

**L-KARNİTİN YÜKLÜ POLİMERİK VE LİPİT BAZLI
NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE
İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**PREPARATION AND *İN-VİTRO* EVALUATIONS OF L-
CARNITINE LOADED POLYMER AND LIPID BASED
NANOPARTICLES**

MERVE YAŞACAN

DOÇ. DR. İPEK EROĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

MERVE YAŞACAN'ın hazırladığı "L-karnitin Yüklü Polimerik ve Lipit Bazlı Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması ve İn-vitro Değerlendirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM

Başkan

Doç. Dr. İpek EROĞLU

Danışman

Prof. Dr. Hayriye Eda ŞATANA KARA

Üye

Doç. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ

Üye

Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından DOKTORA TEZİ olarak/...../2019 tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bilge'ye..



ETİK

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

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

beyan ederim.

30/05/2019

Merve YAŞACAN

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

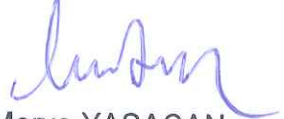
Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm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

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

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

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

30 / 05 / 2019


Merve YAŞACAN

ÖZET

L-KARNİTİN YÜKLÜ POLİMERİK VE LİPİT BAZLI NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE *İN-VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Merve YAŞACAN

Doktora, NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. İpek EROĞLU

Mayıs 2019, 119 sayfa

L-karnitin, metabolizmada yağ yıkımını ve kas yapımını arttırıcı metabolik etkilerinden dolayı son yıllarda obezite, diyabet, bölgesel zayıflama gibi çağın önemli sorunlarının tedavisinde dikkat çekmektedir. Temel işlevi uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyona uğratılması için mitokondriye aktarılması olan L-karnitin, vücuda hem eksojen hem de endojen olarak iki kaynaktan sağlanmaktadır. Gıdalardan alınan L-karnitin'in en önemli kaynakları, kırmızı et ve süt ürünleridir. Gıda sektöründeki suni yemleme ve seri üretimin artışı, yiyeceklerle alınan L-karnitin'in vücuttaki miktarının yetersiz kalmasına sebep olmakta, buna bağlı olarak obezite oranları artmaktadır. Bu nedenle L-karnitin, sporcular ve kilo vermek isteyen kişiler tarafından sıklıkla takviye olarak alınmaktadır. Ancak, L-karnitin'in düşük biyoyararlanıma sahip olması (%14-18), vücutta depolanamaması ve yarılanma ömrünün kısa olması (30-60 dk) nedeniyle, etkin tedavi sağlanabilmesi için sık doz uygulama gerektirmektedir. Ayrıca, L-karnitin'in Avrupa ve Amerikan Farmakope Monograflarında tanımlı impüriteleri bulunmaktadır. Bu nedenle, içerisinde safsızlık varlığı bilinen L-karnitin'in yüksek miktarda ve sık aralıklarla uygulanması toksik ve yan etkileri arttıracığından, kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesi oldukça önem arz

etmektedir. Kontrollü salım sistemleri olarak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin geleceği, nanopartikül yapısının ve hedefleme mekanizmasının aydınlatılmasının yanı sıra hücre üzerine etkilerinin metabolik düzeyde değerlendirilmesine bağlıdır. Nanolipozomlar; hücre membranına benzer lipit çift tabaka yapısında olup, etkin madde penetrasyonunu artırma özelliğine sahiptirler. Polimerik nanopartiküller ise; kontrollü salım ve artırılmış stabilite özellikleri nedeniyle nant taşıyıcı sistemler arasında en sık kullanılan etkin ve güvenilir sistemlerdir.

Bu amaçla tez kapsamında; L-karnitin yüklü nanolipozom ve PLGA nanopartikül formülasyonları hazırlanmış, formülasyonların karakterizasyon (partikül boyutu (PB), polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyel (ZP), morfoloji (SEM), yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE), moleküler yapı/termal özellikler aydınlatma (FT-IR/ATR, TGA)) ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. L-karnitin enkapsüle edilmiş nanolipozom (**Lipo-karnitin**) ve L-karnitin enkapsüle edilmiş PLGA nanopartikül (**Nano-karnitin**) formülasyonları için sırasıyla; PB değerleri 97.88 ± 2.96 nm ve 250.90 ± 6.15 nm; PDI değerleri 0.35 ± 0.01 ve 0.22 ± 0.03 ; ZP değerleri 6.36 ± 0.54 mV ve -30.80 ± 2.26 mV; %EE değerleri ise 14.26 ± 3.52 ve 21.93 ± 4.17 olarak bulunmuştur. Diyaliz membran yöntemiyle, Lipo-karnitin, Nano-karnitin formülasyonları ve L-karnitin'in aynı konsantrasyondaki serbest çözeltisiyle karşılaştırılmalı *in-vitro* salım çalışmaları yapılmıştır. Kontrol çözeltisi 1. saatin sonunda konsantrasyonun %90'ını ani salım ile sonlandırırken, hazırlanan her iki formülasyon için, 1. saatin sonunda gözlemlenen ani salım etkisinden (% 59.90 ve % 65.19) sonra, 2, 4, 6, 8 ve 12.saat salım noktalarından, geciktirilmiş bir kontrollü salım profili elde edilmiştir. Salım profillerine kinetik modeller (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson Crowell) uygulanmış, determinasyon katsayısı (r^2) değerlerinin sırasıyla 0.8539 ve 0.9167 bulunduğu ve her iki formülasyonun da "Birinci Derece" kinetik modele uyum sağladığı tespit edilmiştir. Salım çalışmalarını takiben, *in-vitro* koşullarda kardiyak fibroblast hücreleri üzerinde formülasyonların etkinliği metabolomik çalışmalar ve yolak analizleri ile değerlendirilmiştir. Kardiyak fibroblastlarda yüksek enerji ihtiyacından dolayı mitokondri sayısı fazladır. Dolayısıyla L-karnitin, enerjilerinin

çoğunu yağ asidi oksidasyonundan türeten bu hücrelerin metabolizması için, kritik bir rol oynamaktadır. Hücre içi metabolizma bileşenleri olan metabolitlerin belirlenebildiği ve düzeylerinin anlık görüntüsünün alınabildiği metabolomik çalışmalardan elde edilen sonuçlar kıyaslanarak serbest L-karnitin'in ve L-karnitin yüklü nano-sistemlerin amino asit, karbonhidrat ve lipit metabolizmaları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. L-karnitin'in salım süresinin uzatılmasıyla paralel olarak, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarının, amino asit, karbonhidrat ve lipit metabolizmaları üzerinde etkili oldukları saptanmıştır. Polar yan zincire sahip amino asit düzeylerinin artışında en etkili formülasyonun Nano-karnitin olduğu belirlenmiştir. Sitrik Asit (SA) döngüsüne ait sitrik asit, akonitik asit, süksinik asit, fumarik asit, malik asit, okzaloasetik asit düzeylerinde Nano-karnitin formülasyonu, kontrol ve Lipo-karnitin gruplarına kıyasla daha etkili bulunmuştur. Yeterli miktarda bulunduğu glutamata dönüşen ve bu bileşik üzerinden ornitin, arjinin ve prolin aminoasit metabolik yolları üzerinde etkili olan SA döngüsü arabileşeni α -ketoglutarat için ise, Lipo-karnitin normalize edilmiş pik alanı değerinde bütün gruplara göre anlamlı ($p < 0.05$) bir düşüş (-1.321 ± 0.20) gözlenmiştir. Doymuş yağ asitleri ve doymamış yağ asitleri üzerine etkileri ayrı ayrı incelendiğinde ise, Lipo-karnitin'in, serbest L-karnitine ve Nano-karnitine kıyasla daha etkili olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, uzun süreli etki ile L-karnitin'in yarılanma ömrünün uzatıldığı, sık kullanımın önlenmesine bağlı olarak yan etkilerinin azaltıldığı ve hasta uyuncunun arttırıldığı nano-sistemler hazırlanmış, serbest L-karnitin grubuna kıyasla daha etkili bir metabolomik profil değişikliği sağlanmıştır. Böylece hücrelerin ortamda aşırı bulunan maddeleri depolamak yerine, bu maddeleri metabolik işlevlerde etkin olarak kullanmalarını sağlayacak ve piyasada bulunan konvansiyonel preparatlara alternatif olabilecek yenilikçi nano formülasyonlar geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: L-karnitin, Nanolipozom, PLGA nanopartikül, Omik Teknolojileri, Metabolomik

ABSTRACT

PREPARATION AND *IN-VITRO* EVALUATIONS OF L-CARNITINE LOADED POLYMER AND LIPID BASED NANOPARTICLES

Merve YAŞACAN

**Doctor of Philosophy, Department of NANOTECHNOLOGY and
NANOMEDICINE**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İpek EROĞLU

May 2019, 119 pages

L-carnitine has attracted attention in the treatment of important problems of era such as obesity, diabetes and regional slimming in recent years due to its metabolic effects that increase fat loss and muscle building in metabolism. L-carnitine, whose main function is the transfer of long chain fatty acids to mitochondria for beta oxidation, is supplied to the body from two sources, both exogenous and endogenous. The most important sources of L-carnitine taken from food are red meat and dairy products. The increase in artificial feeding and mass production in the food sector causes the amount of L-carnitine taken into the body to be insufficient therefore obesity rates are increasing. For that reason, L-carnitine is often taken as a supplement by athletes and people who want to lose weight. However, based on its low bioavailability (14-18%), short half-life (30-60 minutes) and inability to be stored in the body L-carnitine, frequent dosing is required for its effective treatment. In addition, L-carnitine has defined impurities in the European and American Pharmacopoeia Monographs. Since frequent and high dose administration of L-carnitine known to have impurities, may increase the toxic and side effects so the development of its

controlled release systems is become a very important issue. The future of nanoparticular drug delivery systems as controlled release systems depend on metabolic level evaluation of the effects on cell as well as clarification of nanoparticle structure and targeting mechanism. Nanoliposomes which have lipid bilayers similar to cell membranes, have the ability to increase the penetration of the active substance. Due to their increased stability, controlled release properties, polymeric nanoparticles are the most commonly used efficient and reliable systems among the nanocarrier systems.

For this purpose, L-carnitine loaded nanoliposome and PLGA nanoparticle formulations have prepared, formulations characterization (particle size (PS), polydispersity Index (PDI), zeta potential (ZP), morphology (SEM), percentage of encapsulation efficiency (EE%), molecular structure/thermal properties clarification (FTIR/ATR, TGA)) and stability studies have made within the scope of the thesis. For L-carnitine encapsulated nanoliposome (**Lipo-carnitine**) and L-carnitine encapsulated PLGA nanoparticle (**Nano-carnitine**) formulations; PS values are 97.88 ± 2.96 nm and 250.90 ± 6.15 nm; PDI values are 0.35 ± 0.01 and 0.22 ± 0.03 ; ZP values are 6.36 ± 0.54 mV and -32.80 ± 2.26 mV; EE% values are 14.26 ± 3.52 and 21.93 ± 4.17 , respectively. Comparative *in-vitro* release studies of Lipo-carnitine, Nano-carnitine formulations and free solution of L-carnitine at the same concentration have performed by dialysis membrane method. While control solution (free L-carnitine) have terminated 90% of the concentration at the end of the 1st hour with immediate release; Lipo-carnitine and Nano-carnitine formulations have showed a delayed controlled release profile which has obtained from 2, 4, 6, 8 and 12 hours release points, after the immediate release effect observed at the end of the 1st hour (59.90% and 65.19%, respectively). Kinetic models (zero, first, Higuchi, Hixson Crowell) have applied to the release profiles, determination coefficients (r^2) were found 0.8539 and 0.9167 respectively, and both formulations have found to be compatible with the "First Order" kinetic model. Following release studies, the effectiveness of formulations have evaluated by metabolomic studies and pathway analyzes on cardiac fibroblast cells *in-vitro* conditions. The number of mitochondria in

cardiac fibroblasts is high due to the energy demand. Thus, L-carnitine plays a critical role in the metabolism of these cells, which derive most of their energy from fatty acid oxidation. Metabolites which are the components of intracellular metabolism, have detected and their levels have quantified by snapshots in metabolomic studies. By comparing the results obtained from metabolomic studies, the effects of free L-carnitine and L-carnitine loaded nano-systems on amino acid, carbohydrate and lipid metabolisms have evaluated. In parallel with prolonged release of L-carnitine, the Lipo-carnitine and Nano-carnitine formulations have found to be effective on amino acid, carbohydrate and lipid metabolisms. Nano-carnitine has found to be the most effective formulation for increasing amino acid levels with polar side chains. Nano-carnitine formulation has found to be more effective compared to control and Lipo-carnitine groups, at citric acid, aconitic acid, succinic acid, fumaric acid, malic acid, oxaloacetic acid levels which are belong to tricarboxylic acid cycle (TCA). When a TCA component called α -ketoglutarate is present in the sufficient amount, it turns into glutamate and acts on the metabolic pathways of ornithine, arginine and proline aminoacids. For the level of α -ketoglutarate, a significant ($p < 0.05$) decrease in the normalized peak area of Lipo-carnitine has observed (-1.321 ± 0.20) compared to all other groups. When the effects of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids have examined separately, Lipo-carnitine has found to be more effective than free L-carnitine and Nano-carnitine.

As a result, nano-systems have prepared by prolonging the half-life of L-carnitine with long-term effect, reducing the side effects due to prevention of frequent use and increasing patient compliance, resulting in a more effective metabolomic profile change compared to the free L-carnitine group. Thus, innovative nano formulations have developed as an alternative to conventional preparations available on the market that enable cells to use substances effectively in metabolic functions instead of storing them when presence of excess amount in the media.

Keywords: L-carnitine, Nanoliposome, PLGA nanoparticles, Omics technology, Metabolomics

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında her türlü bilgi, tecrübe ve önerilerinden faydalandığım, benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yolumu aydınlatan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. İpek EROĞLU'na;

Bilgi ve deneyimleriyle zorlandığım her noktada yolumu genişleten saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU ve Doç.Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye;

Çalışmalarım süresince laboratuvar imkanlarını cömertçe sunan ve bilimsel katkısını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM'a;

Sıvı Kromatografi analizlerini gerçekleştirme imkanını sağlayan HÜNİKAL Koordinatörü Uzm. Ecz. Ekrem KILIÇ'a; hücre kültürü analizlerinde yardımcı olan Arş.Gör. Dr. Açelya ERİKÇİ'ye; GC-MS analizlerinde yardımcı olan Cemil Can EYLEM'e; birlikte çalışmayı keyif haline getiren H.Ü. Ecz. Fak. Temel Eczacılık Bilimleri Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma;

Sosyal ve akademik hayatta her zaman yanımda olan, dostluğuyla hayatımı güzelleştiren yüksek lisans çalışma grubu arkadaşım, H.Ü. Fizik Müh. Bölümü Arş. Gör. Meltem BABAYİĞİT CİNALİ'ye;

Tüm hayatım boyunca kalpleri benim için çarpan, özveriyle beni bugünlere getiren sevgili Anneme, Babama; beni hiç bir zaman yalnız bırakmayan, desteğini hep hissettiğim biricik kardeşime;

Ve koşul gözetmeksizin, beni her zaman yüreklendiren, her sıkıntıma çözümler üretmek için elinden geleni yapan, biricik eşime; son olarak sevgili kızım, canım Bilge Meva'ya;

sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler	7
2.1.1. Mikrokapsüller	8
2.1.2. Mikroküreler	9
2.1.3. Nanopartiküller	9
2.1.3.1. Poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülleri	10
2.1.3.1.1. PLGA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	10
2.1.3.1.2. PLGA Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Farmakokinetiği ve Biyodağılımı	12
2.1.3.1.3. PLGA Kapsülasyon Teknikleri	13
2.1.3.1.4. PLGA Üretim Teknikleri	13
2.1.3.1.4.1. Mikropartikül Oluşturma Yöntemleri	13
2.1.3.1.4.1.1. Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	13
2.1.3.1.4.1.2. Faz Ayrıştırma Yöntemi	14
2.1.3.1.4.1.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi	15
2.1.3.1.4.2. Nanopartikül Oluşturma Yöntemleri	15
2.1.3.1.4.3. Diyaliz	16
2.1.3.1.4.4. Süperkritik Sıvı Teknolojisi	16
2.1.3.2. Katı Lipit Nanopartiküller	17
2.1.3.2.1. Katı Lipit Nanopartiküllerin Hazırlanma Yöntemleri	17

2.1.3.2.1.1. Yüksek Basınçla Homojenizasyon	18
2.1.3.2.1.1.1. Sıcak Homojenizasyon.....	18
2.1.3.2.1.1.2. Soğuk Homojenizasyon	18
2.1.3.2.1.2. Mikroemülsiyon	18
2.1.3.2.1.3. Çözücü ile Çöktürme.....	18
2.2. Nanolipozomlar	19
2.2.1. Nanolipozomların Fiziksel Özellikleri.....	19
2.2.2. Nanolipozomların Sınıflandırılması ve Hazırlanması	21
2.2.2.1. Çok Tabaklı Nanolipozomlar	22
2.2.2.2. Büyük Tek Tabaklı Nanolipozomlar	22
2.2.2.3. Küçük Tek Tabaklı Nanolipozomlar	22
2.2.3. Nanolipozom Hücre Etki Mekanizmaları	23
2.3. L-karnitin Metabolizması ve Klinik Önemi	23
2.3.1. L-karnitin Biyokimyasal Yapısı, Farmakokinetik Özellikleri.....	25
2.3.2. Takviye Olarak L-karnitin: Gelecekteki Önemi	26
2.4. Omik Teknolojileri: Metabolomik ve Yolak Analizi Yaklaşımları	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	30
3.1. Kullanılan Maddeler ve Ekipman.....	30
3.2. Analitik Yöntem Validasyonu.....	32
3.2.1. Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması	33
3.2.2. Özgünlük.....	33
3.2.3. Doğrusallık	34
3.2.4. Doğruluk ve Geri Elde	34
3.2.5. Kesinlik/Ara Kesinlik.....	34
3.2.6. Tayin Alt Limiti (LOQ) ve Tespit Alt Limiti (LOD)	35
3.2.7. Stabilitate	35
3.3. Formülasyonların Hazırlanması	35
3.3.1. Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması	35
3.3.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	37
3.3.2.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	37
3.3.2.2. Çift Emülsiyon Oluşturma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	37

3.3.3. Nanolipozom/Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	38
3.3.3.1. PB / ZP / PDI Analizi.....	39
3.3.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi	40
3.3.3.3. Termalgravimetrik Analiz	40
3.3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskopisi	41
3.3.3.5. Enkapsülasyon Etkinliği	41
3.3.3.6. <i>İn-vitro</i> Salım Çalışmaları ve Kinetik Değerlendirmeler	42
3.3.3.7. Stabilite Çalışmaları.....	44
3.3.3.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	44
3.3.3.9. Metabolomik/Yolak Analizi Çalışmaları: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi	45
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1. Analitik Yöntem Validasyonu	47
4.1.1. Özgünlük	47
4.1.2. Doğrusallık ve Aralık.....	49
4.1.3. Doğruluk	50
4.1.4. Kesinlik	50
4.1.5. Sağlamlık.....	52
4.1.6. LOQ ve LOD.....	56
4.1.7. Stabilite.....	57
4.2. Nanolipozomların ve Nanopartiküllerin PB / ZP ve PDI Analizi	57
4.3. Nanolipozom ve Nanopartiküllere Yüklene L-karnitin'in Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları	63
4.4. FTIR/ATR Analizi Sonuçları.....	64
4.5. Termalgravimetrik Analiz Sonuçları	67
4.6. Taramalı Elektron Mikroskopu Analiz Sonuçları	69
4.7. <i>İn-vitro</i> Salım Analizi Sonuçları.....	70
4.8. Stabilite Sonuçları	72
4.9. Hücre Kültürü Protein Miktar Tayini Sonuçları.....	75
4.10. Metabolomik ve Yolak Analizi Sonuçları	75
4.10.1. GC-MS Temelli Metabolomik Analizi Sonuçları	75

4.10.2. Yolak Analizi Sonuçları	101
5. YORUM.....	105
6. KAYNAKLAR.....	111
ÖZGEÇMİŞ.....	119



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İlaç Hedeflendirme Sistemi Basamakları	5
Şekil 2.2. PLGA: poly(lactic acid-co-glycolic acid), x&y:tekrarlanan her birimin kaç kez olduğunu gösterir [24].....	11
Şekil 2.3. (a) Fosfolipit yapısı ve (b) Nanolipozom vezikülü şematik gösterimi.....	20
Şekil 2.4. Nanolipozomu oluşturan fosfolipit yapı.....	20
Şekil 2.5. Yağ asitlerinin mitokondri iç zara taşınımı sırasında L-karnitin fonksiyonunu gösteren şematik diyagram	24
Şekil 2.6. L-karnitin'in kimyasal yapısı.....	25
Şekil 2.7. Omik teknolojilerinin sınıflandırılması	28
Şekil 3.1. Emülsiyon oluşturma esnasında kullanılan ultraturaks	38
Şekil 3.2. Diyaliz membran yöntemi ile <i>in-vitro</i> salım çalışması	43
Şekil 4.1.A) Seyreltme çözeltisi, B) Referans çözeltisi, C) PBS çözeltisi, D) Boş PLGA nanopartikülleri, E) L-karnitin yüklü PLGA nanopartikülleri (NP-1 formülasyonu), F) Boş nanolipozom, G) L-karnitin yüklü nanolipozom (Lipo-6 formülasyonu) örnek kromatogramları...	48
Şekil 4.2. L-karnitin HPLC yöntemine ait regresyon doğrusu (Y eksenini pik altında kalan eğri altı alanını ve X eksenini L-karnitin konsantrasyonunu göstermektedir).....	49
Şekil 4.3. Lipo-6 formülasyonuna ait PB/PDI değerleri örnek histogram	59
Şekil 4.4. Lipo-6 formülasyonuna ait ZP değeri örnek histogram.....	60
Şekil 4.5. NP-1 formülasyonuna ait PB/PDI değerleri örnek histogram.....	62
Şekil 4.6. NP-1 formülasyonuna ait ZP değeri örnek histogram	62
Şekil 4.7. Lipo-karnitin (L-karnitin yüklü nanolipozom), boş nanolipozom, Lipoid S100 ve L-karnitin HCl fiziksel karışımı, Lipoid S100, L-karnitin HCl'e ait FT-IR/ATR spektrumları	64
Şekil 4.8. Nano-karnitin (L-karnitin yüklü PLGA nanopartikül), boş PLGA nanopartikül, PLGA ve L-karnitin HCl fiziksel karışım, PLGA Polimer ve L-karnitin HCl'e ait FT-IR/ATR spektrumları....	65
Şekil 4.9. L-karnitin HCl, Lipoid S100, Lipoid S100 L-karnitin HCl fiziksel karışım, boş nanolipozom, Lipo-karnitin (L-karnitin yüklü nanolipozom)'a ait DTG termogramlarının karşılaştırılması	67
Şekil 4.10. L-karnitin HCl, PLGA Polimer, PLGA Polimer L-karnitin HCl fiziksel karışım, boş PLGA NP, Nano-karnitin (L-karnitin yüklü Nanopartikül)'e ait DTG termogramlarının karşılaştırılması	68
Şekil 4.11. Lipoid S100 – Soya fosfatidilkolin bazlı Lipo-karnitin numunelerine ait a-b) yükleme yapılmamış, c-d) yükleme yapılmış nanolipozom SEM görüntüleri.....	69
Şekil 4.12. PLGA bazlı Nano-karnitin numunelerine ait a-b) yükleme yapılmamış, c-d) yükleme yapılmış nanopartikül SEM görüntüleri.....	70
Şekil 4.13. Nano-karnitin ve Lipo-karnitin formülasyonu ve kontrol grubunun <i>in-vitro</i> ilaç salım profilleri (n = 6, hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).	71

Şekil 4.14. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait %EE'nin zamanla değişimi	73
Şekil 4.15. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait ZP'nin zamanla değişimi	73
Şekil 4.16. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait PB'nin zamanla değişimi	74
Şekil 4.17. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait PDI değerlerinin zamanla değişimi	74
Şekil 4.18. Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin ile uyarılmış kardiyak fibroblastların, uyarım sonrasında kazınarak türevlendirilmesiyle elde edilen GC/MS kromatogramları (kromatogramlar üst üste çakıştırılmıştır)	76
Şekil 4.19. Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin ile uyarılmış kardiyak fibroblastların, uyarım sonrasında kazınarak türevlendirilmesiyle elde edilen GC/MS kromatogramları	76
Şekil 4.20. A) Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait GC/MS yöntemiyle elde edilen metabolit düzeylerine ilişkin PLS-DA skorlama grafiği, B) Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait GC/MS yöntemiyle elde edilen derişimi en yüksek 25 metabolite ilişkin VIP veri grafiği	83
Şekil 4.21. Kontrol ve L-karnitin gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) Kontrol grubuna göre L-karnitin grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.	84
Şekil 4.22. Kontrol ve Lipo-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) Kontrol grubuna göre Lipo-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.	85
Şekil 4.23. Kontrol ve Nano-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) Kontrol grubuna göre Nano-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.	86
Şekil 4.24. L-karnitin ve Lipo-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) L-karnitin grubuna göre Lipo-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.	87
Şekil 4.25. L-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) L-karnitin grubuna göre Nano-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.	88
Şekil 4.26. Lipo-karnitin formülasyonu ve Nano-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) Lipo-karnitin grubuna göre Nano-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği	89
Şekil 4.27. Amino asit metabolizması şematik gösterimi	95
Şekil 4.28. Yolak analizine ait metabolitlerin etki grafiği	102
Şekil 4.29. Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin kardiyak hücre hatlarında etkileşen yolaklar	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Madde ve Malzemeler.....	30
Çizelge 3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar	31
Çizelge 3.3.HPLC Kromatografik Şartlar	33
Çizelge 3.4. Farklı Lipit Konsantrasyonlarında Hazırlanan Nanolipozom Formülasyonları	36
Çizelge 3.5. Optimize Edilen Rotavapor Cihaz Parametreleri.....	36
Çizelge 3.6. Nanoçöktürme Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları.....	37
Çizelge 3.7.Çift Emülsiyon Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları	38
Çizelge 3.8.GC-MS Analizi için Uygulanan Kromatografik Şartlar.....	46
Çizelge 4.1.L-karnitin Analitik Yöntemine İlişkin Geri Kazanım Sonuçları ($n = 3$).....	50
Çizelge 4.2. L-karnitin için Birinci Gün Elde Edilen Kesinlik Sonuçları.....	51
Çizelge 4.3. L-karnitin için İkinci Gün Elde Edilen Kesinlik Sonuçları	51
Çizelge 4.4. L-karnitin için Üçüncü Gün Elde Edilen Kesinlik Sonuçları.....	51
Çizelge 4.5. L-karnitin için Üç Gün Boyunca Elde Edilen Kesinlik Sonuçları.....	52
Çizelge 4.6. Yöntemin Sağlamlığını Test Etmek için Değiştirilen Parametreler	52
Çizelge 4.7. Standart Yönteme ait Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar.....	53
Çizelge 4.8. Akış Hızı Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar	53
Çizelge 4.9. Dalgaboyu Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar	54
Çizelge 4.10. Hareketli Faz'a ait Organik Çözücü Oranı Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar.....	54
Çizelge 4.11. Hareketli Faz Tampon Çözelti Derişimi Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar	55
Çizelge 4.12. Standart Çözeltideki ve Kromatografik Şartlarda Değişiklik Yapılarak Elde Edilen L-karnitin Pik Alanlarına ait Sapma Sonuçları.....	55
Çizelge 4.13. LOQ Sonuçları	56
Çizelge 4.14. LOD Sonuçları.....	57
Çizelge 4.15. Çözelti Stabilesi Sonuçları	57
Çizelge 4.16. Hazırlanan Nanolipozomların Ortalama PB, ZP ve PDI Değerleri.....	58
Çizelge 4.17. Hazırlanan Nanopartiküllerin Ortalama PB, ZP ve PDI Değerleri	61
Çizelge 4.18. Yüzde Enkapsülasyon Etkinliği (EE%).....	63
Çizelge 4.19. Formülasyonların <i>in-vitro</i> Salım Hızı Kinetik Verileri	72
Çizelge 4.20. Hücre kültürü BCA protein miktar tayini analizi sonuçları.....	75
Çizelge 4.21. GC-MS Yöntemiyle Analiz Edilen Metabolitlere İlişkin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri ve İstatiksel Olarak Karşılaştırmalarına ait p Değerleri Sonuçları.....	78
Çizelge 4.22. Amino asit Metabolizması-1'de Etkili olan Metabolitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri.....	91
Çizelge 4.23. Amino asit Metabolizması-2'de Yer Alan Amino asitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri.....	94

