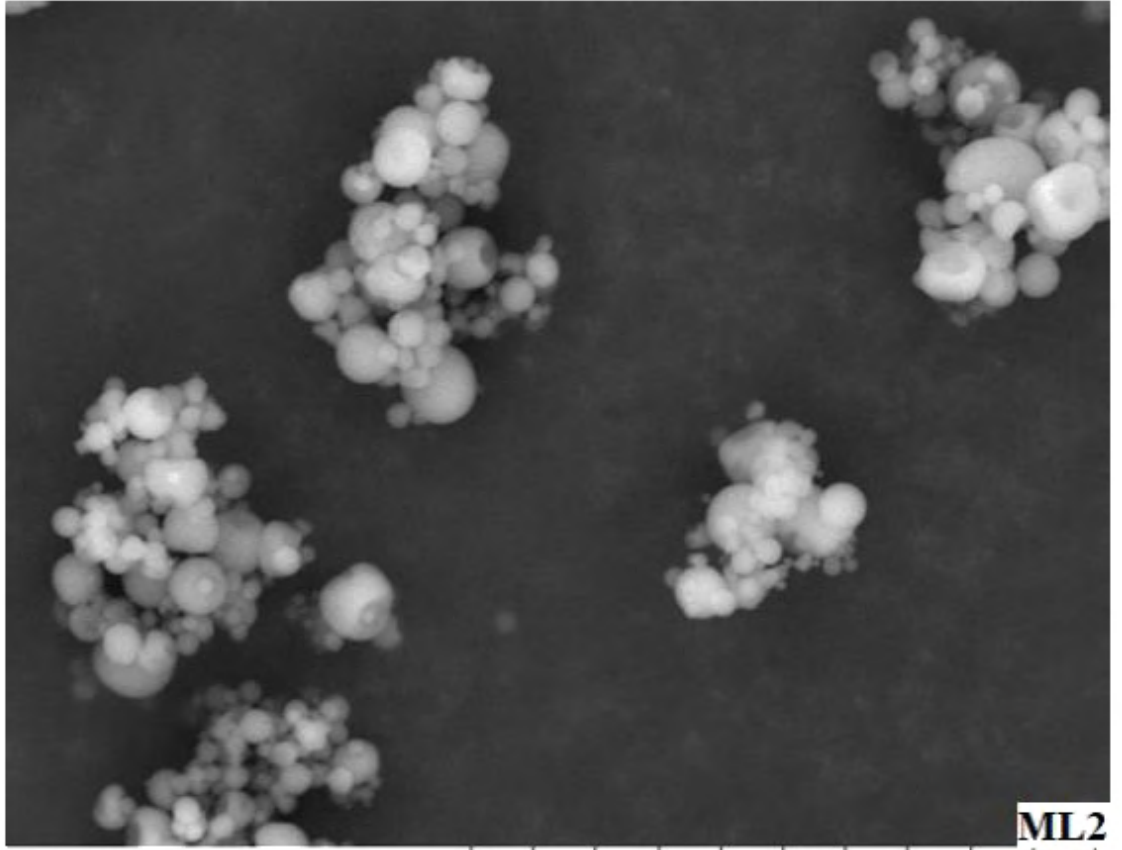
Analizler sonucunda elde edilen SEM görüntüleri değerlendirildiğinde saf etkin maddenin kristal yapıda olduğu ve hazırlanan nanopartiküllerin düzgün yüzeyli küresel partiküller olduğunu görülmüştür. Etkin madde yüklenmiş nanopartiküllere ait analizlerde kristal yapıya rastlanmaması tüm LTZ'ün başarı ile enkapsüle edildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 5.12.) (Matlholo vd., 2015).



Şekil 5.12. Saf etkin maddenin ve Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların SEM görüntüleri



Şekil 5.12. (Devam) Saf etkin maddenin ve Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların SEM görüntüleri



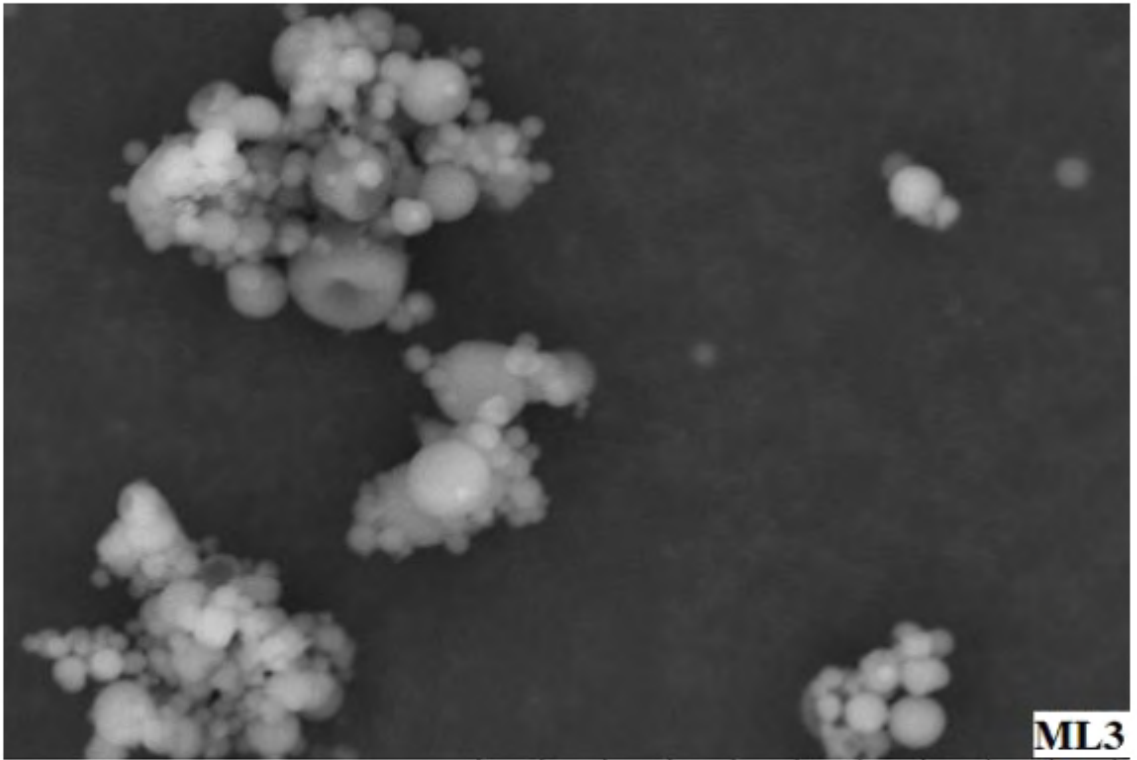
AUBIBAM

2019/11/13

16:33 HMMD4.8

×3.0k

30 µm



AUBIBAM

2019/11/13

16:40 HMMD5.2

×3.0k

30 µm

**Şekil 5.12. (Devam)** Saf etkin maddenin ve Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların SEM görüntüleri

#### 5.2.2.2. Partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı analizleri

Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı analiz sonuçları Çizelge 5.4’de sunulmuştur.

**Çizelge 5.4.** Eudragit®RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI) ve zeta potansiyel analiz sonuçları (ZP) (n=3, Ortalama  $\pm$  SH)

| KOD   | PB (nm)          | PdI             | ZP (mV)        |
|-------|------------------|-----------------|----------------|
| ML-PL | 253.0 $\pm$ 20.4 | 0.30 $\pm$ 0.04 | 48.4 $\pm$ 1.3 |
| ML1   | 279.0 $\pm$ 10.2 | 0.30 $\pm$ 0.07 | 47.2 $\pm$ 0.6 |
| ML2   | 280.0 $\pm$ 15.0 | 0.40 $\pm$ 0.03 | 47.2 $\pm$ 0.2 |
| ML3   | 314.0 $\pm$ 7.5  | 0.44 $\pm$ 0.03 | 36.1 $\pm$ 1.5 |

Partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı analizleri nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında yer alan en önemli analizler olarak tanımlanmaktadır. Partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı, ilacın enkapsülasyonunu, etkin madde salım kinetiğini, taşıyıcı sistemin dolaşımında kalış süresini ve formülasyon stabilitesini etkileyen önemli faktörlerdir (Katmış vd., 2018). Çalışmamızda hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı analizleri hemen hazırlanışından sonra ve stabilite çalışmalarında gerçekleştirilmiştir.

Analizler sonucunda elde edilen değerlerde partiküllerin nanometre boyutunda (~253 -314nm) oldukları görülmüştür (Çizelge 5.4.). Elde edilen partikül boyutu sonuçları değerlendirildiğinde LTZ konsantrasyonunun artmasıyla partiküllerin boyutlarının arttığı gözlenmiştir (Gomathi vd., 2017). Çizelge 5.4.’te bulunan sonuçlar partikül büyüklüğü dağılımının (PdI) ~0.3 - 0.5 değerler arasında yer aldığını ve buna bağlı olarak formülasyonların homojen partiküllere sahip olduklarını ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar, stabilite çalışmalarında partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımındaki oluşabilecek değişimlerin incelenmesinde kullanılmıştır.

#### 5.2.2.3. Zeta potansiyel analizleri

Zeta potansiyel analizi, partiküllerin yüzey yükünü belirleyerek süspande haldeki nanopartiküllerin fiziksel stabilitesini anlamak ve tahmin etmek için kullanılabilen nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında önemli yer alan bir analizdir (Jiang vd., 2009). Genel olarak, zeta potansiyel değerleri pozitif 30 mV'den yüksek veya negatif 30 mV'den düşük olan nanopartiküllerin yüksek stabilite derecesine sahip olduğu

belirtilmektedir. Zeta potansiyel değerinin +25 mV'den daha düşük veya -25 mV'den daha yüksek olması durumunda süspande haldeki partiküller arasındaki itme gücünün zayıf olması nedeniyle agregatlar oluşmaktadır (Kumar ve Dixit 2017).

Çalışmamızda hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel analiz sonuçları Çizelge 5.4.' sunulmuştur. Analizler sonucunda ~+48 - 36mV aralığında değerler alan formülasyonların süspande hallerinin kararlı oldukları görülmüştür. Elde edilen değerlere bağlı olarak formülasyonların katyonik özellikte oldukları belirlenmiştir. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri stabilite çalışmalarında olası değişimlerin değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır (Çizelge 5.4.).

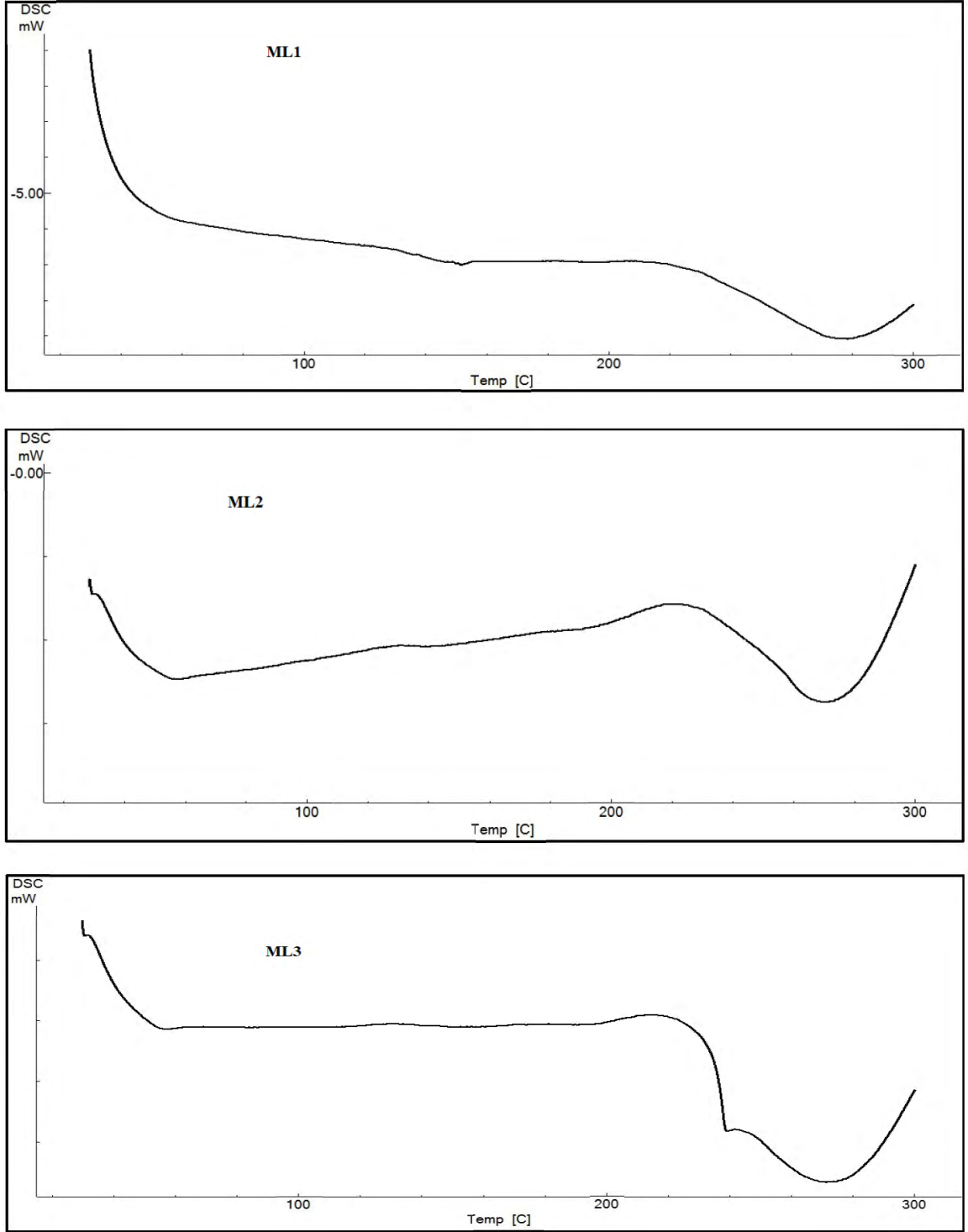
#### **5.2.2.4. Termal analizler**

DSC, ilaç taşıyıcı sistemleri karakterize etmek ve nanotaşıyıcı ilaç taşıyıcı sistemlerin bileşenleri arasındaki etkileşimleri araştırmak amacıyla farmasötik alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Montenegro vd., 2018). DSC analizi maddelerin camsı geçiş sıcaklıkları, erime ve kristallenme noktaları gibi faz geçişlerinin incelenmesinde kullanılmaktadır (Crucho ve Barros, 2017).

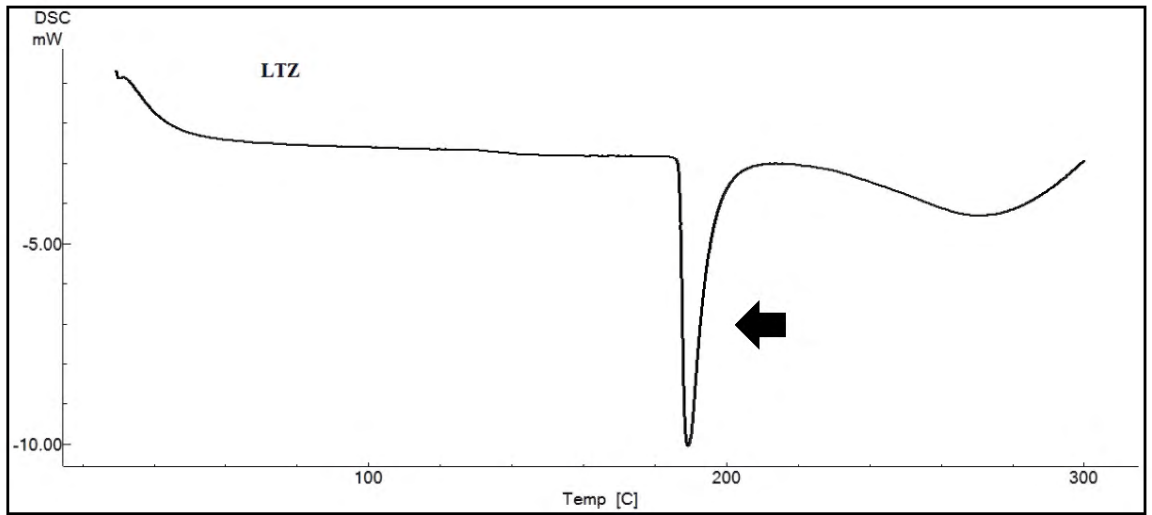
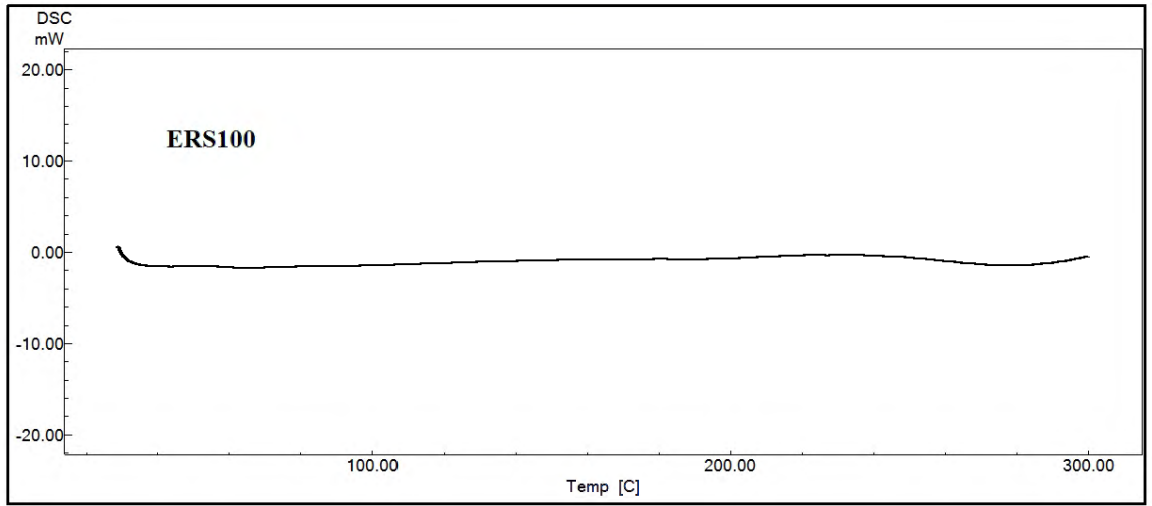
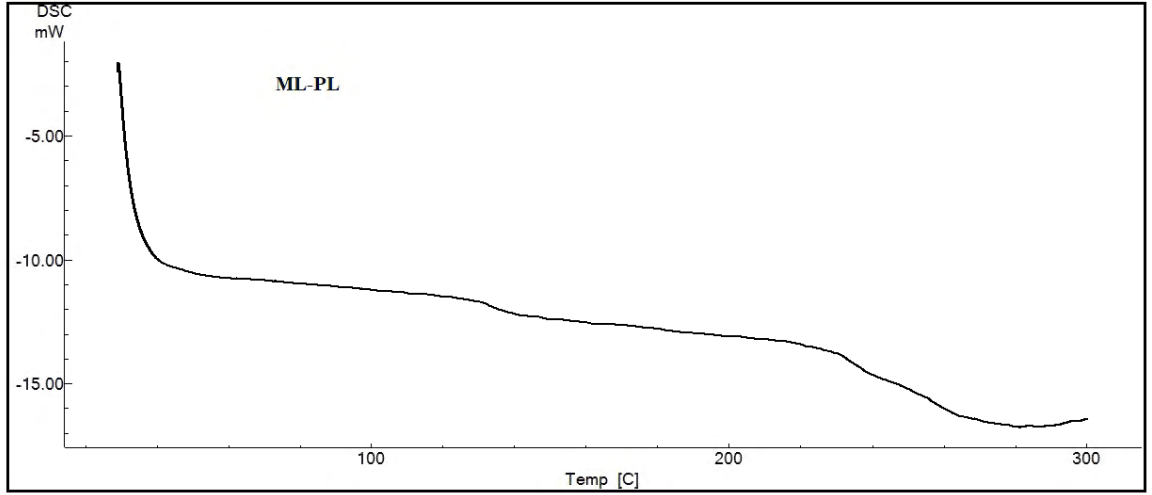
Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların termal analizleri DSC cihazı kullanılarak 30-300°C aralığında gerçekleştirilmiş ve elde edilen termogramlar Şekil 5.13'de sunulmuştur.

Ön formülasyon çalışmalarımızda saf etkin maddenin erime piki yaklaşık 185 °C olarak belirlenmiş ve maddenin kristal yapıda olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 5.1 ve Şekil 5.13). Saf Eudragit® RS 100 termogramında herhangi bir erime piki görülmemiş ve amorf yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.4 ve Şekil 5.13). LTZ ve Eudragit® RS 100'ün fiziksel karışımına ait elde edilen termogramda LTZ'e ait erime piki gözlenmiş ve etkin madde ile polimer arasında herhangi bir geçimsizlik olmadığı belirlenmiştir.

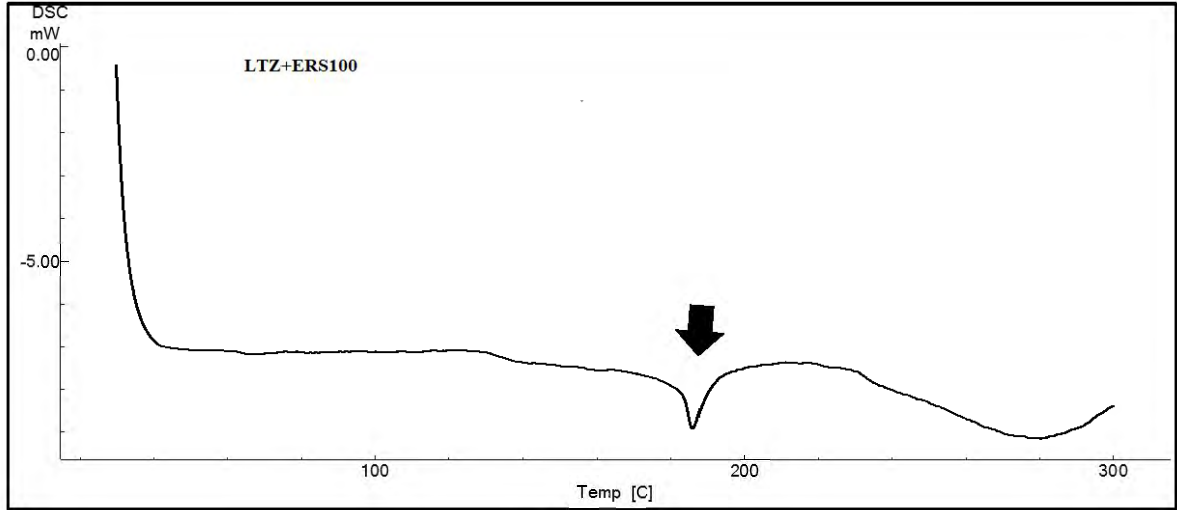
Hazırlanan plasebo ve etkin madde içeren formülasyonların DSC termogramları değerlendirildiğinde amorf yapıda oldukları ve yüklenen LTZ'nin polimerik yapı içinde moleküler olarak dağılması sonucunda formülasyonlara ait termogramlarda LTZ'e ait herhangi bir erime pikinin gözlenmemiştir (Başaran, 2017; Şenel vd., 2017).