Çizelge 4.24. Karbonhidrat Metabolizmasında Etkili olan Metabolitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri.....	97
Çizelge 4.25. Lipit Metabolizmasında Etkili olan Metabolitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri.....	99
Çizelge 4.26. Tanımlanan Metabolitlerin İlişkili Oldukları Biyokimyasal Yolaklar	101
Çizelge 4.27. Hücre Hatlarında İstatiksel Olarak Önemli Değişen Metabolitlerin Yer Aldıkları Yolaklar	104



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

RT	Alıkonma zamanı
T _g	Camsı geçiş sıcaklığı
T _c	Faz değiştirme sıcaklığı
nm	Nanometre
µm	Mikometre
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
r ²	Determinasyon Katsayısı
k	Hız Sabiti

Kısaltmalar

LC	L-karnitin
HÜNİKAL	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç ve Kozmetik Ar-Ge ve Kalite Kontrol Laboratuvarı
HÜNİTEK	Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i> , Amerikan İlaç ve Gıda İdaresi

EP	<i>European Pharmacopoeia</i> , Avrupa Farmakopesi
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> , Birleşik Devletler Farmakopesi
EMA	<i>European Medicine Agency</i> , Avrupa Tıp Ajansı
ICH	<i>The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> , Beşeri İlaçların Ruhsatlandırılmaları için Teknik Gerekliliklerin Uyumuna Üzerine Uluslararası Konferans
PLGA	Poli(d,l-laktik ko-glikolik asit)
PLA	Polilaktik asit
PGA	Poliglikolik asit
PVA	Polivinil alkol
PL	Fosfolipit
PC	Fosfatidilkolin
PDL	Fosfatidilinositol
PA	Fosfatidik asit
PE	Fosfatidiletanolamin
PS	Fosfatidilserin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik asit
KLN	Katı lipid nanopartiküller

FTIR/ATR	<i>Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance</i> , ATR üniteli Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ,Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectroscopy</i> , Gaz Kromatografisi, Kütle Spektroskopisi
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , Taramalı Elektron Mikroskopu
TGA	<i>Thermal Gravimetric Analysis</i> , Termalgravimetrik Analiz
DSC	<i>Differential Scanning Calorimeter</i> , Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
DTG	Derivatif Termogravimetri
ACN	Asetonitril
EtAc	Etilasetat
MetOH	Metanol
THF	Tetrahidrofur
BCA	Bikinkoninik asit tahlili
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium Besi Yeri
LOD	<i>Limit of Detection</i> ,Teşhis alt limiti
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> ,Tayin alt limiti
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Fosfat Tamponlu Tuz
PDI	Polidispersite İndeksi
ZP	Zeta Potansiyel

PB	Partikül Büyüklüğü
KoA	koenzim A
RES	Retikülo Endotelyal Sistem
VK	Varyasyon katsayısı
SS	Standart Sapma
BH	Bağıl Hata
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> , En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi
VIP	<i>Variable Important in Project</i> , Önemli Değişken
ETZ	Elektron Taşıma Zinciri
SA	Sitrik Asit
FDR	<i>False Discovery Rate</i> , Yanlış Bulgu Oranı

1. GİRİŞ

İlaç hedeflendirilmesi, farmakolojik olarak etkin maddenin etki veya absorpsiyon bölgesine seçici olarak yönlendirilmesidir. Hazırlanan preparat etkin maddeyi taşıyan özel bir yapıdır. Uygun bir ilaç taşıyıcı sistem, etkin maddeyi istenilen doku ve/veya organa, istenilen hızda ve sürede taşınmalıdır. Etkin maddeyi istenilen doku ve/veya organa taşıyan sistemlere hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, etkin maddenin salım hızını kontrol eden sistemlere ise kontrollü salım sistemleri denir. Kontrollü salım sistemleri, taşıdıkları etkin maddenin istenen süre ve hızda kontrollü salımını sağlarlar. Bu sistemlerin, salım hızlarının planlanabilmesi ve etkin madde salımını sıfırıncı derece kinetikle gerçekleştirebilmeleri önemli üstünlükleridir. Bu sistemlerin aktif veya pasif hedefleme mekanizmaları ile, istenen doku ve organlarda birikerek tedavi edici etkin konsantrasyonlara ulaşması sağlanmaktadır. Diğer dokulara dağılımının önlenmesi nedeniyle, ilaca bağlı yan etki görülme olasılığı düşmektedir.

Nanoteknoloji fizik, kimya, biyoloji gibi temel bilimlerin mühendislik ile harmanlanıp birleştirildiği bilim alanı olarak adlandırılabilir. Bu yol ile üretilen malzemelerin geleneksel prosedürlerle sentezlenenlere kıyasla daha üstün özelliklere sahip olması en önemli avantajıdır. Nanoteknoloji, tıbbın çok farklı alanlarında (teşhis, tedavi, görüntüleme ve ilaç taşıyıcı sistem olarak) yenilikçi gelişmeler sağlamaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler, kontrollü salım ve hedeflendirme güdümlü yeni kuşak terapötiklerin etkinliğinin artırılması, yan ve toksik etki azaltılması/yok edilmesi gibi yenilikleri sayesinde 'Farmasötik Nanoteknoloji' başlığı modern nanoteknolojinin odak noktalarının başında yer almaktadır. İlaç taşıyıcı sistem olarak; düşük suda çözünürlük, düşük biyoyararlanım ve toksisite gibi problemlerin çözümünde nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler önerilmektedirler. Polimerik veya lipidik nanosistemler, pek çok çalışmada ilacın biyoyararlanımının geliştirilmesi, farmakokinetiğinin modifiye edilmesi veya enkapsüle edilen ilacın enzimatik etkiden korunması aşamasında başarılı sonuçlar vermişlerdir. Son yıllarda, doğal/sentetik polimerler ve lipitler kullanılarak hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler yukarıda özetlenen

sebeplerden dolayı çok ilgi görmektedirler. Gelişmeye devam eden günümüz ilaç sanayisinde yeni bir etkin madde üretmek yerine, mevcut etkin maddenin vücut tarafından biyoyararlanımını artırmak, hedef dokuya/organa ulaşımını sağlamak ve yan etkilerini en aza indirmek önem arz eden konu olmaktadır. Bu durumun en önemli sebepleri, yeni etkin maddenin üretiminin çok uzun zaman alması, ağır ekonomik yük ve sıklıkla istenen sonucu vermemesi olarak gösterilmektedir.

Etkin maddelerin vücuda salım yollarının incelenmesi sırasında yapılan çalışmalarda kontrollü ilaç salım sistemleri öne çıkmaktadır. Ancak çoğu polimerlerin biyoyumlu veya biyobozunur olmayışı ilaç sanayisini bu sentetik polimer malzemelerin yerini alacak biyoyumlu ya da biyobozunur malzeme arayışına sevk etmiştir. Bu aşamada yüksek biyoyumluluğu ve Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (Food and Drug Administration; FDA) onaylı olması nedeniyle poli(d,l-laktik ko-glikolik asit) (PLGA) dikkat çekmektedir. Nanolipozomlar ise biyolojik membrana benzer yapıları ve yüksek biyoyumlulukları nedeniyle pek çok çalışmada kullanılmışlardır. Bu amaçla tez kapsamında, ilaç dağılım sistemleri olarak en kapsamlı araştırılan PLGA nanopartikülleri ve nanolipozom formülasyonları ile çalışmalar yürütülmüştür.

L-karnitin (β -hydroxy- γ -trimethylammonium butyrate) lizin türevidir, suda çözünebilen ve vücut tarafından sentezlenen bir bileşiktir. L-karnitin bütün memeli türlerinde endojen olarak bulunan ve yaşamsal bir kofaktör görevi yapan doğal bir amonyum bileşiğidir [1-3]. Yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasından sorumlu olup, yağ asidi metabolizmasında önemli rol üstlenir ve aynı zamanda antioksidan aktiviteye sahiptir. Serbest karnitin (L-karnitin) vücuttaki toplam karnitin havuzunun % 80' ini oluşturur [4]. Dokularda sadece L formu sentezlenir ve sadece bu formu metabolik olarak aktiftir. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri iç membranına ulaşması ve burada beta oksidasyonlarının gerçekleştirilmesi için kullanılan tek bileşiktir. Adenin-nükleotid-translokaz enzimini modüle ederek mitokondriyal enerjinin sitoplazmaya iletimini kontrol eden L-karnitin'in, kasları güçlendirici, yağ yakımını ve sperm hareketliliğini

arttırıcı özelliklerinin yanı sıra bağışıklık sistemi, yüksek tansiyon, diyabet gibi hastalıkların tedavisinde yardımcı olarak kullanılması birçok çalışma ile kanıtlanmıştır [5, 6]. L-karnitin, bazı spesifik beslenme koşullarında (hamilelik, bebek beslenmesi vb...) dışarıdan alınması zorunlu olan bir mikro besin olmasının yanı sıra obezite, diyabet, bölgesel zayıflama gibi çağın önemli sorun ve unsurlarına takviye olabilecek bir besin ögesidir [7]. Kanser, diyabet, Alzheimer, insülin direnci, kardiyovasküler hastalıkların (Angin, iskemi, periferikvasküler, kardiyojenik şok, kardiyomiyopati, hiperlipitemi, miyokard enfarktüsü vb...) karnitin eksikliğinden kaynaklandıkları görülmektedir [8]. Bu nedenle, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de etkin bir şekilde kullanılmaktadır [9]. Bahsi geçen hastalıkların yanı sıra, atletik performansı artırma ve yağ yakımını hızlandırma gibi destek ürünleri olarak da piyasada büyük bir pazara sahiptir [8]. Yapılan bir çalışmada, uzun süreli L-karnitin takviyesi alan atletlerin koşu hızında artış, ortalama oksijen tüketiminde ve kalp atışlarında azalma saptanmışken [10], bir diğer çalışma da ise egzersiz programına başlamadan yaklaşık bir saat önce alınan L-karnitin takviyesinin plazma laktat miktarını azalttığı belirtilmiştir [11]. L-karnitin takviyesi, karaciğer enzimlerindeki düzenlenmenin yanı sıra izotretinoin tarafından indüklenen miyalji, zayıflık ve hipotansiyonu önlemeye de yardımcı olur [8, 12]. L-karnitin'in eksojen kaynaklı önemli besin öğeleri kırmızı et ve süt ürünlerinden oluşmaktadır. Son yıllarda suni yemleme ve hızlı üretim teknikleri sebebiyle yiyeceklerden alınabilme verimli oldukça azalma gösterme, biyoyararlanımı düşmeye devam etmektedir. Bu sebeple, günümüzde popüler besin takviyelerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Yiyeceklerden alındığı takdirde biyoyararlanımı %54-86 [13] iken, diyet takviyelerinden alındığı durumlarda biyoyararlanımına ait literatür çalışmaları %14-18 [14], %5-25 [13] gibi düşük seviyelerdedir. Karnitin verimini artırmaya yönelik literatür çalışmaları yok denecek kadar az sayıdadır.

Bu sebeplerle, L-karnitin'in biyoyararlanımını artırıp, yan etkilerini en aza indirmek oldukça önem taşımaktadır. Tez kapsamında, L-karnitin emilim sürecinin en azından bir kısmının kolaylaştırılması veya aktif hale getirilmesi için

PLGA nanopartikülleri ve/veya nanolipozom formülasyonları sentezlenerek, kontrollü salımının gerçekleştirilebileceği düşünülmüştür. Bu şekilde etkili alımının sağlanabileceği öngörülmüştür.

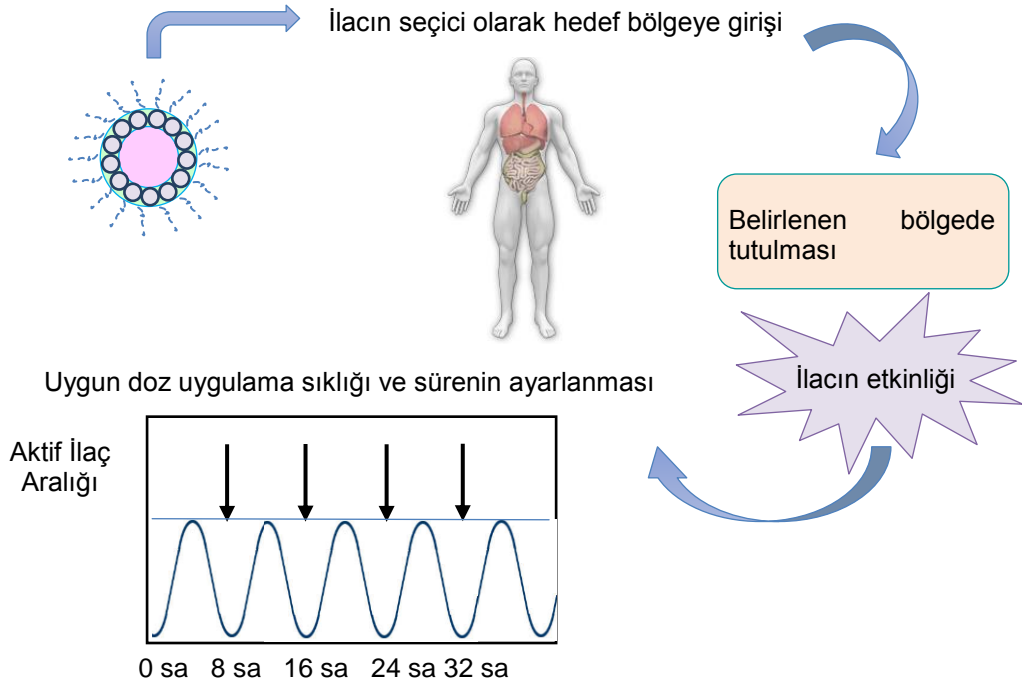
Hücre kültürleri, günümüzde ilaç absorpsiyonunun *in-vitro* değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Hücre kültürleri, canlılardan alınıp canlılık özellikleri korunabilecek şartlar altında yetiştirilen sistemlerdir ve *in-vitro/in-vivo* arası özellik gösterirler ve ilaç absorpsiyon çalışmalarında kullanılabilirler.

Günümüzde yenilikçi teknolojiler sayesinde metabolom, proteom, transkriptom ve genom detaylı tarama analizleri yapılabilmektedir. Bu teknolojilerin genel adı olan "Omik Teknolojileri" analizlerinden elde edilen detaylı bilgiler; ilaç etkileşim mekanizmalarının anlaşılması, bireysel tedavi stratejilerinin seçilmesi ve etkinliklerinin anlaşılıp değerlendirilmesi için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu amaçla tez kapsamında, Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi (*Gas Chromatography Mass Spectroscopy*, GC-MS) tekniği kullanılarak metabolomik analizler gerçekleştirilmiştir.

Yukarıda sayılan sebepler doğrultusunda sunulan bu tez kapsamında; L-karnitin yüklü PLGA nanopartikülleri ve nanolipozom formülasyonları geliştirilmiş, sentezlenen nano ilaç taşıyıcı sistemlerin kritik kalite özellikleri olan, zeta potansiyel (ZP), partikül büyüklüğü (PB), polidispersite indeksi (PDI) ve yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE) üzerine, formülasyon ve üretim parametrelerinin etkisi değerlendirilmiş, analitik yöntemlerle etkin madde miktar tayini çalışmaları yapılmış, salım profilleri belirlenmiş ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hücre içi metabolomik ve yolak analizlerine ait çalışmalar doğrultusunda, farklı metabolit grupları taranarak L-karnitin'in nanotaşıyıcı sistemlerle ve sistemsiz olarak kullanıldığında, hücre düzeyindeki etkileri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Kontrollü ilaç salım sistemleri, ilaçların hedeflenen organlara gerekli olan dozda ve istenen aralıklarla salımını sağladığı için etkili bir tedavi yöntemi olarak son yıllarda ilgi çekmektedir. Hedef olarak, hücresel yapı, özel bir organ, veya intraselüler bölge seçilebilmektedir. İlaç taşıma sistemlerinde iddialı yaklaşımlar yaklaşık 1 asır önce Paul Ehrlich'in "sihirli mermi" (Magic bullet) kavramıyla gündeme gelmiştir. Günümüzde bu kavramın iyice aydınlatılması için çalışmalar devam etmektedir [15, 16]. Emil Heubel, 19. yüzyıl sonlarına doğru bazı ilaçların belli organlara ve/veya organ bölümlerine karşı özel affinite ve seçicilik gösterdiğini keşfetmiştir. Ehrlich ise, etkin maddesi Asfenamin olan "Salvarsan" adlı ilacın frengi hastalığı tedavisine seçici etkisi olduğunu keşfederek "sihirli mermi" (Magic bullet) geliştirmeyi başarmıştır [16]. Kontrollü salım sistemlerinin en temel iki yasasından ilki; ilacın terapötik etkinliğini sağlayabilecek konsantaryonda etki bölgesine istenen hızda ulaşımının sağlanması; diğeri ise etkin maddenin dozunun azaltılarak toksik etkilerinin sınırlandırılması ve etkin maddenin istenen doku ve/veya organ üzerinde dağılımının sağlanarak hedeflendirilmesidir [16]. Hedeflendirmenin basamakları Şekil 2.1.'deki görselde özetlenmiştir [16, 17].



Şekil 2.1. İlaç Hedeflendirme Sistemi Basamakları

Nanopartiküller; terim olarak, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, sentetik veya doğal yapıdaki polimerlerle hazırlanan, etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği veya partikül yüzeyi üzerine adsorbe edildiği, ligand gibi bağlandığı sistemlerdir. Nanoküre veya nanokapsül olarak da isimlendirilirler. Bu sistemlerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılırlar. Nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilme, biyogeçimlilik, mukoadesiflik gibi biyolojik özelliklere sahiptirler. Nanopartiküller, enkapsülasyon yetenekleri, etkin madde stabilitesini artırması ve kontrollü salım sağlamaları bakımından son derece geniş kullanım alanına sahiptirler.

Nanolipozomlar, 0.02-3.5 µm çapında sulu faz ve lipit çift tabaka olmak üzere iki ayrı kısımdan oluşan, koloidal lipit yapısında küresel veziküllerdir. Nanolipozom oluşturmak için genellikle yumurta ve soya bazlı fosfolipitler kullanılır. Nanolipozomlar, biyoyumlu ve biyoparçalanabilen özellikteki lipit içerikleri sayesinde hücre membran yapısına benzerlik gösterirler. Bu nedenle, hücre membranına yüksek afinite göstererek penetrasyonu artırabilirler. Ayrıca, düşük çözünürlüğe sahip etkin maddeler için organik çözücü görevi görmek ve böylece penetrasyonu artırarak yüksek lokalize ilaç konsantrasyonunu sağlamak, uzatılmış salım, lokal depo etki gibi avantajlarının yanı sıra sistemik absorpsiyonun engellenebilmesi için hız sınırlayıcı membran bariyer olarak da etki gösterirler.

Nanopartiküllerin ve nanolipozomların taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemlerle, ilaçların çok uzun süre sürekli ve kontrollü olarak salımı sağlanabilmektedir. Sahip olduğu avantajlarından dolayı etkin maddelerin enkapsülasyonu sonucu kontrollü salımları için nanopartikül üretiminde en yaygın olarak kullanılan biyobozunur polimerler alifatik poliesterler olan Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimeri olan Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'dir. Biyoparçalanabilir bir polimer olan PLGA ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında ve doku mühendisliği alanında çok önemli bir potansiyele sahiptir. FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicine Agency*, EMA) tarafından onaylı olması, DNA, RNA, peptid ve proteinler dahil çok farklı

yapıdaki maddelerin taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılması, uzun süreli klinik deneyiminin kazanılmış olması, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması PLGA'nın önemli üstünlükleridir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar PLGA'nın ayarlanabilir degradasyon özelliklerinin, sürekli salım sistemlerinin hazırlanması için uygun olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, FDA onayı, üretim kolaylığı, karakteristiğindeki çok yönlülük, biyoyumlu, biyoparçalanabilir olmaları, toksik ve immünojenik özellik göstermemeleri bu polimerlerin yoğun bir şekilde taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmasına imkan sağlamaktadır.

2.1. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler

Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller, hacimsel yapılı malzemelerden çok daha farklı ve üstün özellikler sergileyen ve boyutları 10-1000 nanometre (nm) arasında değişen yapılardır. Nanoyapılı partiküller, gösterdikleri üstün özellikler sayesinde ilaç, elektrik-elektronik, biyomedikal, otomotiv ve kimya sektörleri başka olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanıma sahiptirler. İlaç taşıyıcı sistemler başlığı altında incelendiklerinde; hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı kolloidal yapılar olarak tanımlanabilirler. Bu sektörde kullanılan nanopartiküller pek çok avantajları sebebiyle tercih edilmektedirler. Fizikokimyasal olarak istenilen fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip nanotaşıyıcıların hücrelere geçişi büyük moleküllere nazaran çok daha iyidir ve bu sayede hedef doku veya organa biyoaktif bileşenlerin başarıyla taşınmasını sağlamaktadır [18]. İlacın kontrollü salımı ile ilaç etki bölgesine yönelir, dokulara dağılım esnasında ilaç terapötik etkinliğini gösterirken, yan etkiler azaltılmış olur. Nanopartiküler sistemler; paranteral, oral, oküler, topikal gibi birçok farklı yollarla kullanılabilmelerinin yanı sıra biyolojik olarak parçalanabilme, biyogeçimlilik, mukoadesiflik gibi istenilen biyolojik özelliklere sahiptirler.

İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan mikro/nanotaşıyıcılar; mikrokapsül/mikroküreler, polimerik nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller (KLN'ler), nanolipozomlar, dendrimerler, manyetik nanopartiküller, silikon veya

karbon bazlı nanomateryaller vb... olarak sıralanabilirler [19]. Bu sistemlerin tamamı, içerisinde çözünmüş, hapsedilmiş veya yüzeyine adsorbe edilmiş etkin maddelerin kontrollü salımını sağlayan sistemler olup, herbiri avantaj/dezavantaj bakımından ayrı öneme sahiptirler.

2.1.1. Mikrokapsüller

Mikrokapsüller genel olarak 3–800 µm çapındadır ve ağırlıkça %10-90 çekirdek malzemedan oluşurlar. En basit tanımıyla, düzgün sınırlarla çevirili küçük kürelerdir ve mikrokapsülleme yöntemi ile hazırlanırlar. Mikrokapsülleme, katı partikül, gaz veya sıvı damlacık formundaki etkin maddelerin, polimerik film malzemesi ile dış ortamdan izole edilip, çevrenmesi ve korunmaları sağlanarak kaplanması prosesidir [20]. Bu yöntemle çekirdek malzemeler, uzun süreli etkinin sağlanması, çevresel bozunmaya karşı stabilizasyonun artırılması, sıvı çekirdeğin katı forma dönüştürülmesi, kullanımın kolaylaştırılması, kötü tadın maskelenmesi ve toksik etkinin önlenmesi gibi çeşitli nedenlerle enkapsüle edilirler [20, 21]. Mikrokapsülleme teknolojisi, sentezlenmesi diğer yöntemlere göre zahmetli ve pahalı olan yapıların ve istenilen özellikteki maddelerin elde edilmesine kolaylık sağlamaktadır. Bu nedenle, mikrokapsülleme proseslerine olan ilgi artarak gelişmeye devam etmektedir. Mikrokapsülasyon teknolojisi aşağıda sıralanan sebepler doğrultusunda ilaç sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır:

- Etkin maddenin dış ortamdan (ışık, nem vb.) korunarak stabilitesinin artırılması
- Etkin maddenin difüzyon ve buharlaşma hızının azaltılması
- Etkin maddenin kontrollü salımının sağlanabilmesi
- İstenmeyen tat ve kokuların maskelenmesi
- Sıvı damlacıkların ve gaz partiküllerin katı forma dönüştürülmesi
- Geçimsiz maddelerin bir arada verilebilmesi

Mikrokapsülleme prosesleri dört basamakta özetlenebilir: 1) Emülsiyon oluşturma. 2) Polimerlerin kompleks oluşturma. 3) Kaplamanın gerçekleştirilmesi. 4) Kaplamanın sertleşmesiyle mikrokapsüllerin eldesi (termal

çapraz bağlanma prosesi). Birinci ve ikinci basamaklar birbirleriyle karışmayan yapıların sürfaktan yardımıyla emülsiyon oluşturduğu ve çekirdeği çevreleyen duvar materyalinin olduğu kısımdır. Son iki faz ise, içerisine sertleştirme ajanının eklenerek kapsüllemenin gerçekleştiği kısımdır [20, 21].

2.1.2. Mikroküreler

Çapları birkaç mikrometreden birkaç yüz mikrometreye kadar farklılık gösterebilen, monolitik yapıda taşıyıcılarıdır. Mikrokürelerin etkin maddeyi hücre veya dokuya taşıması, etkin maddeyi kontrollü şekilde salması, hedef bölgeye ulaşana dek etkin maddeyi sızdırmaması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması gerekir. Mikrokürelerin hazırlanmasında sentetik ve doğal polimerler kullanılır. Doğal polimerler arasında amino polisakkaritler, proteinler, karbohidratlar ve lipitler yer alır. Sentetik polimer olarak ise, biyolojik parçalanmayan ve parçalanmayan polimerler kullanılır. Doğal polimerler, biyolojik olarak parçalanabilmeleri, metabolize edilebilmeleri, stabiliteyi, suda çözünen ilaçlar için yüksek enkapsülasyon etkinliği vermeleri nedeniyle, mikroküre hazırlamada daha fazla tercih edilir.

Sentetik polimerlerin de istenen spesifikasyonlara göre sentezlenebilmeleri, hazırlama süresince dayanıklı olmaları, fazla miktarda ve yüksek saflıkta üretilibilmeleri gibi özellikleri vardır. Proteinler, aşılarda ve anti-kanserojen ilaçlar mikroküre formunda vücuda verilebilen sistemlerdendir [6, 19]. Yukarıda bahsedilen farmasötik uygulama alanlarına ek olarak mikroküreler, dolaşım sistemi içerisine uygulanarak, sistem fonksiyonlarının incelenmesinde ve damar çaplarının ölçülmesinde de kullanılabilirler.

2.1.3. Nanopartiküller

İçerisinde hapsedilmiş veya çözünmüş formda bulunan veya yüzeyine adsorbe edilen etkin maddeyi kontrollü olarak salabilen kolloidal yapıda katı formda nano boyuttaki partiküllerdir. Nanopartiküller, nanoküre ve yananokapsül olarak da adlandırılabilirler. Nanokürelerde, etkin madde matris sistem içinde homojen

olarak dağılmış şekilde bulunurken, nanokapsüllerde ise etkin madde polimer zarla çevrelenmiştir. Nanopartiküllerin, ilacı kontrollü olarak salması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve taşıyıcının istenilen fizyolojik ortamda parçalanması gibi özelliklere sahip olması beklenir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında, doğal ve sentetik polimerler kullanılır. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan doğal polimerler sıklıkla, albümin, jelatin gibi proteinler ve kitozan, dekstrin, aljinat gibi polisakkaritler olmak üzere iki gruptur. Sentetik polimerler olarak ise, önceden sentezlenen PLA, PLGA, poli-anhidrit veya hazırlama sırasında monomerlerden sentezlenen polimerlerden yararlanılır.

2.1.3.1. Poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartikülleri

PLGA, ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması, doku mühendisliği alanında büyük bir öneme sahiptir. Tasarım ve performans açısından ilaç taşıma sistemleri için en detaylı tanımlanmış biyomateryaldir [22]. Poliester yapıda olan PLGA kopolimeri, FDA ve EMA tarafından onaylı, PLA ve PGA polimerlerinden oluşan, biyoparçalanabilir ve biyoyumlu bir materyaldir. DNA, RNA, ilaç etkin maddeleri, peptid ve proteinler gibi farklı yapıdaki maddelerin taşıyıcı sistemlerinin üretiminde kullanılması, yapısını oluşturan her iki monomerin de doğal olarak oluşmasından ötürü minimum toksisiteye sahip olması, süregelen klinik bilgi birikimine sahip olunması, biyoparçalanabilir ve biyoyumlu yapıda olması gibi özellikleri PLGA'yı en sık kullanılan sürekli salım sistemi ajanı yapmaktadır [22-24].

2.1.3.1.1. PLGA'nın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Laktid yapısında asimetric bir karbon bulunur, L ve D olmak üzere iki optik izomeri bulunmaktadır. Optikçe aktif olan L-laktid ve D-laktid ve optikçe aktif olmayan DL-laktid olmak üzere üç farklı laktid formundan oluşmaktadır [22].

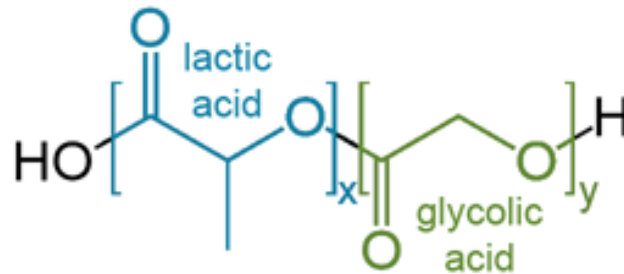
PLGA kopolimerlerinin Tg (camsı geçiş sıcaklığı) 37°C'nin üzerindedir ve oda koşullarında camsıdır, dolayısıyla önemli mekanik mukavemet sağlayan

oldukça sert bir zincir yapısına sahiptirler. Bu sayede kolaylıkla ilaç salım sistemleri olarak formüle edilebilirler [25].

PLA polimeri sahip olduğu metil grubunun hem sterik engel oluşturması hem de hidrofobik yapı göstermesi sebebiyle PGA polimerine nazaran hidrolize daha dayanıklıdır. Fakat, düşük termal stabilite gösterir ve mekanik olarak kırılğan yapıdadır. PGA kısmı ise, %45-55 oranında kristalin yapı gösterir, metil yan grubu içermez [24]. Poli (laktik) ve poli (glikolik) asit çoğu çözücüde zayıf bir şekilde çözünürken, PLGA aseton, tetrahidrofuran (THF), etil asetat ve klorlanmış çözücüler dahil olmak üzere birçok çözücüde çözünür [22, 23]. PLGA suda, ester bağlarının hidrolize olması yoluyla biyobozunurluğa uğrar.

PLA'daki metil yan grupların varlığı, PLA'yı PGA'dan daha hidrofobik kılar ve bu nedenle laktid açısından zengin PLGA kopolimerleri PGA'dan daha az hidrofildir, daha az su emer ve sonrasında daha yavaş bozunur [22].

Poli(DL-laktid) ise yapısındaki düzensizliklerden dolayı amorf yapıda iken poli(L-laktid) yarı-kristal (yaklaşık %37 oranında kristalinite) yapıdadır. PLGA'nın elde edilmesinde glikolid ile kopolimerizasyon yapmak üzere L-laktid veya DL-laktid kullanılmaktadır. Glikolid:laktid oranları farklılaştırılarak PLGA'nın kristalinite derecesi kontrol edilebilmektedir; örneğin PLGA 88:12 oranı, polimerin %88 laktik asit ve %12 glikolik asitten oluştuğunu belirtir.



Şekil 2.2. PLGA: poly(lactic acid-co-glycolic acid), x&y:tekrarlanan her birimin kaç kez olduğunu gösterir [24].

PLGA'nın fiziksel özellikleri moleküler ağırlık, laktid/glikolit oranı, suya direk maruz kalan kısım (yüzey şekli) ve saklama sıcaklığı gibi birçok faktöre bağlıdır [22]. PLGA'nın mekanik özellikleri, moleküler ağırlık ve PDI gibi fiziksel özelliklerinden etkilenir. Bu özellikler ayrıca bir ilaç salım aracı olarak formüle edilme yeteneğini, bozunma hızı ve hidroliz derecesini belirler.

2.1.3.1.2. PLGA Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Farmakokinetiği ve Biyodağılımı

Nanopartiküllerden ilaç salımı genel olarak aşınma, sızma, parçalanma, kopma ve difüzyon mekanizmalarıyla olmaktadır. Difüzyon mekanizması dışında diğer salım mekanizmaları sürekli salım gerçekleştirirler. Difüzyon mesafesi partikül boyutu nedeniyle çok kısadır, bu sebeple bu mekanizma ile salım yapan sistemler sürekli ve kontrollü bir salım profili göstermezler [19]. İlaç taşıma sistemi olarak kullanılan PLGA'nın, taşıdığı ilaç etkin maddesini istenilen terapötik etki için uygun biyodağılım, süre ve konsantrasyonda salımını gerçekleştirmesi gerekmektedir. Bu nedenle, nanopartikül içeren ilaç taşıyıcı sistemler oluşturulurken, geometri, etkin madde dağılım mekanizması, PLGA'nın biyo-bozunması gibi özellikler belirlenmelidir. Etkin madde PLGA'nın polimer degradasyonu ile salınır, bu nedenle ilaç salım kinetiği polimer degradasyonu ile karşılaştırılır. Degradasyon hızı alkil zincir uzunluğuna dayanmaktadır [19]. *İn-vitro* ve *in-vivo* olarak PLGA kopolimeri, omurga ester bağlarının ayrılması yoluyla sulu ortamda (hidrolitik bozunma veya biyodegradasyon) bozunmaya uğrar [25].

PLGA'nın biyo-dağılımı ve farmakokinetiği, doğrusal olmayan ve doza bağlı bir profili takip eder [22, 26]. Literatürde yapılan çalışmalar göstermektedir ki, PLGA nanotaşıyıcılarının bozunması ilk aşamada (yaklaşık%30) hızlıdır ve en sonunda akciğer solunumu ile vücut dışına atılır [22, 27].

2.1.3.1.3. PLGA Kapsülasyon Teknikleri

Her ne kadar bugüne kadar bir dizi PLGA-kapsülasyon tekniği geliştirilmiş ve rapor edilmiş olsa da tekniğin seçimi polimerin doğasına, etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine, formülasyonun kullanım amacına ve terapinin istenen süresine bağlıdır. Kullanılan kapsülasyon yöntemi aşağıdaki gereklilikleri içermelidir [25].

- (i) İlacın stabilitesi ve biyolojik aktivitesi, kapsülleme işlemi sırasında veya nihai üründe olumsuz etkilenmemelidir.
- (ii) İstenilen boyut aralığına sahip mikro/nano PLGA kapsüllerinin verimi ve ilaç kapsülleme verimliliği yüksek olmalıdır.
- (iii) Kapsüllerin kalitesi ve ilaç salım profili belirtilen sınırlar dahilinde tekrarlanabilir olmalıdır.
- (iv) Kapsüller serbest akışlı bir toz olarak üretilmeli ve agregasyon göstermemelidir.

2.1.3.1.4. PLGA Üretim Teknikleri

Mikro ve nanopartikül oluşturma yöntemleri arasında; emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, faz ayrıştırma yöntemi, püskürterek kurutma yöntemi, diyaliz ve süperkritik sıvı teknolojisi olmak üzere farklı üretim teknikleri bulunmaktadır. Kullanılan teknikler alt başlıklarda detaylandırılmıştır.

2.1.3.1.4.1. Mikropartikül Oluşturma Yöntemleri

Mikropartikül oluşturma yöntemleri kendi içerisinde farklı başlıklarda incelenmektedir.

2.1.3.1.4.1.1. Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan bu yöntem, temel olarak aşağıda belirtilen iki basamaktan oluşur:

(1) Sulu faz içerisinde polimer çözeltisinin homojenize edilmesiyle emülsiyon hazırlanması.

(2) Emülsifikasyon sonrası organik çözücünün uzaklaştırılmasıyla nanopartiküllerin elde edilmesi.

Bu yöntemde [25], stabilizatör ve yüksek enerjili homojenizasyon kullanılır. PLGA nanopartikülleri hazırlamak için PLGA, diklorometan, THF, etilasetat veya kloroform gibi suyla karışmayan organik çözücülerde çözündürülür. Daha sonra stabilizatör (polivinil alkol (PVA), sodyum taurodeoksikolat, sodyum dodesil sülfat, Tween 80, vb. yüzey aktif maddeler) içeren sulu faz ile karıştırılarak homojenize edilir. Etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre, ya polimer çözeltisi içerisinde veya sulu faz içerisinde çözündürülerek karışıma ilave edilir. Oluşturulan emülsiyondaki organik faz alçak basınç altında uzaklaştırılır ve böylece nanopartiküler sistemler elde edilir. Bu yöntemle hazırlanan polimerik taşıyıcıların partikül boyutu; karıştırma hızı, stabilizatörün tipi, miktarı, polimer/ilaç konsantrasyonu, organik ve sulu fazın viskozitesi, sıcaklık gibi parametreler değiştirilerek ayarlanabilir [25].

2.1.3.1.4.1.2. Faz Ayrıştırma Yöntemi

Ekonomik, tekrarlanabilen ve hızlı olan bu yöntemde, koaservat ve süpernatant olmak üzere iki ayrı faz bulunmaktadır ve sürfaktan kullanımına gerek duyulmamaktadır. Polimer çözeltisi içinde dağıtılan/çözündürülen ilaç etkin maddesi, koaservat ile kaplanmaktadır.

Yöntem polimerin su ile tamamıyla karışabilen organik bir çözücüde çözündürülmesi ve sonrasında sulu fazın da karıştırılması sonucu nanoboyutta çöktürülmesi ilkesine dayanmaktadır ve aşağıda belirtilen üç basamaktan oluşur [25]:

- (i) Kaplama polimer çözeltisinin faz ayrımı
- (ii) İlaç etkin maddesi etrafında koaservatın adsorbsiyonu
- (iii) Mikrokürelerin katılaştırılması

Öncelikle, polimer organik çözücü içinde çözündürülür. Suda çözünen ilaçlar suda çözündürülürerek, polimer çözeltisinde dağılır. Polimer-ilaç çözücü karışım sistemi üzerine, alkol gibi polimer çözücüsünü ekstrakte edebilecek çözücü kademeli olarak karıştırılarak eklenir. Sonuç olarak, polimer faz ayrışır ve boyutları karıştırma hızı ve süresiyle kontrol edilmiş ilaç etkin maddesini tutan koaservat damlacıkları oluşur. Bu sistem mikrokürelerin sertleştirilmesi için daha yüksek miktardaki başka bir organik olmayan çözücü içerisine (formaldehit, glutaraldehit vb.) transfer edilir, sonrasında yıkama, eleme, filtrasyon veya santrifüjleme ile toplanır ve en son işlem olarak kurutularak final mikroküreler elde edilir [25]. Bu işlemin, emülsifikasyon yönteminden farkı, sulu olmayan bir yöntem olduğu için hem suda çözünen hem de suda çözünmeyen ilaçları kapsüllemek için uygundur.

2.1.3.1.4.1.3. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutma yöntemi; diğer iki yöntemle nazaran çok daha hızlı, rahat, ölçeklendirilmesi kolay olup, ilacın ve polimerin çözünürlük parametrelerine daha az bağımlıdır [28, 29]. Bu yöntemde ilaç, polimer çözeltisi içinde çözündürülür veya disperse edilir. Özel bir alet kullanılarak, püskürtücü iğne yardımıyla püskürtülerek kurutulur. Partiküllerin boyutu; püskürtme hızı, püskürtücü iğne boyutu, kurutma hızı, inlet/outlet sıcaklık ve aspirasyon hızı değiştirilerek kontrol edilebilir [30]. Büyük çaplı üretime imkan vermesi nedeniyle ilaç sanayiinde tercih edilmektedir.

2.1.3.1.4.2. Nanopartikül Oluşturma Yöntemleri

Yukarıda açıklanan tüm mikropartikül üretim teknikleri, parametreler üzerinde gerekli düzenlemeler yapılarak PLGA nanopartiküllerinin (nanoküreler ve nanokapsüller) üretilmesi için de kullanılabilir. Katı, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan en yaygın yöntem, emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma tekniğidir [22]. Nanopartiküller ayrıca nanopresipitasyon (nanoçöktürme) yöntemleri ile hazırlanabilmektedirler. Hızlı, ekonomik ve tekrarlanabilir olması bu yöntemin üstünlükleridir. Bu yöntemin esası, polimerin (genellikle PLGA, PLA, PCL, vb. polimerler) suyla tamamen karışabilir bir

organik çözücüde çözüldürülmesi, daha sonra iki fazın karıştırılması sonucu organik çözücünün uçurularak, çözüldürülmüş materyalin nanoboyutta presipitasyonuna dayanmaktadır. Genellikle; çözücü olarak aseton, aseton-su karışımı, etanol-aseton karışımı, THF kullanılır. Nanopartiküllerin boyutu, çözücülerin oranları ve polimer konsantrasyonu değiştirilerek ayarlanabilmektedir [22].

2.1.3.1.4.3. Diyaliz

Küçük ve homojen partikül dağılımına sahip nanopartiküllerin üretimi için etkili ve basit bir yöntem olan diyaliz yönteminde, polimer organik bir çözücüde çözüldürülür ve uygun molekül ağırlığına göre diyaliz yapan tüp içerisine yerleştirilir. Diyaliz sonucunda, çözücünün yer değiştirmesine bağlı olarak polimer çözünürlüğü azalarak, polimer kademeli olarak agregasyona uğrar ve bu sayede homojen bir nanopartikül süspansiyonu oluşturulmuş olur [31].

2.1.3.1.4.4. Süperkritik Sıvı Teknolojisi

Polimerik nanopartiküller hazırlamak amacıyla kullanılan bu yöntemin en büyük avantajı çöktürülmüş ürünün çözücü içermemesidir. Basıncın değişmesine rağmen süperkritik sıcaklıkları üstünde faz değiştirmeyen sıvılar, süperkritik olarak belirtilirler.

En yaygın kullanılan, süperkritik sıvı CO₂'dir (T_c=31.1°C, P_c=73.8 bar), alev almaz, ucuzdur ve toksik değildir. Süperkritik anti-çözücü yöntemi (SAS) ve süperkritik çözeltinin hızlı genişmesi (RESS) yöntemleri en sık kullanılan yöntemlerdir. RESS yönteminde, etkin madde ve polimer süperkritik çözücüde yüksek basınçta çözüldürülürken, SAS yönteminde ise etkin madde organik bir çözücü içerisinde çözüldürüldükten sonra süperkritik sıvı ile temasta bırakılır. Süperkritik çözücüde organik faz hemen çözünür, geriye filtrasyon sonrası elde edilebilen nanopartiküller kalır [32, 33].

2.1.3.2. Katı Lipit Nanopartiküller

İlk olarak 1991'de mevcut kollodial sistemlere alternatif olarak ortaya atılmış olan katı lipit nanopartiküllerin (KLN) boyutları 50-1000 nm arasında değişkenlik gösterebilir. KLN'ler ilaç taşıyıcı sistemleri ve araştırmalarında oldukça fazla kullanım potansiyeli olan ve nanoteknoloji/nanotıp alanında en dikkat çeken formülasyonlar arasında yer almaktadır [34]. Yağ/su emülsiyonundaki sıvı olan yağ fazının katı lipit ile yer değiştirmesiyle elde edilir.

KLN'lerin aşağıda sıralandığı gibi birçok avantajı bulunmaktadır;

- Yüksek biyouyumluluk
- Lipofilik ve hidrofilik ilaçların yüklenebilmesi
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesi
- Kapsüle edilmiş etkin maddelerin kontrollü salımını sağlamak
- İlaç hedefleme
- Kullanılan etkin maddelerin stabilitesini artırmak
- Ölçeklendirme ve sterilizeedilebilme kolaylığı
- Polimerik nanopartiküllere nazaran daha kolay üretim

KLN'lerin dezavantajları;

- Tahmin edilemeyen jelasyon eğilimi
- Polimerik geçişler esnasında beklenmeyen dinamikler

2.1.3.2.1. Katı Lipit Nanopartiküllerin Hazırlanma Yöntemleri

KLN'ler genellikle yüksek basınçla homojenizasyon, mikroemülsiyon ve çözücü ile çöktürme gibi aşağıda detaylandırılmış yöntemlerle hazırlanabilirler [34].

2.1.3.2.1.1. Yüksek Basınçla Homojenizasyon

2.1.3.2.1.1.1. Sıcak Homojenizasyon

Bu yöntemde, lipit erime derecesinin 5-10°C üzerindeki sıcaklığa getirilir ve lipidik yapı içerisinde, etkin madde çözündürülür veya dağıtılır. Etkin madde içeren bu eriyik haldeki lipidik yapı, aynı derecedeki sulu yüzey etkin madde çözeltisi içinde dağıtılır. Oluşan pre-emülsiyon homojenize edilir ve oda sıcaklığına kadar soğutulur. Lipit tekrar kristalize olur ve böylece katı lipit partiküller oluşur.

2.1.3.2.1.1.2. Soğuk Homojenizasyon

Etkin maddeyi içeren lipit eriyiği soğutularak katı lipit ~50-100 µm boyutlarındaki lipidik mikropartiküller elde edilinceye kadar öğütülür, sonrasında soğuk yüzey etkin madde çözeltisi içerisinde dağıtılır, oda sıcaklığında homojenizasyona maruz bırakılır.

2.1.3.2.1.2. Mikroemülsiyon

50-70°C'de trigliserit ve yağ asidi eritilir. Su/yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde lipofilik faz ile aynı sıcaklığa ısıtılır. Sulu faz, lipofilik faza eklenir ve elde edilen yağ/su emülsiyonu soğuk ortamda (2-3°C) dağıtılır. Genellikle, Trehaloz ve Pluronic F-68 ortamında dispers edilir. Mikroemülsiyonlar suya eklenince lipit faz, küçük partiküller oluşturacak şekilde çöker. Birkaç kez diafiltrasyon ve dia ultrafiltrasyon yöntemiyle yıkanır. Otoklavda sterilize edildikten sonra dondurularak kurutulur.

2.1.3.2.1.3. Çözücü ile Çöktürme

Gliserit organik çözücüde çözündürülür ve sulu faz ortamında emülsifiye edilir. Çözücü buharlaştırılır, lipidin çökmesiyle katı lipit nanopartiküller elde edilir.

2.2. Nanolipozomlar

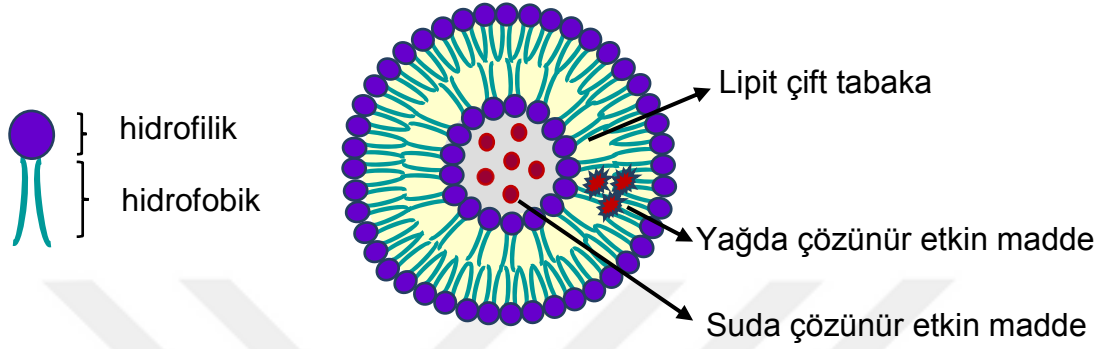
Nanolipozomlar ilaç taşıyıcı sistem uygulamalarında nanotaşıyıcılar olarak pek çok avantajlara sahip kolloidal küresel veziküllerdir [19, 34-36]. 20-3000 nm boyut aralıklarında sentezlenebilirler. Lipozomlarda nano boyuta inildikçe yüzey/hacim oranı artışından dolayı biyoyararlanımı ve hedeflendirilme yetenekleri artırılmış yapılar elde edilebilir [19, 34, 36]. Konu ile ilgili yapılan çalışmalar 1964 yılına kadar gitmektedir. Bangham ve ekibi hücre zar yapısı modelini oluşturmak amacıyla çalışmalarına başlamış, nanolipozomların etkin madde taşıyıcısı olarak kullanılabileceğini keşfetmişlerdir [37]. Günümüzde, piyasada tedavi amaçlı kullanılan etkin madde içeren nanolipozom formülasyonunun az sayıda olmasına karşın, aşağıda bahsedilen avantajlarından dolayı klinik çalışmaların sayısı her geçen gün artarak devam etmektedir [34, 38, 39].

- Vücut yapıtaşı olan fosfolipitlerden üretildikleri için biyolojik ortamda degradasyona uğrayarak toksik, yan ve immünojenik etkileri çok aza indirilebilir veya ortadan tamamen kaldırılabilirler.
- Düşük dozlarda bile yüksek terapötik etki gösterebilirler.
- Etkin madde plazma seviyesini istenilen süre boyunca terapötik düzeyde tutabilirler.
- Suda veya yağda çözünen etkin maddeler enkapsüle edilebilirler.
- Etkin maddeyi enkapsüle ettikleri için vücut ortamında bulunan istenmeyen enzimatik etkilerden koruyabilirler.
- Dozlama aralığını uzatırlar.
- Yarılanma ömrü kısa olan etkin maddelerin, kontrollü salımını sağlayarak yarılanma ömrünü uzatırlar.
- İlacı direkt olarak hedeflenen bölgeye taşıyabilirler.

2.2.1. Nanolipozomların Fiziksel Özellikleri

Nanolipozomlar, biyolojik membran benzeri lipit tabaka(lar) ve bu tabaka(lar) arasında sulu faz olmak üzere iki bölümden oluşurlar [19]. Şekil 2.3.'te fosfolipit

(PL) yapı ve etkin madde yüklü nanolipozom yapısı şematik olarak gösterilmiştir. Şekil 2.4.'te PL kimyasal formu gösterilmiştir. Lipit tabakası, başlıca doğal veya sentetik olarak üretilen fosfolipitlerden oluşur. Nanolipozom sentezinde genellikle kullanılan PL; fosfatidilinositol (PDL), fosfatidik asit (PA), fosfatidilkolin (PC), fosfatidiletanolamin (PE), fosfatidilserin (PS)'dir [34, 36, 39].



Şekil 2.3. (a) Fosfolipit yapısı ve (b) Nanolipozom vezikülü şematik gösterimi.

$\begin{array}{c} \text{CH} - \text{O} - \text{R} \\ \\ \text{C} - \text{O} - \text{R} \\ \\ \text{CH} - \text{O} - \text{P} - \text{X} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ <p>R: Yağ Asitleri</p>	<p>X: — OH fosfatidik asit</p>
	$\text{X: — OCH}_2\text{CH}_2 - \text{N}^+ \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{— CH}_3$ <p>fosfatidilkolin</p>
$\text{X: } \begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{OH} - \text{C} - \text{OH} \\ / \quad \backslash \\ \text{OH} \quad \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>fosfatidilinositol</p>	<p>X: — OCH₂CH(NH₂)COOH fosfatidilserin</p>
	<p>X: — OCH₂CH₂NH₂ fosfatidiletanolamin</p>

Şekil 2.4. Nanolipozomu oluşturan fosfolipit yapı.

Nanolipozomların çift tabakalı vezikül yapısının oluşmasında etkili olan iki non-kovalent etkileşim bulunmaktadır.

(i) Fosfolipit ve su molekülleri arasındaki etkileşimler: Fosfolipitlerin sulu çözeltide dağıtılmaları durumunda hidrofilik bölgeler suya yönelirken, hidrofobik kısımlar sudan uzaklaşırlar.

(ii) Fosfolipit molekülleri arasındaki Van der Waals etkileşimleri.

Fosfolipitler, kuyruk grupları hidrofobik hidrokarbon zincirinden oluşan, baş grupları hidrofilik yapıda olan amfoter özellikte moleküllerdir. Fosfolipitlerin özelliklerini hidrofobik özellik gösteren yağ asidi zincirlerinin uzunluğu ve doymamışlık derecesi belirler. Lipit tabakanın özelliklerini istenilen şekilde düzenleyebilmek için sentez esnasında değişiklikler yapılabilir. Örneğin, kan proteinleri ile lipit tabaka ile birleşmesinin engellenmesi için yapıya kolesterol gibi bir sterolün katılmasıyla lipit tabaka geçirgenliği azaltılabilir. Bu sayede kan proteinlerinin lipit tabakaya geçiş oranı azaltılarak nanolipozom stabilitesi artırılabilir.

Nanolipozomlar katı veya sıvı formda bulunabilirler, faz değiştirme özelliğini fosfolipitin kendi yapısı belirler ve her lipitin belirli bir faz değiştirme sıcaklığı vardır. Faz değiştirme sıcaklığı (T_C) 37°C 'nin üzerinde ise, fizyolojik şartlarda daha kararlıdır. Faz değiştirme sıcaklıkları yakınlarında, nanolipozomlar jelleşme göstereceğinden enkapsüle edilmiş etkin maddeleri serbestleştirmeye başlarlar. T_C 'nin 37°C altında olduğu durumlarda ise sentez esnasında değişiklikler yapılabilir. Örneğin lipit tabakaya ilave edilen kolesterol ile T_C artırılır ve bu sayede etkin madde miktar kaybı azaltılabilir [34].