**Şekil 5.13.** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar



**Şekil 5.13. (Devam)** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar



**Şekil 5.13. (Devam)** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar

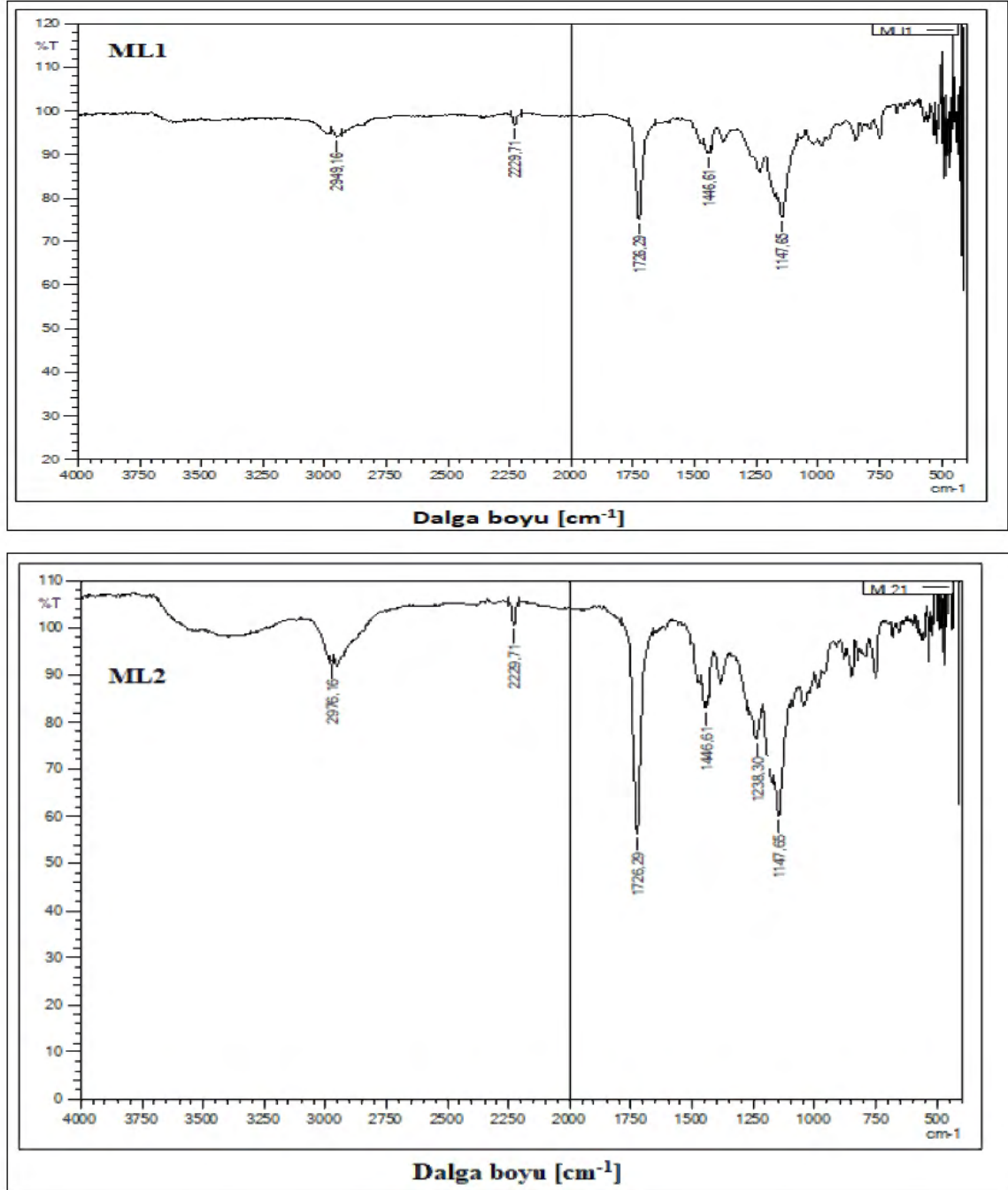
#### 5.2.2.5. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

FT-IR spektroskopisi, maddenin yapısını moleküler ölçekte aydınlatmak için gerekli ve önemli bir analizdir. Genel olarak bir homopolimer, kopolimer, polimer kompozit ve polimerik malzemelerdeki bileşenlerin olası etkileşimleri ve bağ düzenlemesi FT-IR spektroskopisi kullanılarak kolaylıkla aydınlatılabilmektedir (Barrios 2012).

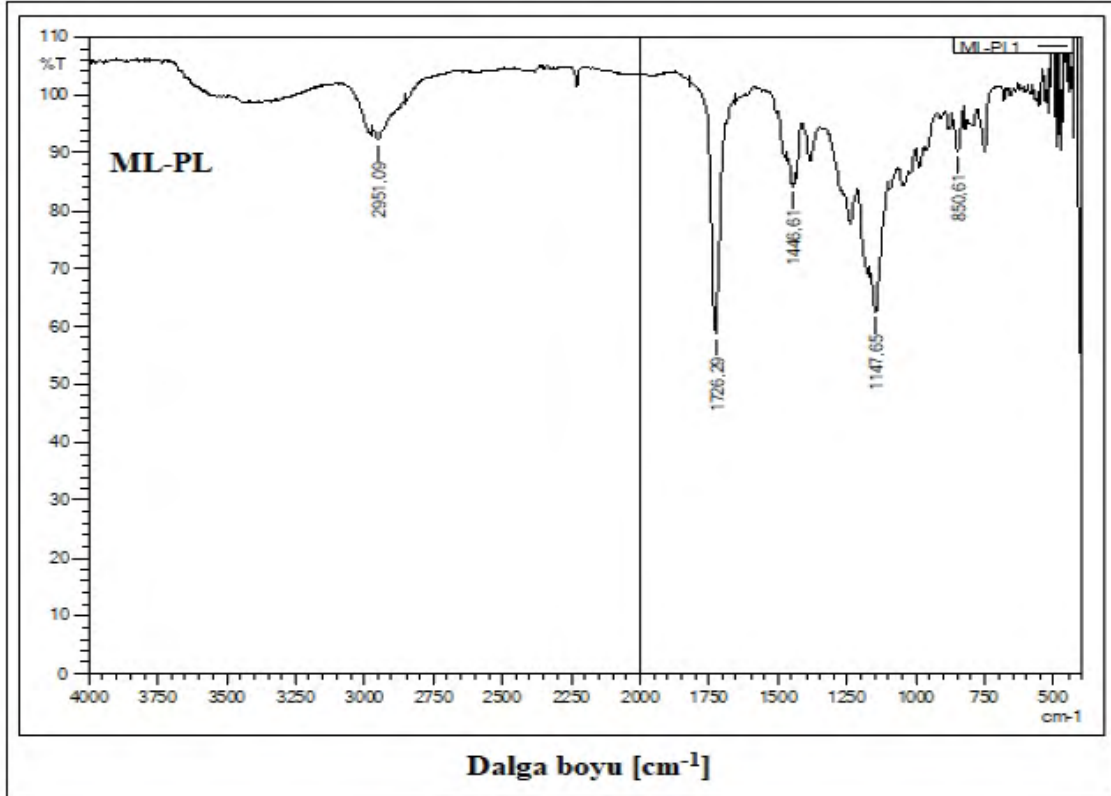
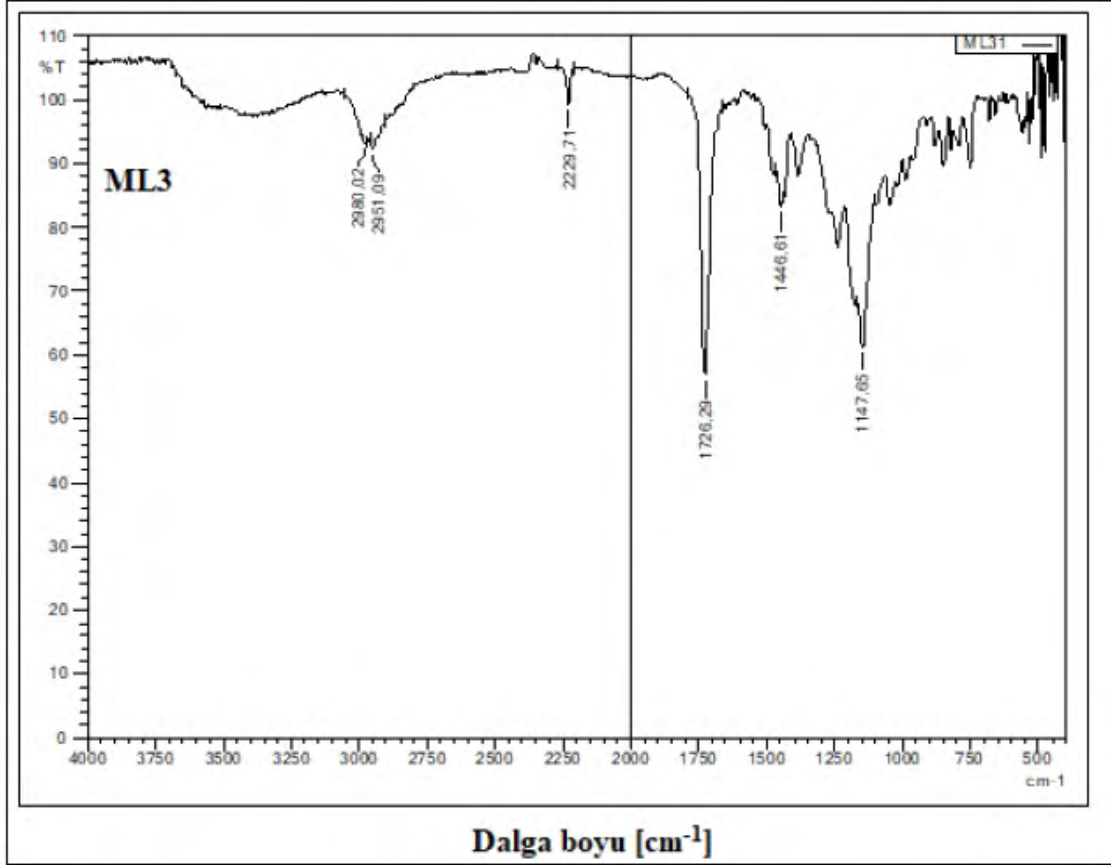
Çalışmamızda Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve bileşenlerine ait FT-IR analiz sonuçları Şekil 5.14’da verilmiştir.

Çalışmada elde edilen FT-IR spektrumları değerlendirildiğinde saf etkin madde için  $1138\text{ cm}^{-1}$ ’de N-C amin,  $1436.04\text{ cm}^{-1}$ ’de C-H alkan metil,  $1600-1475\text{ cm}^{-1}$ ’de C=C aromatik,  $1690-1640\text{ cm}^{-1}$ ’de C=N,  $1728.22\text{ cm}^{-1}$ ’de C-H zayıf aromatik,  $2231.64\text{ cm}^{-1}$ ’de  $\text{C}\equiv\text{N}$  zayıf nitril,  $2951.09\text{ cm}^{-1}$ ’de N-H amin tuzu ve  $3118.90\text{ cm}^{-1}$ ’de C-H orta şiddetli alkan grublarına ait pikler kaydedilmiştir (Dey vd., 2009; Maniyar vd., 2019; Sheoran vd., 2020). Kaydedilen piklerden  $1138\text{ cm}^{-1}$ ’de N-C amin,  $1600-1475\text{ cm}^{-1}$ ’de C=C aromatik,  $1690-1640\text{ cm}^{-1}$ ’de C=N ve  $3118.90\text{ cm}^{-1}$ ’de C-H orta şiddetli alkan grubları LTZ için karakteristik pikler olarak belirlenmiştir. Saf Eudragit® RS100’e ait FT-IR spektrumu incelendiğinde  $1147.65\text{ cm}^{-1}$ ’de C-O,  $1436.97\text{ cm}^{-1}$ ’de  $\text{CH}_3$  ve  $1728.22\text{ cm}^{-1}$ ’de C=O gruplarına ait pikler karakteristik pikler olarak belirlenmiştir (Jain ve Singh, 2010). Saf LTZ’e ait belirlenen karakteristik pikler fiziksel karışıma ait spektrumda görülmesine rağmen formülasyonlara ait FT-IR spektrumlarında görülmemektedir. Bu durum etkin

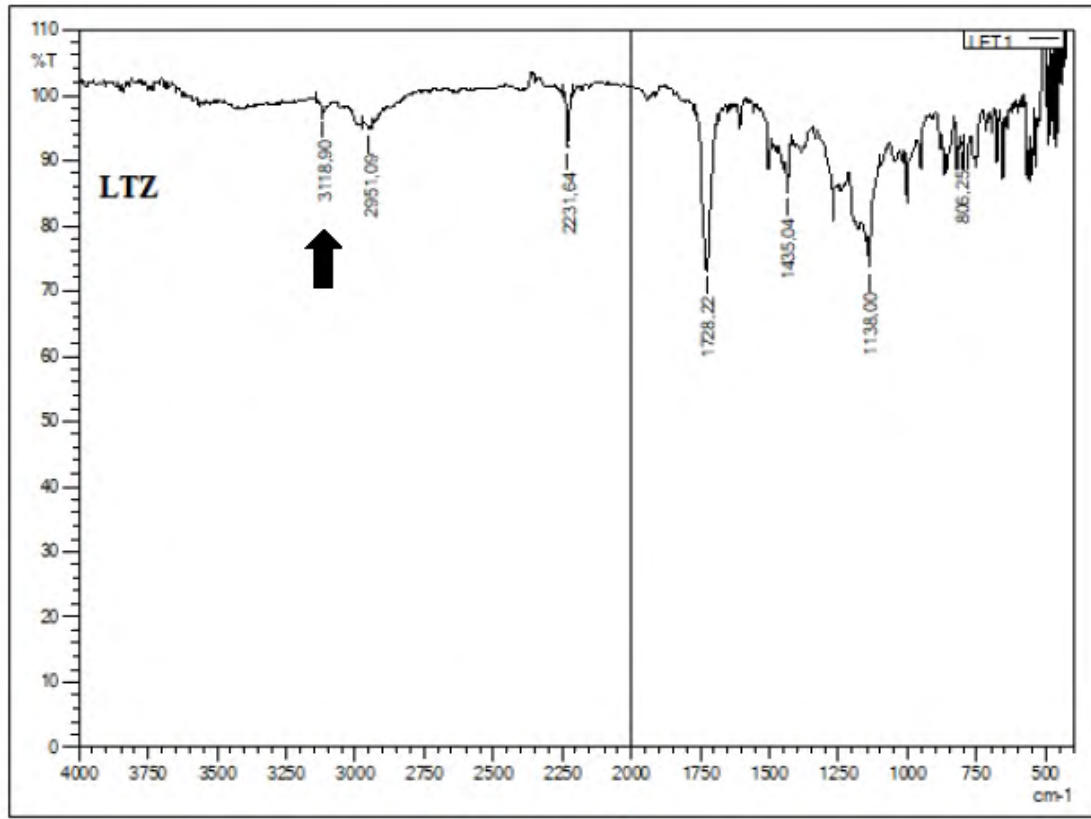
maddenin polimerik yapı içinde moleküler düzeyde dağılmış halde bulunduğunu ve yeni bir sinyalin belirlenmemesi ile de etkin madde ile polimer arasında kimyasal bir etkileşim olmadığını ortaya koymaktadır (Gomathi vd., 2017; Garjani vd., 2018). FT-IR sonuçları DSC analizlerini desteklemektedir (Şekil 5.13, Şekil 5.14).



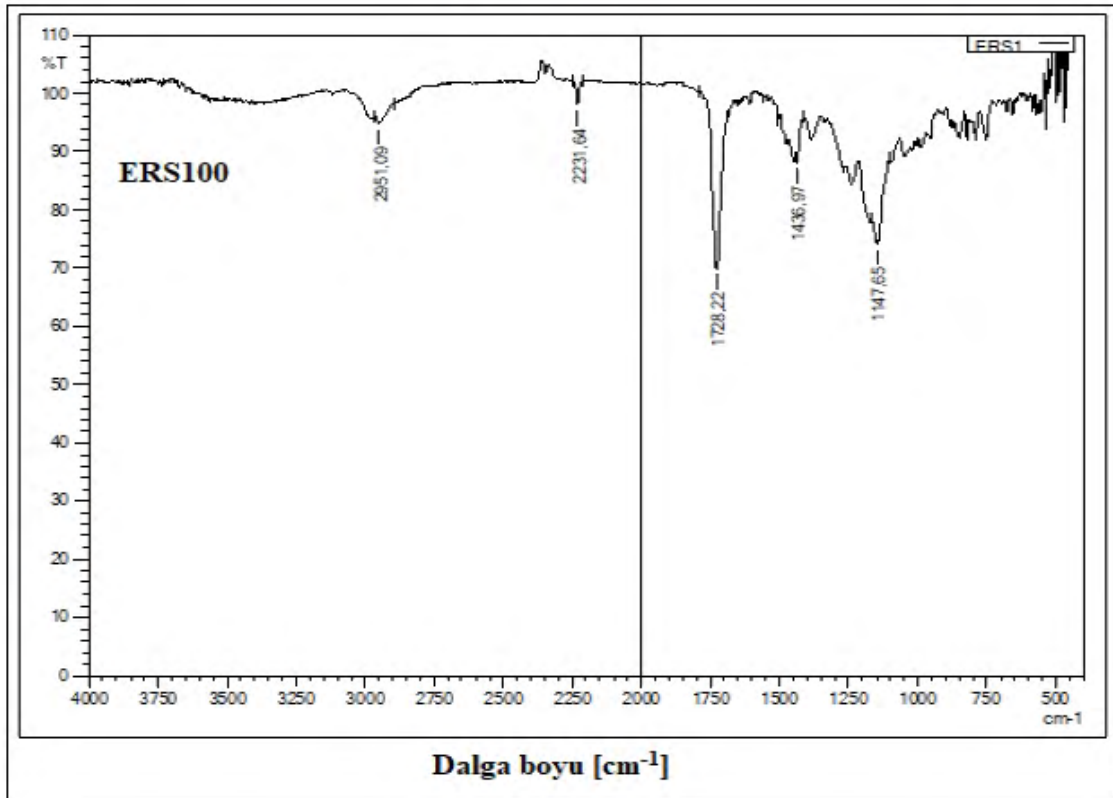
Şekil 5.14. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları



**Şekil 5.14. (Devam)** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları

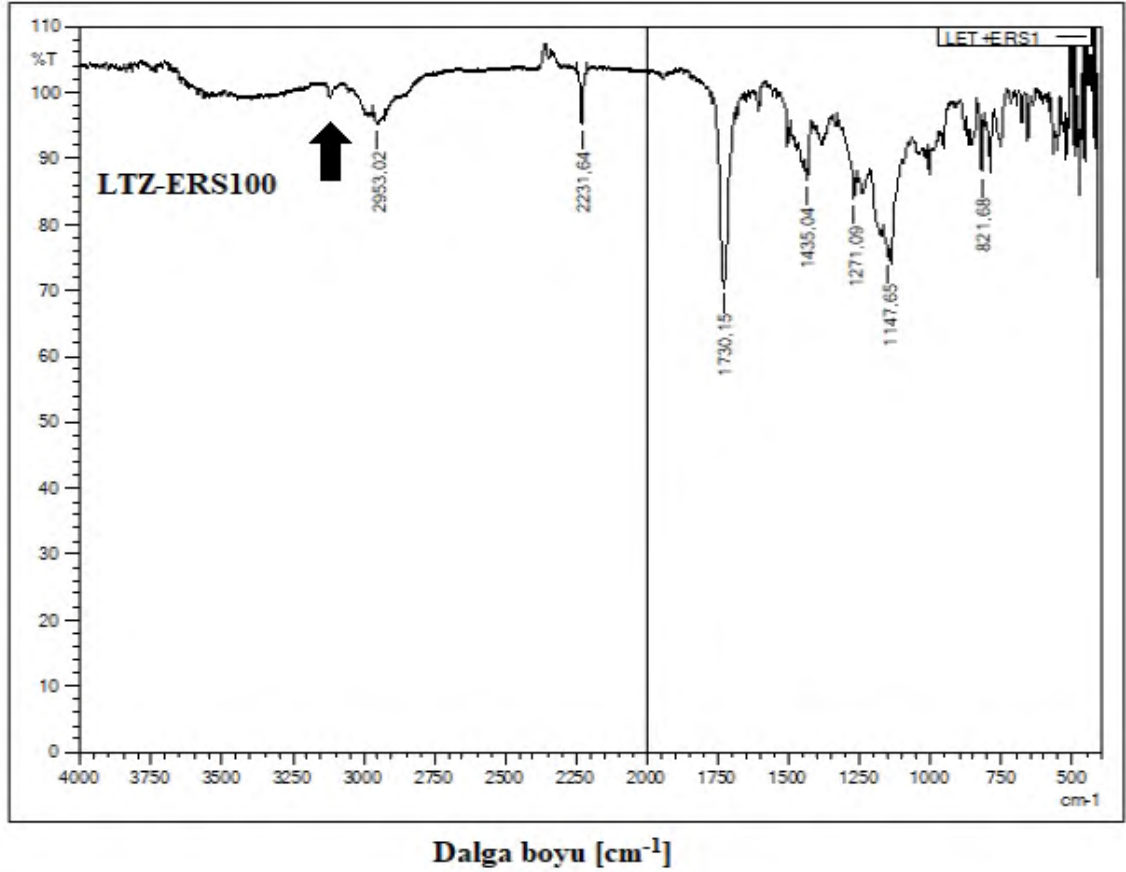


**Dalga boyu [cm<sup>-1</sup>]**



**Dalga boyu [cm<sup>-1</sup>]**

**Şekil 5.14. (Devam) Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları**

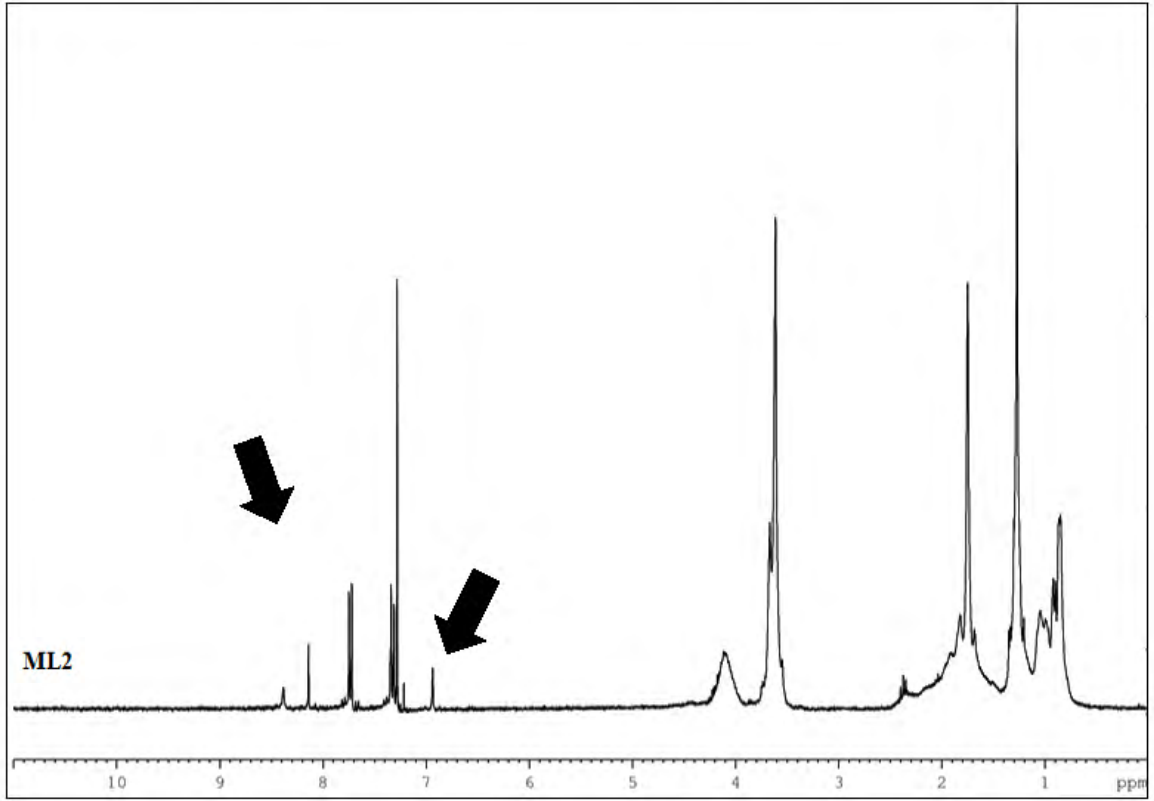
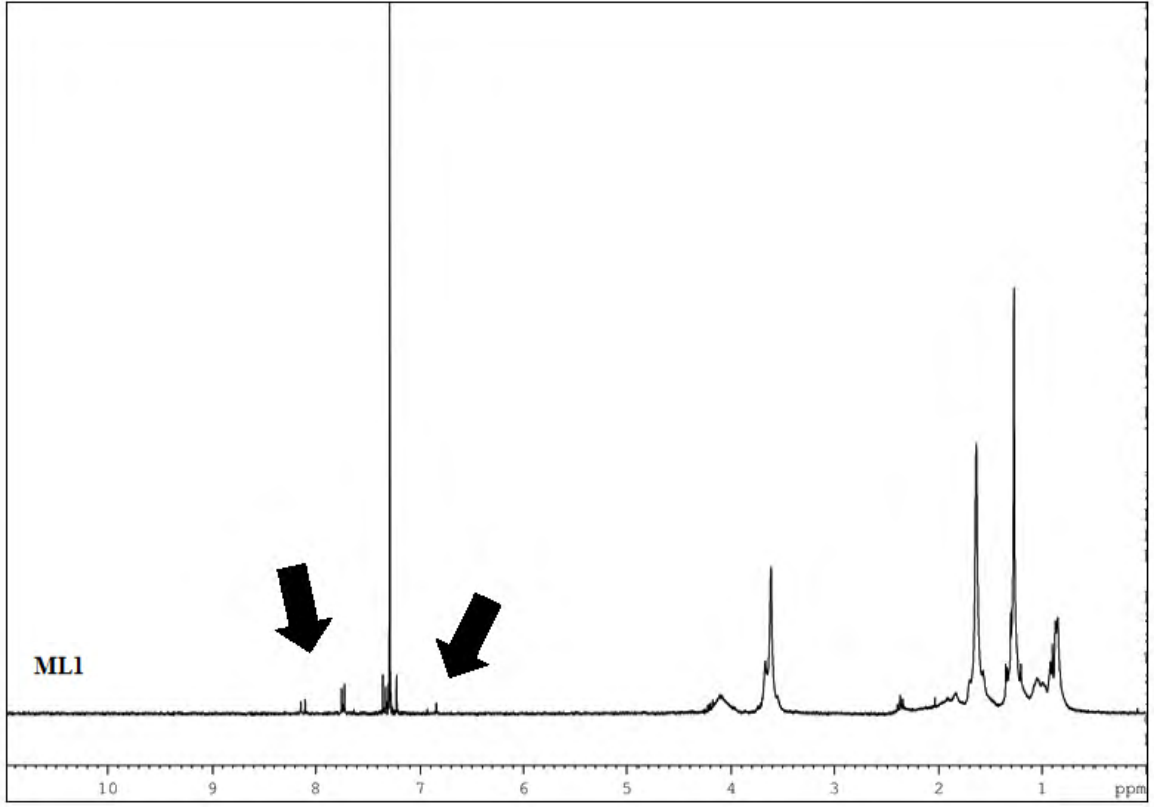