2.2.2. Nanolipozomların Sınıflandırılması ve Hazırlanması

Nanolipozomlar, özel amaçlar doğrultusunda; sıcaklığa hassas, pH'a hassas, Retikulo Endotelial Sistem (RES) korumalı, katyonik yapıda, polimerize yapıda, üstü kaplı yapıda olarak hazırlanabilir ve bu şekilde sınıflandırılabilirler [34].

Nanolipozomlar genel olarak tabaka sayıları ve büyüklükleri göz önüne alınarak aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir [34]. Aşağıdaki kısımda sınıflandırılmalarına göre ayrılan başlıklarda, hazırlama yöntemlerinden de bahsedilmiştir.

2.2.2.1. Çok Tabaklı Nanolipozomlar

Birden fazla lipit tabakasını içerisinde barındıran yapılardır. İç içe dairesel birçok tabakadan ve bu tabakalar arasındaki sulu fazdan oluşurlar. 400-3500 nm arasında değişen büyüklüklere sahiptirler. Lipofilik veya hidrofobik etkin maddeler nanolipozomların lipit tabakasında hapsedilirken, hidrofilik etkin maddeler sulu fazda enkapsüle edilirler. Hazırlanışları için genellikle, 'Bangham Yöntemi' veya 'ince lipit tabaka' olarak adlandırılan yöntem kullanılır. Bu yöntemde; nanolipozomu oluşturan lipit veya lipit karışımı organik çözücüde çözündürülür, çözücünün uçurulmasının ardından oluşan lipit tabakası, pH 7.4 tamponu veya sulu faz ile karıştırılarak nanolipozomlar oluşturulur [34].

2.2.2.2. Büyük Tek Tabaklı Nanolipozomlar

Tek bir lipit tabakasında oluşan, içerisinde sulu faz bulunan ve 100 nm'den daha büyük olan nanolipozomlardır. Ters faz buharlaştırma yöntemi veya deterjan diyaliz yöntemleriyle hazırlanabilirler. Ters faz buharlaştırma yönteminde; fosfolipitlerin su ve organik faz karışımı ile s/y emülsiyonu oluşturulur, organik faz vakum altında uçurulur. Deterjan diyaliz yönteminde ise; fosfolipitlerin sürfaktan ile misel karışımları hazırlanır. Etkin madde bu çözelti içerisinde çözündürülür, diyaliz veya jel filtrasyon gibi tekniklerle kullanılan surfaktant ortamdan uzaklaştırılır.

2.2.2.3. Küçük Tek Tabaklı Nanolipozomlar

İçerlerinde sulu faz bulunan ve büyüklükleri 0.25 – 0.50 nm olan tek tabakalı yapılardır. Çok tabakalı nanolipozomların N₂ atmosferi altında sonike edilmeleriyle veya çözücü enjeksiyonu yöntemi kullanılarak hazırlanabilirler.

2.2.3. Nanolipozom Hücre Etki Mekanizmaları

Nanolipozomların taşıdığı etkin maddeler hücre içerisine,

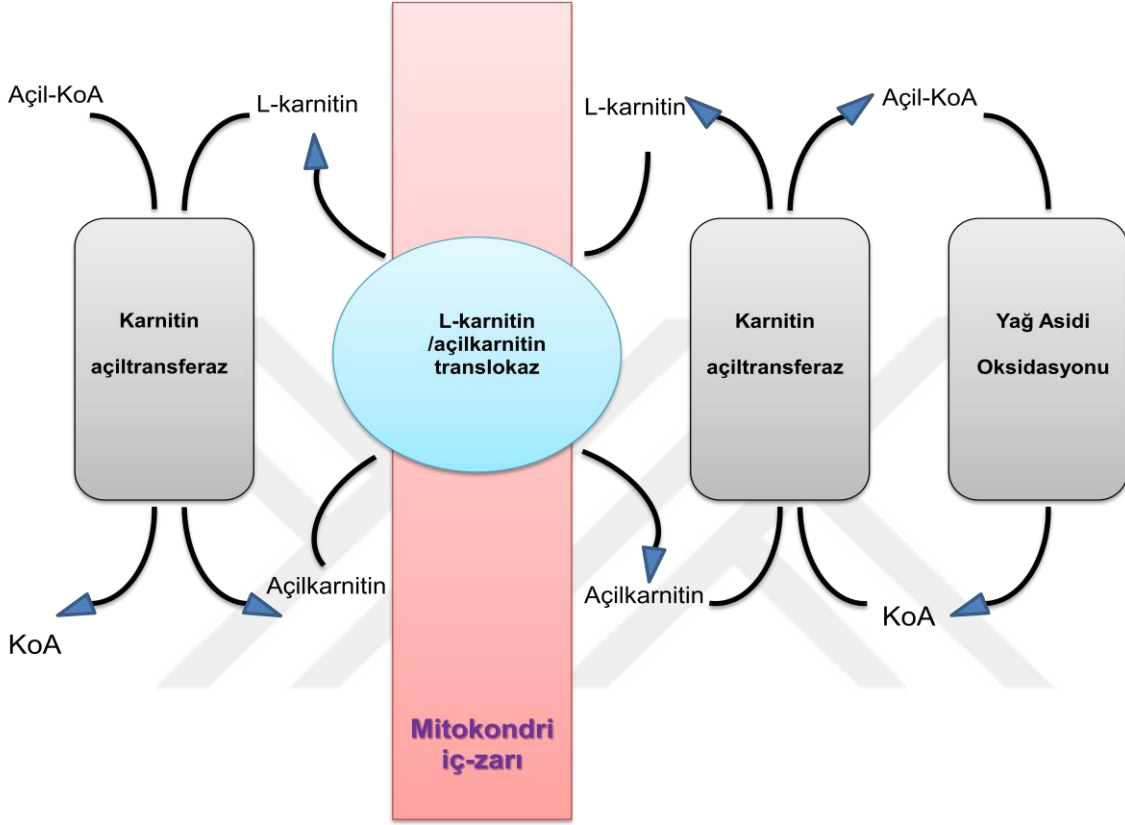
- (i) Adsorpsiyon: Hücre duvarına nanolipozomun tutunup içeriğini difüzyon yoluyla salması,
- (ii) Endositoz: Hücrenin fagositoz yoluyla nanolipozomu içerisine direkt alması, lizozom ile sitoplazma içerisinde nanolipozom dış yapısının sindirilmesi sonucu içeriğinin sitoplazmaya salımının gerçekleşmesi,
- (iii) Lipit değişimi: Nanolipozomun hücre zarına tutunması sonucu, zarıda bulunan lipitlerin ve nanolipozom yapısındaki lipitlerin yer değiştirmesi esnasında açılan porlardan nanolipozomal içeriğin geçişi,
- (iv) Füzyon (Eriyerek Birleşme): Nanolipozomun lipit çift tabakasının hücre zarıyla birleşmesiyle hücre duvarının bir parçası haline gelmesi, nanolipozomal içeriğin sitoplazmaya eşzamanlı salınması, yollarıyla girebilirler [40].

2.3. L-karnitin Metabolizması ve Klinik Önemi

Rus bilim insanları Gulewitsch ve Krimberg tarafından hayvan kas dokusundan izole edilen L-karnitin, 1905 yılında keşfedilse de, yağ metabolizmasındaki hayati rolü ve eksikliğinin önemi 1970'li yıllara kadar açıklanamamıştır [8].

Yağ yakımı mekanizması başlayabilmesi için yağ asitlerinin özgün bir taşıyıcı ile mitokondri içine taşınması gerekmektedir, bu taşıyıcının adı 'karnitin' ve izlediği biyokimyasal yola 'karnitin yolu' denir. L-karnitin'in ana fonksiyonu; karaciğerde depolanan uzun zincirli yağ asitlerini mitokondriye taşımak ve böylece hücre içerisine transfer olarak oksidasyona uğrayan yağ moleküllerinin sayısını çoğaltarak, yağ yakma verimliliğini yükseltmek ve vücuda enerji sağlamaktır [41]. Yağ asidi, enerji elde etmek amacıyla bir hücreye alındıktan sonra, açılkoenzim A (açıl-KoA) tarafından sitozolde (hücre sitoplazmasının suda çözünmeyen sıvı ortamı) KoA (koenzim A) türevlerine dönüştürülür. Yağ yakım mekanizması, mitokondri matriksinde gerçekleştiği için, Şekil 2.5.'te gösterildiği

gibi yağ asidi, mitokondrinin iç zarını geçmelidir, ancak bu zar KoA gibi polar yapıda ve büyük moleküllere karşı geçirgen değildir. Bu sebeple, ne serbest yağ asitlerinin ne de Açıl-KoA'nın tek başlarına mitokondri iç zarı boyunca ilerleyemeyecekleri göz önüne alındığında, L-karnitin ve karnitin açıltransferazlar yağ asidi metabolizmasında hayati rol üstlenmektedirler.



Şekil 2.5. Yağ asitlerinin mitokondri iç zara taşınımını sırasında L-karnitin fonksiyonunu gösteren şematiik diyagram

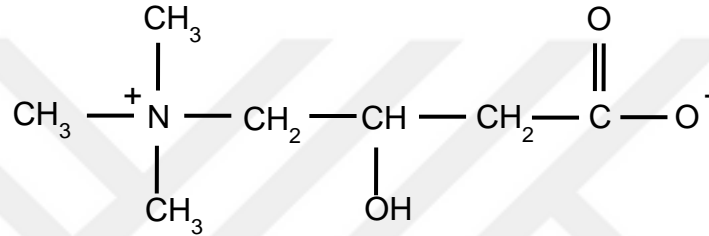
L- karnitin'in yağ asitlerinin oksidasyonundaki görevi dışında, aerobik karbonhidrat metabolizmasını kolaylaştırmak, oksidatif fosforilasyon hızını arttırmak ve bazı organik maddelerin atılımını arttırarak antioksidan etki göstermek gibi görevleri bulunmaktadır [42].

L-karnitin, vücuda eksojen ve endojen olarak iki kaynaktan sağlanmaktadır. L-karnitin'in biyosentezi için lizin ve metionin esansiyel amino asitleri kullanılmaktadır. Gıdalardan alınan L-karnitin'in en önemli kaynakları, kırmızı et ve süt ürünleridir. Gıda sektöründeki suni yemleme ve seri üretimin artışı,

yiyeceklerle alınan L-karnitin'in vücuttaki miktarını yetersiz kılmakta, dolayısıyla çağımızın sorunu olan obezitenin başlıca sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sebepler doğrultusunda L-karnitin, sporcular ve kilo vermek isteyen kişiler tarafından sıklıkla takviye olarak alınmaktadır.

2.3.1. L-karnitin Biyokimyasal Yapısı, Farmakokinetik Özellikleri

Kapalı formülü $C_7H_{15}NO_3$ olan L-karnitin (3-hidroksi-4-N-trimetil azonumilbütanoat) bileşiğinin açık molekül gösterimi Şekil 2.6.'da belirtilmiştir.



Şekil 2.6. L-karnitin'in kimyasal yapısı.

Hidrofilik bir bileşik olan L-karnitin, içeriğinde bulunan bir adet asimetrik karbondan dolayı D ve L formlarına sahiptir. Doğada sadece L formunda bulunan L-karnitin, D formu kimyasal olarak üretilir ve bu formu aktif değildir. Asetil-L-Karnitin, Propionil-L-Karnitin olmak üzere iki kimyasal formu daha bulunmaktadır. L-karnitin'in ;

- Düşük biyoyararlanıma sahip olması (%14-18) [13, 14],
- Vücutta depolanamaması (bağırsaklardan aktif transport ile absorbe olur ve eliminasyonu böbreklerden sağlanır),
- Yarılanma ömrünün kısa olması (30-60 dk) [43, 44],
- Üretilen L-karnitin etkin maddesi kaynaklarının Avrupa ve Amerikan Farmakopelerinde tanımlı muhtemel bazı safsızlıkları içermesi,
- Etkin tedavi sağlanabilmesi için sık doz uygulama gerektirmesi,
- Bahsi geçen safsızlıklar sebebiyle yüksek miktarda ve sık aralıklarla uygulanması sonucu toksik ve yan etkilerinin artması,

Sebepleri doğrultusunda L-karnitin'in kontrollü salım sistemleri ile vücuda verilmesi oldukça önem arz etmektedir.

2.3.2. Takviye Olarak L-karnitin: Gelecekteki Önemi

L-karnitin, bebek beslenmesi, sağlık hizmetleri, performans geliştirme, yaşlanma geciktirme ve kronik hastalıklardan koruma gibi stratejik sağlık alanlarında etkili olabilecek FDA onaylı bir gıda takviyesidir [13]. FDA tarafından bebek beslenmesi formülasyonlarında günlük minimum karnitin içeriği 7.5 µmol/100 kcal olarak belirlenmiş, yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda bebekler için önemli bir gıda maddesi olduğu belirtilmiştir [13, 45].

Karnitin üzerine fiziksel eforu azaltarak, performans geliştirme ve yağ yakım hızını artırma açısından da araştırmalar bulunmaktadır. Bu strateji, ilave karnitin oksidatif metabolizmayı arttırmasına dayanmaktadır. Vücutta bulunan karnitin artışı, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasını sağlayarak yağ yakımına destek olmaktadır. Bu oksidasyon sonucu ortaya çıkan enerji, kas dokusu tarafından kullanılarak, fiziksel performansı arttırmaya katkı sağlamaktadır. Klinik veriler, karnitin konsantrasyonu normalin %25-50'sinden az olduğu durumlarda, kas fonksiyonunun azalmaya duyarlı olduğunu göstermektedir [46]. Ayrıca karnitin, egzersiz sonrası dokularda oluşan kimyasal hasarı azaltmakta ve kas onarımı/yeniden yapılanma süreçlerini hızlandırmaktadır [47].

Bu bilgiler ışığında, karnitin takviyelerinin yararları ve kontrollü salımının kaçınılmaz olduğu göz önüne alınırsa;

- L-karnitin antioksidan ve anti-apoptotik etkilerinin kimyasal temelini aydınlatmak ve
- L-karnitin biyoyararlanımını arttırmak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır [13].

Bu nedenle, tez kapsamında L-karnitin model bileşik olarak seçilmiş ve farklı formülasyonların metabolomik çalışmalarla etkinlikleri değerlendirilmiştir.

2.4. Omik Teknolojileri: Metabolomik ve Yolak Analizi Yaklaşımları

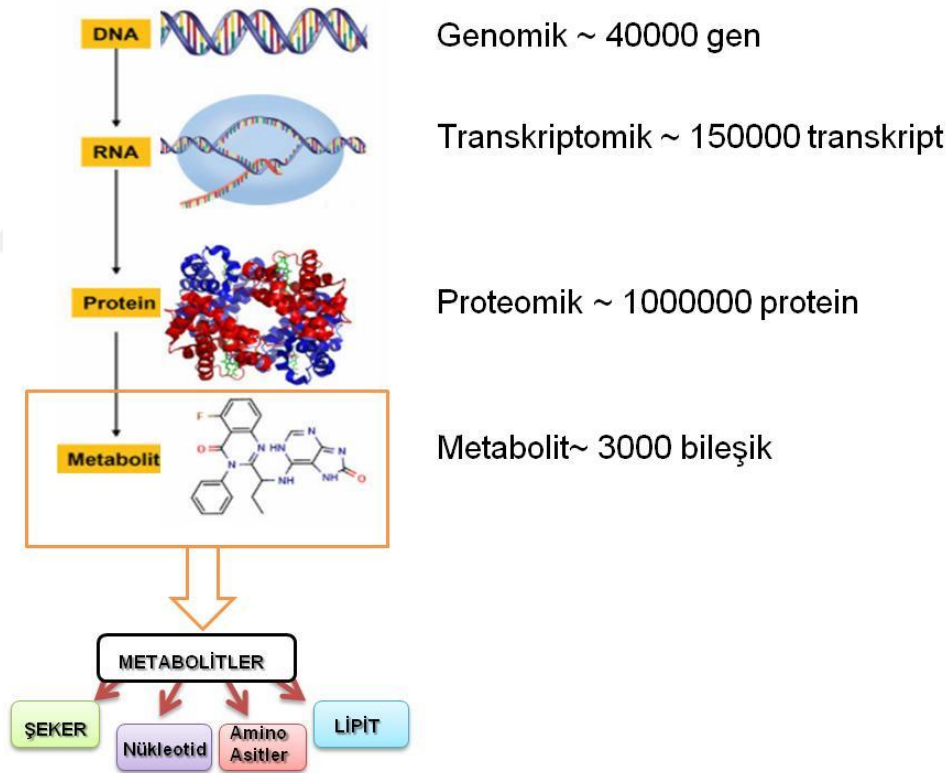
Geçmişten günümüze kadar, hücresel metabolizmanın araştırılması için, biyokimya, biyoteknoloji ve hücresel fizyoloji gibi çeşitli araştırma alanlarında pekçok çalışma yapılmış olup, halen devam etmektedir [48]. Hücresel metabolizma değişimlerinin ölçümü; kanser, metabolik sendromlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın kökeninde yatan sorunların ve daha sağlıklı, uzun yaşam için gerekli olan mekanizmaların aydınlatılması için oldukça önemlidir. Bu kapsamda, hücre içi metabolizmanın nicel olarak ölçülmesi için yaygın olarak uygulanabilir analitik yöntemlerin geliştirilmesi büyük bir öneme sahiptir [49]. Hücresel metabolizma, besin alımı ve metabolit sekresyon oranları, hücre içi metabolit seviyeleri, hücre içi metabolik oranlar (yolaklar) ve bu hücresel döngüler üzerindeki aktiviteler gibi birçok parametre ile karakterize edilmektedir [50].

Sistem biyolojisinin nihai amacı, tüm bileşenlerin davranışına dayanarak tüm sistemin davranışını tahmin etmektir. Bir organizmanın morfolojisi, fizyolojik özellikleri, gelişim süreçleri, biyokimyasal özellikleri ve davranışı gibi gözlemlenebilir özelliklerinin tümü, o organizmanın fenotipini oluşturmaktadır. Bu fenotip, bir arada olan ve etkileşen genler, metabolitler, transkriptler ve proteinler ile birlikte tanımlanmaktadır. Metabolitlerin proteom düzeyindeki değişikliklere neden olması ve organizmanın fenotipini diğer belirteçlere göre daha iyi göstermesi özelliklerinden dolayı, metabolit düzeyinde gerçekleştirilen metabolomik analizler, fenotip-genotip boşluğunu bağlayan modern 'omik' teknolojisinin temelini oluşturmaktadır [51].

Omik teknolojilerindeki son gelişmeler, yeni hesaplama tekniklerinin ve algoritmaların geliştirilmesi bakımından, biyokimya alanındaki ilerlemelere büyük katkı sağlamaktadır. Bu "moleküler indirgeme yaklaşımı", genotip ve fenotipi hem ayrı ayrı hem de birlikte irdeleyebilmektedir. Dolayısıyla moleküler

düzeydeki bileşenleri tanımlamada, hastalıkların teşhis ve tedavisinde, hastalık fenotipi belirlenmesinde oldukça etkin bir analiz olarak modern biyokimyaya ışık tutmaktadır.

Şekil 2.7.'de sınıflandırıldığı gibi omik tarama teknolojilerinde; genomik (genetik dizilim, genetik varyantlar/epigenetik modifikasyonlar), transkriptomik (transkripsiyon sonrasında mRNA dizilimi), proteomik (translasyon sonrasında protein oluşumu mekanizması), metabolomik (metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan bileşikler) ile moleküler ağırlık bazında madde analizi yapılırken, 'yolak analizleri' ile de hücresel bileşenlerin regülasyonu araştırılmaktadır [52].



Şekil 2.7. Omik teknolojilerinin sınıflandırılması

Metabolitler, biyokimyasal reaksiyonların ara ürünleridir. Canlı hücre içerisinde farklı kimyasal tepkimeler esnasında ortaya çıkmakta ve başka bileşiklere dönüşebilmektedirler. Metabolitler, farklı yolakların bağlanmalarında rol alırlar.

Metabolomik profil analiz teknolojisini diğer omik teknolojilerinden ayıran en temel özellik, hücresel metabolizmada tespit edilen bileşiklerin miktarlarını anlık olarak belirtmesidir. Bu metabolitlere, genel olarak peptitler, lipitler, organik asitler, aminler, şekerler, nükleozidler, aldehitler, ketonlar, alkaloidler örnek olarak verilebilir ve organizma içerisindeki bu metabolit topluluğuna 'metabolom' denir.

Metabolitlerin saptanması, tanımlanması ve miktar tayini analizlerinin yapılması işlemleri 'metabolomik' olarak tanımlanmaktadır. Metabolitlerin seviyeleri hücresel düzeyde gerçekleşen işlevlerle ilgili bilgileri yansıtmakta, dolayısıyla metabolitler, çevresel veya genetik değişikliklere bağlı olarak hücrenin veya dokunun fenotipini tanımlayabilmektedirler. Metabolomik analizler, hücrede gerçekleşmesi mümkün olan bütün metabolik hikayeyi anlatamazlar [53-55]. Bu sebeple reaksiyon yolunu aydınlatacak tamamlayıcılara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yolak analizlerinde, hücre içindeki biyokimyasal süreçlerin, moleküler düzeydeki hücresel işlevlerindeki değişimlerinin zamana bağlı olarak araştırılması sağlanmaktadır. Böylece, ağ içerisinde gerçekleşen her bir reaksiyonun molar akışına dair bilgi elde edilebilmektedir [52]. Büyüme hızlarıyla (metabolik yollar hakkında bilgi sağlayan), metabolit alım/salgılama oranları kombinasyon halinde yorumlandığında ise, genel metabolizmanın makroskopik görüntüsü hakkında önemli bilgi sağlanmaktadır [50].

Bu amaçla tez kapsamında; kardiyak hücre hatlarından elde edilen metabolitlerin tanımlanması, düzeylerinin saptanması, miktarlarının belirlenmesi için GC-MS kullanılarak, metabolomik ve yolak analizleri çalışmaları yapılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Maddeler ve Ekipman

Tez çalışmasında kullanılan maddeler Çizelge 3.1.'de, ekipman ise Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Madde ve Malzemeler

Madde	Marka
L – carnitine hydrochloride (\geq %98.0)	Sigma Aldrich (ABD)
Lipoid S100 – Soya fosfatidilkolin	LipoidGmbH (Almanya)
Phospholipon 90 G	LipoidGmbH (Almanya)
Kolesterol	Sigma Aldrich (ABD)
Kloroform	Merck (Almanya)
Etanol	Merck (Almanya)
Metanol	Merck (Almanya)
Resomer RG502H, Poly(D,L-lactide-co-glycolid) M _w 7.000-17.000	Sigma Aldrich (ABD)
Sodyum dihidrojenfosfat	Merck (Almanya)
Tween 80	Merck (Almanya)
Piridin	Merck (Almanya)
Pluronic F68	Sigma Aldrich (ABD)
Fosforik asit	Merck (Almanya)
Methoxyamine hydrochloride 98%	Sigma Aldrich (ABD)
Heptan sülfonik asit sodyum tuzu	Merck (Almanya)
N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide	Thermo Scientific (ABD)
Asetonitril	Sigma Aldrich (ABD)
Tetrahidrofur	Merck (Almanya)
Etilasetat	Merck (Almanya)
Diyaliz tüp selüloz Membran	Sigma Aldrich (ABD)
Amonyum format	Sigma Aldrich (ABD)

İnsan Kardiyak Fibroblast	Lonza (İsviçre)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Besi Yeri	Lonza (İsviçre)
BCA (Bikinkoninik asit tahlili) Protein Tayin Kiti	Boster (ABD)

Kullanılan tüm kimyasallar ekstra saf veya kromatografi kalitesindedir.

Çizelge 3.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Ekipmanlar

Ekipman	Marka	Kurum
Rotary evaporatör	Buchi R-114	ETB. ABD.*
Sonikatör	BandelinSonoplus HD 2070	ETB. ABD.*
Manyetik karıştırıcı	Heidolph MR 3003	ETB. ABD.*
Manyetik karıştırıcı	ThermoScientific	ETB. ABD.*
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayini cihazı	Malvern ZetasizerNanoS	ETB. ABD.*
Hassas terazi	Shimadzu Ax200	HÜNİKAL
Hassas terazi	MettlerToledo PB 303-S	ETB. ABD.*
Liyofilizatör	Christ Alpha 1-4 LSC	ETB. ABD.*
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent 1260 InfinityII	HÜNİKAL
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5430 R	ETB. ABD.*
TGA, DSC	TA Instruments, Q600 SDT (Simültane DSC/DTA/TGA)	HÜNİTEK
Taramalı Elektron Mikroskobu	Tescan, GAIA 3	HÜNİTEK
Ultraturaks	Pro200	ETB. ABD.*
Evaporatör	Labconco 7310030	Analitik Kimya ABD.**
Su banyosu	Buchi	ETB. ABD.*

Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi	Shimadzu GC/MS QP2010	Analitik Kimya ABD.**
Çalkalayıcı su banyosu	Memmert	ETB. ABD.*
pH-metre	İnolab WTW	ETB. ABD.*
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex Digital	ETB. ABD.*
Çalkalayıcı İnkübatör	Grant-Bio ES20	Analitik Kimya ABD.**
FT-IR/ATR	Thermo Fisher, Nicolet is50	HÜNİTEK
Ultra Saf Su Cihazı	MP MiniPure	ETB. ABD.*
UV-Mikroplaka Okuyucu	BMG Lab Tech	Biyokimya ABD.***

* H.Ü. Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı

** H.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı

*** H.Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

3.2. Analitik Yöntem Validasyonu

İlaç analiz yöntemleri için, Avrupa Farmakopesi (EP), Birleşik Devletler Farmakopesi (USP), Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), FDA'nın verdiği talimatlar doğrultusunda validasyonlar gerçekleştirilmesi gerekmektedir [56-58]. Bu bağlamda analitin fiziksel ve kimyasal özellikleri incelenerek kullanılacak olan dedektör, hareketli faz, sabit faz ve çalışılacak olan cihaz analiz parametreleri valide edilmektedir. Optimum kromatografik şartlar, hem sistem uygunluk testleri hem de yöntem validasyonu analizleri ile belirlenmektedir.

Tez kapsamında, etkin madde olan L-karnitin'in miktar tayini çalışmaları için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan yöntemin validasyon çalışmaları yapılarak, özgün, kesin, doğru, duyarlı, sağlam ve doğrusal bir yöntem elde etmek amacıyla uygun enjeksiyon hacmi, hareketli faz akış hızı, kolon özellikleri ve kromatografik şartlar belirlenmiştir. Belirlenen parametreler (özgünlük, doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, stabilite) aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 3.3.HPLC Kromatografik Şartlar

Cihaz	HPLC (Agilent 1260 Infinity II)
Kolon	ACE C18 5µm, 4.6x300 mm
Dedeksiyon	UV, 200 nm
Akış Hızı	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	60 µL
Analiz Süresi	7.5 dk
Hareketli Faz	Tampon:MetOH (450:50, h/h). Hareketli faz cihaza takılmadan önce 0.22 µ filtreden süzülür ve 15 dakika boyunca degaze edilir.
Tampon	475 mL saf su üzerine 2.5 mL H ₃ PO ₄ eklenir, üzerine 25 mL 1 N NaOH eklenerek çözeltinin pH'ı 2.4 e NaOH ile ayarlanır. Hazırlanan bu çözelti üzerine 277.5 mg C ₇ H ₁₅ NaO ₃ S eklenerek, karıştırılır.
Kolon Basıncı	~192 bar
Alıkonma Zamanı (RT)	L-karnitin, ~5 dk

3.2.1. Stok ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması

L-karnitin referans çözeltileri, 2 mg/mL konsantrasyonda, balon joje içerisinde ultra saf su ile çözündürülmesiyle, 2 adet olacak şekilde hazırlanmıştır. Referans çözelti (1)'den altı enjeksiyon, referans çözelti (2)'den iki enjeksiyon olacak şekilde uygulama yapılmıştır. Referans çözelti (1) ile referans çözelti (2) arasındaki uyum kontrol edilerek analizlere devam edilmiştir (%98-%102).

L-karnitinin 20 mg/mL stok çözeltisi, balon joje içerisinde ultra saf su ile çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Standart çözeltiler ise 50; 100; 200; 500; 1000; 2000 ve 2500 µg/mL konsantrasyonlar elde edilecek şekilde, stok çözeltinin ultra saf su ile seyreltilmesiyle elde edilmiştir.

3.2.2. Özgünlük

L-karnitinin, ortamda bulunan diğer maddelerden ayırt edilebilme yeteneğini ispatlamak adına analitik yöntemin özgünlük testleri yapılmıştır. Bunun için seyreltme çözeltisi, plasebo çözeltisi, standart çözelti, test çözeltisi, *in-vitro*

salım ortamı olan pH 7.4 PBS (potasyum dihidrojen fosfat tuzu tamponu) hazırlanarak viallere aktarılıp, sırasıyla analiz edilmiş ve elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

3.2.3. Doğrusallık

Geliştirilen analitik yöntem ile derişime karşı ölçülen analitik cevabın doğru orantılı olarak arttığıının ispatı için, L-karnitin konsantrasyonunun korelasyonu incelenmiştir. Bu sebeple 50-2500 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık çalışmaları yapılmıştır, en küçük kareler yöntemi kullanılarak basit doğrusal regresyon istatistikleri analizi uygulanmış ve *t* testi ile regresyon katsayısı ve interseptin anlamlılığı test edilmiştir.

3.2.4. Doğruluk ve Geri Elde

Geliştirilen analitik metodun doğruluğu, metot ile elde edilen ortalama test sonuçlarının analitin gerçek konsantrasyonuna ne derece yakın sonuç verdiği ile ilişkilidir [56]. Elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini test edebilmek amacıyla üç ayrı konsantrasyonda (50, 500 ve 2500 µg/mL) L-karnitin standart çözeltileri üçer defa hazırlanmıştır. Elde edilen ortalama değerlerin gerçek değerlerden sapma oranı, doğruluk parametresinin ölçütüdür. Doğruluk parametresi için validasyon sonuçları geri elde (%) olarak belirtilmiştir.

3.2.5. Kesinlik/Ara Kesinlik

Analitik metodun kesinliği normal koşullar altında tekrarlanabilirliğin bir ölçüsüdür [59]. Yöntemin tekrarlanabilirliği (aynı analizci, aynı yöntem, aynı laboratuvar koşulları, aynı cihaz vb.) gün içi ve günler arası kesinlik çalışması yapılarak ispatlanmıştır. Tekrarlanabilirlik için standart çözeltiden iki adet hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Standart çözelti (1)'den altı, standart çözelti (2)'den ise iki enjeksiyon yapılmıştır. Yöntemin günler arasındaki değişkenliğinin analizi için, aynı prosedür üç ardışık gün boyunca tekrarlanmıştır. Bu üç gün kendi içerisinde, kesinlik ve tekrarlanabilirlik olarak değerlendirilirken, üç günün toplamında elde edilen sonuçlar ara kesinlik olarak değerlendirilmiştir. Kesinlik

ve tekrarlanabilirlik parametreleri, her bir konsantrasyon düzeyi için, ayrı ayrı günler içerisinde elde edilen sonuçların yüzde varyasyon katsayısı (% VK) olarak ifade edilmiştir. Ara kesinlik parametreleri ise, her bir konsantrasyon düzeyi için, üç ardışık gün içerisinde elde edilen bütün sonuçlar %VK olarak ifade edilmiştir. %VK değerlerinin %2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

3.2.6. Tayin Alt Limiti (LOQ) ve Tespit Alt Limiti (LOD)

Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılığının değerlendirilebilmesi için, tayin alt limiti (*limit of quantitation*, LOQ) ve tespit alt limiti (*limit of detection*, LOD) değerleri sinyal/gürültü oranı kullanılarak hesaplanmıştır. LOD çözeltisinden elde edilen pik için sinyal/gürültü oranının 3'ten büyük olmaması gerekmekte, LOQ parametresi için ise, sinyal gürültü oranının 10'dan küçük olmaması gerekmektedir. Bu sebeple, LOQ çözeltisinden bir adet hazırlanmış, vialer aktarıldıktan sonra ardışık altı enjeksiyon yapılmıştır, ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen L-karnitin pik alanları %VK değeri ≤ 10 olması gerekmektedir [60-62]. LOD çözeltisinden bir adet hazırlanmış, vialer aktarıldıktan sonra bir enjeksiyon yapılmıştır.

3.2.7. Stabilite

Etkin maddenin stok çözeltisinden 500 µg/mL konsantrasyonda çözelti hazırlanmış ve 48 saat bekletilerek belirli zaman aralıklarında miktar tayini çalışmaları yapılmıştır. %VK değerlerinin %2'den küçük olması, etkin madde stabilitesinin sürdürülebilirliğini göstermektedir.

3.3. Formülasyonların Hazırlanması

3.3.1. Nanolipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Nanolipozom formülasyonları, 2 farklı lipit (Lipoid S100, Fosfolipon 90G) ve farklı lipit oranları (2 mg/mL, 4 mg/mL, 20 mg/mL) kullanılarak, ince film tabaka

oluşturma yöntemi ile hazırlanmıştır [63]. Hazırlanan nanolipozomların, lipit bileşimi ve oranları aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir.

Çizelge 3.4. Farklı Lipit Konsantrasyonlarında Hazırlanan Nanolipozom Formülasyonları

Formülasyon Kodu	Kullanılan Lipit	Lipit Konsantrasyonu
Lipo-1	Phospholipon 90G	2 mg/mL
Lipo-2		4 mg/mL
Lipo-3		20 mg/mL
Lipo-4	Lipoid S100	2 mg/mL
Lipo-5		4 mg/mL
Lipo-6		20 mg/mL

Farklı miktarlarda lipitler (50, 100, 500 mg), 100 mL'lik balon içerisine alınarak, üzerlerine stabilite artırıcı ajan olarak seçilen kolesterol (0.6 mg/mL) eklenmiştir. Organik çözücü olarak kloroform:Tween 80 (1:1 molar oranda) (25 mL) eklenip çözünmesi sağlandıktan sonra, rotavaporda vakum altında uçurularak ince lipit film tabaka elde edilmiştir [64]. Boş nanolipozomlarla yapılan denemeler sonucunda optimize edilen rotavapor şartları Çizelge 3.5.'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. Optimize Edilen Rotavapor Cihaz Parametreleri

Rotavapor Cihaz şartları	
Vakum:	400 mmHg
Süre:	1 saat
Sıcaklık:	40°C
Dönme Hızı:	100 rpm

Ardından, etkin madde ultra saf su içinde çözüldürülerek (2 mg/mL), sulu faz oluşan lipit film üzerine eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda (200 rpm, 30 dk) karıştırılmıştır. Son olarak, sonikatör yardımıyla rehidrate edilerek (%50 power, 2 cycle, 35 dk) nanolipozomlar hazırlanmıştır.

3.3.2. Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için PLGA polimerinin farklı oranları (0.25, 0.50, 0.75 mg/mL) kullanılmıştır. Ayrıca, karakterizasyon ve enkapsülasyon parametrelerinin etkilenebileceği göz önüne alınarak, nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için 2 ayrı yöntem (nanoçöktürme ve çift emülsiyon oluşturma yöntemleri) kullanılmıştır.

3.3.2.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanoçöktürme yöntemiyle nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için PLGA polimeri ve farklı oranları (0.25, 0.50, 0.75 mg/mL) kullanılmıştır. Aşağıdaki çizelgede kullanılan miktarlar belirtilmiştir. Tartılan PLGA, THF içerisinde (5 mL) çözündürüldükten sonra, manyetik karıştırıcı ile karıştırılan 20 mL ultra saf suya (etkin madde içeren ve içermeyen) damlatılarak eklenmiş (100 rpm) ve 15 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra teflon yüzeye aktararak, THF hava akımı altında uçurulmuş ve nanopartiküller elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. Nanoçöktürme Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları

Formülasyon Kodu	Kullanılan Polimer	Miktar (mg)	Hacim (mL) (THF)	Hacim (mL) (sulu faz)
NP-1	PLGA	5	5	20
NP-2	PLGA	10	5	20
NP-3	PLGA	15	5	20

3.3.2.2. Çift Emülsiyon Oluşturma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküller, modifiye çift emülsiyon oluşturma (su/yağ/su emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma) yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır [65]. Öncelikle primer emülsiyon hazırlanmıştır. Bu amaçla, etilasetat (EtAc) içerisindeki polimer çözeltilerine (5 mg/mL, 10 mg/mL, 15 mg/mL), ultra saf su içerisindeki L-karnitin stok çözeltisinden 200µL damla damla eklenerek, ultraturaksla 10.000 rpm'de 1.5 dakika karıştırılması ile primer emülsiyon elde

edilmiştir. Hazırlanan primer emülsiyon, enjektör yardımı ile % 2'lik (a/h) Pluronic F68 sulu çözeltisine (5 mL) damla damla eklenerek, Şekil 3.1.'de gösterilen ultraturaks ile 20.000 rpm'de 2 dakika boyunca karıştırılmış ve sekonder emülsiyon elde edilmiştir. Son olarak hazırlanan sekonder emülsiyon, % 0.5'lik (a/h) Pluronic F68 çözeltisi (15 mL) üzerine enjektör yardımı ile eklenerek (100 rpm, 30 dk) nanopartiküller elde edilmiştir. Elde edilen nanopartiküller, EtAc'in uzaklaştırılması amacıyla +4°C'de, 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (100 rpm) karıştırılmıştır (Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.7.Çift Emülsiyon Yöntemi ile Hazırlanan Nanopartikül Formülasyonları

Formülasyon Kodu	Kullanılan Polimer	Miktar (mg)	Hacim (mL) (EtAc)	Hacim (mL) (sulu faz)
NP-1	PLGA	5	1	20
NP-2	PLGA	10	1	20
NP-3	PLGA	15	1	20



Şekil 3.1. Emülsiyon oluşturma esnasında kullanılan ultraturaks.

3.3.3. Nanolipozom/Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan nanolipozom/nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonları; PB, PDI ve ZP parametreleri ile değerlendirilmiştir. İdeal özelliklere sahip (yüksek enkapsülasyon etkinliği) nanolipozom/nanopartikül formülasyonları, SEM görüntüleri alınarak morfolojik açıdan değerlendirilmiş, ATR üniteli Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy/Attenuated Total Reflectance*, FTIR/ATR) analizleriyle molekül

bağ yapıları, Termalgravimetrik/Diferansiyel Tarama Kalorimetresi Analizleri (*Thermalgravimetric/Differential Scanning Calorimetry Analyses*, TGA/DSC) termogramlarıyla da termodinamik özellikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır. *In-vitro* salım çalışmalarının ardından, GC-MS yöntemiyle metabolomik ve yolak analizleri yapılarak sentezlenen nanolipozom/nanopartikül formülasyonlarının hücre kültürü numunelerinin karşılaştırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1. PB / ZP / PDI Analizi

PB, ZP, PDI değerleri formülasyon geliştirme aşamasında göz önünde bulundurulması gereken en önemli fizikokimyasal parametrelerdendir. Bu özellikler, lipidik ve polimerik nanotaşıyıcı sistemlerin, nihai ürüne dönüşme aşamasında, ürünün etkinlik/güvenilirlik/kalite ve stabilite özelliklerini direkt etkilemesi açısından mutlaka değerlendirilmelidir [66].

PB ve dağılımı analizlerindeki temel prensip, süspansiyon içerisindeki nanopartiküllerin Brownian hareketlerinin dinamik ışık saçılımıyla ölçümüne dayanmaktadır. ZP ise, sulu ortamda bulunan partiküllerin yüzeylerinde bulunan iyonların meydana getirdiği yüzey yüküdür. Partikülü çevreleyen bu yükün dağılımı değişiklik göstermekte ve partikül bu iyon bulutuyla birlikte hareketlerine devam etmektedir. Nanopartiküllerin ve nanolipozomların ZP'lerinin ölçümü, süspansiyona uygulanan elektriksel alan ile partiküllerin üzerindeki yüklere bağlı olarak gelişen hareketlerinin hızlarını ölçme ilkesine dayanmaktadır. Bu değer pozitif veya negatif yönde artmasıyla partiküller birbirini itmekte bu sayede sistem kararlılığını korumaktadır [67]. PDI ise, nanopartiküllerin büyüklüklerinin dağılımı açısından kalitelerini belirlemeye yarayan bir parametre olup, lipidik ve polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül boyut dağılımlarının homojenliği hakkında fikir verir ve 0.5'ten küçük olması beklenir.

Etkin madde yüklü nanolipozomların ve nanopartiküllerin, PB ve dağılımı ile ZP analizleri, lazer ışık saçılımı yöntemi ile DTS1060C kodlu özel zeta hücre

küvetleri kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, bölümümüzde bulunan Malvern marka Zeta-SizerNanoS cihazı kullanılmış, ölçümler 25°C'de, geri saçılan elektronların dedektöre geliş açısı 173° olacak şekilde ayarlanarak 3 ardışık tekrar ile yapılmıştır.

3.3.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Etkin madde ve nanolipozom formülasyonları arasındaki moleküler bağlanmaları değerlendirmek için; L-karnitin HCl, kullanılan lipit (Lipoid S100), L-karnitin HCl + Lipoid S100 fiziksel karışımı, boş nanolipozomlar ve L-karnitin yüklü nanolipozomlar ile FT-IR/ATR analizleri yapılmıştır.

Benzer şekilde, etkin madde ve PLGA nanopartikül formülasyonları arasındaki moleküler bağlanmaları değerlendirmek için; L-karnitin HCl, PLGA polimer, L-karnitin HCl +PLGA polimer fiziksel karışımı, boş PLGA nanopartiküller ve L-karnitin yüklü PLGA nanopartiküller ile FTIR/ATR analizleri yapılmıştır.

FTIR modülleri genel olarak, Transmisyon, ATR ve Speküler yansıtma olmak üzere 3 aksesuarlı olmaktadır. Genel olarak polimerlerde, yumuşak tozlarda, jellerde, ATR üniteli FTIR tekniği öne çıkmaktadır. Tez çalışmalarında da, daha çok yüzey özelliklerinin analizinde kullanılan FTIR/ATR tekniği kullanılmıştır. ATR genel olarak ~ 1-2 µm derinliğe kadar nüfuz edebilme özelliğine sahiptir.

Nanolipozom ve nanopartiküller 0.370 mbar vakum ortamında, -55°C'de 72 saat boyunca çözelti fazı uçurularak liyofilize edildikten sonra numuneler ölçüme alınmıştır. Spektrumlar 4000-550 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükte ve her bir örnek için 10 tarama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.3. Termalgravimetrik Analiz

Hazırlanan formülasyonların termal ve polimorfik özelliklerinin incelenmesi için TGA yapılmıştır. Nanolipozom ve nanopartikül formülasyonlarının yüksek oranda

su içermesi TGA analizi için uygun olmadığından boş ve etkin madde yüklenmiş formülasyonlar analiz öncesinde bölüm 3.2.3.3.'te anlatıldığı gibi liyofilize edilmiştir. Etkin madde-lipit, etkin madde-polimer etkileşimini (fiziksel karışımlar) ve etkin maddenin nanolipozomal ve PLGA nanopartiküler matris içerisindeki polimorfizmini daha net şekilde inceleyebilmek ve daha kesin sonuçlar alabilmek adına TGA analizlerinden elde edilen verilerin birinci türevleri alınarak Derivatif Termalgravimetri (DTG) termogramları çizilmiştir.

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

3.3.3.4. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Nanopartiküllerin ve nanolipozomların morfolojilerinin ve dağılımlarının araştırılması için Taramalı Elektron Mikroskopisi (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) çalışmaları, yüksek vakum ortamında hızlandırma gerilimi 1-5 kV olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. L-karnitin yüklü nanolipozomlar, L-karnitin yüklü PLGA nanopartiküller ve boş nanotaşıyıcılar alüminyum plakalara damlatılmıştır, daha sonra kurumaları için 3 saat oda sıcaklığında bekletilip, altın-paladyum alaşımı ile ~2 nm kalınlıkta püskürtme yöntemiyle kaplanarak analiz yapılmıştır.

3.3.3.5. Enkapsülasyon Etkinliği

İlaç enkapsülasyon etkinliğini belirlemek amacıyla, santrifüj/ultrasantrifüj yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla, nanolipozomlar 1 mL'lik ependorf tüplere alınarak 20000 g dönme hızında +4°C'de 1 saat santrifüj edilmiş, süpernatant faz ayrıştırılarak, etkin madde miktar tayini için HPLC cihazında analize alınmıştır. PLGA nanopartiküller ise, öncelikle +4°C'de 5 dakika boyunca 5000 rpm'de ardından +4°C'de 45 dakika boyunca 50000 g'de santrifüjlenerek

çöktürülmüş, yine aynı şekilde süpernatant fazı ayrıştırılarak HPLC cihazında etkin madde miktar tayini için analiz edilmiştir.

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

Enkapsülasyon Etkinliği (EE%)

$$= \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Yüklenmemiş etkin madde miktarı}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}} \times 100$$

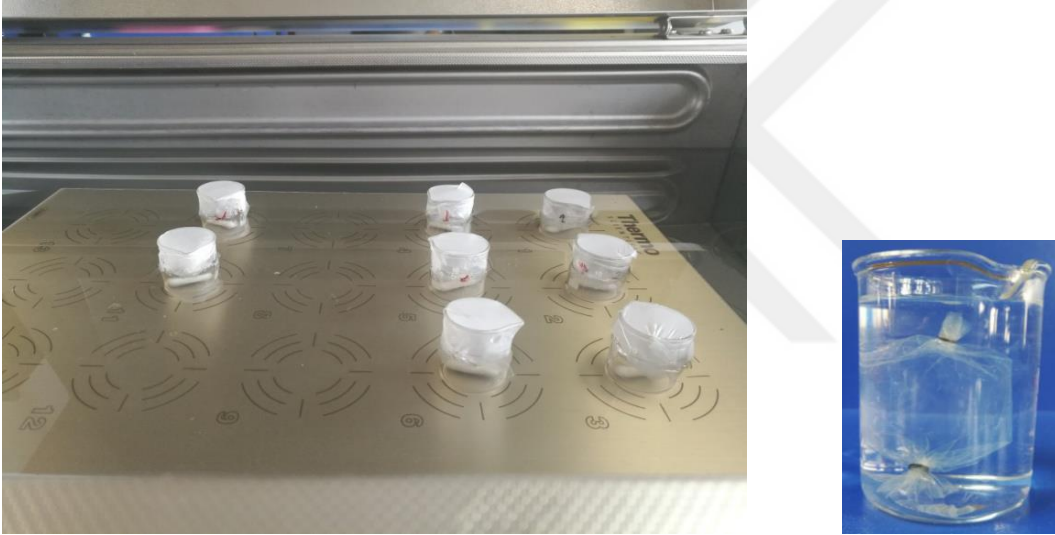
3.3.3.6. *In-vitro* Salım Çalışmaları ve Kinetik Değerlendirmeler

Hazırlanan formülasyonların kalite kontrol çalışmaları kapsamında, etkin maddenin salım hızının ve mekanizmasının belirlenmesi büyük önem taşımakta ve formülasyonun etkinliği hakkında fikir vermektedir. Salım hızı, formülasyondan birim zamanda çözünme ortamına geçen etkin madde miktarı olarak tanımlanmakta ve *in-vitro* salım testleri ile belirlenmektedir. Dissolüsyon ortamının hacmi *in-vitro* salım testlerinde dikkat edilmesi gereken en önemli parametre olup, salım sonuçlarını direkt etkileyebilmektedir. Çalışmalarda mutlaka sink koşulu (çözünme ortamında etkin maddenin doyumluk konsantrasyonunun %10-15'i kadar madde bulunması) sağlanmalıdır.

Bu amaçla tez çalışmamızda, nanolipozom ve nanopartikül formülasyonlarının *in-vitro* salım çalışmaları diyaliz membran yöntemi ile tayin edilmiştir. Diyaliz yönteminin temel prensibi, dozaj formundaki ilacın bir kompartmandan diğer kompartmana difüze olarak geçmesidir. Diyaliz yöntemini etkileyen en önemli parametreler arasında karıştırma hızı, hücre hacmi, membranın molekül ağırlığı gelmektedir.

Tez çalışmamızda, L-karnitin yüklü nanolipozom ve nanopartikül formülasyonu ile, aynı miktarda ilaç içeren çözelti (kontrol – 2mg/mL ultra saf su içinde)

selüloz asetat diyaliz membranlara (Sigma-Aldrich, 33 mm, MW cut-off 14.000, ABD) konulmuş (2 mL) ve reseptör faz olarak 6 mL PBS (pH:7.4) kullanılmıştır. Beherler parafilm ile kapatılarak 37°C'deki manyetik karıştırıcılı su banyosunda 100 rpm'de karıştırılmış ve belirli zaman noktalarında (0, 1, 2, 4, 6, 8 ve 12.saat) reseptör fazdan 0.5 mL örnek alınmıştır. Örnekler viallere konulmuş ve etkin madde konsantrasyonları HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Sink koşulunun devamlılığını sağlamak için, her numune alma işleminden sonra, ortamdaki miktar kadar salım ortamı (0.5 mL) beherlere eklenmiştir. Bu koşullar altında *in-vitro* L-karnitin salım deneyleri yapılmıştır. Salım deneylerine ait düzenek Şekil 3.2.'de fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.2. Diyaliz membran yöntemi ile *in-vitro* salım çalışması

Özellikle kontrollü salım yapan sistemlerde formülasyondan etkin madde salımı; etkin maddenin ilaç taşıyıcı sistem içindeki difüzyonu, taşıyıcının degradasyonu veya erozyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Salımı etkileyen parametreler ise; formülasyonun tipi, hazırlama yöntemi, partikül şekli ve büyüklüğü, etkin maddenin özellikleri, kullanılan polimer ve yardımcı maddelerin özellikleri olup, salım mekanizması kinetik modeller ile belirlenmektedir.

Bu amaçla tez kapsamında, kinetik çalışmalardan elde edilen salım sonuçlarına dört farklı kinetik model (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson-Crowell) uygulanmış ve formülasyonların salım mekanizmaları değerlendirilmiştir.

3.3.3.7. Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan L-karnitin yüklü nanolipozom ve L-karnitin yüklü nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonlarında tayin edilen parametrelerdeki değişimler göz önüne alınarak, +4°C ve 25°C sıcaklıkta 3 ay süre (1. ay, 2. ay ve 3. ay) ile bekletilen nanolipozomların ve nanopartiküllerin stabiliteleri incelenmiştir.

3.3.3.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında, yağ asidi oksidasyonu ve bu metabolizmaya bağlı olarak gerçekleşen yolaklar üzerindeki metabolit miktarlarının daha yüksek miktarda bulunabileceği hücre seçimi yapılmıştır. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondrilere taşınmasının, yağ asidi oksidasyonunda hız sınırlayıcı adım olduğu göz önüne alınacak olursa, taşıyıcı varlığının arttığı bir ortamda, mitokondri sayısının da çok olması durumunda daha çok yağ asidi metabolize olabilecektir [68]. Mitokondri sayısı arttıkça hücre tarafından hem daha çok enerjiye ihtiyaç duyulacak, hem de daha çok yağ asidi mitokondri içerisinde oksidasyona uğrayabilecektir. Bu sebeple tez kapsamında, mitokondri sayısı fazla olan ve fazla miktarda enerjiye ihtiyaç duyan kardiyak fibroblast hücre hatları kullanılmıştır.

%5 CO₂ atmosferinde, 37°C'de, nemlendirilmiş inkübatör içerisinde, %10 fetal sıgır serumu, 100U/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin ile desteklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ortamında 25 cm'lik hücre kültürü flasklarında tam doluluğa ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda, her bir grup 3'er adet olacak şekilde; kontrol, aynı miktarda ilaç içeren L-karnitin çözeltisi (ultra saf su içerisinde), NP-1 kodlu nanopartikül ve Lipo-6 kodlu

nanolipozom formülasyonları ile 6 gün boyunca hücre kültürü ortamlarına maruz bırakılmıştır. Uyarım süresinin sonunda besi yeri uzaklaştırılarak hücreler %0.9 NaCl izotonik çözeltisiyle yıkanarak 1 mL metanol:su (9:1, h/h) çözeltisinden eklenmiş ve sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Kazınan hücrelerden protein miktar tayini, BCA Protein Tayin Kiti kullanılarak üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Standartlar ve numunelerin protein miktarları UV-mikroplaka okuyucu ile ölçülerek µg/mL cinsinden hesaplanmıştır.

3.3.3.9. Metabolomik/Yolak Analizi Çalışmaları: Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi

Metabolitler, canlı hücre içindeki biyokimyasal reaksiyonlar esnasında ortaya çıkan ara ürünler olup, başka bileşiklere dönüşen ve vücutta birikmeyen kimyasal bileşiklerdir. Hücre içerisinde gerçekleşen metabolik yolların bağlanmasında önemli rol oynarlar. Molekül ağırlıkları 1.500Da'un altında olan bu moleküller; nükleozidlerin, amino asitlerin, organik asitlerin, oligonükleotidler, aldehitlerin, aminlerin, şekerlerin, ketonların, peptidlerin, lipidlerin ve ilaçların ürünleri şeklinde özetlenebilirler [53, 69].

Bu amaçla tez çalışmamızda, metabolitlerin işlevselliği, çeşitli yollarla alt-ürünlere metabolize olan substratların yolak analizleri ile incelenmiştir [70]. Metabolitlerin tanımlanması, düzeylerinin saptanması ve miktarının belirlenmesi için GC-MS analizleri yapılmıştır.

GC-MS analizleri için, hücreler 25 cm'lik flasklardan kazınarak 1 mL metanol:su (9:1, h/h) çözeltisiyle yıkanarak saklama tüplerine alınmıştır. Tüp üzerine 500 µL daha bu çözeltiden eklenerek 20000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu tüpler 24 saat boyunca +4°C'de evapore edilerek, kalan çökeltiler türevlendirme işlemi için hazır hale getirilmiştir. 10 mg metoksamın hidrokloridin üzerine 0.5 mL piridin eklenerek hazırlanan çözeltiden 20 µL her bir tüpe ekleme yapılmıştır.