Şekil 5.14. (Devam) Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları

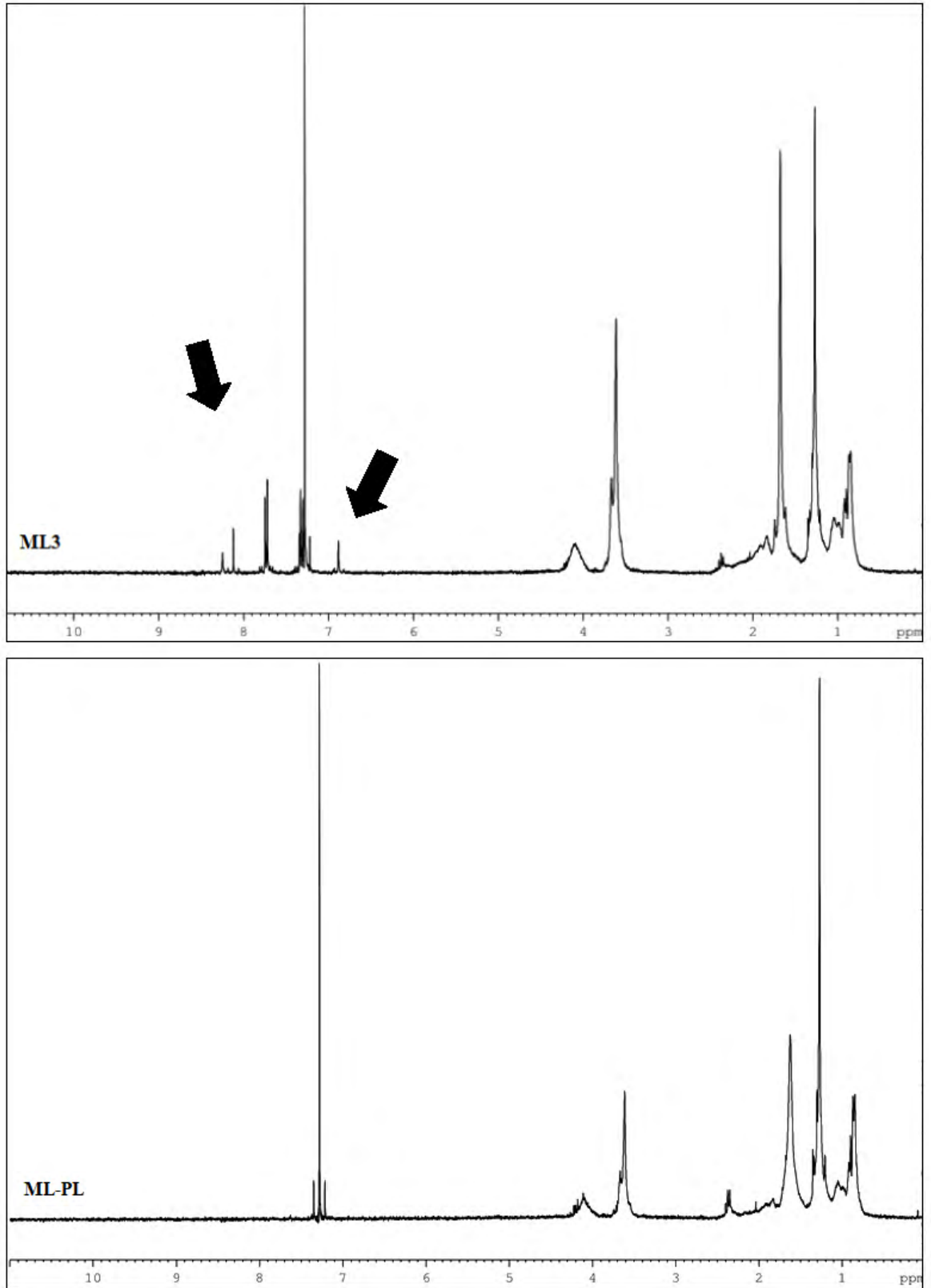
#### 5.2.2.6. Nükleer manyetik rezonans analizleri

NMR spektroskopisi, moleküllerin kimyasal yapısı ve hareketliliği hakkında atomlar düzeyinde önemli bilgiler sağlanmasında kullanılan bir karakterizasyon yöntemidir. Nanotaşıyıcı sistemlerde NMR spektroskopisi analizleri kullanılarak ilaç-polimer arasındaki olası moleküler etkileşimleri, dinamikleri, kimyasal yapıları, bağlanma ve değişim süreçleri hakkında bilgi sağlanabilmektedir (Coelho vd., 2015).

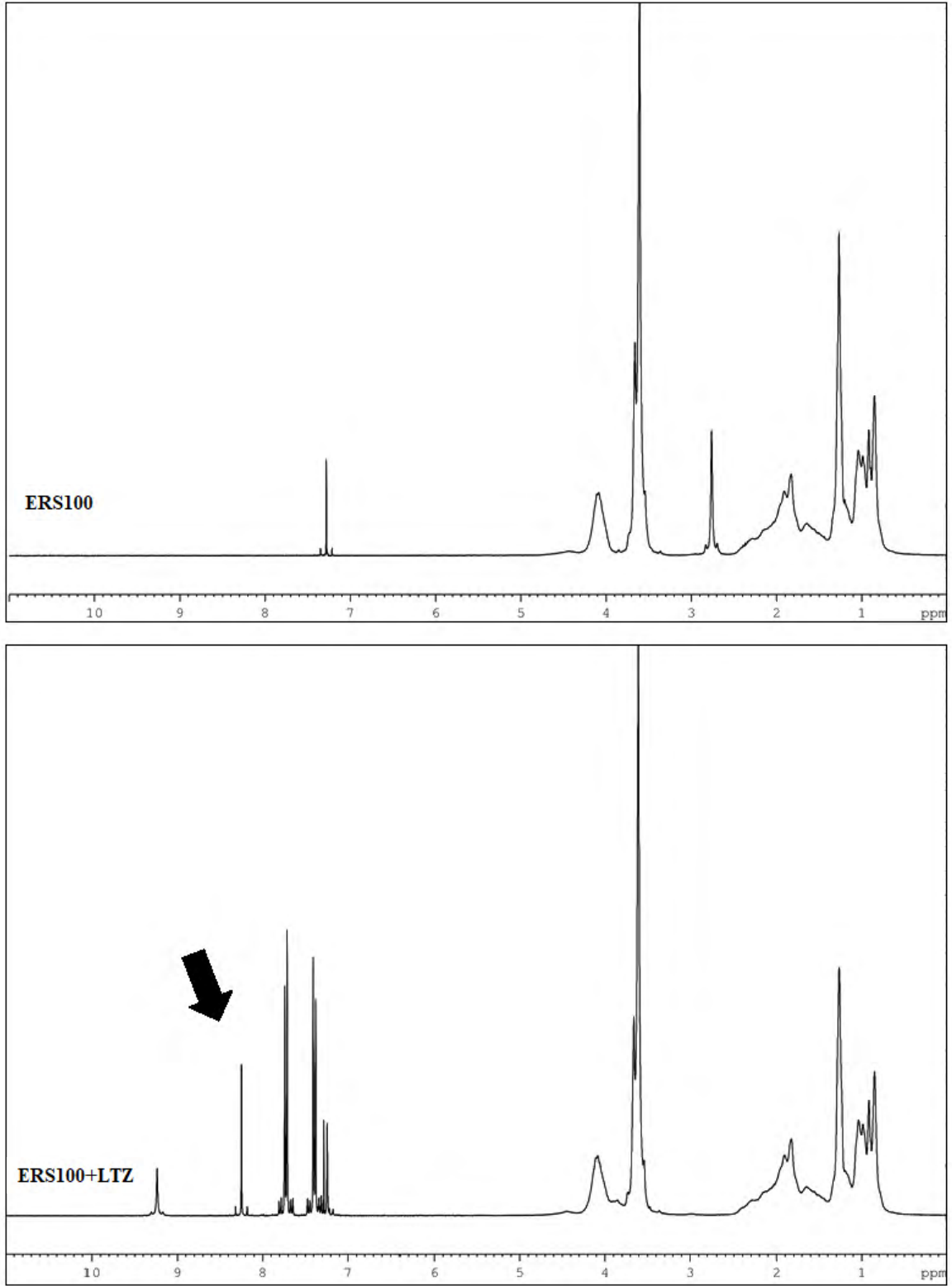
Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin <sup>1</sup>H-NMR analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.15’de sunulmuştur. Yapılan çalışmanın sonucunda saf LTZ’ün yapısında bulunan aromatik yapılara bağlı olarak 7-8 ppm arasında karakteristik sinyaller belirlenmiştir. Saf LTZ’e ait belirlenen karakteristik sinyaller etkin madde içeren formülasyona ait spektrumlarda da görülmüş (oklar ile işaretlenmiş) ve bu durum etkin madde ile polimer arasında kimyasal bir etkileşimin olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 5.15.).



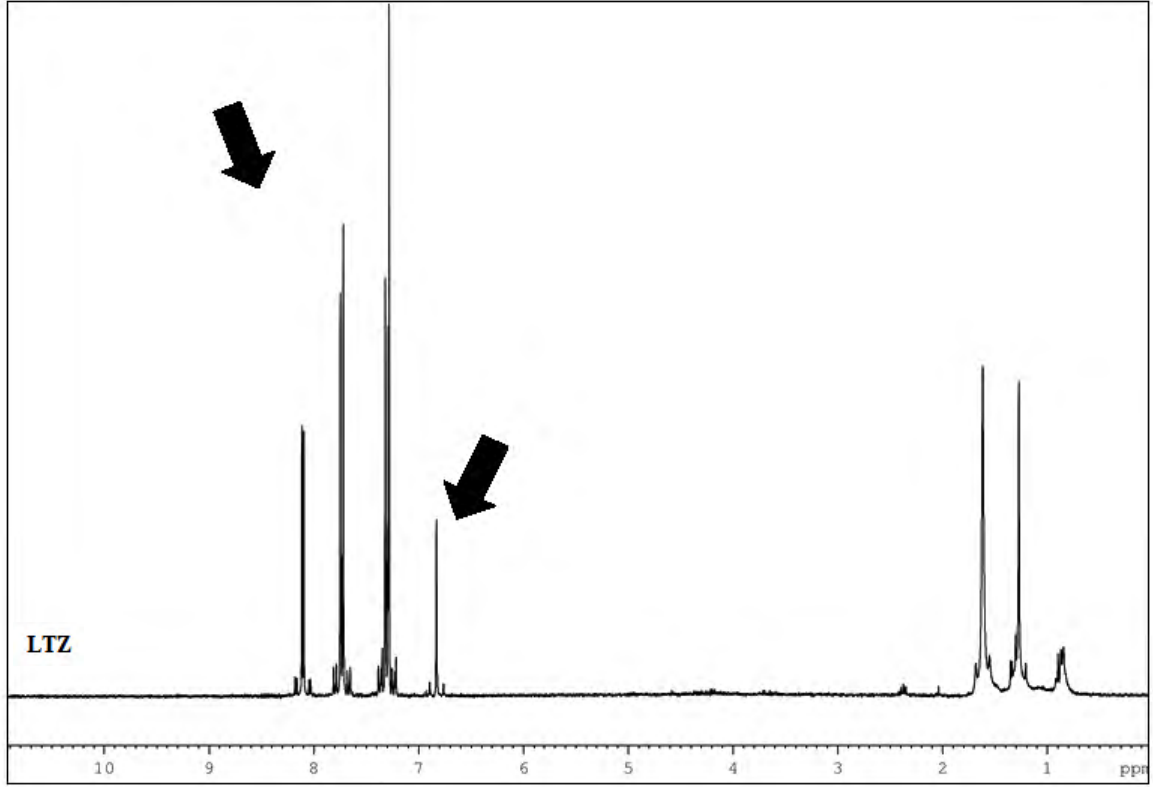
Şekil 5.15. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin <sup>1</sup>H-NMR analiz spektrumları



**Şekil 5.15. (Devam)** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları



**Şekil 5.15. (Devam)** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları



**Şekil 5.15. (Devam)** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin <sup>1</sup>H-NMR analiz spektrumları

#### 5.2.2.7. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini

Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini Çizelge 4.1.'de belirtilen analiz şartlarında, HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 5.5.'de verilmiştir.

**Çizelge 5.5.** Eudragit® RS 100 ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini analiz sonuçları (Ortalama  $\pm$  SH, n=3)

| KOD   | Toplam Etkin Madde Miktarı (% (a/a) $\pm$ SH, n=3) |
|-------|----------------------------------------------------|
| ML-PL | -                                                  |
| ML1   | 9.66 $\pm$ 0.03                                    |
| ML2   | 14.37 $\pm$ 0.02                                   |
| ML3   | 18.62 $\pm$ 0.05                                   |

Çalışmanın sonucunda elde edilen sonuçlar değerlendirilmiş ve nanopartiküllere yüklenen toplam etkin madde miktarı belirlenerek stabilite çalışmalarında değişimin belirlenmesi amacı ile başlangıç değeri olarak kullanılmıştır.

### 5.2.3. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları

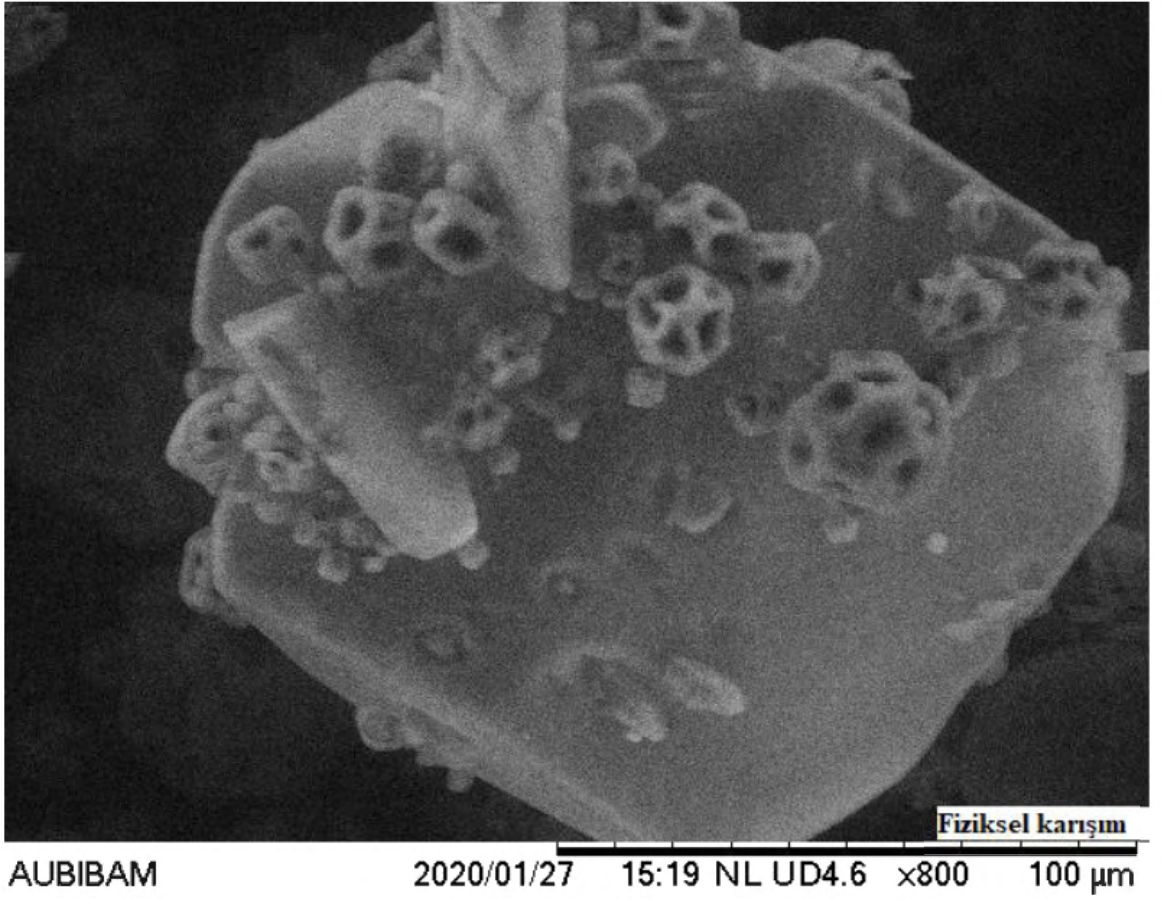
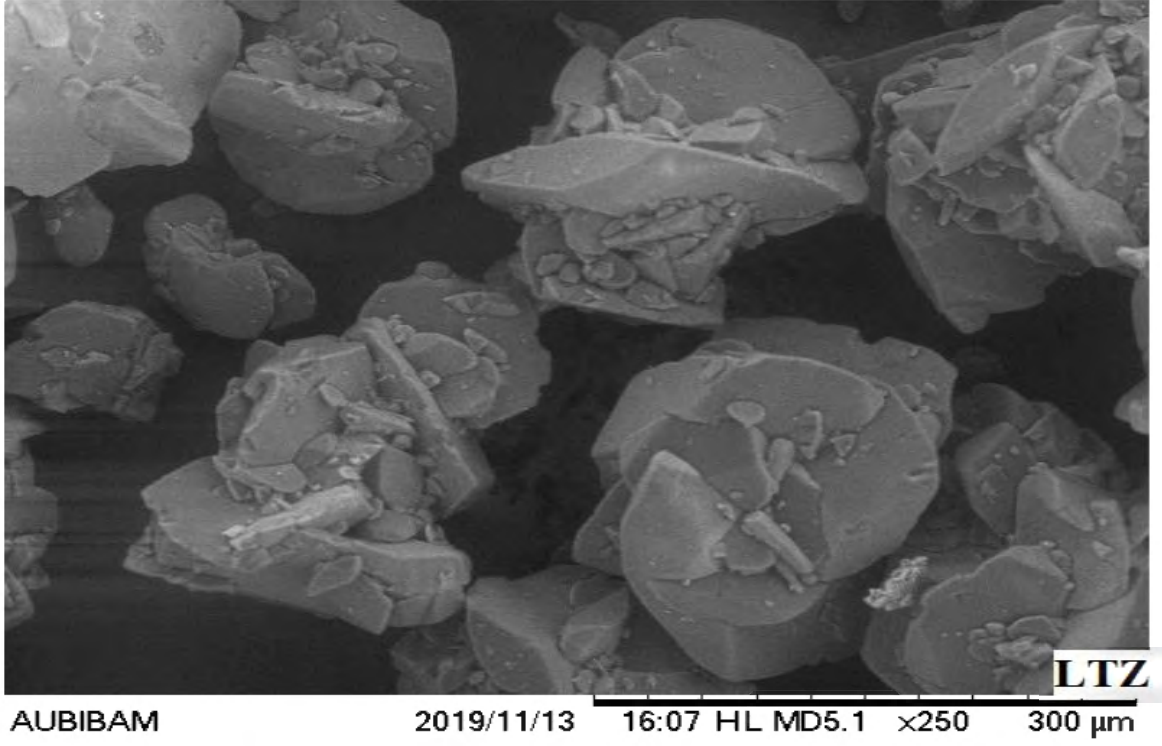
#### 5.2.3.1. Partikül şekli analizleri

SEM, nano taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı ve yüzey şekilleri hakkında bilgi sağlayan en önemli analizlerden biri olarak kabul edilmektedir (Fornaguera ve Solans 2018).

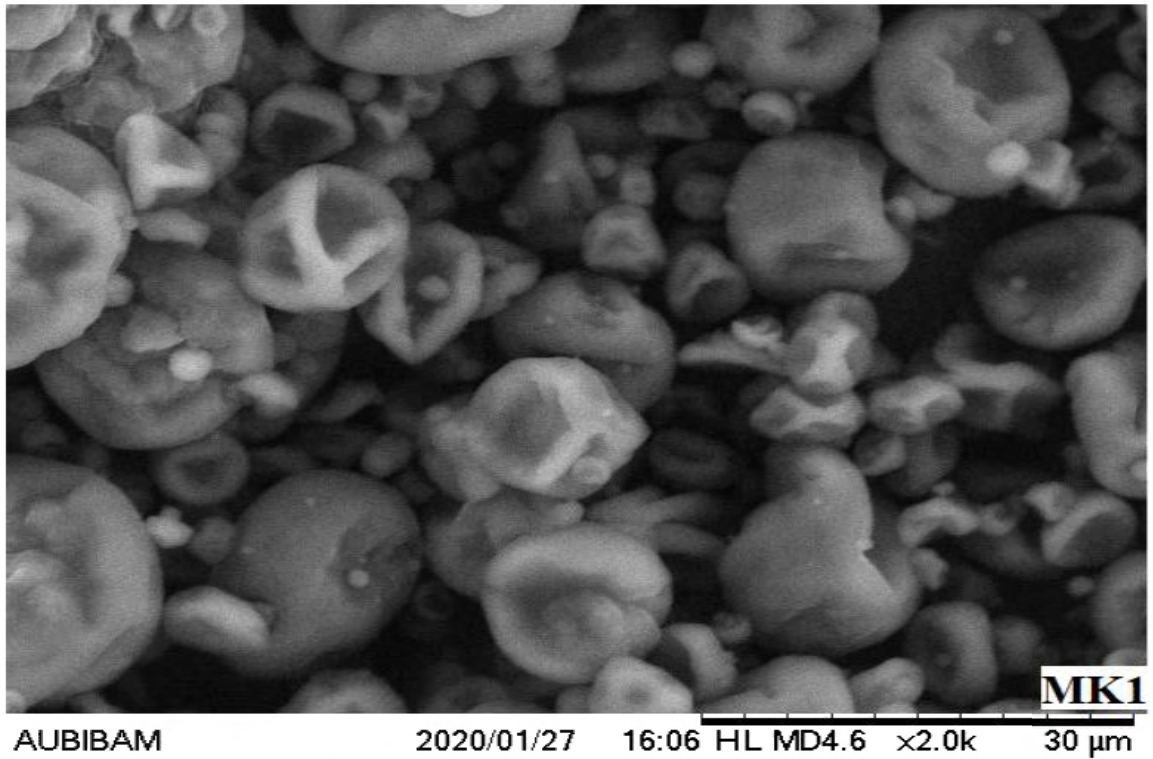
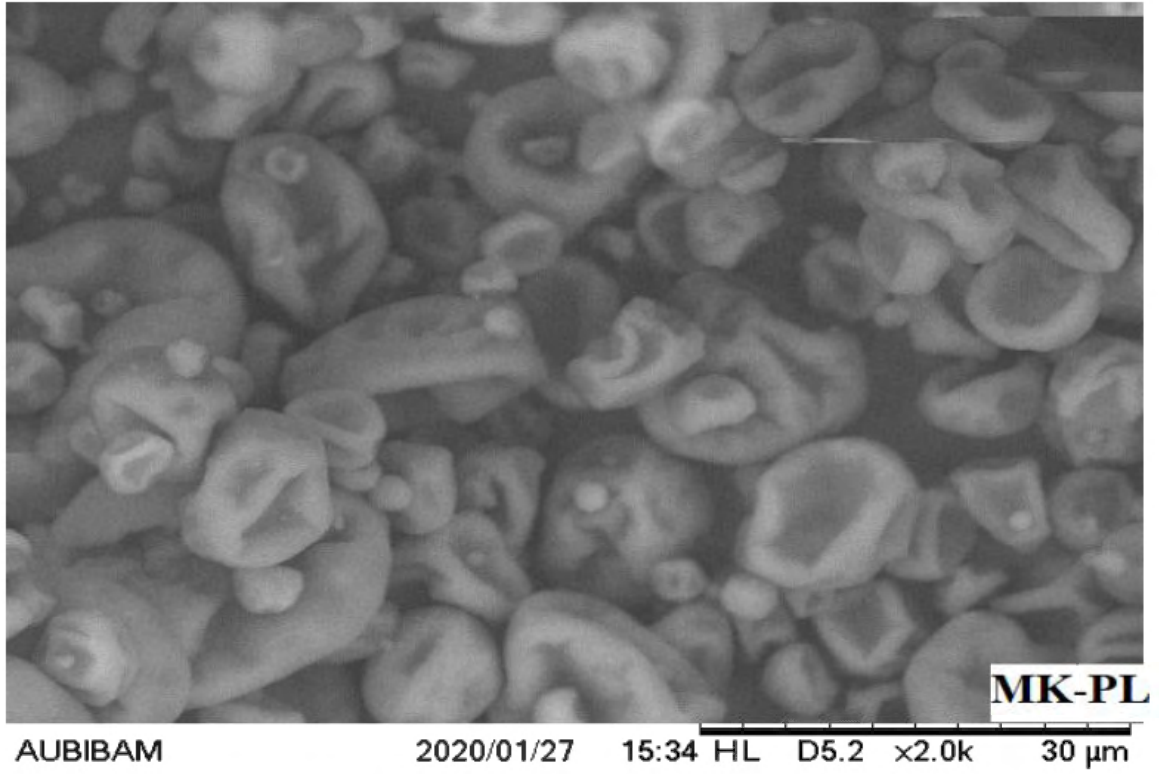
Çalışmamızda Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların morfolojik analizleri SEM ile belirlenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 5.16.'de sunulmuştur.

Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında elde edilen SEM görüntüleri değerlendirildiğinde saf etkin maddenin ve fiziksel karışımındaki LTZ'ün kristal yapıda olduğu görülmektedir. Formülasyonlar için elde edilen SEM görüntüleri ise nanopartiküllerin amorf yapıda olduklarını belirlemiştir. Formülasyonlarda kristal yapının ve pürüzlü yüzeylerin görülmemesi yüklenmeyen etkin maddenin bulunmadığını ortaya koymaktadır (Şekil 5.16.). Polimerik nanopartiküllerin amorf yapıda olması ilaç salımının sürdürülmesinde etkin rol oynamaktadır (Güven ve Yenilmez, 2019).

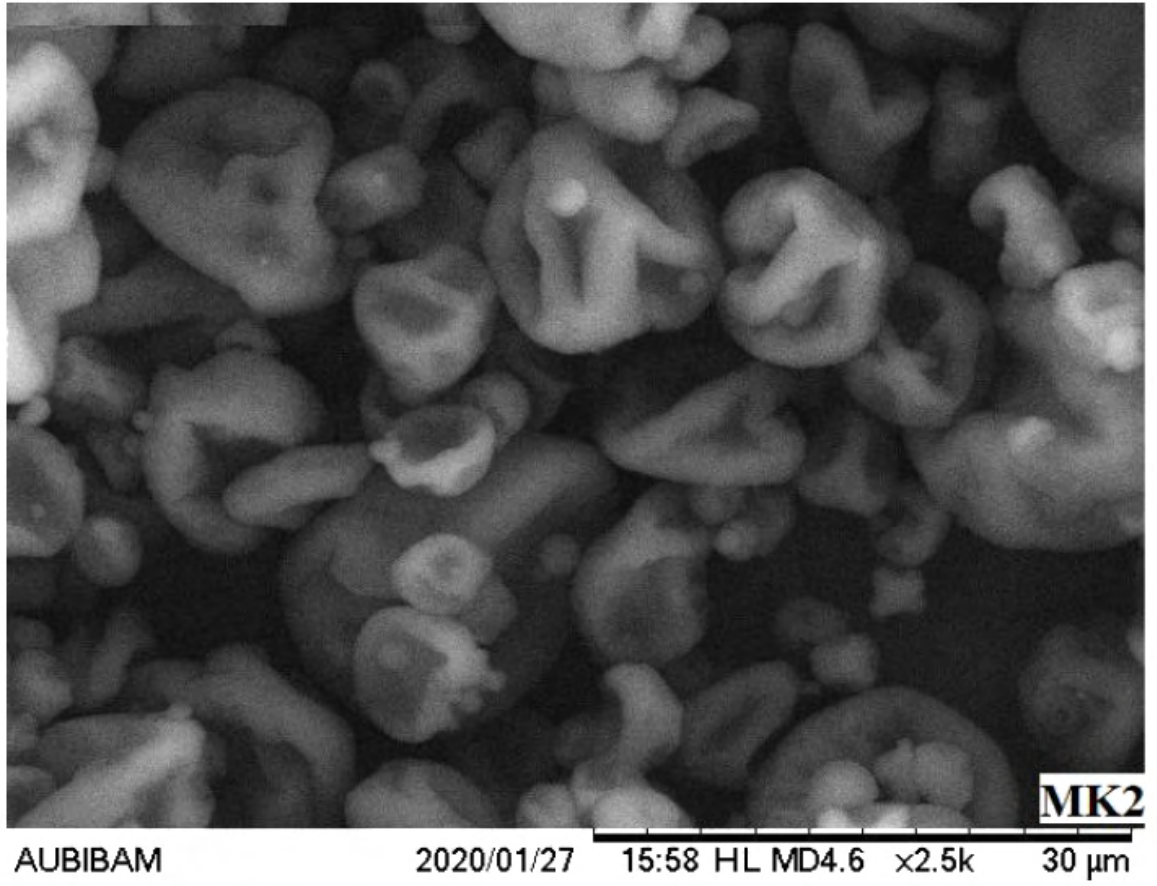
Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin SEM görüntülerinin değerlendirilmesinde gözlenen partiküllerin çoğunluğunun nano boyutta olduğu belirlenmiştir. Ancak mikro boyutunda gözlenen partiküller de bulunmuştur. Buna bağlı olarak Zetasizer cihazı ile yapılan partikül boyutu analizleri çalışmasında süzme işlemleri kullanılarak mikro boyutundaki partiküller uzaklaştırılarak nanoboyutunda veriler elde edilmiştir.



Şekil 5.16. Saf etkin maddenin ve Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların SEM görüntüleri



Şekil 5.16. (Devam) Saf etkin maddenin ve Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların SEM görüntüleri



Şekil 5.16. (Devam) Saf etkin maddenin ve Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların SEM görüntüleri

### 5.2.3.2. Partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı analizleri

Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı analiz sonuçları Çizelge 5.6’de sunulmuştur.

**Çizelge 5.6.** Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI) ve zeta potansiyel (ZP) analiz sonuçları (n=3, Ortalama ± SH)

| KOD   | PB (nm)    | PdI       | ZP (mV)   |
|-------|------------|-----------|-----------|
| MK-PL | 270.0±20.6 | 0.43±0.03 | -16.7±1.3 |
| MK1   | 287.0±14.3 | 0.47±0.05 | -17.3±0.8 |
| MK2   | 322.0±17.0 | 0.52±0.02 | -18.3±0.4 |
| MK3   | 380.0±23.3 | 0.50±0.05 | -21.5±0.6 |

Partikül boyutu, ilaç taşıyıcılarının ve dozaj formlarının üzerinde taşıdığı fizikokimyasal ve biyofarmasötik özellikler nedeniyle farmasötik ürünlerin üretiminde kritik bir proses parametresi olarak sayılmaktadır. Partikül boyutu analizi, nihai dozaj formlarının ve ilaç taşıyıcı sistemlerinin kalite kontrolü çalışmalarında önemli yer almaktadır (Shekunov vd., 2007). Küçük partiküller, daha uzun süre yapışkanlık özelliği nedeniyle büyük partiküllere göre daha yüksek biyoyararlanım göstermektedir (Al-Heibshy vd., 2016). Formülasyonun partikül boyutu dağılımı özellikle kolloidal sistemlerin fiziksel stabilitesi için önemli rol oynamaktadır (Yurtdaş Kırımlıoğlu ve Görgülü, 2019).

Çalışmada elde edilen sonuçlardan partiküllerin nanometre boyutunda (~270 -380 nm) ve homojen partikül büyüklüğü dağılımına (PdI ~0.4 - 0.5) sahip oldukları görülmüştür (Çizelge 5.6.). Partiküllerin, partikül büyüklüğü dağılımının 0.7’den yüksek olması partiküllerin geniş partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduklarını gösterir ve zayıf stabiliteye işaret etmektedir (Yenilmez . E., 2017; Yurtdaş Kırımlıoğlu ve Görgülü., 2019). Çalışmamızda bulunan partikül büyüklüğü dağılımı değerlerinin hepsi Çizelge 5.4’te görüldüğü gibi 0.7’nin altında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, stabilite çalışmalarında partikül büyüklüğü ve dağılımındaki olası değişimlerin araştırılmasında başlangıç değerler olarak kullanılmıştır.

### 5.2.3.3. Zeta potansiyel analizleri

Zeta potansiyeli, kolloidal sistemlerde elektrokinetik potansiyeli için kullanılan bir kavramdır ve nanotaşıyıcıların kararlılıklarının araştırılmasında önemli bir rol

oynamaktadır (Kumar ve Dixit 2017). Zeta potansiyeli, ayrıca nanosistemlerin vücutta fiziksel ve farmakokinetik özelliklerini veya nanopartiküllerin kan akışındaki fagositozunu etkileyebilmektedir (Yurtdaş Kırımlıoğlu ve Öztürk, 2020).

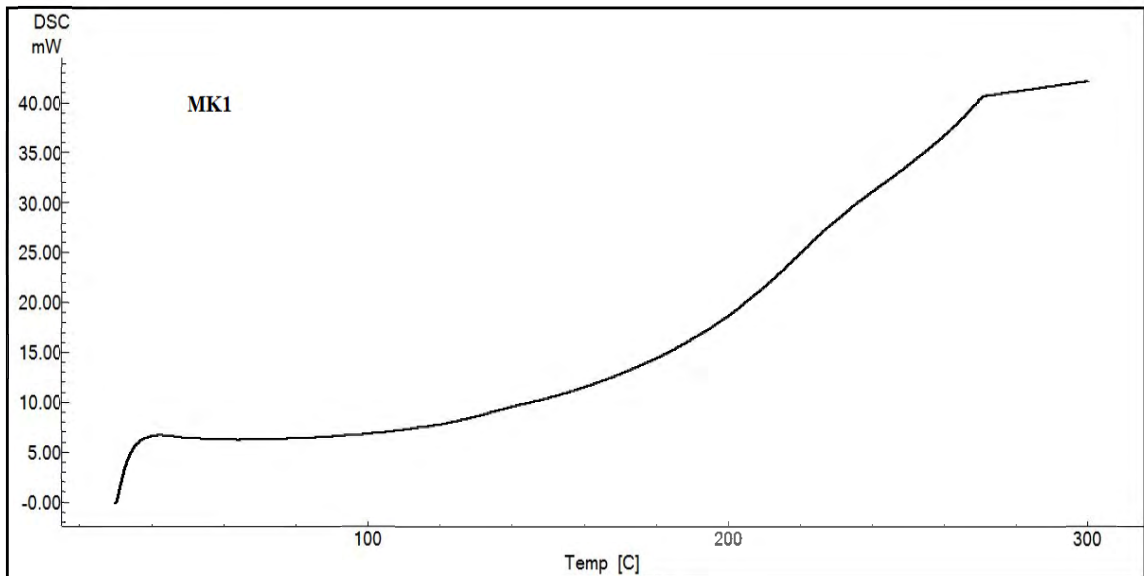
Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel analizleri Çizelge 5.6.'de sunulmuştur.

Çalışmanın sonucunda formülasyonlar beklendiği gibi anyonik özellik göstermişler ( $\sim -16$  -  $-21\text{mV}$ ) ve aldıkları yüksek değerler sayesinde süspande halde kararlı olacakları belirlenmiştir (Çizelge 5.6.) (Öztürk vd., 2017).

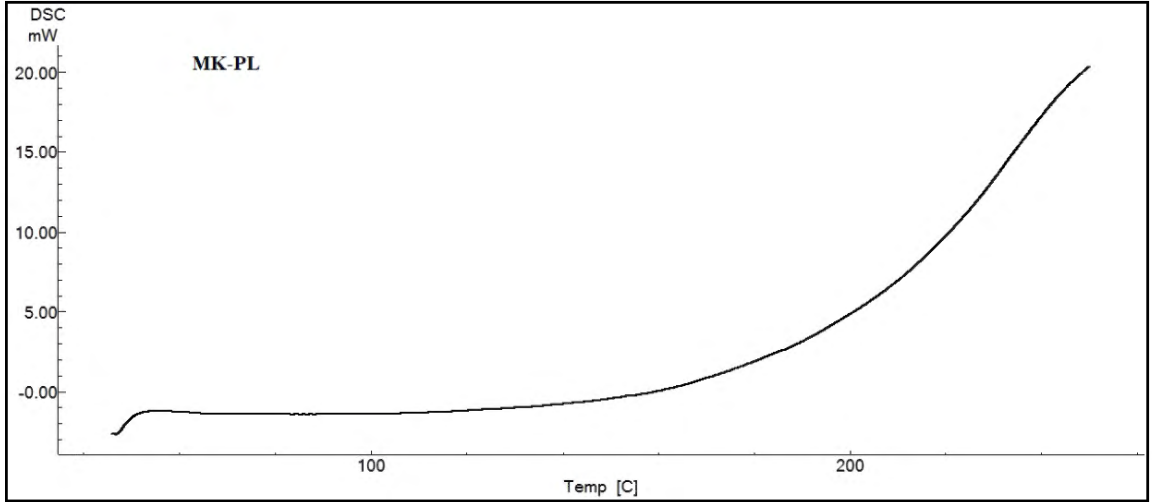
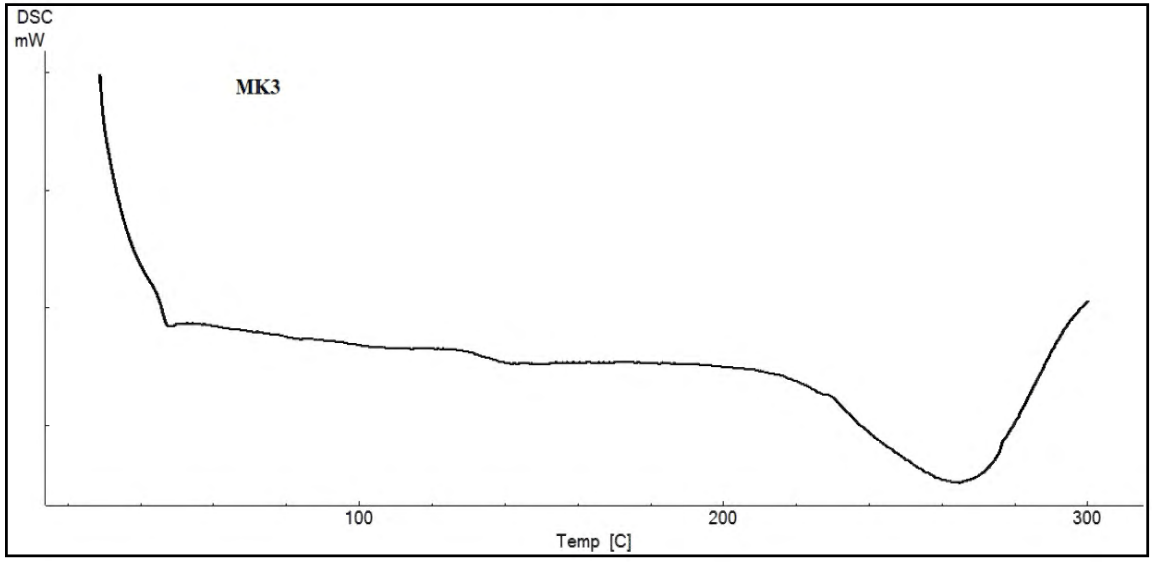
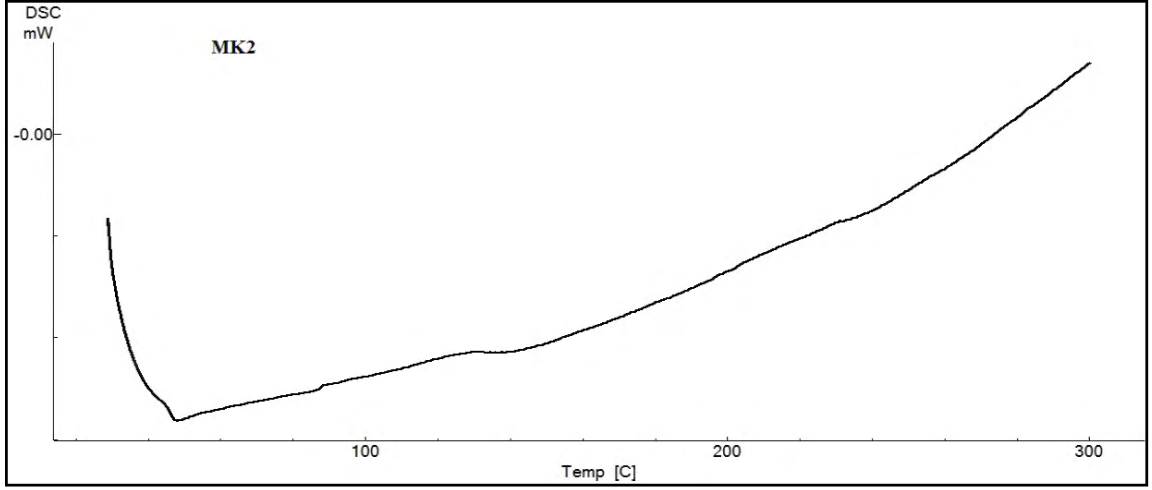
#### 5.2.3.4. Termal analizler

Kollidon® SR 100 ile hazırlanan formülasyonların DSC termogramları Şekil 5.17'de sunulmuştur.

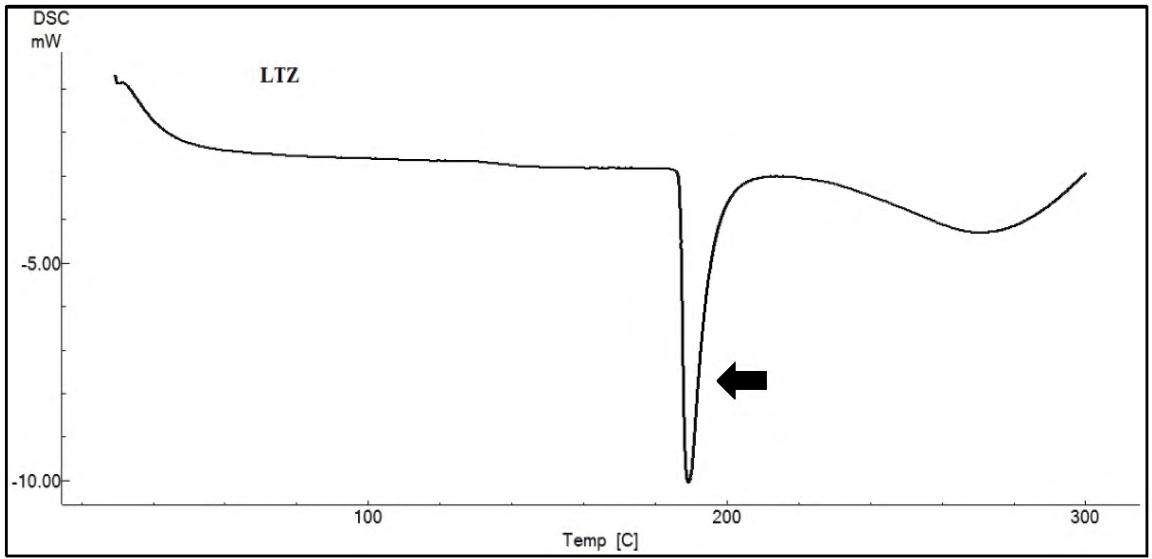
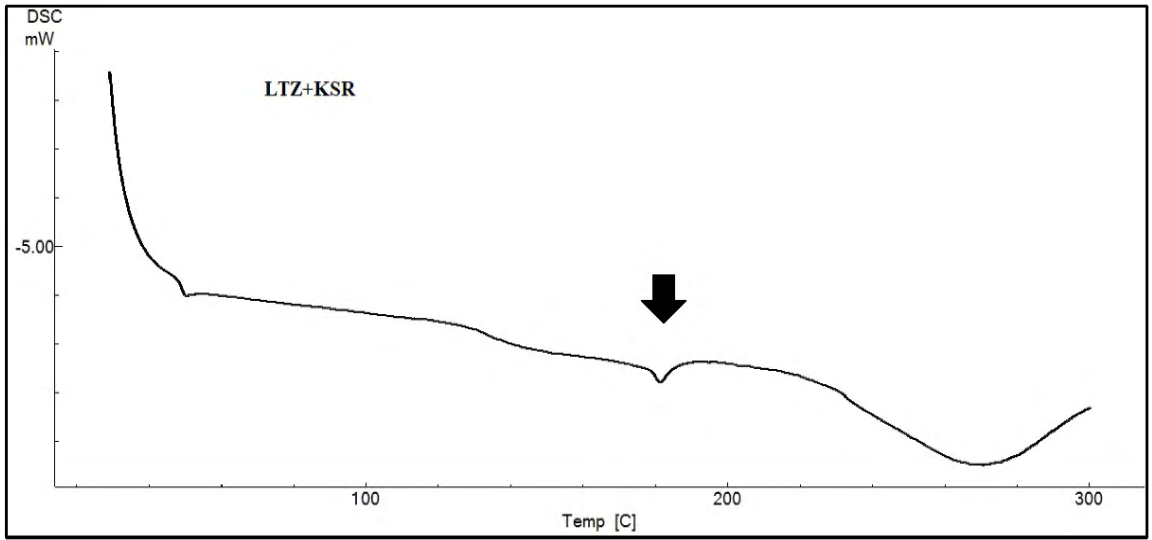
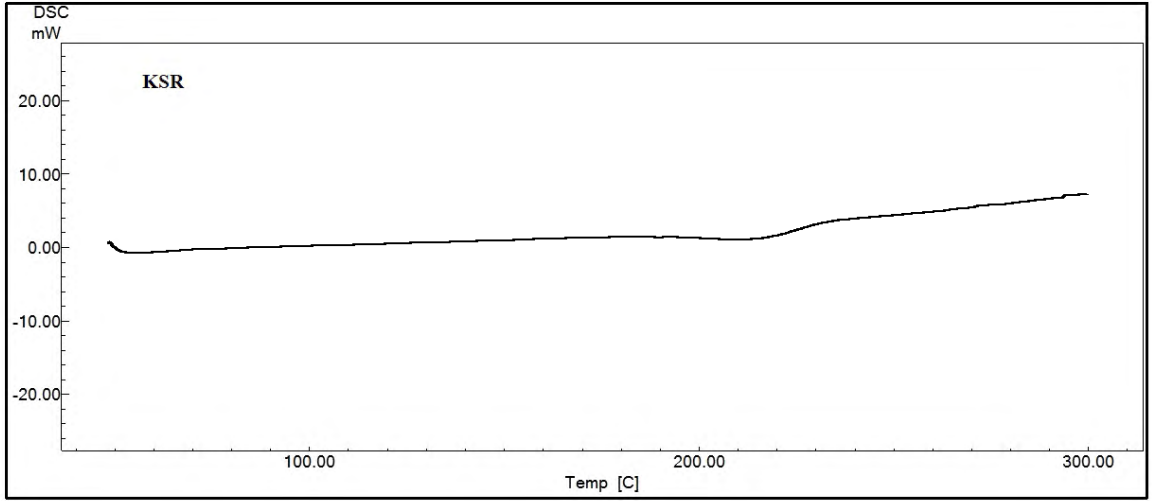
Çalışmanın sonucunda saf etkin madde'ye ve fiziksel karışıma ait DSC termogramları incelendiğinde LTZ'e ait erime pikinin ortaya çıkması maddenin kristal yapıda olduğunu göstermektedir. Amorf yapıya sahip Kollidon® SR (Şekil 5.5.) ile hazırlanan formülasyonlara ait termogramlarda herhangi bir pikin gözlenmemesi sonucunda nanopartiküllerin de amorf yapıda oldukları ve etkin madde ile polimer arasında kimyasal etkileşimin bulunmadığını ortaya koymaktadır (Şekil 5.17.).