Sonraki aşamada, tüpler, 30°C'de 90 dakika boyunca etüvde yatay konumda çalkalanmıştır. Bu işlemin ardından sililasyon reaksiyonu için her bir tüpe 80 µL MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide) eklenerek 37°C'de 30 dakika boyunca etüvde yatay konumda çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda analiz için, çözeltilerden GS-MS viallerine transfer edilmiştir.

Çizelge 3.8.GC-MS Analizi için Uygulanan Kromatografik Şartlar

Cihaz	Shimadzu GC-MS-QP2010 (Ultra split/splitless injector)
Kolon	Agilent 122-5532G DB5-MS (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm, 95% dimetil / 5% dimetil polisioksan)
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Akış Hızı	1.0 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	1 µL (1:10 bölmeli)
MSD geçiş sıcaklığı	290 °C
Çözücü gecikme süresi	5.90 dk
Kütle Aralığı	50-650 dalton
Analiz Süresi	37.5 dk

Tez kapsamında geliştirilen kantitatif metabolomik ve yolak analizleri verilerinin değerlendirilme stratejileri, temel olarak üç prosedür içermektedir. Hücre kültüründen alınan örneklerin uçurulması, türevlendirilmesi ve GC/MS cihazına verilmesi ilk aşamadır. Daha sonra, metabolitlerin analizi için; elde edilen kromatogramlardaki metabolit piklerinin, belirlenen kantitatif program yardımıyla integre edilmesi ve son olarak elde edilen verilerin grafiklere ve çizelgelere dönüştürülmesiyle değerlendirilmesi yapılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması üç temel başlıkta özetlenmiştir. Bu kapsamda;ⁱ⁾L-karnitin miktar tayini çalışmaları için kullanılan yöntem validasyonu ve nanolipozom/nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılan yöntem optimizasyonu ⁱⁱ⁾ sentezlenen nanolipozom ve nanopartiküllerin, enkapsülasyon etkinliklerinin, morfolojik, kimyasal özelliklerinin ve salım profillerinin incelenmesi ve ⁱⁱⁱ⁾kardiyak fibroblast hücre hatlarında yapılan uygulamalar sonucunda GC/MS cihazı ile metabolik faaliyetlerin (metabolitlerin teşhis-tayini ve hücresel yollar üzerindeki metabolitlerin değişiminin saptanması) değerlendirilmesi çalışmaları yürütülmüştür.

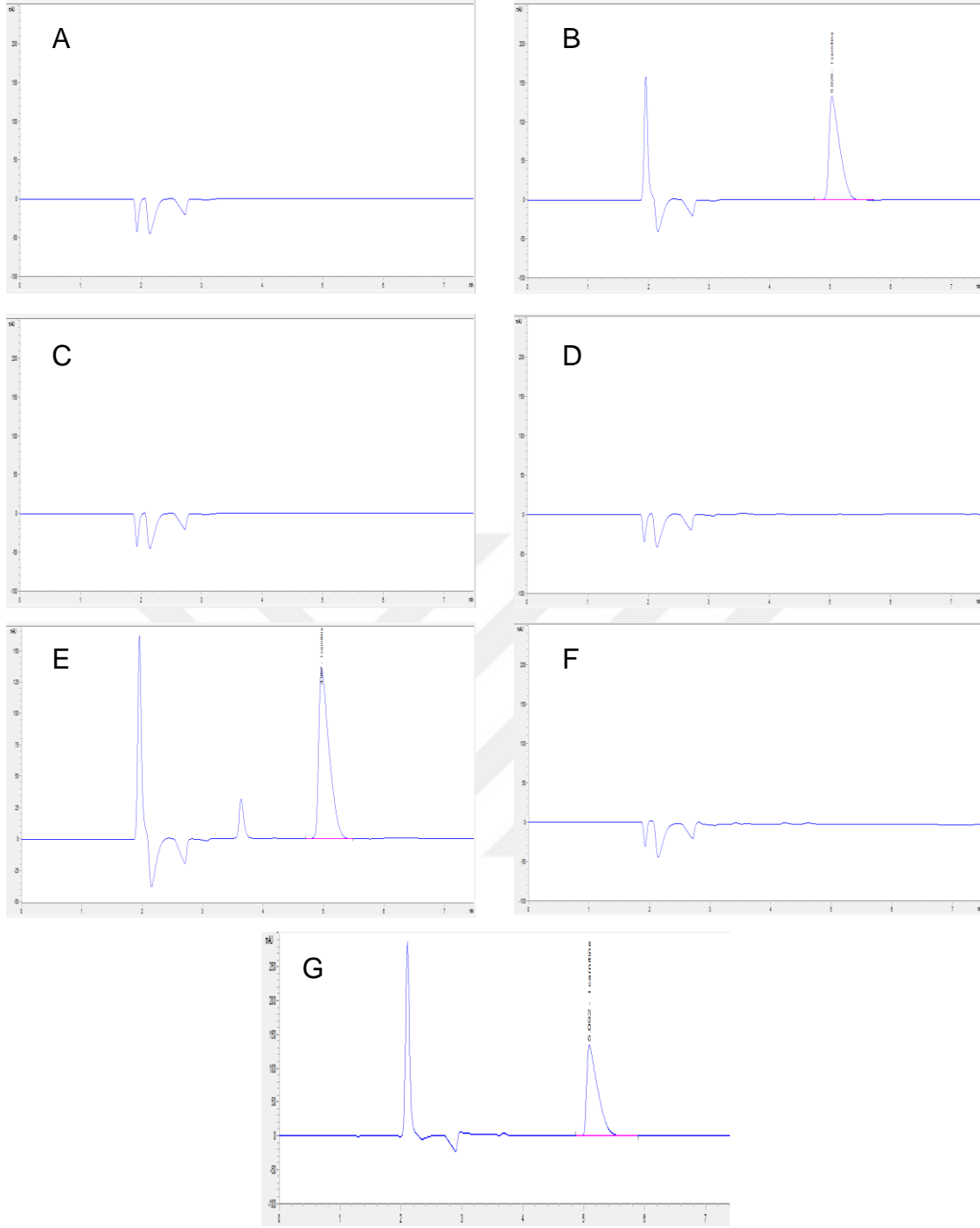
4.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Nanolipozomlara ve nanopartiküllere yüklenen L-karnitin'in enkapsülasyon etkinliği ve *in-vitro* ilaç salımı analizleri için kullanılan analitik yöntemin validasyonuna ait sonuçlar aşağıdaki bölümlerde sunulmuştur.

4.1.1. Özgünlük

L-karnitin ile matris arasında herhangi bir girişim bulunmadığını göstermek için seyreltme, plasebo, referans, test, *in-vitro* salım ortamı olan pH 7.4 PBS çözeltilerine ait kromatogramlar görsel olarak karşılaştırılmıştır.

Kromatogramlarda L-karnitin pikiyle girişim yapan bir pik gözlenmemiş ve yöntemin L-karnitin analizi için belirlenen kromatografik şartlarda özgün olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.1).

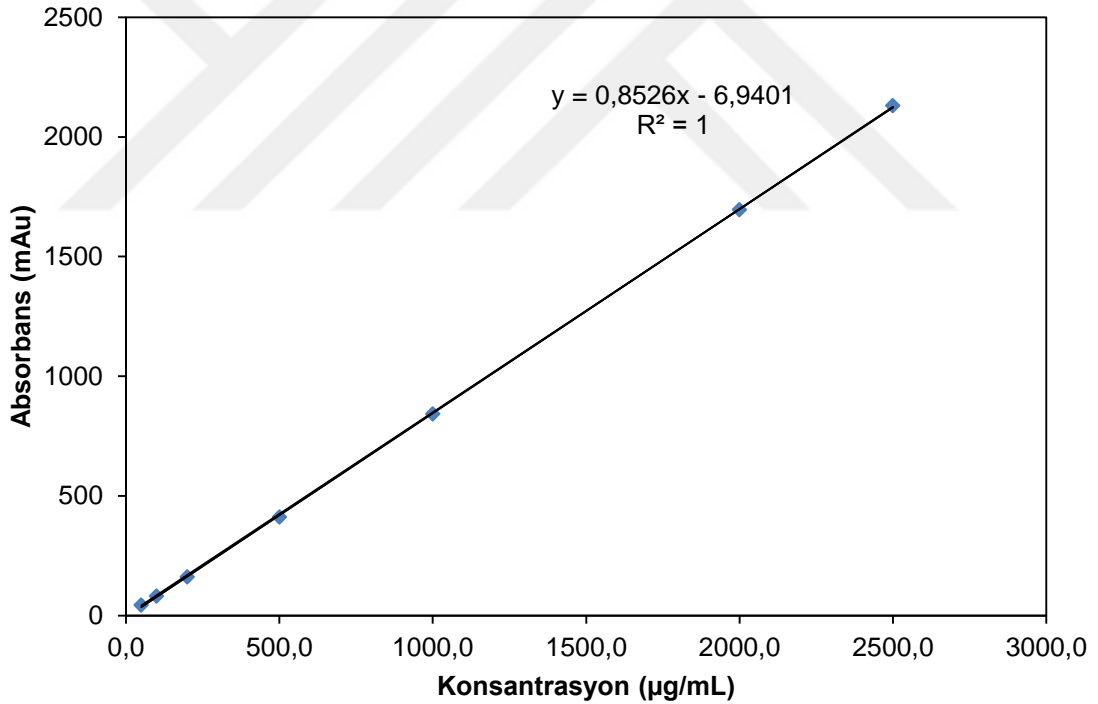


Şekil 4.1.A) Seyreltme çözeltisi, B) Referans çözeltisi, C) PBS çözeltisi, D) Boş PLGA nanopartikülleri, E) L-karnitin yüklü PLGA nanopartikülleri (NP-1 formülasyonu), F) Boş nanolipozom, G) L-karnitin yüklü nanolipozom (Lipo-6 formülasyonu) örnek kromatogramları

4.1.2. Doğrusallık ve Aralık

Basit doğrusal regresyon analiziyle analitik yöntemin doğrusallığı değerlendirilmiştir. 50-2500 µg/mL konsantrasyon aralığında L-karnitin için yöntemin doğrusal olduğu belirlenmiştir.

Regresyon doğrusunun denklemi grafik üzerinde belirtilmiş, regresyon katsayısı $R^2=1$; kesişim -6.940 ve eğim 0.852 bulunmuştur (Şekil 4.2.). Yapılan *t*-testiyle kesişimin sıfırdan farklı $p_{kesişim}=0.097$, dolayısıyla anlamsız ($p > 0.05$), eğimin sıfırdan farklı $p_{eğim}=5.53 \times 10^{-12}$, dolayısıyla anlamlı ($p < 0.05$) olduğu bulgusu elde edilmiştir. Regresyon analizi sonucunda kalibrasyon eşitliği elde edilmiş ve L-karnitin enkapsülasyon hesaplamaları bu eşitliğe göre yapılmıştır.



Şekil 4.2. L-karnitin HPLC yöntemine ait regresyon doğrusu (Y eksenini pik altında kalan eğri altındaki alan ve X eksenini L-karnitin konsantrasyonunu göstermektedir)

4.1.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluk parametresi, her bir konsantrasyon için yüzde geri kazanım olarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1.L-karnitin Analitik Yöntemine İlişkin Geri Kazanım Sonuçları ($n = 3$)

Doğruluk Çözeltisi	Tartılan L-karnitin Miktarı (mg)	Hesaplanan L-karnitin miktarı (mg)	Geri Kazanım (%)	Bağıl Hata (%)	Ortalama Geri Kazanım (%)	SS	VK (%)
Doğruluk Çözeltisi (a) -1	11.0	10.9	98.9	0.01			
Doğruluk Çözeltisi (a) -2	11.0	10.9	98.9	0.01	98.8	0.13	0.13
Doğruluk Çözeltisi (a) -3	11.0	10.9	98.7	0.01			
Doğruluk Çözeltisi (b) -1	100.0	100.6	100.6	-0.01			
Doğruluk Çözeltisi (b) -2	100.0	101.0	101.0	-0.01	100.6	0.39	0.39
Doğruluk Çözeltisi (b) -3	101.0	101.3	100.2	0.00			
Doğruluk Çözeltisi (c) -1	258.0	259.3	100.5	0.00			
Doğruluk Çözeltisi (c) -2	255.0	257.0	100.8	-0.01	100.8	0.38	0.37
Doğruluk Çözeltisi (c) -3	253.0	256.1	101.2	-0.01			

Yapılan doğruluk analizleri sonucunda her bir konsantrasyon düzeyi için elde edilen yüzde geri kazanım sonuçlarının %98.0-102.0 aralığında bulunmuş olup, %VK değerleri %0.1 ve 0.4 arasındadır, elde edilen sonuçlar doğrultusunda analitik yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

4.1.4. Kesinlik

Kesinlik parametresi tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik olarak değerlendirilmiştir.

Tekrarlanabilirlik; her bir konsantrasyon için, gün içerisinde elde edilen sonuçların %VK değerleri 2.0'den büyük değildir.

Ara Kesinlik; tekrarlanabilirlik testinin yapıldığı gün ve iki farklı gün boyunca tüm kesinlik çözeltilerinden üçer adet hazırlanan çözeltilerin ara kesinlik sonuçlarının %VK değerleri 2.0'den büyük değildir.

Yapılan kesinlik çalışmalarına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.2.-4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. L-karnitin için Birinci Gün Elde Edilen Kesinlik Sonuçları

Kesinlik Çözeltisi	Konsantrasyon (µg/mL)	Enjeksiyon Alanı	Ortalama Alan	SS	VK(%)
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -1	55.00	44.9			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -2	55.00	44.9	44.9	0.06	0.13
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -3	55.00	44.8			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -1	500.00	415.5			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -2	500.00	417.1	416.9	1.27	0.30
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -3	505.00	418.0			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -1	2580.00	2140.8			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -2	2550.00	2122.3	2126.0	13.34	0.63
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -3	2530.00	2114.9			

Çizelge 4.3. L-karnitin için İkinci Gün Elde Edilen Kesinlik Sonuçları

Kesinlik Çözeltisi	Konsantrasyon (µg/mL)	Enjeksiyon Alanı	Ortalama Alan	SS	VK(%)
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -1	55.00	45.0			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -2	55.00	44.9	44.9	0.06	0.13
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -3	55.00	44.9			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -1	500.00	419.9			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -2	510.00	421.2	421.0	0.97	0.23
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -3	505.00	421.8			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -1	2630.00	2204.8			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -2	2620.00	2203.0	2206.3	4.20	0.19
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -3	2640.00	2211.0			

Çizelge 4.4. L-karnitin için Üçüncü Gün Elde Edilen Kesinlik Sonuçları

Kesinlik Çözeltisi	Konsantrasyon (µg/mL)	Enjeksiyon Alanı	Ortalama Alan	SS	VK(%)
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -1	55.0	45.4			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -2	55.0	45.2	45.1	0.36	0.80
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (a) -3	55.0	44.7			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -1	505.0	421.7			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -2	510.0	422.3	422.2	0.50	0.12
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (b) -3	510.0	422.7			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -1	2650.0	2211.7			
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -2	2640.0	2205.4	2213.3	8.81	0.40
Kesinlik 1. gün Çözeltisi (c) -3	2650.0	2222.8			

Çizelge 4.5. L-karnitin için Üç Gün Boyunca Elde Edilen Kesinlik Sonuçları

Kesinlik Çözeltileri	Birinci güne ait ortalama sonuçlar (%)	İkinci güne ait ortalama sonuçlar (%)	Üçüncü güne ait ortalama sonuçlar (%)	Günler arası ortalama sonuçlar (%)	Günler arası SS	Günler arası VK (%)
Kesinlik Çözeltisi (a)	98.8	98.9	99.6	99.1	0.44	0.44
Kesinlik Çözeltisi (b)	100.6	101.0	100.9	100.8	0.17	0.17
Kesinlik Çözeltisi (c)	100.8	101.6	101.6	101.3	0.43	0.43

Her bir konsantrasyon düzeyi için elde edilen sonuçların %VK %2.0'den küçüktür. Elde edilen hesaplamalar doğrultusunda analitik yöntemin tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri sonuçları uygun bulunmuştur.

4.1.5. Sağlamlık

Sağlamlık parametresi için 2000 µg/mL L-karnitin çözeltisi kullanılmıştır. Kromatografik şartlarda Çizelge 4.6.'da belirtilen değişiklikler yapılarak yöntemin sağlamlığı test edilmiştir.

Çizelge 4.6. Yöntemin Sağlamlığını Test Etmek için Değiştirilen Parametreler

Parametreler	Değişiklikler
Akış hızı	±0.1 mL/dk
Dalga boyu	±5 nm
Hareketli fazdaki organik faz oranı	±2%
Tampon derişimi	±0.5 mM

Yapılan sağlamlık çalışmasına ait sonuçlar Çizelgeler 4.7.- 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Standart Yönteme ait Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar

Standart Yöntem		
Enjeksiyon	Pik Alanı	Alıkonma Zamanı (dk)
1	1616.9	5.025
2	1618.7	5.024
3	1618.6	5.026
4	1619.4	5.028
5	1618.5	5.029
6	1617.7	5.032
Ortalama	1618.3	5.03
SS	0.87	0.00
% VK	0.22	0.06

Yöntemde değişiklik yapılmadan analiz edilen referans çözeltinin ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen L-karnitin pikinin alanlarının %VK 0.22, alıkonma zamanlarının %VK 0.06 olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.7.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8. Akış Hızı Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar

Enjeksiyon No	1,1 mL/dk Akış Hızı		0,9 mL/dk Akış Hızı	
	Alan	RT (dk)	Alan	RT (dk)
1	1457.2	4.559	1793.9	5.602
2	1456.3	4.554	1793.0	5.610
3	1455.8	4.556	1796.6	5.610
4	1456.3	4.554	1793.4	5.610
5	1456.1	4.554	1793.2	5.608
6	1456.9	4.555	1793.3	5.608
Ortalama	1456.4	4.56	1793.9	5.61
SS	0.52	0.00	1.36	0.00
% VK	0.04	0.04	0.08	0.06

Çizelge 4.9. Dalgaboyu Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar

Enjeksiyon No	195 nm		205 nm	
	Alan	RT (dk)	Alan	RT (dk)
1	1632.5	5.033	1625.5	5.035
2	1632.5	5.034	1625.5	5.034
3	1633.2	5.034	1625.7	5.032
4	1632.6	5.033	1625.9	5.032
5	1630.6	5.035	1625.7	5.034
6	1631.7	5.035	1625.9	5.029
Ortalama	1632.2	5.03	1625.7	5.03
SS	0.91	0.00	0.18	0.00
% VK	0.06	0.02	0.01	0.04

Çizelge 4.10. Hareketli Faz'a ait Organik Çözücü Oranı Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar

Enjeksiyon No	Hareketli Faz (- 2%)		Hareketli Faz (+ 2%)	
	Alan	RT (dk)	Alan	RT (dk)
1	1612.9	5.07	1605.3	4.163
2	1611.8	5.182	1610.4	4.033
3	1612.5	5.156	1605.8	4.159
4	1613.1	5.095	1607.1	4.106
5	1610.9	5.102	1609.2	4.112
6	1610.1	5.111	1605.9	4.123
Ortalama	1611.9	5.12	1607.3	4.12
SS	1.19	0.04	2.07	0.05
% VK	0.07	0.81	0.13	1.15

Çizelge 4.11. Hareketli Faz Tampon Çözelti Derişimi Azaltılarak/Arttırılarak Elde Edilen L-karnitin Pikine ait Sonuçlar

Enjeksiyon No	2,5 mM tampon		3 mM tampon	
	Alan	RT (dk)	Alan	RT (dk)
1	1648.2	5.329	1656.2	6.431
2	1645.2	5.350	1656.8	6.433
3	1643.5	5.352	1657.0	6.434
4	1642.6	5.357	1657.7	6.438
5	1640.9	5.357	1655.1	6.436
6	1640.0	5.36	1657.1	6.437
Ortalama	1643.4	5.35	1656.7	6.43
SS	2.99	0.01	0.90	0.00
% VK	0.18	0.21	0.05	0.04

Tüm bu veriler doğrultusunda, standart çözeltilerin ardışık 6 enjeksiyonuna ve kromatografik şartlarda değişiklik yapılarak elde edilen ardışık 6 enjeksiyona ait L-karnitin pikinin alanlarının, standart sapması (SS) ve %VK değerleri Çizelge 4.12.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.12. Standart Çözeltideki ve Kromatografik Şartlarda Değişiklik Yapılarak Elde Edilen L-karnitin Pik Alanlarına ait Sapma Sonuçları

Sağlamlık Parametreleri	Yapılan Değişiklikler	SS	VK(%)
Hareketli Faz Oranı	Organik çözelti azaltılarak(-2%)	3.50	0.22
	Organik çözelti arttırılarak(+2%)	5.95	0.37
Akış Hızı	1.1 mL/dk	84.53	5.50
	0.9 mL/dk	91.71	5.38
Dedeksiyon	195 nm	7.30	0.45
	205 nm	3.91	0.24
Tampon Derişimi	2.5 mM	13.28	0.81
	3 mM	20.05	1.22

Bu bilgiler ışığında akış hızının yöntem üzerinde önemli ve dikkat edilmesi gereken bir parametre olduğu sonucuna varılmış olup, çalışmalarımızda akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır.

4.1.6. LOQ ve LOD

L-karnitin için LOQ=5 µg/mL ve LOD=1.5 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu derişimlerde hazırlanan çözeltilerden elde edilen kromatogramlar üzerinde HPLC cihazının OpenLab (Agilent Kromatografik Yazılım) yazılımı üzerinden otomatik olarak hesaplanan Sinyal/Gürültü değerleri kullanılmıştır.

LOQ

Yapılan LOQ çalışmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. LOQ Sonuçları

Enjeksiyon	L-karnitin Pik Alanı	L-karnitin sinyal/gürültü oranı
1	4.6	10.7
2	4.4	10.0
3	4.4	10.9
4	4.8	11.2
5	4.6	10.8
6	4.8	10.6
Ortalama	4.6	10.7
SS	0.18	0.40
%VK	3.89	3.74

LOQ çözeltilerinden elde edilen L-karnitin pikinin sinyal/gürültü oranının 10'dan küçük olmadığı ve ardışık altı enjeksiyonundan elde edilen L-karnitin pikinin %VK değerinin ≤10 olduğu gösterilmiştir.

LOD

Yapılan tespit alt limiti çalışmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.14.'te verilmiştir.

Çizelge 4.14. LOD Sonuçları

Enjeksiyon	L-karnitin Pik Alanı	L-karnitin sinyal/gürültü oranı
1	1.1	2.8

LOD çözeltisinden elde edilen L-karnitin pikinin sinyal/gürültü oranı 3'ten büyük olmadığı gösterilmiştir.

LOQ ve LOD alt limiti sonuçları EP ve ICH tarafından belirtilen limitler için uygun aralıklarda bulunmuştur [60-62]. Geliştirilmiş olan analitik yöntemin duyarlılığı enkapsülasyon etkinliği ve *in-vitro* ilaç salımı çalışmalarında elde edilecek değerler için yeterli bulunmuştur.

4.1.7. Stabilite

500 µg/mL hazırlanan standart çözelti oda sıcaklığında 48 saat boyunca bekletilerek alan değerinde değişme olup olmadığı tespit edilmiştir. Alan değerleri arasındaki uyum % 98 – %102 aralığında bulunmuştur.

Çizelge 4.15. Çözelti Stabilitesi Sonuçları

Saat	Alan	Uyum (%)
t=0	415.5	
t=24	419.9	98.53
t=48	421.7	

4.2. Nanolipozomların ve Nanopartiküllerin PB / ZP ve PDI Analizi

Phospholipon 90 Gve Lipoid S100-Soyafosfotidil kolin bazlı iki farklı tip lipit kullanılarak nanolipozomlar hazırlanmış, L-karnitin etkin maddesi içerisine enkapsüle edilmeye çalışılmıştır. Her bir formülasyon 50 mg, 100 mg ve 500 mg arasında nanolipozom miktarları farklılaştırılarak hazırlanmıştır. Her

formülasyon için 6 adet örnekle çalışılmış; her ölçüm 3 tekrarlı olarak alınmış, ortalama PB, PDI ve ZP değerleri %VK hesaplanarak elde edilmiştir. Elde edilen verilerin ortalama ve %VK değerleri Çizelge 4.16.'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.16. Hazırlanan Nanolipozomların Ortalama PB, ZP ve PDI Değerleri

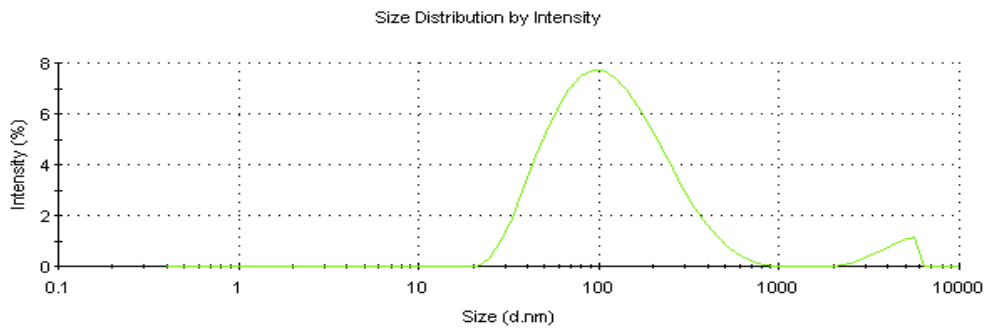
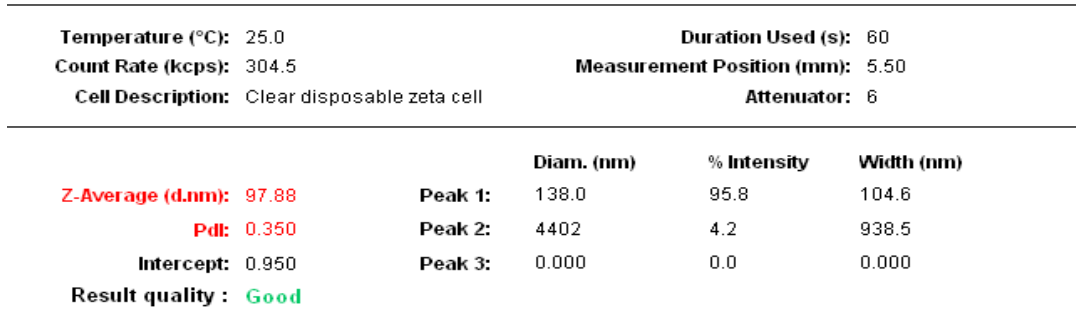
Formülasyon Kodu	Lipit	Lipit Miktarı (mg)	PB (nm)	ZP (mV)	PDI
Lipo-1	Phospholipon 90G	50	60.82±1.31	9.93±0.14	0.27±0.02
Lipo-2		100	84.52±3.13	7.16±0.29	0.42±0.01
Lipo-3		500	93.58±1.44	5.94±0.22	0.36±0.02
Lipo-4	Lipoid S100 (Soya fosfatidilkolin)	50	58.59±2.72	8.11±0.62	0.27±0.02
Lipo-5		100	76.23±2.25	6.18±0.56	0.33±0.01
Lipo-6		500	97.88±2.96	6.36±0.54	0.35±0.01

Literatürde, nanolipozomların hazırlanması aşamasında eklenen kolesterolün, stabiliteyi olumlu yönde etkilediği belirtilmektedir [71]. Bu nedenle çalışmamızda kolesterol stabilite artırıcı ajan olarak kullanılmıştır. ZP, süspansiyonlarının stabilitesinin önemli bir göstergesidir, bu nedenle L-karnitin yüklü nanolipozomlarının kalitesini belirleyen kritik parametrelerden biridir. İlaç yüklü nanolipozomların düşük stabilite göstermesinin en önemli nedeni lipit yüzey oksidasyonunun artması ve zamanla polaritesini kaybetmesidir [72]. Bu sebeple ZP değerinin ölçülmesi, koloidal dispersiyonun saklama stabilitesi ile ilgili önemli bilgiler vermektedir. ZP arttıkça partiküllerin birbirlerini itmeleri daha kuvvetli olacak ve bu sayede agregasyon eğilimleri azalacaktır. Lipoid S100 ile hazırlanan nanolipozomlar ile Phospholipon 90 G ile hazırlananlar arasında belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir. Lipoid S100 içeriğinde %100'e yakın fosfatidil kolin miktarı bulunurken, Phospholipon 90 G'de ise %90'a yakın fosfatidil kolin miktarı bulunmaktadır [73]. Her iki lipit de soya bazlı olup nötr yapıdadır. Literatürde bulunan bazı fosfatidilkolin bazlı yüksüz nanolipozomların

ZP değerinin pozitif 6-8 mV aralığında olmasıyla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir [74, 75]. Nanolipozom formülasyonlarıyla elde edilen ZP değerleri, nötral formda lipit kullanılmasından ve formülasyonlara eklenen sürfaktanın da (Tween 80) nötral formda olmasından dolayı, hafif pozitif alana kaymasından kaynaklanmaktadır [75, 76]. Bununla birlikte, nötral lipitlerde (fosfatidilkolin bazlı) düşük kolesterol içeriklerinde (Lipit:kolesterol, 9:1 (molar oran)) pozitif yük sonuçları elde edilmesi beklenmektedir [77].