Şekil 5.17. Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar



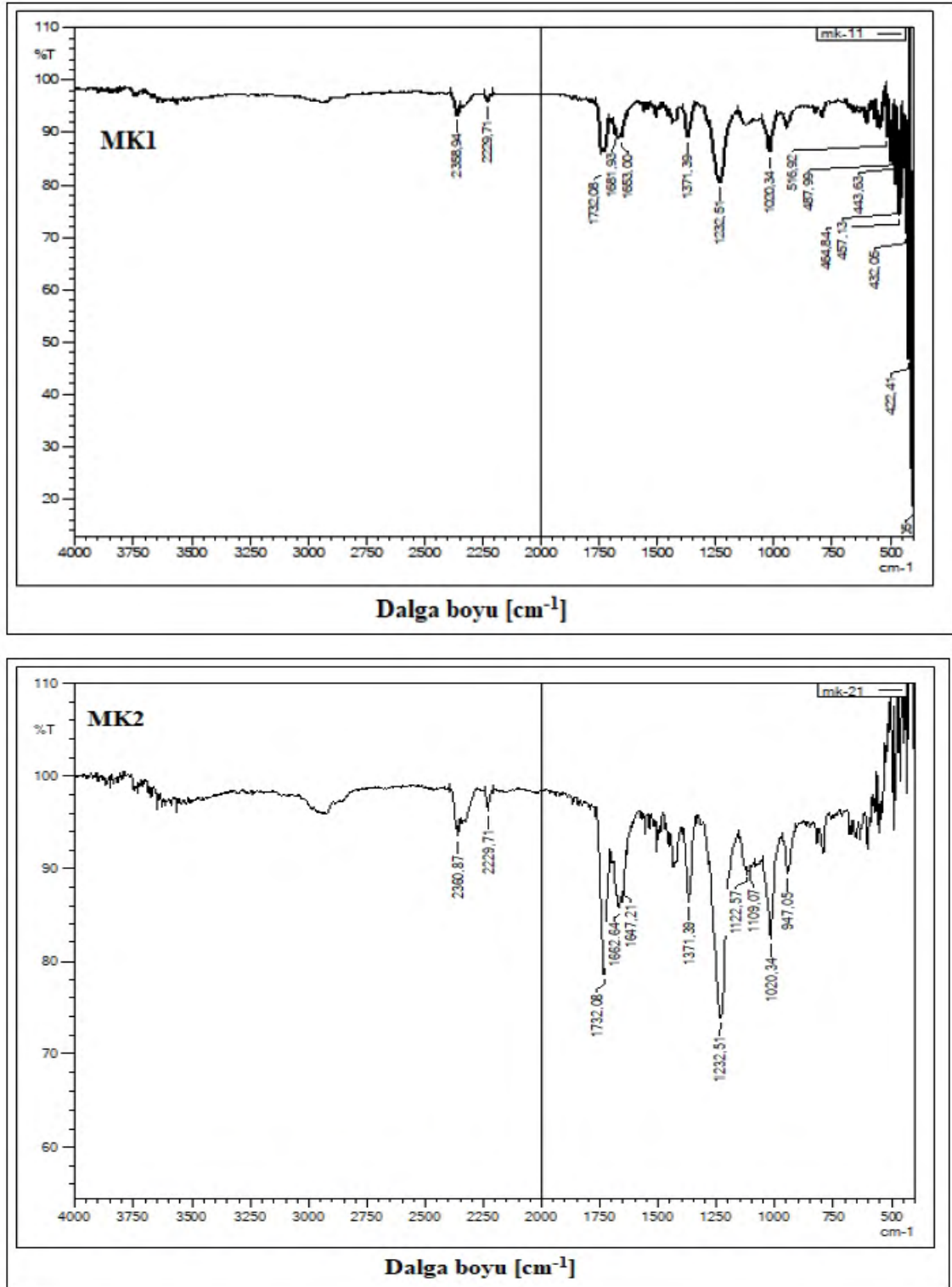
**Şekil 5.17. (Devam)** Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar



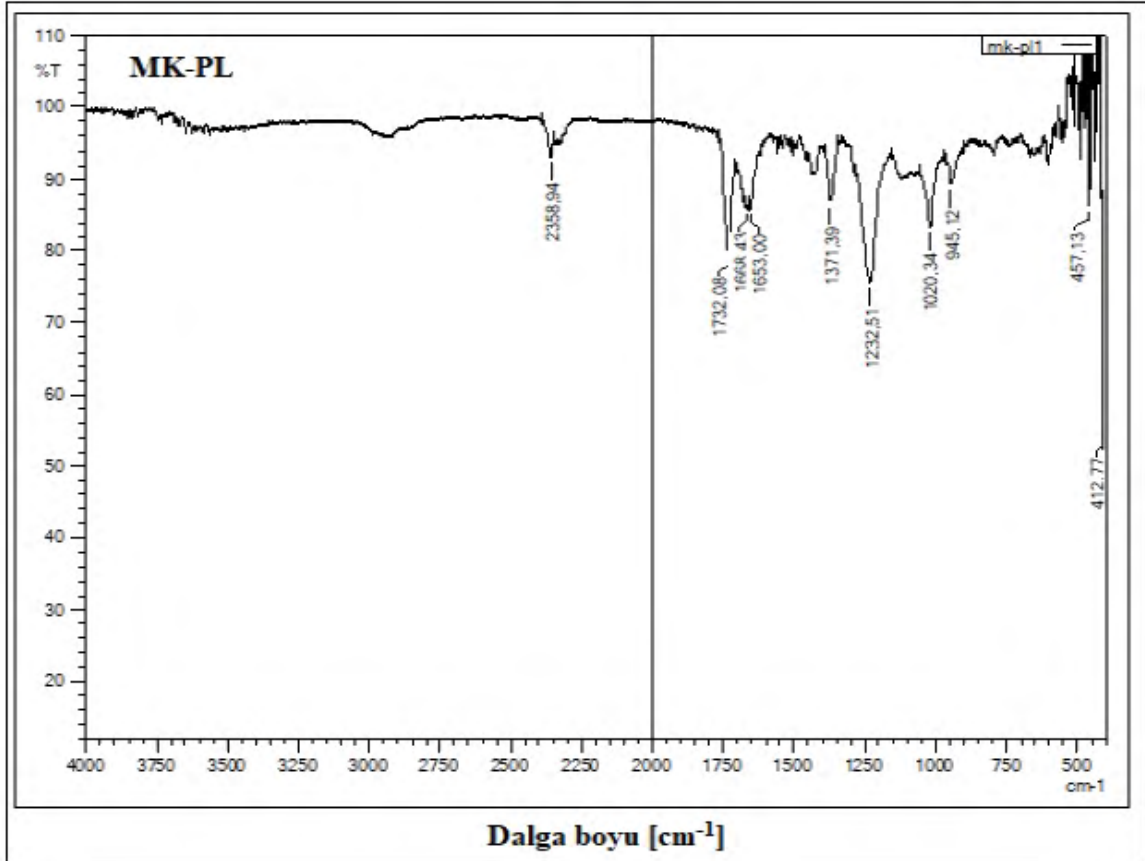
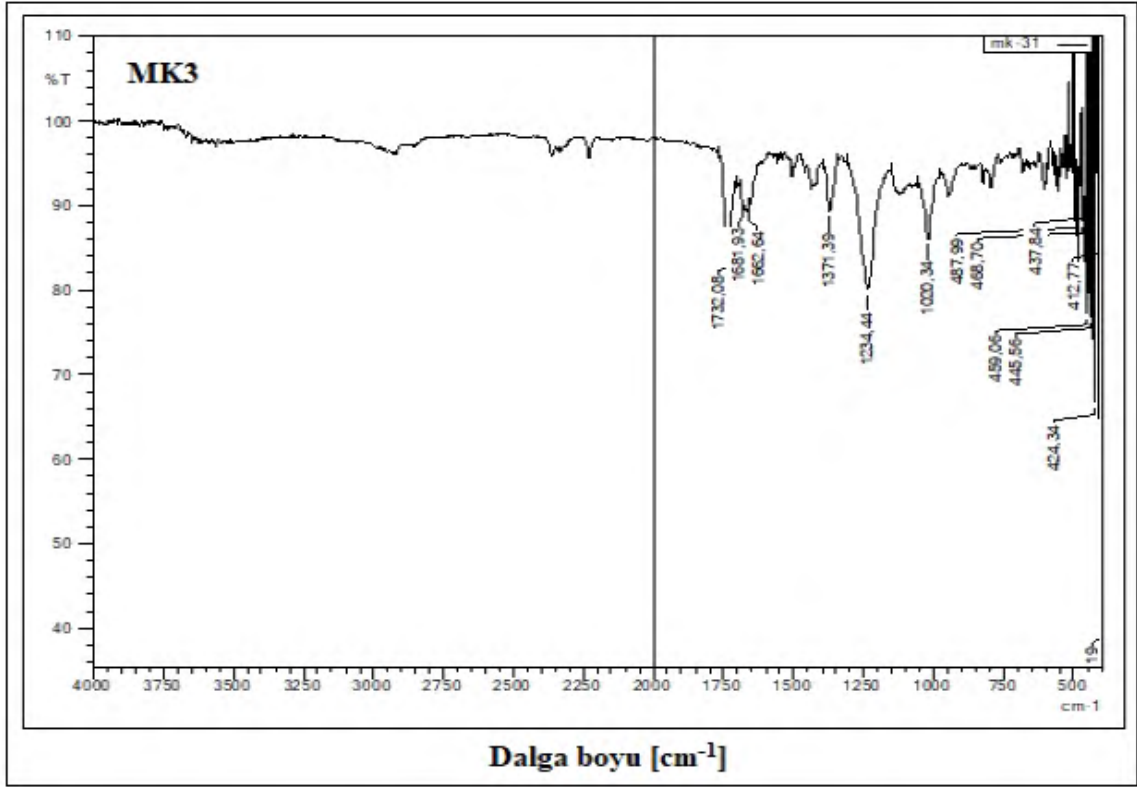
**Şekil 5.17. (Devam)** Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların ve kullanılan saf maddelerin DSC analizlerine ait termogramlar

### 5.2.3.5. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

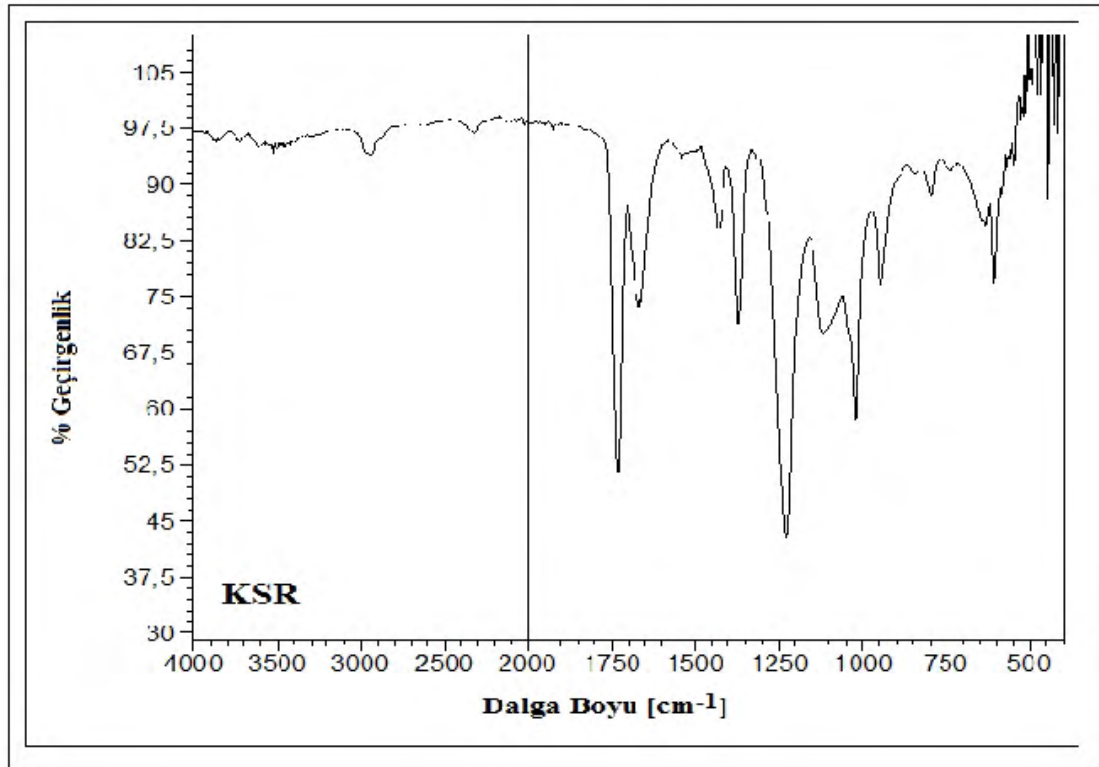
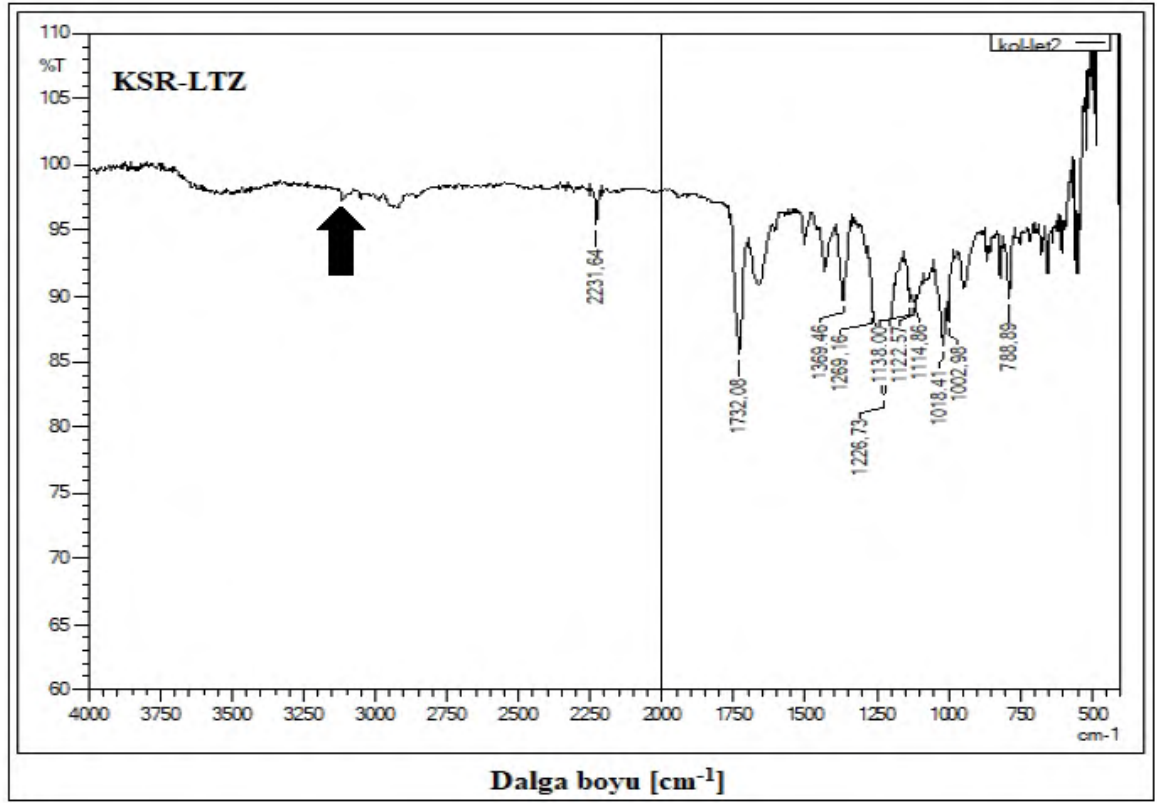
Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların ve bileşenlerine ait FT-IR analiz sonuçları Şekil 5.18’de verilmiştir.



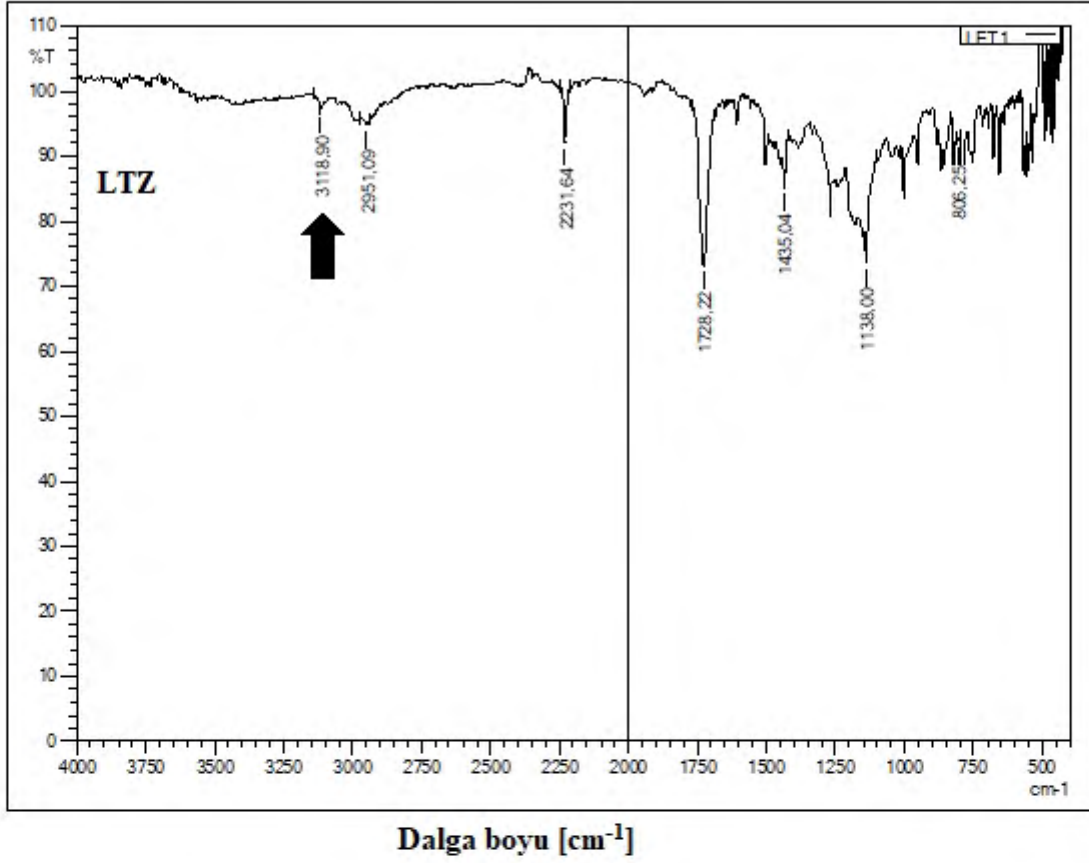
Şekil 5.18. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları



**Şekil 5.18. (Devam)** Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları



Şekil 5.18. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları



**Şekil 5.18. (Devam)** Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve kullanılan saf maddelerin FT-IR analiz spektrumları

FT-IR analizleri, bileşiklerin fonksiyonel grupları hakkında bilgi sağlayarak formülasyonlardaki etken madde ve polimer arasındaki olası etkileşimlerin araştırılmasında önem taşımaktadır (Saito ve Iwata, 2012; Mourdikoudis vd., 2018).

Çalışmada elde edilen FT-IR spektrumları değerlendirildiğinde saf LTZ'e ait spektrumda 1600-1475  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=C aromatik, 1690-1640  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=N, 1728.22  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H zayıf aromatik, 2231.64  $\text{cm}^{-1}$ 'de C≡N zayıf nitril, 2951.09  $\text{cm}^{-1}$ 'de N-H amin tuzu ve 3118.90  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H orta şiddetli alkan gruplarına ait pikler karakteristik pikler olarak belirlenmiştir (Dey vd. 2009; Maniyar vd., 2019; Sheoran vd., 2020). Saf Kollidon® SR'e ait FT-IR spektrumu incelendiğinde 1020  $\text{cm}^{-1}$ 'de N-C amin, 1232  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O ve 1732  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=O gruplarına ait pikler karakteristik pikler olarak belirlenmiştir (Choiri vd., 2019; Güven ve Yenilmez, 2019).

Saf Kollidon® SR'ye ait belirlenen karakteristik pikler tüm formülasyonlarda görülmüştür. Saf LTZ'e ait karakteristik pikler ise fiziksel karışımda görülmesine rağmen formülasyonlara ait FT-IR spektrumlarında saptanmamıştır. Bunun nedeni ise etkin

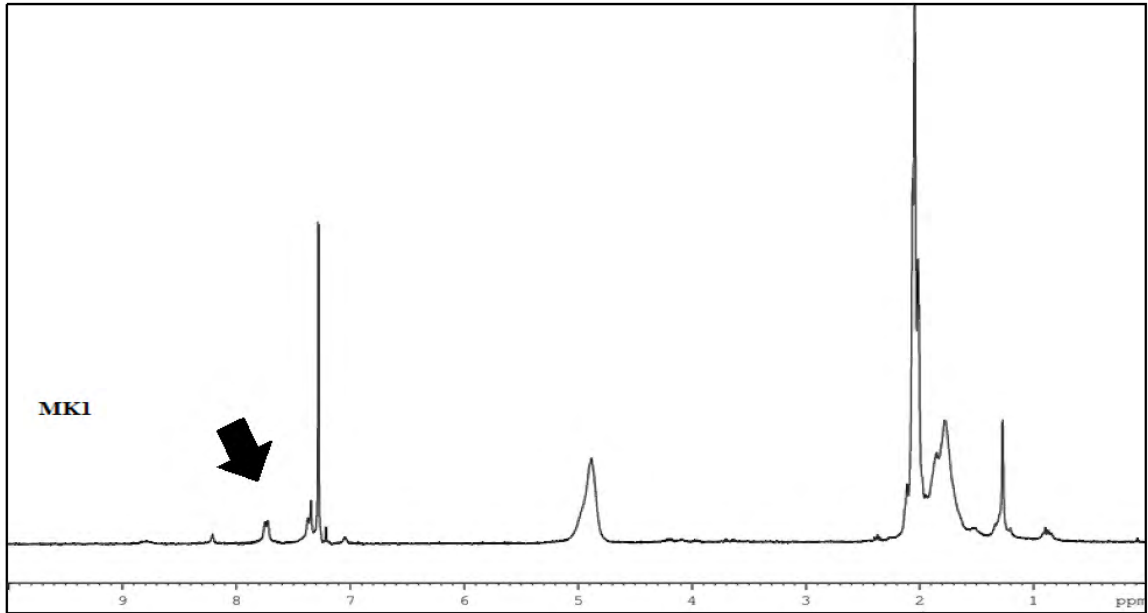
maddenin polimerik yapı içinde moleküler düzeyde dağılması ve etkin madde ile polimer arasında kimyasal bir etkileşimin olmamasını açıklamaktadır (Gomathi vd., 2017).

#### 5.2.3.6. Nükleer manyetik rezonans analizleri

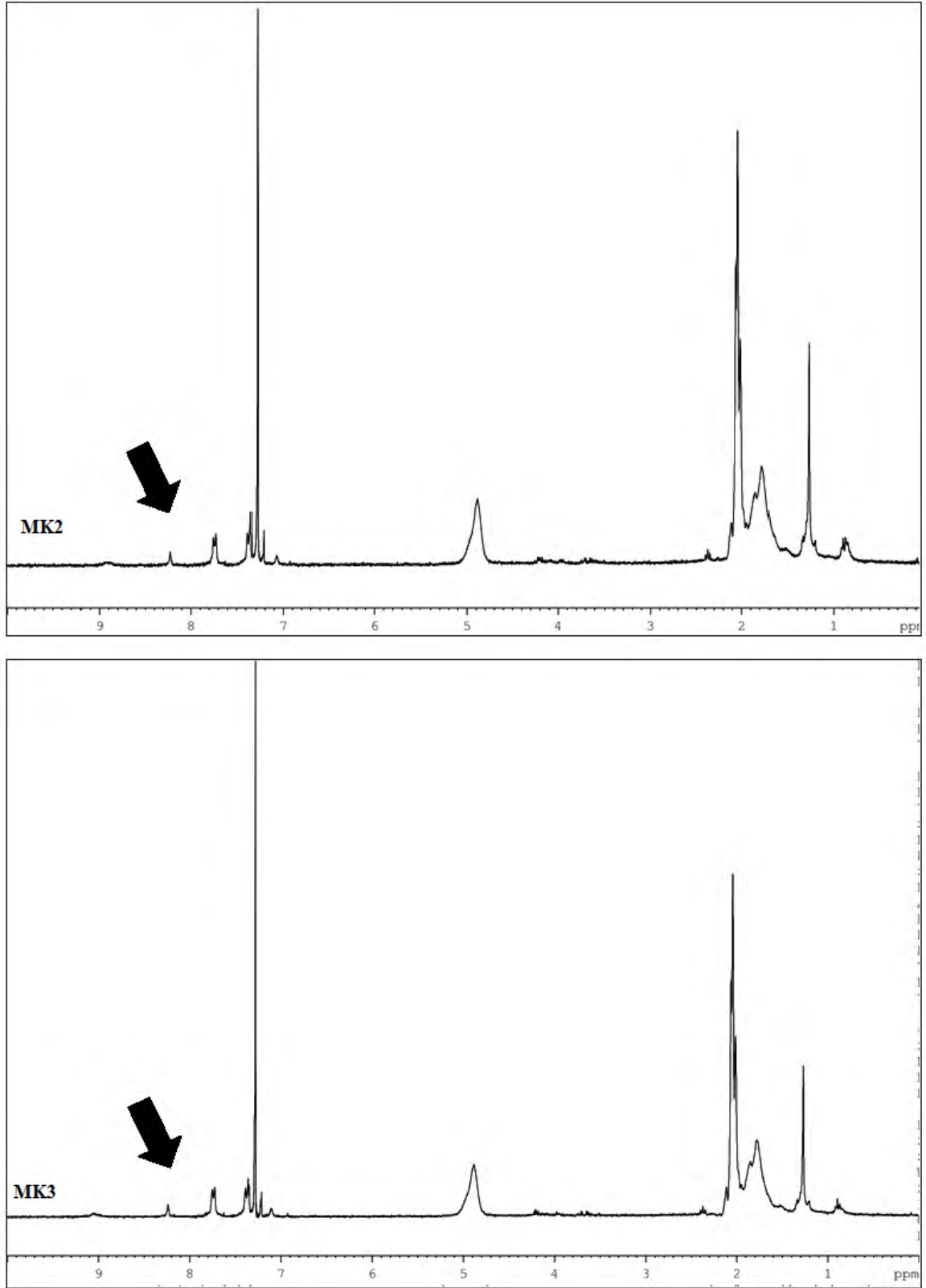
NMR analizleri, formülasyondaki maddelerin kimyasal özellikleri ve taşıyıcılara yüklenen etkin madde ile yardımcı maddeler arasındaki moleküler etkileşimleri açıklamak için kullanılmaktadır (Al-Heibshy vd., 2016).

Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların  $^1\text{H}$ -NMR analizlerine ait spektrumlar Şekil 5.19’da sunulmuştur.

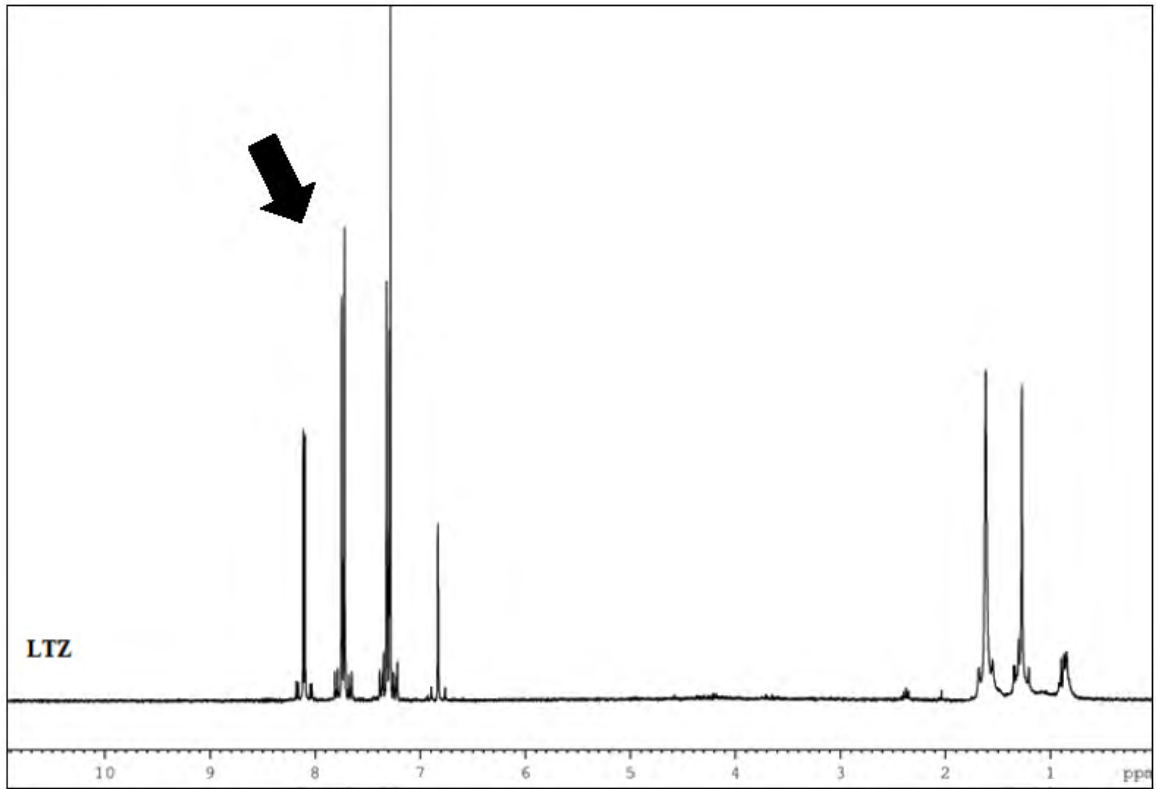
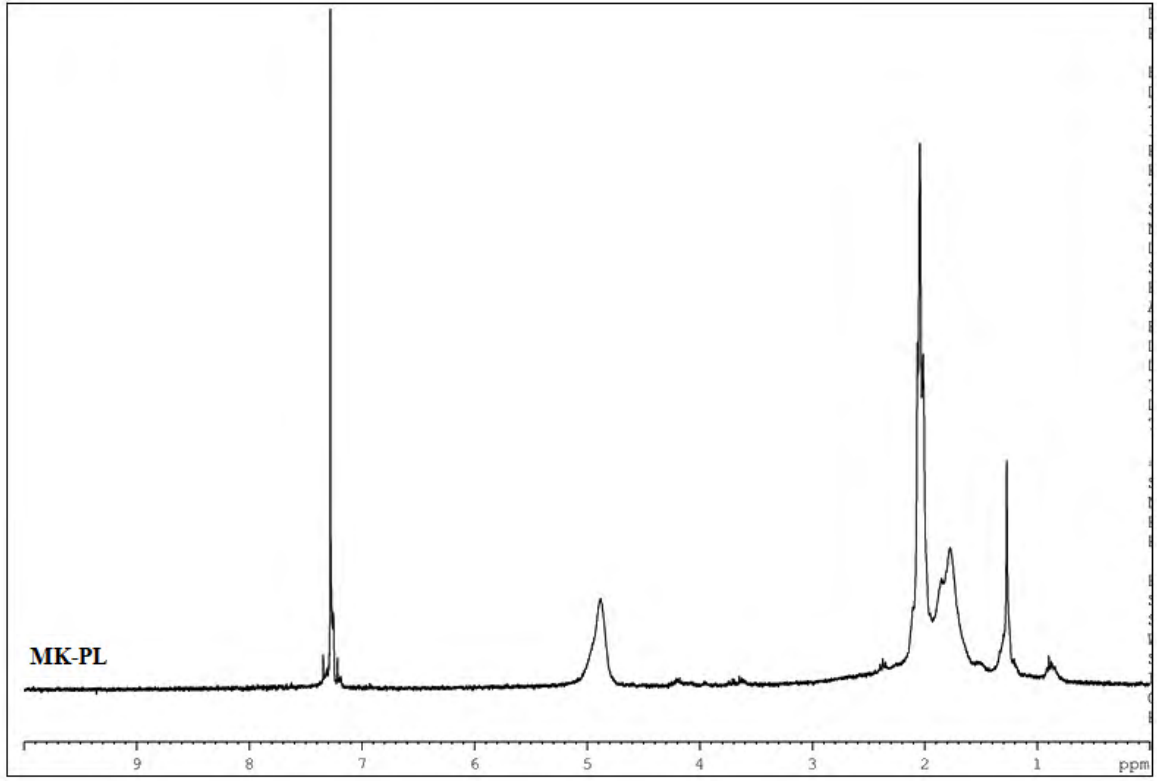
Yapılan çalışmanın sonucunda saf etken madde yapısında bulunan aromatik gruplara bağlı olarak 7-8 ppm arasında karakteristik sinyaller belirlenmiştir. Saf LTZ’e ait belirlenen karakteristik sinyaller etkin madde içeren formülasyonlara ait spektrumlarda tespit edilmiş (oklar ile işaretlenmiş) ve bu durum etkin madde ile polimer arasında kimyasal etkileşimin bulunmadığını ortaya koymuştur (Yurtdaş Kırımlıoğlu ve Öztürk, 2020).



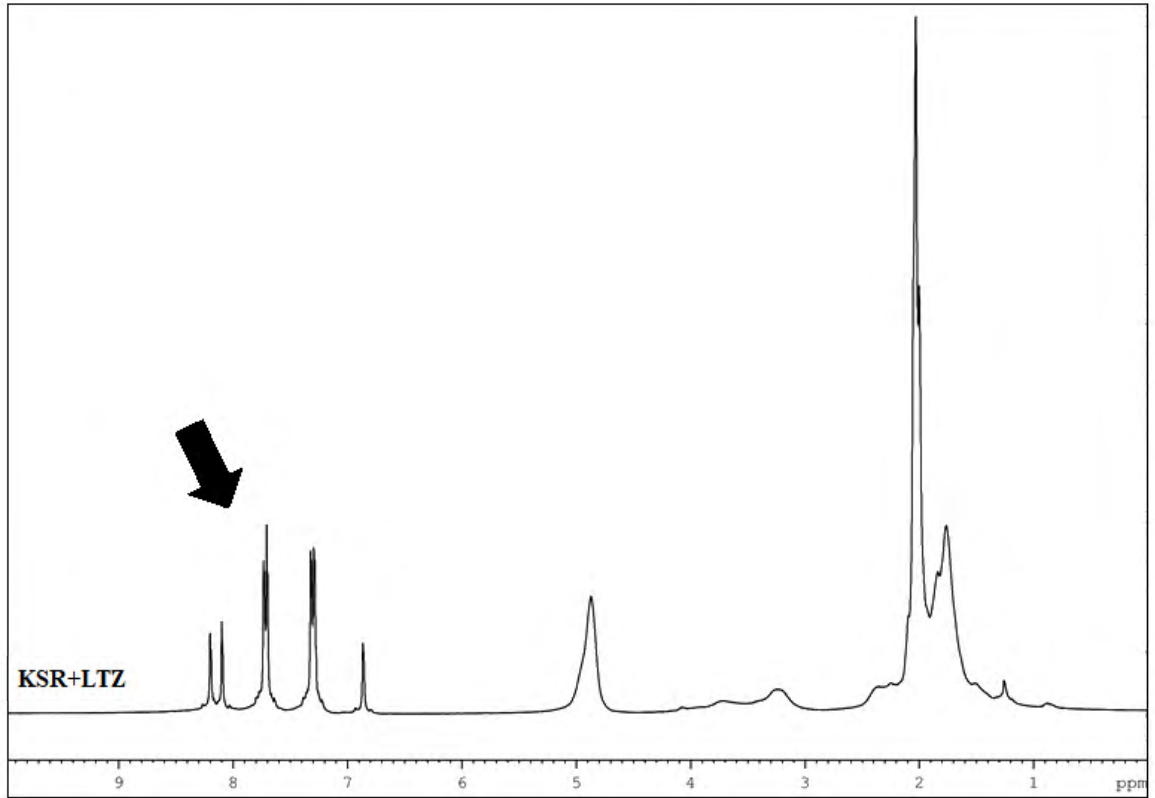
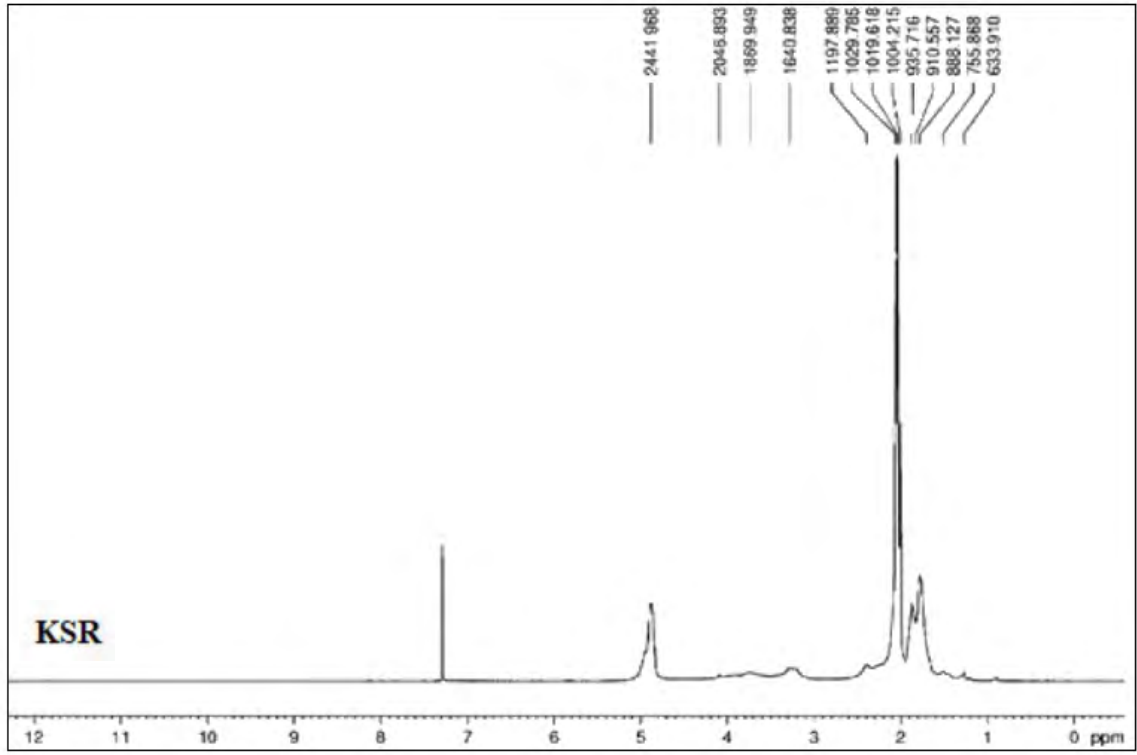
Şekil 5.19. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları



Şekil 5.19. (Devam) Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları



**Şekil 5.19. (Devam)** Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin <sup>1</sup>H-NMR analiz spektrumları



**Şekil 5.19. (Devam)** Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin ve saf maddelerin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları

### 5.2.3.7. Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini

Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar analiz sonuçları Çizelge 5.7.'de verilmiştir.

**Çizelge 5.7.** Kollidon® SR ile hazırlanan nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini analiz sonuçları  
(Ortalama  $\pm$  SH, n=3)

| KOD   | Toplam Etkin Madde Miktarı<br>(%(a/a) $\pm$ SH, n=3) |
|-------|------------------------------------------------------|
| MK-PL | -                                                    |
| MK1   | 9.72 $\pm$ 0.02                                      |
| MK2   | 14.61 $\pm$ 0.04                                     |
| MK3   | 19.02 $\pm$ 0.06                                     |

Gerçekleştirilen miktar tayini çalışması sonucunda elde edilen veriler stabilite çalışmasında başlangıç değerler olarak belirlenmiştir.

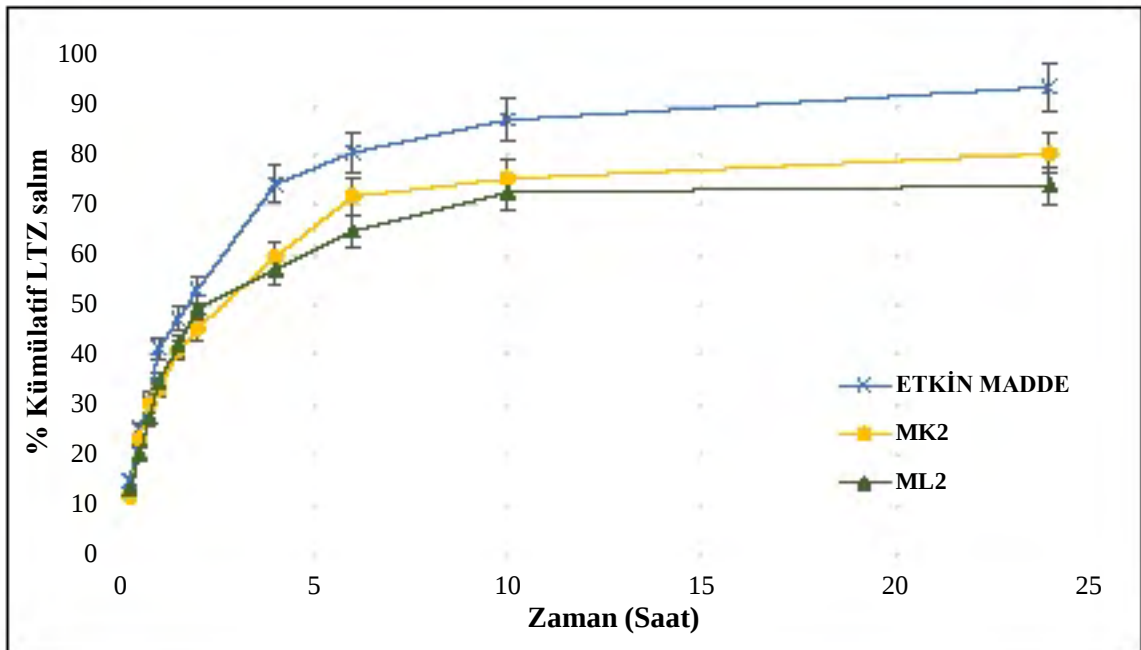
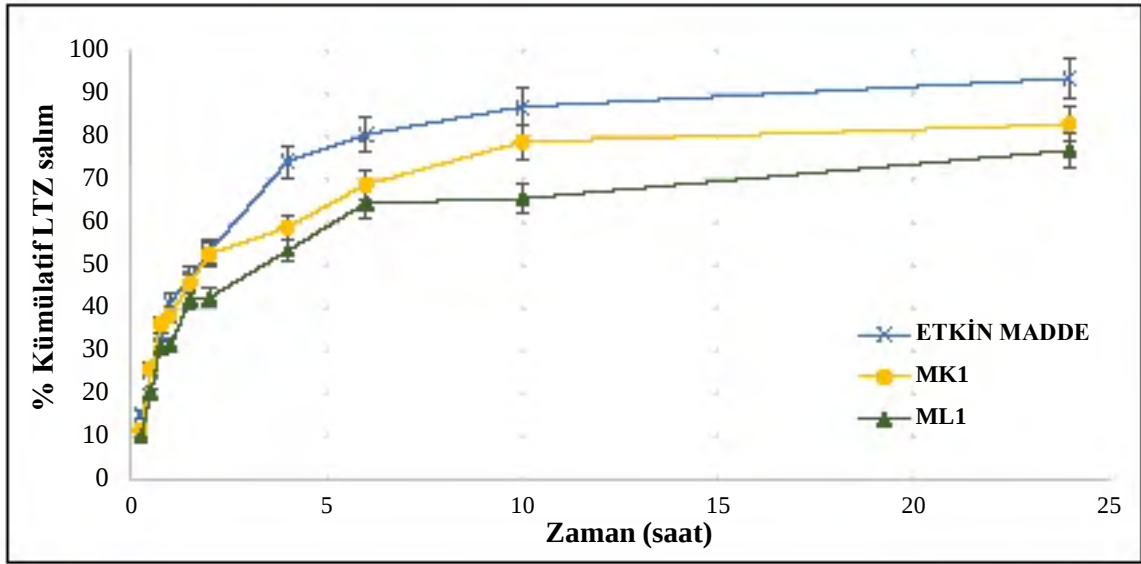
### 5.2.3.8. *İn vitro* salım çalışması

*İn vitro* salım çalışması, LTZ'ün davranışını ve polimerik nanopartiküllerin ilaç salım mekanizmalarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. İlacın *in vivo* davranışını ve etkin maddenin biyodağılımını tahmin etmek için *in vitro* salım çalışmaları kullanılmaktadır (Balzus vd., 2016). *İn vitro* çözünme/salım testleri, ürün geliştirme aşamasında, kalite kontrolünde ve onay işlemleri sürecinde önemli bir araçtır (Jug vd., 2018).

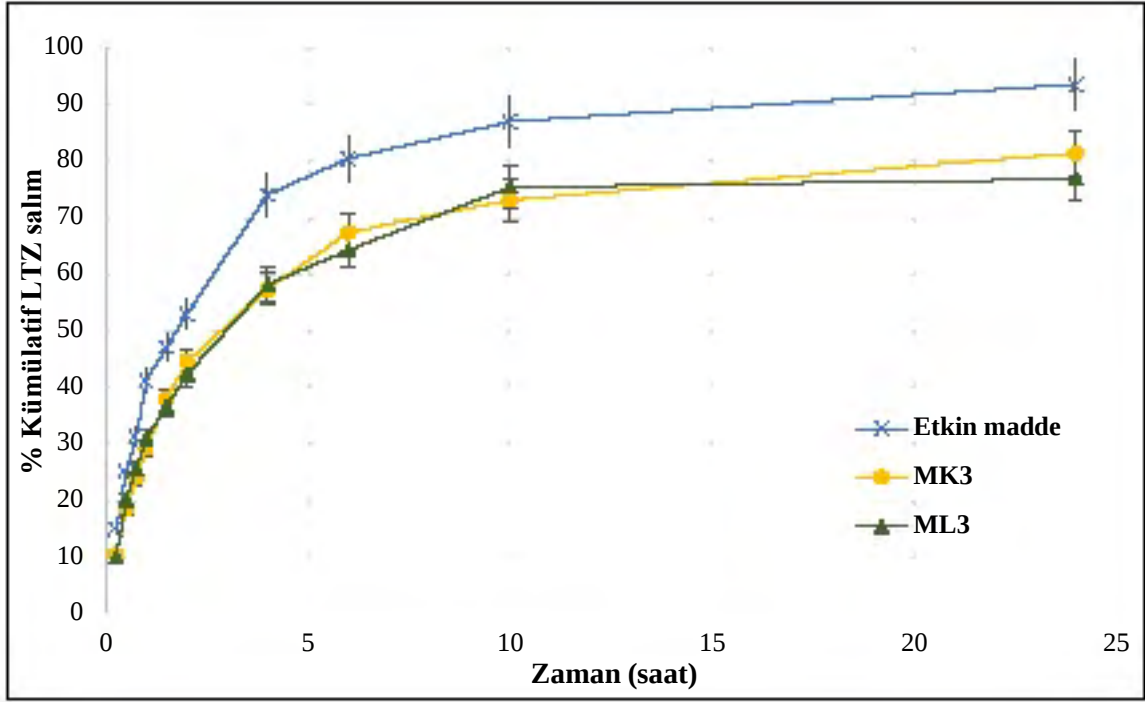
Çalışmamızda Eudragit® RS100 ile hazırlanan üç farklı konsantrasyona sahip formülasyonlar (ML1, ML2 ve ML3) (Çizelge 5.3.) ve Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların (MK1, MK2 ve MK3) (Çizelge 5.3.) 37°C $\pm$ 2°C'de pH 7.4 fosfat tamponu içerisinde 150 rpm karıştırma hızında diyaliz membran kullanılarak salım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen salım profilleri Şekil 5.20.'de sunulmuştur (Alemrayat vd., 2019).

Çalışmada elde edilen sonuçlar incelendiğinde partiküllerin yüzeyine ve içine yüklenen etkin madde miktarına bağlı olarak iki aşamalı salım profilleri elde edilmiştir (Başaran, 2017). İlk iki saat içinde nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan etkin madde nedeni ile salım hızlı bir şekilde gerçekleşmiş ve yaklaşık olarak %30 kümülatif konsantrasyona ulaşmıştır. Nanopartiküllerin içine yüklenen etkin maddenin salımı ise

24 saatlik süre boyunca artarak devam etmiş ve uzatılmış salım elde edilmiştir. Saf LTZ'ün salım profili referans olarak kullanılmış ve 24 saat sonunda ~ % 93 oranında salım gerçekleştiği görülmüştür. Eudragit® RS 100 ile hazırlanan ML1 ve ML3 formülasyonlarından etkin madde 24 saat sonunda ~ % 76 oranında salınırken ML2 formülasyonu 24 saat sonunda ~ % 73 oranına yaklaşmıştır. Kollidon® SR ile hazırlanan formülasyonların MK1, MK2 ve MK3 salım profilleri, Eudragit® RS 100 ile hazırlanan formülasyonlara kıyasla biraz daha hızlı gerçekleşmiş ve % kümülatif konsantrasyonları 24 saat sonunda yaklaşık olarak %80 seviyesine kadar ulaşmıştır.



**Şekil 5.20.** Saf etkin maddenin ve hazırlanan nanopartiküllere yüklenen etkin maddenin in vitro salım profilleri



**Şekil 5.30. (Devam)** Saf etkin maddenin ve hazırlanan nanopartiküllere yüklenen etkin maddenin in vitro salım profilleri

#### 5.2.3.9. Salım kinetik modellerinin değerlendirilmesi

Farmasötik nanopartiküllerden ilaç salımının belirlenmesi ve salım kinetiğinin değerlendirilmesi nanopartiküllerin karakterizasyonunda büyük önem taşımaktadır. Kinetik modellerin kullanımı genellikle salımın kontrolünde kullanılabilen salım mekanizmalarının aydınlatılmasında yardımcı olmaktadır (Barzegar-Jalali vd., 2008).

Taşıyıcılardan etkin madde salım davranışlarının belirlenmesi amacı ile birçok matematiksel model kullanılmıştır. Matematiksel modeller, farmasötik formülasyonların tasarlanmasında ilaç salım süreçlerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilmelerinde kullanılan önemli bir araçtır (Peppas ve Narasimhan, 2014). Salım kinetiğinin belirlenmesi için (sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson-Crowell, Weibull, Higuchi, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas ve Hopfenberg vb.) modeller kullanılmaktadır (Dash vd., 2010).

Çalışmamızda nanopartiküllerden etkin maddenin salım kinetiğinin belirlenmesi için DDSolver programı kullanılmıştır. Çalışmada sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson Crowell ve Hopfenberg kinetik modellerinin uygunlukları değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 5.8.'de sunulmuştur.