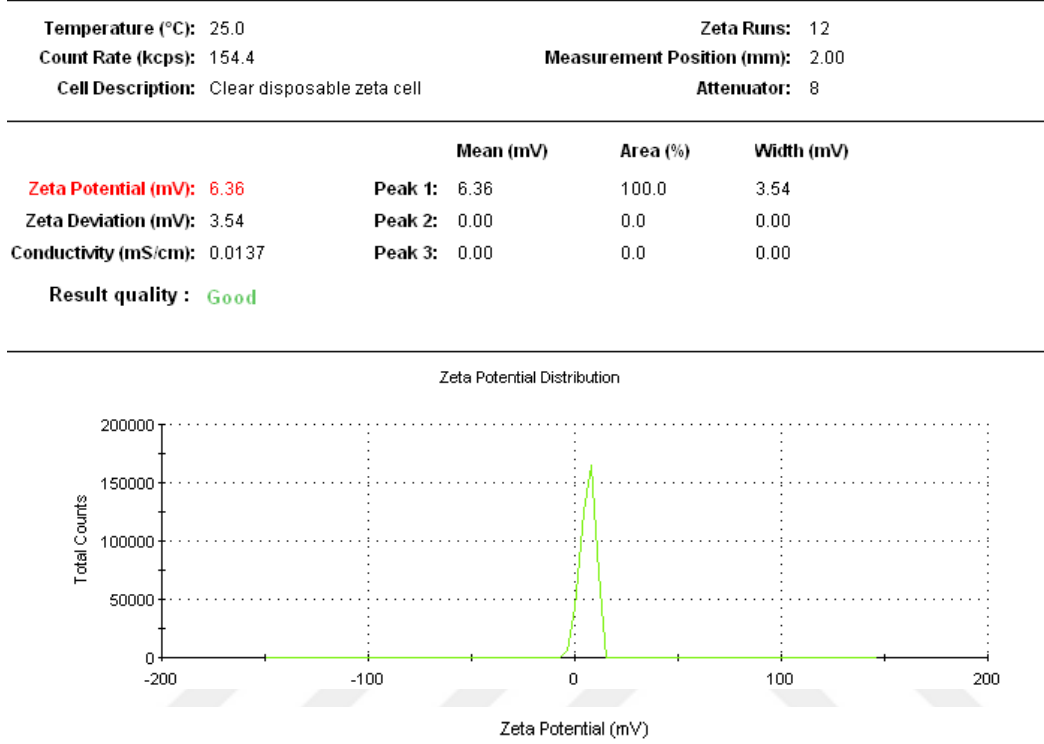
Nanolipozom partikül büyüklüklerinin dağılımının homojen olup olmadığını izleyebilmek için partikül boyutu ve partiküllerin dağılımı incelenmiştir. Hazırlanan ilaç yüklü nanolipozomların boyutları 50 - 100 nm arasında değişim göstermekte ve PDI değerleri ise 0.27 ile 0.42 arasında bulunmaktadır. Artan nanolipozom miktarı ile birlikte PB artarken, dağılımlarının daha geniş oldukları izlenmiştir.

Malvern Nanosizer cihazından elde edilen PB/PDI ve ZP değerlerine ait örnek histogramlar aşağıdaki şekillerde belirtilmiştir.



Şekil 4.3. Lipo-6 formülasyonuna ait PB/PDI değerleri örnek histogram

Şekil 4.3.'te görüldüğü gibi nanolipozomal yapıların çoğunluğu (yaklaşık %96'sı) 100 nm civarındayken, %4'lük bir kısmı ise daha büyük boyutta veya agregre olmuş nanolipozomal yapıda olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.



Şekil 4.4. Lipo-6 formülasyonuna ait ZP değeri örnek histogram

L-karnitin HCl yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamak için, iki ayrı yöntem kullanılmış ve enkapsülasyon dereceleri değerlendirilmiştir. Her formülasyon 5 mg, 10 mg ve 15 mg arasında polimer miktarları artırılarak hazırlanmıştır.

Her formülasyon için 3 adet örnekle çalışılmış; her ölçüm 3 tekrarlı olarak alınmış, ortalama PB, PDI ve ZP değerleri %VK hesaplanarak elde edilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.17.'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.17. Hazırlanan Nanopartiküllerin Ortalama PB, ZP ve PDI Değerleri

Kod	Nanoçöktürme Yöntemi			Çift Emülsiyon Yöntemi		
	PB (nm)	ZP (mV)	PDI	PB (nm)	ZP (mV)	PDI
NP-1	244.41±5.92	-4.14±1.71	0.15±0.02	250.90±6.15	-30.80±2.26	0.22±0.03
NP-2	340.13±4.65	-10.87±1.46	0.47±0.01	379.86±6.50	-17.84±3.38	0.38±0.01
NP-3	404.52±3.85	-9.28±0.87	0.31±0.01	1152.75±4.27	-15.31±3.20	0.60±0.02

Nanopartikülpartikül büyüklüklerinin dağılımının homojen olup olmadığını izleyebilmek için PB ve PDI değerleri incelenmiştir. Hazırlanan ilaç yüklü nanopartiküllerin boyutları geniş bir aralıkta değişim göstermektedir, PDI değerleri ise 0.13 ile 0.62 arasında bulunmuştur. Artan derişimle birlikte PB anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.05$).

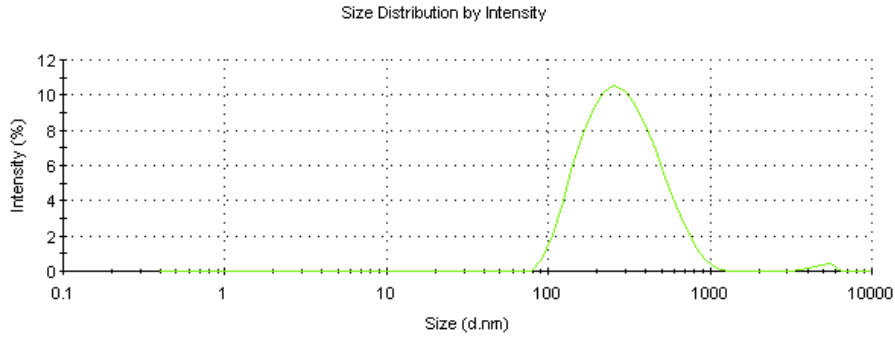
ZP değerleri ise polimer konsantrasyonu ve hazırlama yöntemine göre -2.43 ve -32.86 değerleri arasında değişiklik göstermektedir. Pluronik F68 sürfaktanı eklenen PLGA formülasyonlarında literatürle benzer aralıkta ve negatif yüklü ZP elde edilmiştir [78, 79].

Aynı şekilde, NP-1 fomülasyonlarında sonikasyon süresine bağlı olmak kaydıyla, emülsifikasyon süresine bakılmaksızın ~250-280 nm civarında nanopartikül büyüklükleri elde edilmiştir. Farklı yöntemlerle sentezlenen aynı nanopartiküllerin tamamen farklı PB, ZP ve PDI değerleri gösterdikleri izlenmiştir.

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 80
Count Rate (kcps): 89.1	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 3

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 250.9	Peak 1: 312.7	99.0	166.2
Pdl: 0.213	Peak 2: 4807	1.0	722.0
Intercept: 0.912	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good



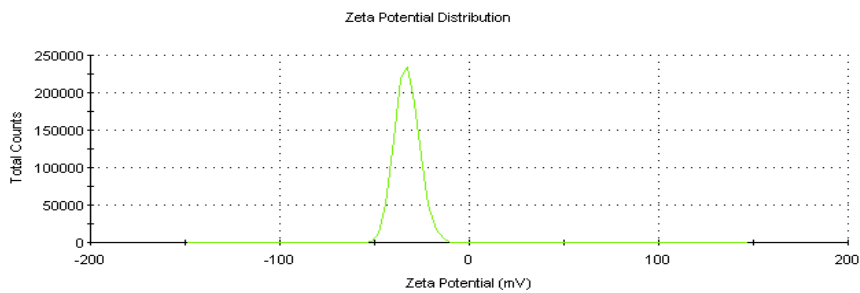
Şekil 4.5. NP-1 formülasyonuna ait PB/PDI değerleri örnek histogram

Şekil 4.5.'te görüldüğü gibi nanopartikül yapıların yaklaşık %95'i, 250 nm civarındayken, %1'lik kısmı ise daha büyük partikül büyüklüğüne sahip yapılardan oluşmaktadır. Bu farklılığın asıl sebebi sonikasyon esnasında nanopartiküllerin tam olarak parçalanamaması ve emülsiyon içerisinde agrege olmuş yapıların bulunmasından kaynaklanmaktadır.

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 251.4	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -32.8	Peak 1: -32.8	100.0	6.39
Zeta Deviation (mV): 6.39	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0421	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good



Şekil 4.6. NP-1 formülasyonuna ait ZP değeri örnek histogram

4.3. Nanolipozom ve Nanopartiküllere Yüklenen L-karnitin'in Enkapsülasyon Etkinliği Sonuçları

Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi nanolipozom formülasyonları hazırlanmıştır. L-karnitin miktar tayini bölüm 4.1.'de validasyonu detaylandırılan HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. L-karnitin'in enkapsülasyon etkinliğinin saptanabilmesi için nanolipozom ve nanopartikül hazırlama işlemi sonrasında, santrifüj işlemi sonrasında, sulu dış fazda serbest halde bulunan L-karnitin miktarı HPLC ile tayin edilmiştir. Hazırlanan nanolipozom ve nanopartikül formülasyonları için elde edilen enkapsülasyon etkinliği verilerini gösteren çizelge aşağıda sunulmuştur (çizelgede polimer bazlı nanopartiküller için çift emülsiyon yöntemi bulguları verilmiştir).

Çizelge 4.18. Yüzde Enkapsülasyon Etkinliği (EE%)

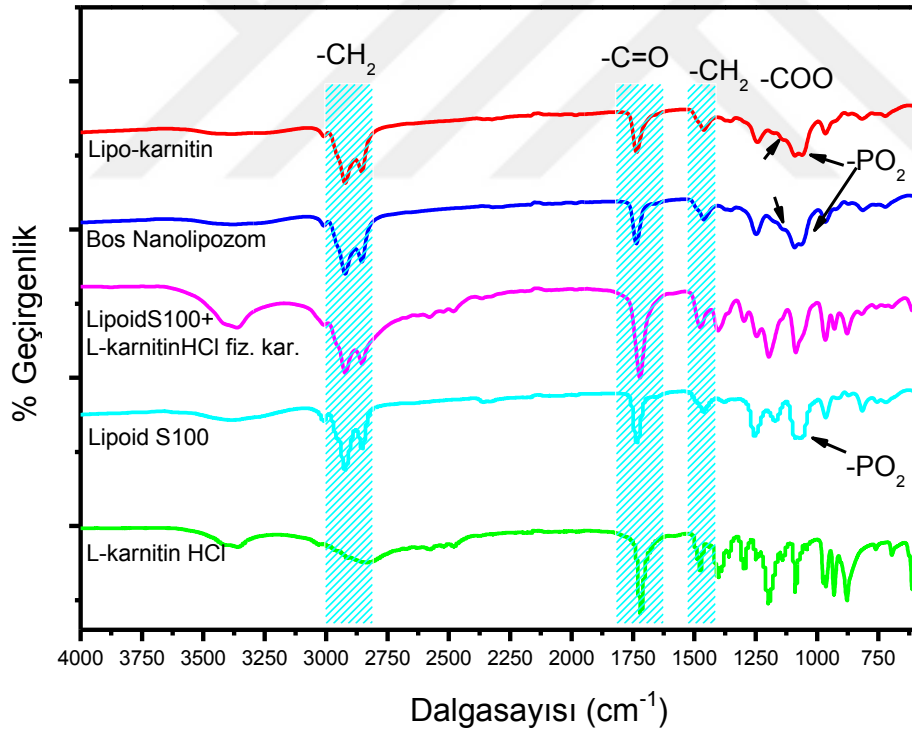
Formülasyon Kodu	Lipit-Polimer Adı	Lipit/Partikül Konsantrasyonu	EE%
Lipo-1	Phospholipon 90G	2mg/mL	-
Lipo-2		4mg/mL	-
Lipo-3		20mg/mL	8.94±2.40
Lipo-4	Lipoid S100	2mg/mL	-
Lipo-5		4mg/mL	-
Lipo-6		20mg/mL	14.26±3.52
NP-1	PLGA	0.25mg/mL	21.93±4.17
NP-2		0.50mg/mL	5.28±2.09
NP-3		0.75mg/mL	-

Lipo-3 ve Lipo-6 formülasyonları dışında herhangi bir nanolipozom formülasyonuna L-karnitin'in enkapsüle olmadığı bulgusu elde edilmiştir. Artan lipit miktarı ile birlikte enkapsülasyon etkinliği de artmıştır. Phospholipon 90G nanolipozomu yapısında ~%90 fosfatidil kolin bulunurken, Lipoid S100 – Soya fosfatidilkolin nanolipozomu yapısında ~%100 fosfatidil kolin bulunmaktadır. Fosfatidilkolin uzun doymuş yağ zincirlerinden oluşmaktadır. Fosfatidilkolin oranı arttıkça, yapı içerisine enkapsüle olan L-karnitin'in yapı dışına çıkması zorlaştığından yapı daha kararlı bir hal alırken, daha çok miktarda etkin madde içeride hapsolmuştur [80, 81]. Enkapsülasyon etkinliğinin en çok olduğu (%14.26±3.52) Lipoid S100 – Soya fosfatidilkolin bazlı Lipo-6 (**Lipo-karnitin**)

nanolipozom formülasyonu ile *in-vitro* salım deneyleri ve hücre kültürü deneylerine geçilmiştir. Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan nanopartiküllerin hiçbirinde yükleme saptanamamıştır. Çift emülsiyon yönteminde ise, NP-1 ve NP-2 formülasyonlarında ilaç enkapsülasyonu sağlanmıştır. Artan polimer miktarı ile nanopartikül boyutu artışı kontrol edilemediğinden, hücre kültürü deneyleri için ideal PB (250.9 ± 6.15 nm), en yüksek ZP (-30.80 ± 2.26 mV) ve aynı zamanda en yüksek enkapsülasyon etkinliği değerine sahip olan PLGA bazlı NP-1 (**Nano-karnitin**) formülasyonu ile deneysel çalışmalara devam edilmiştir.

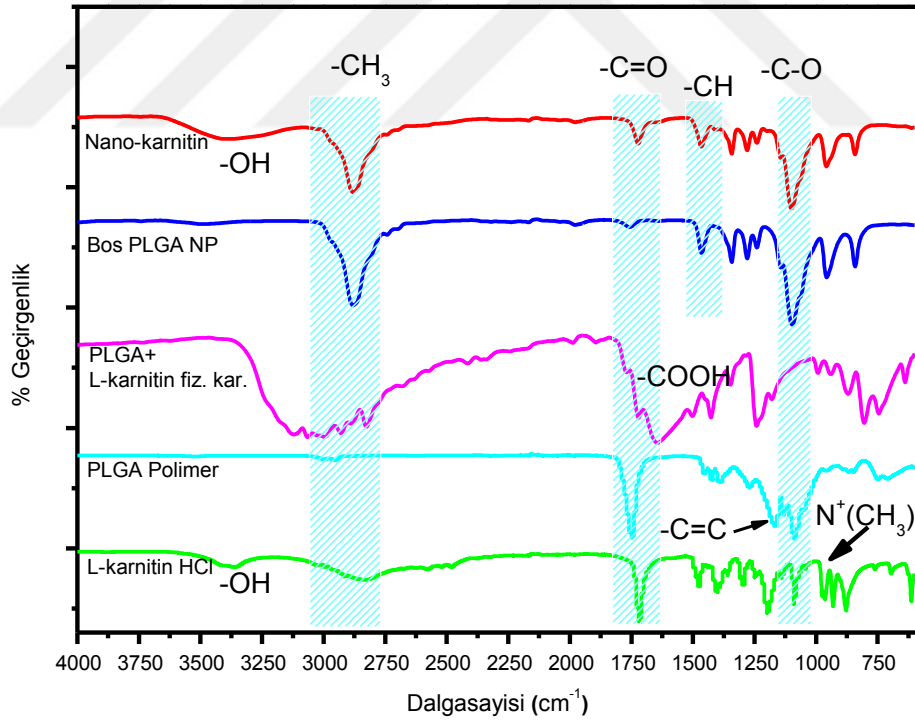
4.4. FTIR/ATR Analizi Sonuçları

Nano yapıları lipidik ve polimerik bazlı taşıyıcıların formülasyon bileşenleri ve L-karnitin arasındaki etkileşimlerini incelemek amacıyla FT-IR/ATR analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.7. Lipo-karnitin (L-karnitin yüklü nanolipozom), boş nanolipozom, Lipoid S100 ve L-karnitin HCl fiziksel karışımı, Lipoid S100, L-karnitin HCl'e ait FT-IR/ATR spektrumları

L-karnitin yüklü nanolipozom (Lipo-karnitin), boş nanolipozom, lipid S100+L-karnitin HCl fiziksel karışım, Lipoid S100 spektrumlarında lipit yapısına özgü etilenik (2930.75, 2852.04 cm^{-1}) gerilimi gözlenmiştir. Bütün spektrumlarda 1730 cm^{-1} bandında madde yapısına bağlı olarak şiddetli ester karbonil grubu C=O gerilimi madde içerisindeki tekrarlanan grupların sayısına oranla artış ve azalış göstermiştir. Etkin madde yüklenmiş ve yüklenmemiş olan nanolipozom spektrumları oldukça benzerlik göstermektedir. Lipoid S100'e ait parmak izi bölgesindeki PO_2 grupları bükülme pikleri (1081.72, 1059.02 cm^{-1}) boş ve dolu nanolipozomal yapılarda deformasyona uğramış, 1143 cm^{-1} 'de bulunan ester grubu simetrik gerilmesi ile pik genişlemiştir. Boş ve dolu nanolipozomal yapıların spektrumlarının hemen hemen aynı olması, L-karnitin'in hidrofilik yapısından dolayı nanolipozomal yapı içerisindeki iç tabakaya enkapsüle olduğunu, bu nedenle L-karnitin'e ait parmak izi bölgesi titreşimlerinin detekte edilemediğini düşündürmüştür. Bu durum ATR üniteli FTIR analizlerinin madde yüzeyinden elde edilen titreşim bilgilerini verdiği sonucunu da desteklemektedir.



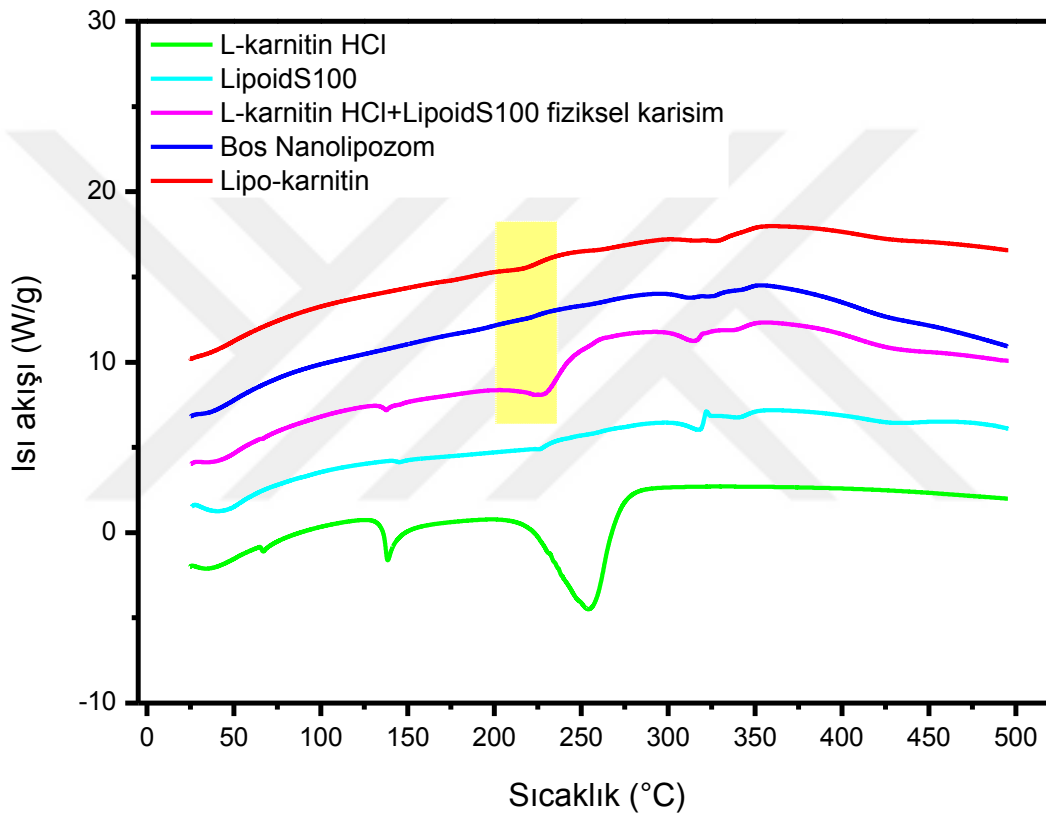
Şekil 4.8. Nano-karnitin (L-karnitin yüklü PLGA nanopartikül), boş PLGA nanopartikül, PLGA ve L-karnitin HCl fiziksel karışım, PLGA Polimer ve L-karnitin HCl'e ait FT-IR/ATR spektrumları

L-karnitine ait zayıf şiddette ve genişlemiş OH gerilimi (3429.76 cm^{-1}) aynı zamanda L-karnitin yüklü PLGA NP (Nano-karnitin) spektrumunda da gözlemlenmiştir. 3000 cm^{-1} gözlemlenen pik; L-karnitine ait 2878 cm^{-1} de bulunan CH_3 gerilmesi, 3429.76 cm^{-1} de bulunan OH gerilmesi ve PLGA NP spektrumundaki 3003.21 cm^{-1} 'deki CH_3 gerilmesi ile birleşerek yayılmıştır. 1145.13 cm^{-1} bandında bulunan C-O gerilmesi boş PLGA NP'de ve Nano-karnitin'de şiddetli olarak gözlemlenmiştir. PLGA+L-karnitin fiziksel karışımına ait spektrumda 1600 cm^{-1} bandında görülen geniş pikin, L-karnitin'de bulunan C=O gerilmesi ile hem PLGA hem de L-karnitinde bulunan karboksilik asit gruplarının titreşimlerinin birbirini kuvvetlendirmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Nano-karnitin ve boş PLGA NP spektrumlarında gözlemlenen 2878.83 cm^{-1} 'deki şiddetli pik CH_3 gerilmesinden kaynaklanmaktadır. L-karnitin'den kaynaklanan OH gerilimi (3429.76 cm^{-1}) Nano-karnitin'de bulunurken, boş PLGA NP spektrumunda çok zayıf bir şekilde görülmektedir. Bu pikin PLGA polimer spektrumunda olmamasına rağmen gözlemlenmesinin sebebi olarak sentez esnasında kullanılan OH gruplarının bulunmaması düşünülebilir. 1728.77 cm^{-1} bandında bulunan C=O gerilmesi kaynaklı pik, L-karnitin, PLGA polimer spektrumlarında şiddetli olarak belli olurken, boş PLGA NP'de azalma göstermiş, Nano-karnitin'de orta şiddetli olarak gözlemlenmiştir. Bunun sebebi olarak boş PLGA nanopartiküller sentez esnasında küresel forma geçtiğinden sadece dış kabuk yapısındaki C=O gerilimlerinin dedekte edilebildiği, küresel yapı içerisinden absorpsiyona uğrayan elektron bilgisinin alınamadığı düşünülebilir. Bu pikin Nano-karnitin'de şiddetinin boş PLGA NP spektrumuna kıyasla artmasının sebebi olarak da L-karnitin'in kısmen yapı içerisine girmediği, sentez esnasında nanopartiküllere bağlanmış yapılar oluşturduğu sonucu çıkarılabilir. Etkin madde yüklenmiş ve yüklenmemiş olan PLGA formülasyonlarının spektrumları oldukça benzerlik göstermektedir. L-karnitin'e ait $928.90, 879.15 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen orta şiddetli karakteristik $\text{N}(\text{CH}_3)$ gerilmesinin Nano-karnitin spektrumunda gözlenmemesi L-karnitin'in kısmen PLGA NP'lere enkapsüle olduğunun sonucuna varılmasında rol almaktadır.