**Çizelge 5.8.** Hazırlanan formülasyonların *in vitro* salım kinetik modellere uyum analiz sonuçları

| Kod        | Kriterler            | Sıfırncı<br>Derece | Birinci<br>Derece | Higuchi | Hixon<br>Crowel | Korsmeyer<br>Peppas | Hopfenberg |
|------------|----------------------|--------------------|-------------------|---------|-----------------|---------------------|------------|
| <b>ML1</b> | <b>K</b>             | 4.501              | 0.216             | 20.728  | 0.051           | <b>32.577</b>       | 0.000      |
|            | <b>r<sup>2</sup></b> | -1.0027            | 0.5432            | 0.5917  | 0.3624          | <b>0.9033</b>       | 0.4860     |
|            | <b>AIC</b>           | 92.1783            | 77.3975           | 76.2767 | 80.7331         | <b>62.6978</b>      | 79.4005    |
|            | <b>MSC</b>           | -0.8945            | 0.5836            | 0.6957  | 0.2500          | <b>2.0536</b>       | 0.3833     |
|            | <b>n</b>             | -                  | -                 | -       | -               | <b>0.298</b>        | -          |
| <b>ML2</b> | <b>K</b>             | 4.542              | 0.251             | 21.275  | 0.054           | <b>34.696</b>       | 0.000      |
|            | <b>r<sup>2</sup></b> | -1.3107            | 0.5587            | 0.4684  | 0.3231          | <b>0.8663</b>       | 0.5031     |
|            | <b>AIC</b>           | 93.7637            | 77.2087           | 79.0698 | 81.4860         | <b>66.0916</b>      | 79.2158    |
|            | <b>MSC</b>           | -1.0375            | 0.6180            | 0.4318  | 0.1902          | <b>1.7297</b>       | 0.4172     |
|            | <b>n</b>             | -                  | -                 | -       | -               | <b>0.281</b>        | -          |
| <b>ML3</b> | <b>K</b>             | 4.649              | 0.229             | 21.337  | 0.053           | <b>32.180</b>       | 0.000      |
|            | <b>r<sup>2</sup></b> | -0.7104            | 0.7506            | 0.6686  | 0.6071          | <b>0.8881</b>       | 0.7194     |
|            | <b>AIC</b>           | 92.4824            | 73.2279           | 76.0699 | 77.7729         | <b>66.0381</b>      | 75.2299    |
|            | <b>MSC</b>           | -0.7368            | 1.1887            | 0.9045  | 0.7342          | <b>1.9077</b>       | 0.9885     |
|            | <b>n</b>             | -                  | -                 | -       | -               | <b>0.317</b>        | -          |
| <b>MK1</b> | <b>K</b>             | 5.000              | 0.317             | 23.310  | 0.058           | <b>38.177</b>       | 0.000      |
|            | <b>r<sup>2</sup></b> | -1.3750            | 0.6639            | 0.4659  | 0.3489          | <b>0.8900</b>       | 0.6219     |
|            | <b>AIC</b>           | 95.3357            | 75.7822           | 80.4138 | 82.3944         | <b>65.4378</b>      | 77.7832    |
|            | <b>MSC</b>           | -1.0650            | 0.8904            | 0.4272  | 0.2291          | <b>1.9248</b>       | 0.6903     |
|            | <b>n</b>             | -                  | -                 | -       | -               | <b>0.278</b>        | -          |
| <b>MK2</b> | <b>K</b>             | 4.846              | 0.270             | 22.416  | 0.056           | <b>35.076</b>       | 0.000      |
|            | <b>r<sup>2</sup></b> | -0.9760            | 0.7472            | 0.5920  | 0.5347          | <b>0.8887</b>       | 0.7155     |
|            | <b>AIC</b>           | 93.9828            | 73.4221           | 78.2080 | 79.5220         | <b>66.0376</b>      | 75.4250    |
|            | <b>MSC</b>           | -0.8811            | 1.1750            | 0.6964  | 0.5650          | <b>1.9134</b>       | 0.9747     |
|            | <b>n</b>             | -                  | -                 | -       | -               | <b>0.300</b>        | -          |
| <b>MK3</b> | <b>K</b>             | 4.791              | 0.232             | 21.771  | 0.054           | <b>35.076</b>       | 0.000      |
|            | <b>r<sup>2</sup></b> | -0.5284            | 0.8082            | 0.7304  | 0.6740          | <b>0.9048</b>       | 0.7842     |
|            | <b>AIC</b>           | 92.1941            | 71.4393           | 74.8441 | 76.7424         | <b>65.2525</b>      | 73.4424    |
|            | <b>MSC</b>           | -0.6242            | 1.4513            | 1.1108  | 0.9210          | <b>2.0700</b>       | 1.2510     |
|            | <b>n</b>             | -                  | -                 | -       | -               | <b>0.331</b>        | -          |
| <b>LTZ</b> | <b>K</b>             | 5.643              | 0.402             | 26.119  | 0.063           | <b>40.906</b>       | 0.000      |
|            | <b>r<sup>2</sup></b> | -0.9759            | <b>0.9270</b>     | 0.5886  | 0.5846          | 0.8853              | 0.9178     |
|            | <b>AIC</b>           | 97.0826            | <b>64.1019</b>    | 81.389  | 81.4878         | <b>69.4375</b>      | 66.1115    |
|            | <b>MSC</b>           | -0.8810            | <b>2.4170</b>     | 0.6883  | 0.6784          | <b>1.8835</b>       | 2.2161     |
|            | <b>n</b>             | -                  | -                 | -       | -               | <b>0.300</b>        | -          |

Elde edilen verilere bağılı olarak en düşük Akaike bilgi kriteri (AIC) ve model seçim kriteri (MSC) ile en yüksek  $r^2$  ve K değerlerine sahip olan modeller en uygun salım modeli olarak seçilmiştir (Çizelge 5.8.) (Zhang vd., 2010).

Hazırlanan formülasyonların salım modellemesi sonucunda elde edilen en yüksek MSC,  $r^2$  ve K ve en düşük AIC değerleri Korsmeyer-Peppas salım modelinin tüm formülasyonlar için uygun olduğunu göstermektedir. Saf etkin maddeye ait salım profili maddenin çözünürlüğüne bağılı olan birinci derece kinetik modeline uyum göstermektedir (Çizelge 5.8).

Korsmeyer-Peppas modeli, ilaç salımının aydınlatılması için Korsmeyer ve Peppas tarafından geliştirilen basit bir modeldir. Model, özellikle ilaç molekülünün polimerik bir matristen salımının açıklanması için geliştirilmiştir. Korsmeyer-Peppas modeli aynı zamanda ampirikal bir model olup hem fick yasasına uyan hem de uymayan salım sistemlerini aydınlatabilmektedir (Preethy vd., 2018; Permanadewi vd., 2019).

Çizelge 5.8’de elde edilen “n” verileri değerlendirilerek nanopartiküllerden sebestleşen etkin maddenin Fick yasasına göre uygunluğunu araştırılmıştır. Fick yasasına göre uygun difüzyon gösteren sistemlerin “n” verileri 0,45’ten küçük olması gerekmektedir (Grassi ve Grassi, 2005). Çalışmamızda elde edilen “n” verileri tüm formülasyonlarda 0,45’ten küçük değerlerde bulunmuş ve böylece formülasyonların Fick yasasına göre uygun difüzyon gösterdikleri sonucu belirlenmiştir (Siepmann ve Siepmann, 2008).

#### **5.2.4. Formülasyonların stabilite çalışmaları**

Farmasötik bileşiklerin stabilite testi, sıcaklık, nem ve ışık gibi çevresel faktörlerin etkisi altında herhangi bir ilaç ürün kalitesinin zamana bağılı olarak olası değişikliklerini inceleyen önemli bir araştırmadır. Stabilite çalışmaları genellikle yeni ilaçların ürün geliştirme sırasında ilaç ürünü için bir raf ömrü oluşturmak ve uygun bir saklama koşulu önermek için yapılmaktadır (ICH Q1 A, 2003; Muthu ve Feng, 2009).

Çalışmamızda hazırlanan nanopartiküller stabilite çalışmalarının yapılması için sıkıca kapalı kaplara konulmuş ve 3 ay boyunca saklanmıştır. Formülasyonlar üç farklı sıcaklık derecesinde ( $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ;  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (%60  $\pm$  %5 RN);  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (%75  $\pm$  %5

RN) saklanmış ve 0, 1 ve 3 aylık sürelerin sonunda, partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyeli analizleri ve LTZ miktar tayinleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 5.9. Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11.de sunulmuştur (Crucho vd., 2017).

Çalışmanın sonuçları değerlendirdiğinde  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $\%60 \pm \%5$  RN) ve  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $\%75 \pm \%5$  RN)'de saklanan formülasyonların partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımının  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  yani buzdolabında saklanan formülasyonlara göre biraz daha fazla değişim gösterdiği görülmüştür. Ancak her üç ortamda saklanan formülasyonların elde edilen sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 5.9. Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11).

Çalışmada her üç ortamda saklanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri de 3 ay süresince belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 5.9., Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11'de sunulmuştur. Çalışmaların sonucunda hem anyonik hem de katyonik özellikteki formülasyonlar için elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında elde edilen farkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 5.9. Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11).

Etkin madde miktarındaki değişimler araştırılması amacıyla üç farklı ortamda saklanan formülasyonların LTZ miktar tayin analizleri gerçekleştirilmiş ve  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan ML1, ML2, ML3, MK1, MK2 ve MK3 formülasyonların  $\%9.66$ ,  $\%14.37$ ,  $\%18.62$ ,  $\%9.72$ ,  $\%14.61$  ve  $\%19.02$  olan başlangıç etkin madde miktarları üç ay sonunda sırasıyla  $\%9.51$ ,  $\%14.42$ ,  $\%18.73$ ,  $\%9.63$ ,  $\%14.64$  ve  $\%19.1$  değerinde bulunmuş,  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $\%60 \pm \%5$ )'lik ortamda saklanan formülasyonlardaki etkin madde miktarları sırasıyla  $\%9.62$ ,  $\%14.43$ ,  $\%18.71$ ,  $\%9.76$ ,  $\%14.64$  ve  $\%18.90$  olarak bulunmuş,  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $\%75 \pm \%5$ )'de saklanan formülasyonların üç ay sonunda LTZ miktarları sırasıyla  $\%9.58$ ,  $\%14.46$ ,  $\%18.71$ ,  $\%9.65$ ,  $\%14.54$  ve  $\%19.08$  olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ( $p > 0.05$ ) ve tüm formülasyonların saklama süresi boyunca kararlı kaldıkları sonucuna varılmıştır (Çizelge 5.9. Çizelge 5.10. ve Çizelge 5.11).

**Çizelge 5.9.** 5°C±3°C'de saklanan formülasyonların stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), Zeta Potansiyel (ZP) ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları (Ortalama ± SH, n=3)

| 0 Zaman Analizleri | PB (nm)    | PdI        | ZP (mV)   | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
|--------------------|------------|------------|-----------|--------------------------------|
| ML-PL              | 253.0±20.4 | 0.30±0.04  | +48.4±1.3 | -                              |
| ML1                | 279.0±10.2 | 0.30±0.07  | +47.2±0.6 | 9.66 ± 0.03                    |
| ML2                | 280.0±15.0 | 0.40±0.03  | +47.2±0.2 | 14.37 ± 0.02                   |
| ML3                | 314.0±7.5  | 0.44±0.03  | +36.1±1.5 | 18.62 ± 0.05                   |
| MK-PL              | 270.0±20.6 | 0.30±0.03  | -16.7±1.3 | -                              |
| MK1                | 287.0±14.3 | 0.470±0.05 | -17.3±0.8 | 9.72 ± 0.02                    |
| MK2                | 322.0±17.0 | 0.52±0.02  | -18.3±0.4 | 14.61 ± 0.04                   |
| MK3                | 380.0±23.3 | 0.50±0.05  | -21.5±0.6 | 19.02 ± 0.06                   |
| 1. Ay Analizleri   | PB (nm)    | PdI        | ZP (mV)   | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
| ML-PL              | 260.0±12.6 | 0.40±0.2   | +47.2±0.7 | -                              |
| ML1                | 290.0±5.2  | 0.30±0.06  | +46.5±0.6 | 9.50 ± 0.04                    |
| ML2                | 305.0±7.4  | 0.50±0.04  | +44.7±1.4 | 14.45 ± 0.03                   |
| ML3                | 370.0±16.4 | 0.30±0.05  | +42.4±0.8 | 18.69 ± 0.03                   |
| MK-PL              | 265.0±17.4 | 0.47±0.02  | -17.5±1.6 | -                              |
| MK1                | 270.0±8.2  | 0.52±0.06  | -17.9±1.4 | 9.64 ± 0.04                    |
| MK2                | 340.0±13.9 | 0.55±0.03  | -19.6±1.5 | 14.52 ± 0.04                   |
| MK3                | 395.0±16.7 | 0.60±0.03  | -22.2±0.5 | 18.92 ± 0.05                   |
| 3. Ay Analizleri   | PB (nm)    | PdI        | ZP (mV)   | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
| ML-PL              | 270.0±17.8 | 0.45±0.05  | +46.4±1.2 | -                              |
| ML1                | 290.0±18.4 | 0.40±0.04  | +48.2±0.7 | 9.51± 0.03                     |
| ML2                | 320.0±10.5 | 0.50±0.01  | +45.2±1.3 | 14.42 ± 0.04                   |
| ML3                | 360.0±16.8 | 0.54±0.02  | +41.1±1.9 | 18.73 ± 0.02                   |
| MK-PL              | 270.0±20.6 | 0.44±0.05  | -15.5±0.6 | -                              |
| MK1                | 295.0±21   | 0.54±0.06  | -18.5±1.2 | 9.63 ± 0.01                    |
| MK2                | 345.0±25.9 | 0.60±0.04  | -19.6±1.6 | 14.64 ± 0.02                   |
| MK3                | 410±7.5    | 0.61±0.05  | -20.3±0.4 | 19.1 ± 0.05                    |

**Çizelge 5.10.** 25°C±2°C (%60 ± %5 RN)'de saklanan formülasyonların stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (PdI), Zeta Potansiyel (ZP) ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları (Ortalama ± SH, n=3)

| 0 ZamanAnalizleri | PB (nm)    | PdI        | ZP (mV)   | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
|-------------------|------------|------------|-----------|--------------------------------|
| ML-PL             | 253.0±20.4 | 0.30±0.04  | +48.4±1.3 | -                              |
| ML1               | 279.0±10.2 | 0.30±0.07  | +47.2±0.6 | 9.66 ± 0.03                    |
| ML2               | 280.0±15   | 0.40±0.03  | +47.2±0.2 | 14.37 ± 0.02                   |
| ML3               | 314.0±7.5  | 0.44±0.03  | +36.1±1.5 | 18.62 ± 0.05                   |
| MK-PL             | 270.0±20.6 | 0.30±0.03  | -16.7±1.3 | -                              |
| MK1               | 287.0±14.3 | 0.470±0.05 | -17.3±0.8 | 9.72 ± 0.02                    |
| MK2               | 322.0±17.0 | 0.52±0.02  | -18.3±0.4 | 14.61 ± 0.04                   |
| MK3               | 380.0±23.3 | 0.50±0.05  | -21.5±0.6 | 19.02 ± 0.06                   |
| 1. Ay Analizleri  | PB (nm)    | PdI        | ZP (mV)   | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
| ML-PL             | 245.0±15.2 | 0.34±0.03  | +44.3±1.1 | -                              |
| ML1               | 285.0±10.5 | 0.38±0.01  | +43.7±1.4 | 9.53± 0.03                     |
| ML2               | 297.0±14.6 | 0.53±0.02  | +42.5±0.9 | 14.35 ± 0.04                   |
| ML3               | 347.0±19.7 | 0.60±0.04  | +39.6±1.3 | 18.71 ± 0.02                   |
| MK-PL             | 255.0±11.3 | 0.43±0.04  | -14.2±1.8 | -                              |
| MK1               | 310.0±9.5  | 0.51±0.02  | -18.7±0.6 | 9.74 ± 0.05                    |
| MK2               | 358.0±18.5 | 0.60±0.03  | -20.3±1.2 | 14.56 ± 0.02                   |
| MK3               | 422.0±15.4 | 0.62±0.04  | -21.8±2.2 | 19.07 ± 0.03                   |
| 3. Ay Analizleri  | PB (nm)    | PdI        | ZP (mV)   | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
| ML-PL             | 270±17.8   | 0.38±0.06  | +48.8±1.2 | -                              |
| ML1               | 290±18.4   | 0.52±0.02  | +46.4±1.6 | 9.62 ± 0.04                    |
| ML2               | 320±10.5   | 0.55±0.03  | +44.2±1.4 | 14.43 ± 0.02                   |
| ML3               | 360±16.8   | 0.48±0.04  | +42.3±0.6 | 18.71 ± 0.05                   |
| MK-PL             | 283±14.3   | 0.40±0.02  | -15.8±2.3 | -                              |
| MK1               | 307±16.4   | 0.58±0.04  | -19.5±1.8 | 9.76 ± 0.04                    |
| MK2               | 384±8.9    | 0.63±0.03  | -18.6±0.8 | 14.64 ± 0.03                   |
| MK3               | 440±7.5    | 0.6±0.02   | -23.3±2.1 | 18.90 ± 0.07                   |

**Çizelge 5.11.**  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $\%75 \pm \%5 \text{ RN}$ ) 'de saklanan formülasyonların stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen partikül büyüklüğü (PB), polidisperslik indisi (Pdl), Zeta Potansiyel (ZP) ve etkin madde miktar tayini analiz sonuçları (Ortalama  $\pm$  SH, n=3)

| 0 Zaman Analizleri | PB (nm)          | Pdl              | ZP (mV)         | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
|--------------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------------------|
| ML-PL              | 253.0 $\pm$ 20.4 | 0.30 $\pm$ 0.04  | +48.4 $\pm$ 1.3 | -                              |
| ML1                | 279.0 $\pm$ 10.2 | 0.30 $\pm$ 0.07  | +47.2 $\pm$ 0.6 | 9.66 $\pm$ 0.03                |
| ML2                | 280.0 $\pm$ 15   | 0.40 $\pm$ 0.03  | +47.2 $\pm$ 0.2 | 14.37 $\pm$ 0.02               |
| ML3                | 314.0 $\pm$ 7.5  | 0.44 $\pm$ 0.03  | +36.1 $\pm$ 1.5 | 18.62 $\pm$ 0.05               |
| MK-PL              | 270.0 $\pm$ 20.6 | 0.30 $\pm$ 0.03  | -16.7 $\pm$ 1.3 | -                              |
| MK1                | 287.0 $\pm$ 14.3 | 0.470 $\pm$ 0.05 | -17.3 $\pm$ 0.8 | 9.72 $\pm$ 0.02                |
| MK2                | 322.0 $\pm$ 17   | 0.52 $\pm$ 0.02  | -18.3 $\pm$ 0.4 | 14.61 $\pm$ 0.04               |
| MK3                | 380.0 $\pm$ 23.3 | 0.50 $\pm$ 0.05  | -21.5 $\pm$ 0.6 | 19.02 $\pm$ 0.06               |
| 1. Ay Analizleri   | PB (nm)          | Pdl              | ZP (mV)         | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
| ML-PL              | 220.0 $\pm$ 17.4 | 0.37 $\pm$ 0.03  | +49.4 $\pm$ 0.5 | -                              |
| ML1                | 288.0 $\pm$ 13.8 | 0.42 $\pm$ 0.05  | +45.8 $\pm$ 1.7 | 9.55 $\pm$ 0.02                |
| ML2                | 315.0 $\pm$ 16.7 | 0.62 $\pm$ 0.02  | +46.2 $\pm$ 1.6 | 14.32 $\pm$ 0.06               |
| ML3                | 425.0 $\pm$ 11.6 | 0.54 $\pm$ 0.03  | +38.7 $\pm$ 1.2 | 18.58 $\pm$ 0.04               |
| MK-PL              | 268.0 $\pm$ 14.5 | 0.30 $\pm$ 0.04  | -15.5 $\pm$ 1.6 | -                              |
| MK1                | 293.0 $\pm$ 2.2  | 0.46 $\pm$ 0.05  | -16.4 $\pm$ 2.4 | 9.67 $\pm$ 0.03                |
| MK2                | 367.0 $\pm$ 26.5 | 0.61 $\pm$ 0.06  | -19.2 $\pm$ 0.7 | 14.60 $\pm$ 0.04               |
| MK3                | 432.0 $\pm$ 12.4 | 0.50 $\pm$ 0.05  | -22.8 $\pm$ 1.4 | 18.85 $\pm$ 0.05               |
| 3. Ay Analizleri   | PB (nm)          | Pdl              | ZP (mV)         | Toplam LTZ Miktarı<br>(%, a/a) |
| ML-PL              | 276.0 $\pm$ 5.7  | 0.41 $\pm$ 0.03  | +47.8 $\pm$ 0.8 | -                              |
| ML1                | 286.0 $\pm$ 13.8 | 0.46 $\pm$ 0.02  | +46.7 $\pm$ 1.6 | 9.58 $\pm$ 0.06                |
| ML2                | 346.0 $\pm$ 16.2 | 0.56 $\pm$ 0.06  | +43.8 $\pm$ 2.2 | 14.46 $\pm$ 0.05               |
| ML3                | 372.0 $\pm$ 6.7  | 0.68 $\pm$ 0.04  | +38.4 $\pm$ 1.5 | 18.71 $\pm$ 0.04               |
| MK-PL              | 259.0 $\pm$ 19.3 | 0.48 $\pm$ 0.01  | -13.8 $\pm$ 1.2 | -                              |
| MK1                | 312.0 $\pm$ 12.8 | 0.57 $\pm$ 0.02  | -17.8 $\pm$ 2.1 | 9.65 $\pm$ 0.03                |
| MK2                | 363.0 $\pm$ 15.7 | 0.63 $\pm$ 0.06  | -20.7 $\pm$ 1.3 | 14.54 $\pm$ 0.05               |
| MK3                | 437.0 $\pm$ 24.8 | 0.69 $\pm$ 0.02  | -23.8 $\pm$ 0.9 | 19.08 $\pm$ 0.06               |

## 6. SONUÇ

Yapılan tez çalışması kapsamında, kanser tedavisinde kullanılmak üzere Eudragit® RS 100 ve Kollidon® SR polimerleri ile LTZ içeren polimerik nanopartiküller püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların karakteristik özellikleri morfolojik analizler, partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel analizleri, etkin madde miktar tayini, DSC, FT-IR ve <sup>1</sup>H-NMR analizleri ve *in vitro* salım çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin stabilite çalışmaları  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (%60  $\pm$  %5 RN) ve hızlandırılmış stabilite çalışmaları ise  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (%75  $\pm$  %5 RN)'de 3 ay süresince analiz edilmiştir.

Elde edilen veriler nanopartiküllerin başarı ile hazırlandığını ve 3 ay süresince her üç saklama ortamında stabilitelerini başarı ile koruduklarını göstermiştir. Analiz sonuçları değerlendirildiğinde hazırlanan formülasyonların kanser tedavisinde kullanılma potansiyellerinin oldukça yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmanın devamı olarak hazırlanan formülasyonların antikanser özellikleri ve etkinlikleri hücre kültürü çalışmaları ve *in vivo* uygulamalar ile belirlenecektir.

## KAYNAKÇA

- Adibkiaa, K., Javadzadeha, Y., Dastmalchia, S., Mohammadic, G., Niria, F. K., & Alaei-Beirami, M. (2011). Naproxen–Eudragit® RS100 Nanoparticles: Preparation and Physicochemical Characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155–159.
- Ahmedin, J., Bray , F., Center M., Ferlay J., Ward E, F. D. (2011). Global Cancer Statistics. *American Cancer Society*, 61(1), 69–90.
- Akgün, M., & Nebioğlu, S., (2006). Kemoterapi Amacı ile Primidin Antimetabolitlerini Kullanan Hastalarda Timidilat Sentetaz Polimorfizmine Dayalı Yan Etkilerin ve İlaç Rezistansının İzlenmesi. *Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi. Ankara Üniversitesi*.
- Al-Heibshy, F. N. S., Başaran, E., & Demirel, M. (2016). Studies on Rosuvastatin Calcium Incorporated Chitosan Salt Nanoparticles. *Latin American Journal of Pharmacy*, 35, 1065–1076.
- Al-Shehri, M., Hefnawy, M., Abuelizz, H., & Alzamil, A. (2019). Evaluation of the Pharmacokinetics of the Simultaneous Quantification of Letrozole and Palbociclib in Rat Plasma by a Developed and Validated HPLC–PDA. *Acta Chromatographica*, 1–9.
- Alemrayat, B., Elhissi, A., & Younes, H. M. (2019). Preparation and Characterization of Letrozole-Loaded Poly(D,L-Lactide) Nanoparticles for Drug Delivery in Breast Cancer Therapy. *Pharmaceutical Development and Technology*, 24(2), 235–242.
- Amoabediny, G., Haghirsadat, F., Naderinezhad, S., Helder, M. N., Akhoundi Kharanaghi, E., Mohammadnejad Arough, J., & Zandieh-Doulabi, B. (2018). Overview of Preparation Methods of Polymeric and Lipid-Based (Niosome, Solid Lipid, Liposome) Nanoparticles: A Comprehensive Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(6), 383–400.
- Annapurna, M. M., Pratyusha, S. M., & Naik, R. R. (2019). New RP-HPLC Method for the Quantification of Letrozole ( An Anti-Cancer Agent ). *Acta Scientific Pharmaceutical Science*., 3(8), 106–109.

- Arpagaus, C. (2012). A Novel Laboratory-Scale Spray Dryer to Produce Nanoparticles. *Drying Technology An International Journal*. 30: 1113–1121.
- Atasoy, Ö., & Başaran, E. (2019). Paklitaksel İçeren Biyoparçalanır Polimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve *In Vitro* Değerlendirilmesi. *Anadolu Üniversitesi. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi*.
- Balzus, B., Colombo, M., Sahle, F. F., Zoubari, G., Staufienbiel, S., & Bodmeier, R. (2016). Comparison of Different In Vitro Release Methods Used To Investigate Nanocarriers Intended for Dermal Application. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1–2), 247–254.
- Banik, B. L., Fattahi, P., & Brown, J. L. (2016). Polymeric Nanoparticles : The Future of Nanomedicine. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* , 8:271–299.
- Barnadas, A., Estévez, L. G., Lluch-Hernández, A., Rodriguez-Lescure, Á., Rodriguez-Sanchez, C., & Sanchez-Rovira, P. (2011). An Overview of Letrozole in Postmenopausal Women with Hormone-Responsive Breast Cancer. *Advances in Therapy*, 28(12), 1045–1058.
- Barrios, V. A. E. (2012). FTIR – An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. *Research Gate*.
- Barzegar-Jalali, M., Adibkia, K., Valizadeh, H., Shadbad, M. R. S., Nokhodchi, A., Omid, Y., Hasan, M. (2008). Kinetic Analysis of Drug Release From Nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 167–177.
- Başaran, E. (2017). Ocular Application of Dirithromycin Incorporated Polymeric Nanoparticles : an In Vitro Evaluation. 14(2), 191–200.
- Başaran, E., Şenel, B., Kirmilioğlu, G. Y., Güven, U. M., & Yazan, Y. (2015). Ornidazole Incorporated Chitosan Nanoparticles for Ocular Application. *Latin American Journal of Pharmacy*, 34(6), 1180–1188.
- Başaran, E., Yenilmez, E., Berkman, M. S., Büyükköroğlu, G., & Yazan, Y. (2014). Chitosan Nanoparticles for Ocular Delivery of Cyclosporine A. *Journal of Microencapsulation*, 31(1), 49–57.

- Baykara, O. (2016). Current Modalities in Treatment of Cancer. *Balıkesir Health Sciences Journal*, 5(3), 154–165.
- Bergmann, C. P., Sharma, V., Nor, K., & Hamid, H. B. (2017). Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering Series Editor: Engineering Applications of Nanotechnology From Energy to Drug Delivery. ISBN 978-3-319-29761-3.
- Bhatnagar, A. S. (2014). The Discovery And Mechanism of Action of Letrozole the Discovery and Mechanism of Action of Letrozole. *Breast Cancer Res Treat.* 105:7–17
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers In 185 Countries. *A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Buzdar, A. U., Robertson, J. F. R., Eiermann, W., & Nabholz, J. (2006). An Overview of the Pharmacology and Pharmacokinetics of the Newer Generation Aromatase Inhibitors Anastrozole , Letrozole , and Exemestane. *American Cancer Society*, 95, 9.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*, 2 (4), MR17–MR71.
- Canfarotta, F., Whitcombe, M. J., & Piletsky, S. A. (2013). Polymeric nanoparticles for optical sensing. *Biotechnology Advances*, 31 (8), 1585–1599.
- Chalmers, J. M., & Everall, N. J. (2006). Polymer Analysis and Characterization by FTIR, FTIR-Microscopy, Raman Spectroscopy and Chemometric. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization. ISSN: by FTI R , FTIR-Microscopy , Raman.* 5341.
- Choiri, S., Sulaiman, T. N. S., & Rohman, A. (2019). Characterization of Eudragit Types and Kollidon SR Inter-Polymer Complexes and Their Effects on the Drug Release. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(7), 058–068.

- Coelho, S. C., Rangel, M., Pereira, M. C., Coelho, M. A. N., & Ivanova, G. (2015). Structural Characterization of Functionalized Gold Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy: A NMR Based Approach. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(29), 18971–18979.
- Cohen, M. H., Johnson, J. R., Li, N., Chen, G., & Pazdur, R. (2002). Approval Summary: Letrozole in the Treatment of Postmenopausal Women with Advanced Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 8(3), 665–669.
- Crucho, C. I. C., & Barros, M. T. (2017). Polymeric Nanoparticles: A Study on the Preparation Variables and Characterization Methods. *Materials Science and Engineering C*, 80, 771–784.
- Dağlıoğlu, Y., & Yılmaz, H. Ö. (2018). Ekotoksisite Deneylerinde Nanopartikül Karakterizasyonunun Önemi ve Yöntemleri. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(3), 217–223.
- Deepu, S., Molly Mathew., & Shamna<sup>1</sup>, M. (2014). Controlled Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 3(3), 636–641.
- Demir, D., & Çapan, Y. (2013). Dosetaksel İçeren Nanopartiküllerin Formülasyonu ve *in Vitro* Değerlendirilmesi. *Hacettepe Üniversitesi. Yüksek Lisans tezi*.
- Demir, G. M., & Degim, I. T. (2016). Preparation of Chitosan Nanoparticles by Nano Spray Drying Technology. *FABAD J. Pharm. Sci.* 38, 3, 127-133, 2013
- Derman, S., Kizilbey, K., & Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric Nanoparticles. *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi Derleme Makalesi*.
- DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Kramer, J. L., Smith, R. A., & Jemal, A. (2016). Breast Cancer Statistics, 2015: Convergence of Incidence Rates Between Black and White Women. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 31–42.
- Dey, S. K., Mandal, B., Bhowmik, M., & Ghosh, L. K. (2009). Development and In Vitro Evaluation of Letrozole Loaded Biodegradable Nanoparticles for Breast Cancer Therapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 45, 3.

- Fornaguera, C., & Solans, C. (2018). Characterization of Polymeric Nanoparticle Dispersions for Biomedical Applications: Size, Surface Charge and Stability. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 6(3), 147–164.
- Garcia, P. L., Buffoni, E., Gomes, F. P., Luis, J., & Quero, V. (2011). Analytical Method Validation. 10.5772/21187.
- Garjani, A., Barzegar-Jalali, M., Osouli-Bostanabad, K., Ranjbar, H., & Adibkia, K. (2018). Morphological and Physicochemical Evaluation of the Propranolol Hcl–Eudragit® RS100 Electrospayed Nanoformulations. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(4), 749–756.
- Gomathi, T., Sudha, P. N., Kamala, J. A., Venkatesan, J., & Anil, S. (2017). Fabrication of Letrozole Formulation Using Chitosan Nanoparticles Through Ionic Gelation Method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 1820–1832.
- Grassi, M., & Grassi, G. (2005). Mathematical Modelling and Controlled Drug Delivery: Matrix Systems. *Current Drug Delivery*, 2(1), 97–116.
- Gültekin, H. E., & Değİm, Z. (2013). Biodegradable Polymeric Nanoparticles are effective Systems for Controlled Drug Delivery. *FABAD J Pharm Sci*, 38(2), 107–118.
- Guterres, S. S., Alves, M. P., & Pohlmann, A. R. (2007). Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. 2 147–157.
- Güven, U. M., & Yenilmez, E. (2019). Olopatadine Hydrochloride Loaded Kollidon ® SR Nanoparticles For Ocular Delivery: Nanosuspension Formulation and In Vitro–In Vivo Evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 506–512.
- Haynes, B. P., Dowsett, M., Miller, W. R., Dixon, J. M., & Bhatnagar, A. S. (2003). The Pharmacology of Letrozole. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 87, 35–45.

- Heinzelmann-Schwarz, V., Knipprath Mészáros, A., Stadlmann, S., Jacob, F., Schoetzau, A., Russell, K., Vetter, M. (2018). Letrozole May Be A Valuable Maintenance Treatment in High-Grade Serous Ovarian Cancer Patients. *Gynecologic Oncology*, 148(1), 79–85.
- Holzer, H., Casper, R., & Tulandi, T. (2006). A New Era in Ovulation Induction. *Fertility and Sterility*. 85(2), 277–284.
- Hornig, S., Heinze, T., Remzi, C., & Schubert, U. S. (2009). Synthetic Polymer Nanoparticles by Nanoprecipitation Synthetic Polymeric Nanoparticles by Nanoprecipitation. *Journal of Materials Chemistry*. (19), 3838–3840.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and Future. *Human and Experimental Toxicology*, 34(12), 1318–1321.
- IARC. (2018). Latest Global Cancer Data: Cancer Burden Rises to 18.1 Million New Cases and 9.6 Million Cancer Deaths in 2018. *IARC*, 13–15.
- ICH. (2003). ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products. *European Medicines Agency*. CPMP/ICH/2736/99.
- ICH. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology: *ICH Harmonised Tripartite Guideline*, 1994(October 1994).
- Jain, V., & Singh, R. (2010). Development and Characterization of Eudragit RS 100 Loaded Microsponges and Its Colonic Delivery Using Natural Polysaccharides. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(4), 407–415.
- Joshi, M., Bhattacharyya, A., & Ali, S. W. (2008). Characterization Techniques for Nanotechnology Applications in Textiles. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 33(3), 304–317.
- Jethara, S. I. (2015). Pharmaceutical Controlled Release Drug Delivery Systems : A Patent Overview. *Aperito Journal of Drug Designing and Pharmacology*. 1:107.
- Jiang, J., Oberdörster, G., & Biswas, P. (2009). Characterization of Size, Surface Charge, and Agglomeration State of Nanoparticle Dispersions for Toxicological Studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 77–89.

- Jug, M., Hafner, A., Lovrić, J., Kregar, M. L., Pepić, I., Vanić, Ž., Filipović-Grčić, J. (2018). An Overview of *in Vitro* Dissolution/Release Methods For Novel Mucosal Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 350–366.
- Kar, S. (2013). Current Evidence Supporting “Letrozole” for Ovulation Induction. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(2), 93–98.
- Katmis, A., Fide, S., Karaismailoglu, S., & Derman, S. (2018). Synthesis and Characterization Methods of Polymeric Nanoparticles. 2 . 1, 1–9.
- Kumar, A., & Dixit, C. K. (2017). Methods for Characterization of Nanoparticles. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, 44–58.
- Kumar, B., Jajodia, K., Kumar, P., & Gautam, H. K. (2017). Recent Advances In Nanoparticle-Mediated Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. S1773-2247(17)30451-3.
- Kumar Jana, S., Chakravarty, B., & Chaudhury, K. (2014). Letrozole and Curcumin Loaded-PLGA Nanoparticles: A Therapeutic Strategy for Endometriosis. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery*, 04(01), 1–10.
- Kumari, B. (2019). " A Review On Nanoparticles : Their Preparation Method and Applications ". *Ind Res J Pharm & Sci*. 5 (2).
- Kumari, S., & Kondapi, A. K. (2016). Cancer Nanotechnology: Current Status and Glimpse into The Future. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (3), 1–9.
- Lopedota, A., Trapani, A., Cutrignelli, A., Chiarantini, L., Pantucci, E., Curci, R., ... Trapani, G. (2009). The Use of Eudragit® RS 100/Cyclodextrin Nanoparticles for the Transmucosal Administration of Glutathione. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(3), 509–520.
- Louage, B., Zhang, Q., Vanparijs, N., Voorhaar, L., Shi, Y., Hennink, W. E., ... Geest, B. G. De. (2015). Degradable Ketel-Based Block Copolymer Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery : A Systematic Evaluation. *Biomacromolecules*. 16, 336–350.

- Mahalingam, M., & Krishnamoorthy, K. (2015). Selection of a Suitable Method for the Preparation of Polymeric Nanoparticles: *Multi-Criteria Decision Making Approach*. 5(1), 57–67.
- Mahapatro, A., & Singh, D. K. (2011). Biodegradable Nanoparticles are Excellent Vehicle for Site Directed *In-Vivo* Delivery of Drugs and Vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, 9(1), 55.
- Mandawgade, S. D., & Patravale, V. B. (2008). Development of SLNs From Natural Lipids: Application to Topical Delivery of Tretinoin. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1–2), 132–138.
- Maniyar, M., Chakraborty, A., & Kokare, C. (2019). Formulation and Evaluation of Letrozole-Loaded Spray Dried Liposomes with Pes for Topical Application. *Journal of Liposome Research*, 0(0), 1–11.
- Matlholo, K., Katata-seru, L., Tshweu, L., Bahadur, I., Makgatho, G., & Balogun, M. (2015). Formulation and Optimization of Eudragit RS PO-Tenofovir Nanocarriers Using Box-Behnken Experimental Design. *Journal of Nanomaterials*. 2015, 630690, 11.
- Mitra, A. K., Agrahari<sup>1</sup>, V., Mandal<sup>1</sup>, A., Kishore Cholkar<sup>1, 2</sup>, Natarajan<sup>1</sup>, C., Shah<sup>1</sup>, S., Dhananjay, P., (2017). Novel Delivery Approaches for Cancer Therapeutics. *Physiology & Behavior*, 176.
- Mondal, N., Pal, T. K., & Ghosal, S. K. (2008). Development, Physical Characterization, Micromeritics and In Vitro Release Kinetics of Letrozole Loaded Biodegradable Nanoparticles. *Pharmazie*, 63(5), 361–365.
- Montenegro, L., Castelli, F., & Sarpietro, M. G. (2018). Differential Scanning Calorimetry Analyses of Idebenone-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Interactions with a Model of Bio-Membrane: A Comparison with *in Vitro* Skin Permeation Data. *Pharmaceutics*, 11(4).
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity Upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934.

- Müderrişoğlu, A., & Çomoğlu, T. (2010). Review article. İlaç Taşıyıcı Polimerik Partiküler Sistem. *Ankara Üniversitesi*, 39(4), 343–368.
- Muthu. (2009). Nanoparticles Based On PLGA and its Co-Polymer : An Overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 266-272.
- Muthu .M., & Feng. S.-S. (2009). Editorial Pharmaceutical Stability Aspects of Nanomedicines. *Future Medicine*, 857–860.
- Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K. S., Ayaz, A., Vasudha, L. S., & Shivakumar, H. G. (2012). Different Techniques For Preparation of Polymeric Nanoparticles. A Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* , 16–23.
- Nalbantoğlu, A., Uğurlu, T., (2016). İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Katı Lipit Nanopartiküllerin Hazırlanması ve *İn-Vitro* Değerlendirilmesi. *Marmara Üniversitesi. Farmasötik Teknoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi*.
- Nantasenamat, C., Worachartcheewan, A., Prachayasittikul, S., Isarankura-Na-Ayudhya, Isarankura, C., & Prachayasittikul, V. (2013). QSAR Modeling of Aromatase Inhibitory Activity of 1-Substituted 1,2,3-Triazole Analogs of Letrozole. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 99–114.
- Nerella, A., Raju, B., & Devi, A. (2014). Formulation, Optimization and *in Vitro* Characterization of Letrozole Loaded Solid Lipid Nanoparticles. 6(3), 183–188.
- Nikalje, A. P. (2017). Nanotechnology and its Applications In Agriculture. *Engineering Practices for Agricultural Production and Water Conservation: An Interdisciplinary Approach*, 307–324.
- Ochekpe, N. A., Olorunfemi, P. O., & Ngwuluka, N. C. (2009). Nanotechnology and Drug Delivery Part 1: Background and Applications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(3), 265–274.
- Ölgen, S., Bıçak, I., & Nebioğlu, D. (2002). Angiogenesis ve Kanser Kedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 31(3), 193–214.
- Oylar, Ö., & Tekin, İ. (2011). Kanserin Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, Cilt 16, Sayı 1, 147–154.

- Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Arslan, R., Şenel, B., & Yazan, Y. (2017). Dexketoprofen Trometamol-Loaded Kollidon® SR and Eudragit® RS 100 Polymeric Nanoparticles: Formulation and *In Vitro-In Vivo* Evaluation. *Latin American Journal of Pharmacy*, 36(11), 2153–2165.
- Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., & Manavalan, R. (2011). Nanoparticle : An Overview of Preparation and Characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* . 01(06), 228–234.
- Pan, J., Rostamizadeh, K., Filipczak, N., & Torchilin, V. P. (2019). Polymeric Co-Delivery Systems in Cancer Treatment: An Overview on Component Drugs' Dosage Ratio Effect. *Molecules*, 24(6).
- Park, K. (2015). The Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back. *NIH Public Access*, 3–8.
- Patel, A., Khanna, S., Xavier, G. K., Khanna, K., & Goel, B. (2017). Polymeric Nano-Particles for Tumor Targeting – A Review. *International Journal of Drug Development and Research*. 9(1): 50-59.
- Peppas, N. A., & Narasimhan, B. (2014). Mathematical Models In Drug Delivery: How Modeling Has Shaped the Way we Design New Drug Delivery Systems. *Journal of Controlled Release*, 190, 75–81.
- Permanadewi, I., Kumoro, A. C., Wardhani, D. H., & Aryanti, N. (2019). Modelling of Controlled Drug Release in Gastrointestinal Tract Simulation. *Journal of Physics: Conference Series*, 1295(1).
- Pezzini, B. R., Grossl, A. D., Muraro, A., Zétola, M., Bazzo, G. C., & Soares, L. (2014). Formulation and *in Vitro* Assessment of Sustained Release Matrix Tablets of Atenolol Containing Kollidon SR and Carnauba Wax. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 8(41), 1058-1065.
- Pignatello, R., Amico, D., Chiechio, S., Spadaro, C., Puglisi, G., & Giunchedi, P. (2001). Preparation and Analgesic Activity of Eudragit RS100® Microparticles Containing Diflunisal. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 8(1), 35–45.

- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I . Methods For Preparation of Drug-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Nanomedicine*, 2, 8–21.
- Pradeep, A., & Sreeganesan. (2015). Formulation of Gastro Retentive Floating Microballoons of Ciprofloxacin Hydrochloride. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 53(9), 1–12.
- Preethy A. J., Padmaa, P. M., Setty. C M, & V, P. G. (2018). Release Kinetics - Concepts and Applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 8, 12–20.
- Quintanar-guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2008). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 24:12, 1113-1128.
- Raaijmakers, M. J. T., & Benes, N. E. (2016). Current Trends In Interfacial Polymerization Chemistry. *Progress in Polymer Science*, 63, 86–142.
- Rajesh, T. (2016). Controlled Release Drug Formulation In Pharmaceuticals: A Study On Their Application and Properties. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 1704-1720.
- Rao, P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(7), 887 913.
- Requena, A., Herrero, J., Landeras, J., Navarro, E., Neyro, J. L., Salvador, C., Graña-Barcia, M. (2008). Use of Letrozole In Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Human Reproduction Update*, 14(6), 571–582.
- Rodzinski, A., Guduru, R., Liang, P., Hadjikhani, A., Stewart, T., Stimphil, E., Khizroev, S. (2016). Targeted and Controlled Anticancer Drug Delivery and Release with Magnetoelectric Nanoparticles. *Scientific Reports*, 6.
- Saboktakin, M. R., Tabatabaie, R. M., Maharramov, A., & Ramazanov, M. A. (2010). Synthesis and *in Vitro* Evaluation of Thiolated Chitosan-Dextran Sulfate Nanoparticles for the Delivery of Letrozole. *J Pharm Educ Res*. 1, Issue No. 2.

- Saito, Y., & Iwata, T. (2012). Characterization of Hydroxyl Groups of Highly Crystalline B-Chitin Under Static Tension Detected by FT-IR. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2154–2159.
- Schaming, D., & Remita, H. (2015). Nanotechnology: From the Ancient Time to Nowadays. *Foundations of Chemistry*, 17(3), 187–205.
- Selvakumaran, S., & Muhamad, I. I. (2014). Designing Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System. 288-312. <https://www.researchgate.net/publication/280858357>
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 1–19.
- Şenel, B., & Başaran, E., Yenilmez, E., Kırımlıoğlu G.Y., (2017). Preparation , Characterization and *in Vitro* Evaluation of Dirithromycin Loaded Eudragit® RS 100 Nanoparticles for Topical Application. *Latin American Journal of Pharmacy*. 36(11), 2203–2212.
- Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H. Y., & Chow, A. H. L. (2007). Particle Size Analysis in Pharmaceuticals: Principles, Methods and Applications. *Pharmaceutical Research*, 24(2), 203–227.
- Sheoran, R., Khokra, S. L., & Dureja, H. (2020). Preparation, Optimization and Characterization of Letrozole Nano- Liposomes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3), 1373–1379.
- Shirakura, T. (2015). Development of Drug-Loaded Nanoparticles for Targeted Chemotherapy. *University of Michigan. Doctorate thesis*.
- Shiwei, S. (2007). Development of Controlled Drug Delivery Systems Using Uniform Nanoporous Materials As Matrices. *Biomolecular Engineering*.
- Shuling, L., Sie Kuei, M. L., Saffari, S. E., Jiayun, Z., Yeun, T. T., Leng, J. P. W., ... Hao, T. H. (2019). Do Men With Normal Testosterone–Oestradiol Ratios Benefit From Letrozole for the Treatment of Male Infertility? *Reproductive Biomedicine Online*. 38(1), 39–45.

- Siepmann, J., & Siepmann, F. (2008). Mathematical Modeling of Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(2), 328–343.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable Polymeric Microparticles as Drug Delivery Devices. *Journal of Controlled Release*, 49, 187–190.
- Steichen, S. D., Caldorera Moore, M., & Peppas, N. A. (2013). A Review of Current Nanoparticle and Targeting Moieties for the Delivery of Cancer Therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(3), 416–427.
- Tang, Z., He, C., Tian, H., Ding, J., Hsiao, B. S., Chu, B., & Chen, X. (2016). Progress In Polymer Science Polymeric Nanostructured Materials For Biomedical Applications. *Progress in Polymer Science*, 60, 86–128.
- Trapani, A., Laquintana, V., Denora, N., Lopodota, A., Cutrignelli, A., Franco, M., Liso, G. (2007). Eudragit®RS100 Microparticles Containing 2-Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin and Glutathione: Physicochemical Characterization, Drug Release and Transport Studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(1), 64–74.
- TÜBİTAK. (2004). Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri. Ankara.
- Turgut, O., Keskin, L., & Avşar, F. (2015). Derleme, Nanoteknoloji Nedir ? 5(1), 45–49.
- Tüylek, Z. (2017). İlaç Taşıyıcı Sistemler Ve Nanoteknolojik Etkileşim. *Bozok Tıp Derg*, 7(3), 89–98.
- Tyagi, S., & Pandey, V. K. (2016). Nanoparticles: An Overview of Preparation. *JPN Reviews on Pharmaceutics and Nanotechnology*, 4(2), 1–12.
- Üstündağ, S. (2013). Kemoterapi Alan Kanser Hastalarının Semptom Yönetiminde Kullandıkları Tamamlayıcı Tedavi Yaklaşımlarının Yaşam Kalitesine Etkisi. *Ankara Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi*.
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26(5), 1025–1058.
- Vikas, K., Arvind, S., Ashish, S., Gourav, J., & Vipasha, D. (2011). Recent Advances In NDDS (Novel Drug Delivery System) for Delivery of Anti- Hypertensive Drugs. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(1), 252–259.

- Vosooghi, M., Firoozpour, L., Rodaki, A., Pordeli, M., Safavi, M., Ardestani, S. K., ... Foroumadi, A. (2014). Design, Synthesis, Docking Study and Cytotoxic Activity Evaluation of Some Novel Letrozole Analogs. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 1–7.
- Wang, X., Yang, L., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(2), 97–110.
- WHO. (2017). Guide To Cancer - Guide to Cancer Early Diagnosis. In *World Health Organization*. 978-92-4-151194-0.
- X. Li., Anton, N., Anton, N., Arpagaus, C., Belleteix, F., & Vandamme, T. F. (2010). Nanoparticles By Spray Drying Using Innovative New Technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90 . *Journal of Controlled Release*. 05557; 7.
- Yadav, K. S., & Sawant, K. K. (2010). Modified Nanoprecipitation Method for Preparation of Cytarabine-Loaded PLGA Nanoparticles. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 11(3), 1456–1465.
- Yang, L. (2015). Nanotechnology-Controlled Drug Delivery For Treating Bone Diseases. *Nanotechnology-Enhanced Orthopedic Materials*, 141–161.
- Yenilmez, E., Başaran, E., & Yazan, Y. (2011). Release Characteristics of Vitamin E Incorporated Chitosan Microspheres and *in Vitro-in Vivo* Evaluation For Topical Application. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 807–811.
- Yenilmez, Evrim. (2017). Desloratidin-Euragit® RS100 Nanopartikülleri: Formülasyon Ve Karakterizasyon. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2), 148–156.
- Yokuş, B., Çakır. D. Ü., (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya ABD. Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD. Derleme makelesi. Dicle Üniv Vet Fak Derg*, Vol. 1, pp. 7–18.
- Yurtdaş Kırımlıoğlu, G., & Görgülü, Ş. (2019). Design and Characterization of Montelukast Sodium Loaded Kollidon® SR Nanoparticles and Evaluation of Release Kinetics and Cytotoxicity Potential. *Latin American Journal of Pharmacy*. 38 (7): 1350-60.

- Yurtdaş Kırımlıoğlu, G., & Öztürk, A. A. (2020). Levocetirizine Dihydrochloride-Loaded Chitosan Nanoparticles: Formulation and *in Vitro* Evaluation. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(1), 27–35.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program For Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS Journal*, 12(3), 263–271.
- Zuo, J., Gao, Y., Bou-Chacra, N., & Löbenberg, R. (2014). Evaluation of The DDSolver Software Applications. *BioMed Research International*, 2014, 9.
- http-1: NNI. *National Nanotechnology Initiative*. <https://www.nano.gov/about-nni>,
- http-2: <https://www.drugs.com/search.php?searchterm=letrozole&a=1>