4.5. Termalgravimetrik Analiz Sonuçları

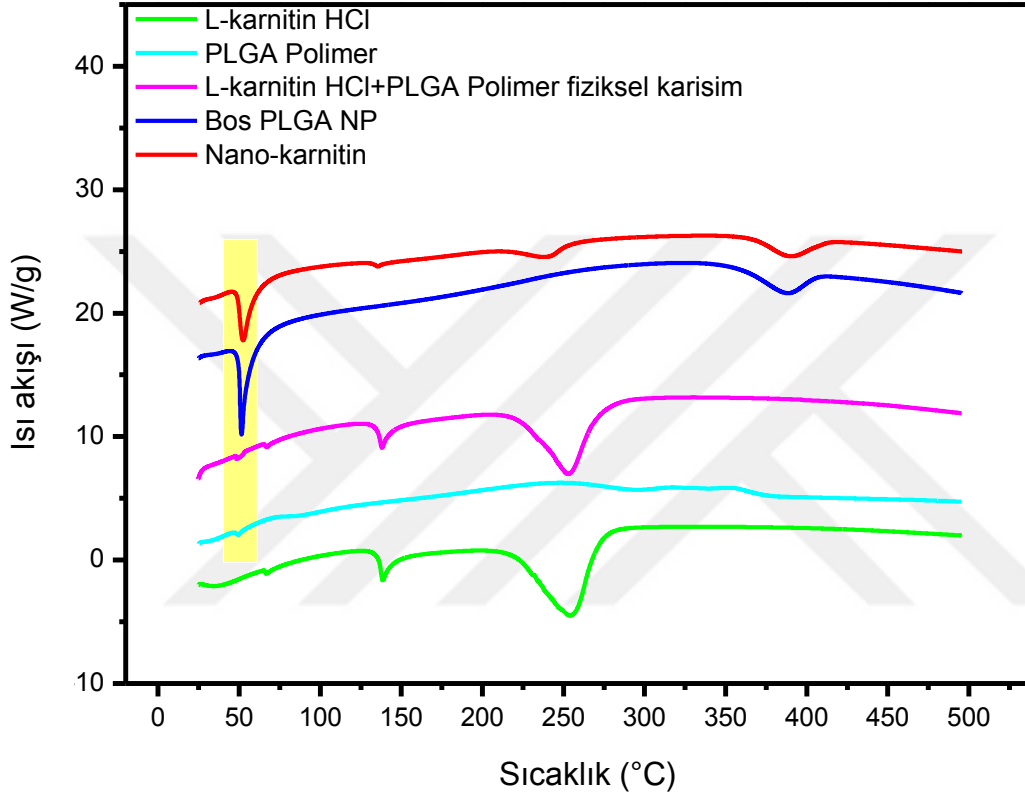
Bölüm 3.3.3.3.'te anlatıldığı gibi, L-karnitin HCl, Lipoid S100, PLGA polimer, Lipoid S100 L-karnitin HCl fiziksel karışım, PLGA polimer L-karnitin HCl fiziksel karışım, boş nanolipozom, boş PLGA NP, L-karnitin yüklü nanolipozom, L-karnitin yüklü PLGA NP'lerin TGA analizlerinden elde edilen verilerin birinci türevi alınarak DTG (Derivatif Termalgravimetri) termogramları çizilmiştir. Boş ve etkin madde yüklü nanolipozomlar, boş ve etkin madde yüklü PLGA NP'ler, liyofilize edildikten sonra termalgravimetrik analize alınmıştır.



Şekil 4.9. L-karnitin HCl, Lipoid S100, Lipoid S100 L-karnitin HCl fiziksel karışım, boş nanolipozom, Lipo-karnitin (L-karnitin yüklü nanolipozom)'a ait DTG termogramlarının karşılaştırılması

L-karnitin HCl 220°C civarında erimeye başlamış, 250°C'de keskin endotermik erime piki gözlemlenmiştir. Lipoid S100'e ait termogramda, ~50°C'de endotermik erime piki gözlemlenirken, 317°C'de endotermik pikin ardından, lipidik yapının bozunmasına ilişkin ekzotermik bir eğri gözlemlenmiştir. L-karnitin HCl+LipoidS100 fiziksel karışımında L-karnitine ait endotermik erime piki 225°C

civarında baskılanmış bir şekilde gözlenirken, boş nanolipozom yapısında gözlemlenmemekte, Lipo-karnitin yapısında ise çok hafif bir şekilde gözlenebilmektedir. Liyofilize formülasyonların analizlerinde benzer termogram sonuçları elde edilmiştir. Bunun sebebinin nanolipozomal yapılarda elde edilen düşük enkapsülasyon yüzdeleri ve enkapsülasyon sırasında etkin maddenin nanolipozomlara amorf düzende dahil olduğu sonucuna varılabilir [82].

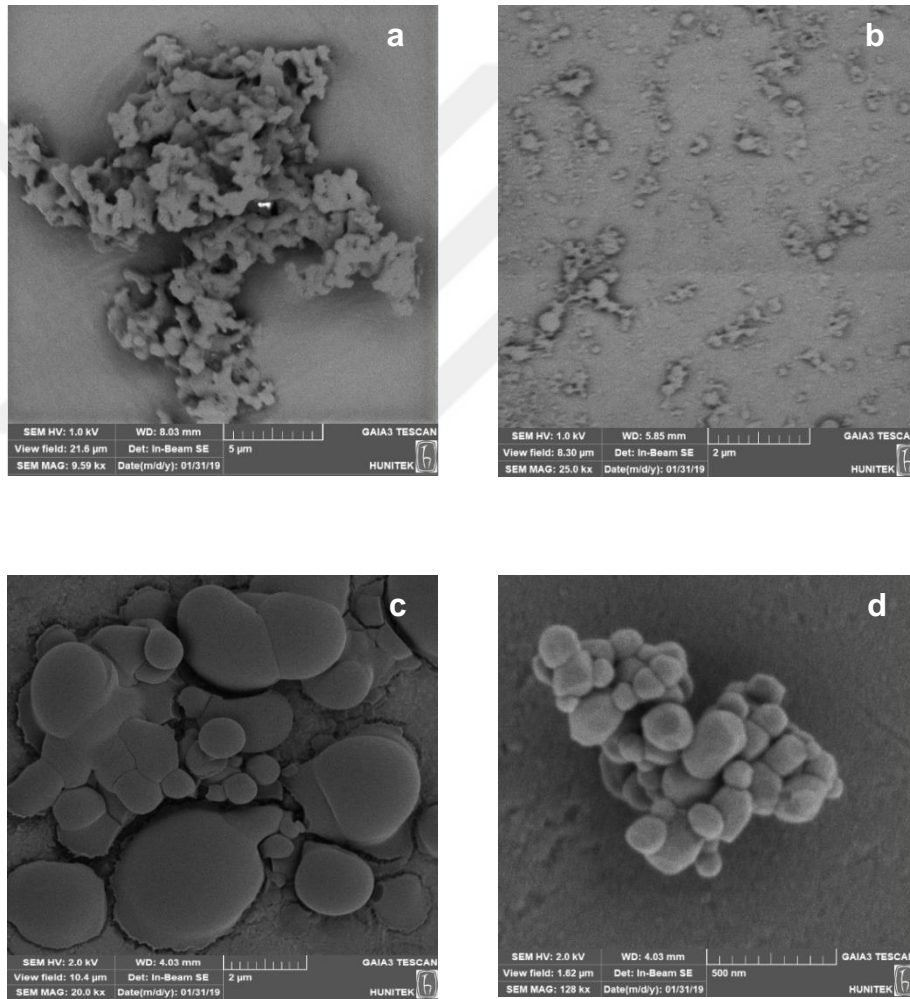


Şekil 4.10. L-karnitin HCl, PLGA Polimer, PLGA Polimer L-karnitin HCl fiziksel karışım, boş PLGA NP, Nano-karnitin (L-karnitin yüklü Nanopartikül)'e ait DTG termogramlarının karşılaştırılması

L-karnitin HCl 220°C civarında erimeye başlamış, 250°C'de keskin endotermik erime piki gözlenmektedir. PLGA'nın Tg: 50°C olarak bulunmuş ve bu değer literatürle uyum göstermiştir [82, 83]. PLGA polimer L-karnitin fiziksel karışımı, boş ve etkin madde yüklü nanopartiküllere ait termogramlarda değişmemiştir. Etkin madde yüklü termogramda 250°C'de L-karnitin'e ait endotermik erime pikinin belirginleşmesi dışında etkin madde yüklü ve boş nanopartikül termogramları benzerlik göstermektedir.

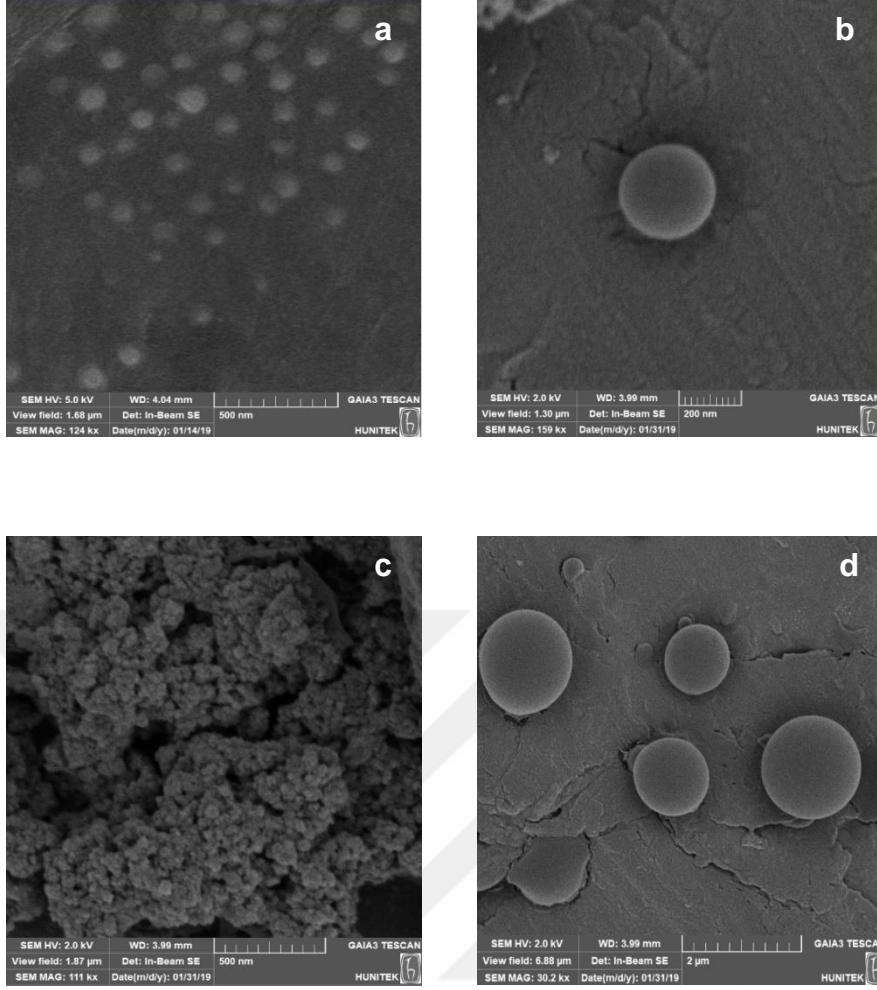
4.6. Taramalı Elektron Mikroskobu Analiz Sonuçları

Geliştirilen nanopartikül ve nanolipozomların partikül boyutu, şekli ve dağılımlarını ncelenmesi için Taramalı Elektron Mikroskobu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Numune üzerine gönderilen elektron demetinin oluşturduğu sıcaklık artışı nedeniyle özellikle sıcaklıktan daha çok etkilenen nanolipozomal yapıların görüntülenmesi esnasında deformasyonlar gözlenmiştir. Deformasyonlar, nanolipozom yapılarının eriyik halde birbiri içerisine geçmeleri şeklinde gözlemlenmiş olup, Şekil 4.11.c'de görülmektedir.



Şekil 4.11. Lipoid S100 – Soya fosfatidilkolin bazlı Lipo-karnitin numunelerine ait a-b) yükleme yapılmamış, c-d) yükleme yapılmış nanolipozom SEM görüntüleri.

SEM çalışmaları, sentezlenen Lipoid S100–Soya fosfatidilkolin bazlı nanolipozomların homojen dağıldıkları, küresel yapıda ve düzgün yüzeyli olduklarını göstermektedir.

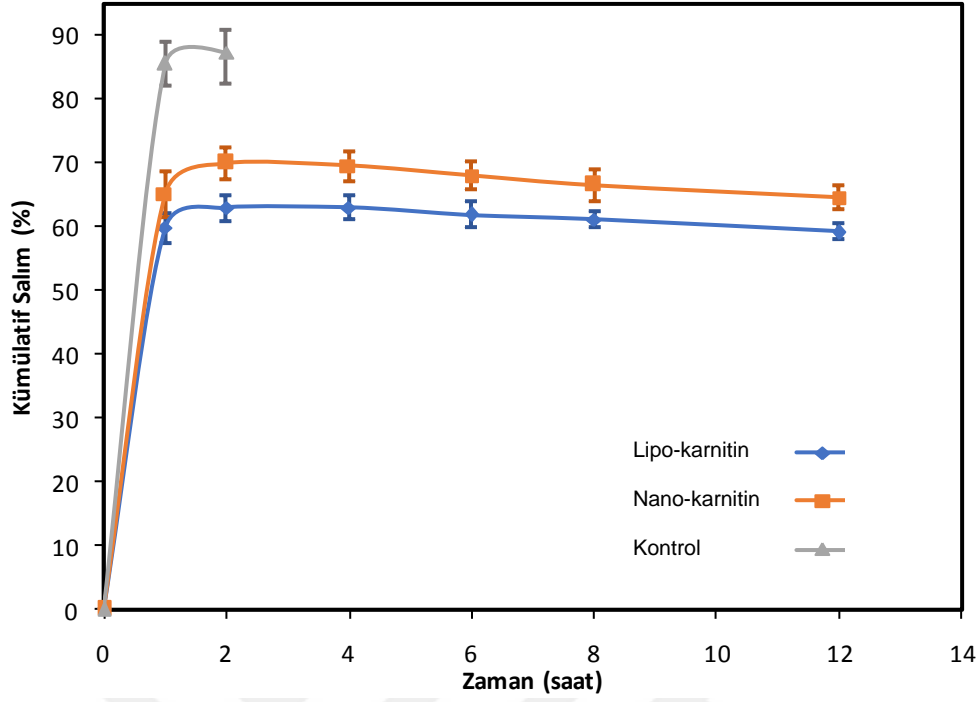


Şekil 4.12. PLGA bazlı Nano-karnitin numunelerine ait a-b) yükleme yapılmamış, c-d) yükleme yapılmış nanopartikül SEM görüntüleri.

SEM çalışmaları ile sentezlenen PLGA bazlı nanopartiküllerin agrega olmadıkları, homojen dağıldıkları, küresel yapıda ve düzgün yüzeyli olduklarını gösterilmiştir.

4.7. *In-vitro* Salım Analizi Sonuçları

Detayları Bölüm 3.2.3.8.'de anlatıldığı şekilde yapılan *in-vitro* salım çalışmalarında elde edilen salım grafiği Şekil 4.13.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Nano-karnitin ve Lipo-karnitin formülasyonu ve kontrol grubunun *in-vitro* ilaç salım profilleri (n = 6, hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

Diyaliz membran yöntemi ile yapılan ve kümülatif olarak değerlendirilen *in-vitro* salım çalışmaları sonucunda, etkin madde çözeltisi ile 1. saatin sonunda yaklaşık %90 salıma ulaşılırken, nanolipozom ve nanopartikül formülasyonlarında sürekli bir salım profili gözlenmiştir. Her iki formülasyon için 1. saatin sonunda ani salım etkisi gözlenmiş olup, nanolipozom ve nanopartikül formülasyonları için salım değerleri sırasıyla % 59.90 ve % 65.19 olarak bulunmuştur. Nano-karnitin ve Lipo-karnitin formülasyonları salım profillerine ait verilere uygulanan *t* testi sonucunda; *p* değeri 0.07 bulunmuş olup aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0.05$).

Kinetik değerlendirmeler kapsamında ise, formülasyonlarından etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla salım sonuçlarına dört farklı kinetik model (sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson-

Crowell) uygulanmış ve k/r^2 (salım hız sabiti/determinasyon katsayısı) değerleri, Çizelge 4.19.'da verilmiştir [84].

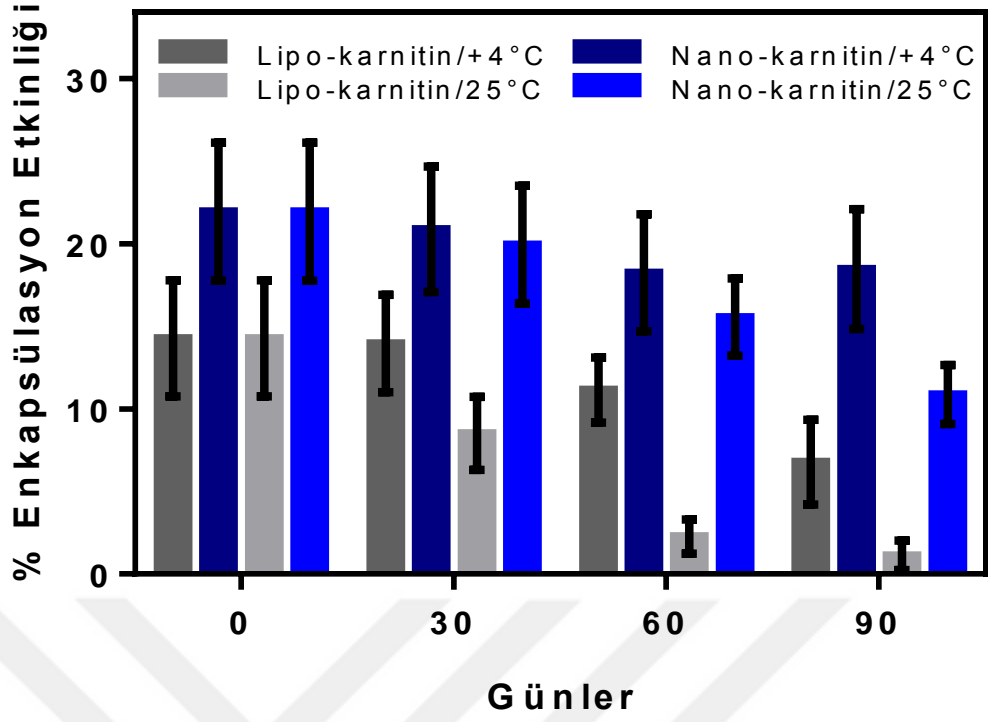
Çizelge 4.19. Formülasyonların *in-vitro* Salım Hızı Kinetik Verileri

Formülasyon		Sıfıncı derece	Birinci derece	Higuchi	Hixson Crowell
Lipo-karnitin	k	36.5806	4.1526	33.9060	0.6513
	r^2	0.8461	0.8539	0.6973	0.8515
Nano-karnitin	k	29.9709	4.2567	24.4665	0.5130
	r^2	0.9010	0.9167	0.8091	0.9121

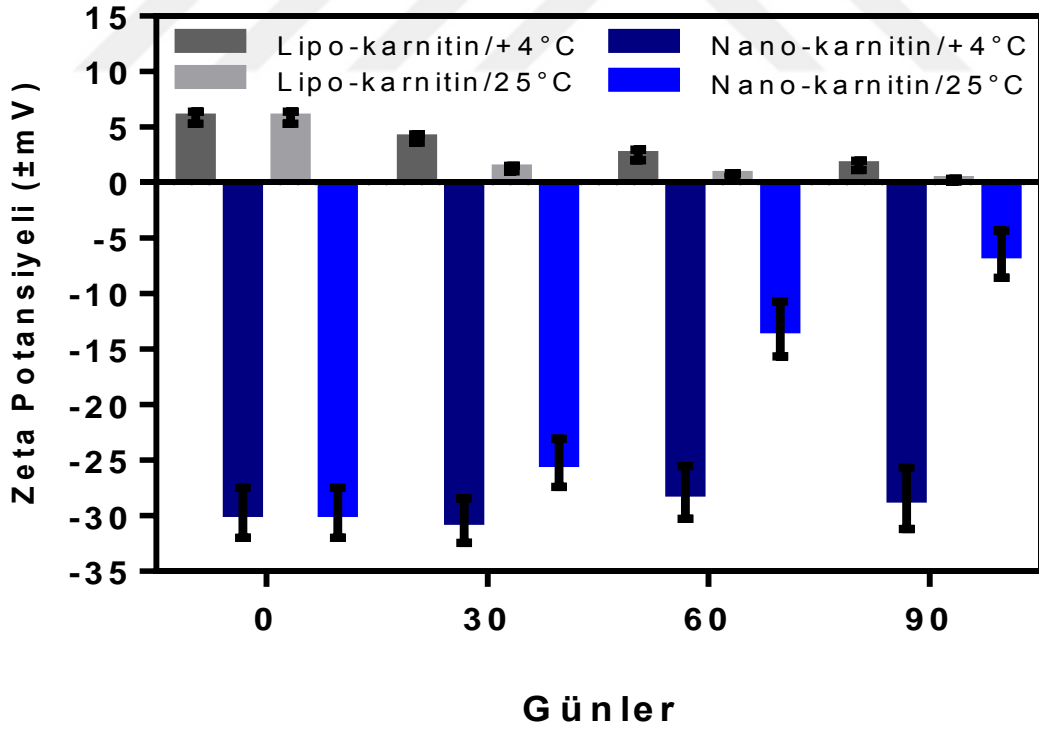
Nanolipozom formülasyonu için, en yüksek determinasyon katsayısı (0.8539) birinci dereceden kinetik modelde elde edilmiş olup, çözünme hızının yüksek olduğu etkin maddenin salımının konsantrasyona bağlı olduğu görülmüştür. Nanopartikül formülasyonu için ise, en yüksek determinasyon katsayısı değeri (0.9167) bulunmuş, salımın birinci dereceden kinetik modele uyduğu gösterilmiştir.

4.8. Stabilite Sonuçları

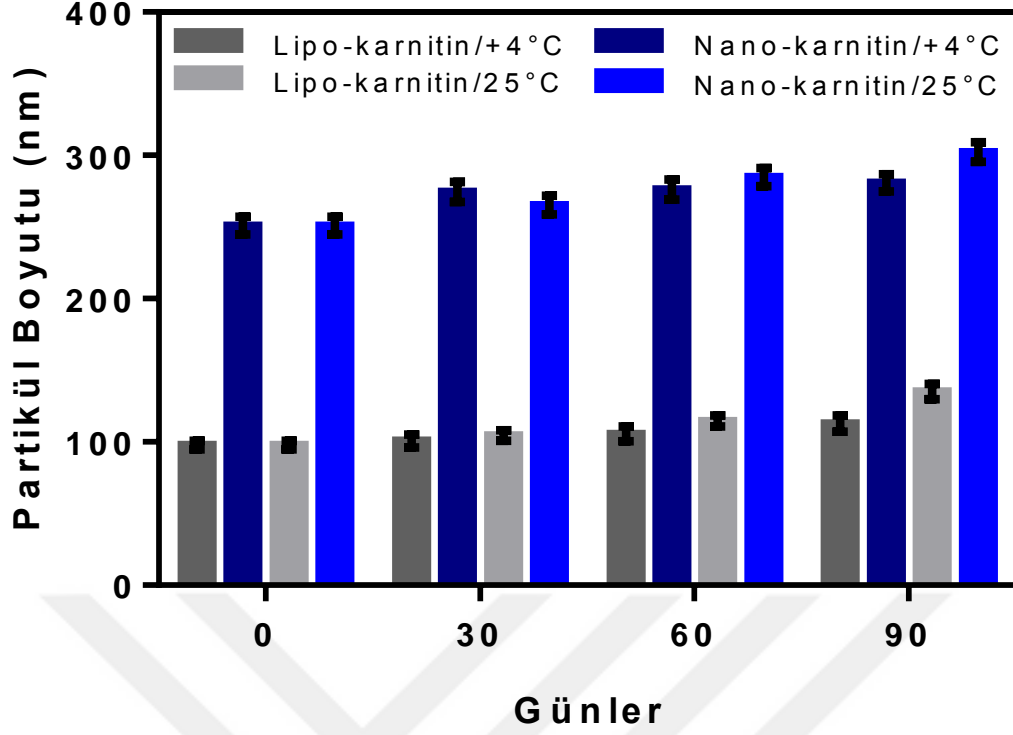
Stabilite testleri Lipo-karnitin ve Nano-karnitin kodlu formülasyonlar ile yürütülmüştür. Yapılan incelemelerde Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarının her ikisinde de 3. ayın sonuna kadar +4°C'de herhangi bir makroskobik incelemede farklılık gözlenmezken, 25°C'de 2.ayın sonunda sadece Lipo-karnitin formülasyonunda sedimentasyon gözlemlenmiştir. Her iki koşul altındaki örnekler sırasıyla; PB, ZP, PDI ve %EE açısından değerlendirilmiştir.



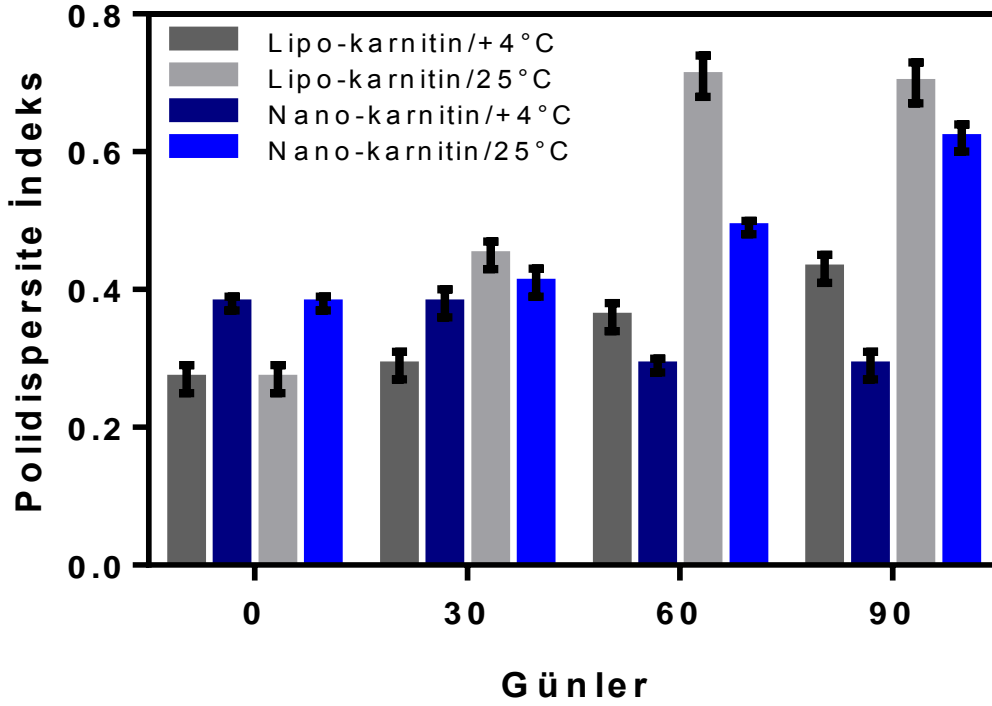
Şekil 4.14. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait %EE'nin zamanla değişimi



Şekil 4.15. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait ZP'nin zamanla değişimi



Şekil 4.16. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait PB'nin zamanla değişimi



Şekil 4.17. Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait PDI değerlerinin zamanla değişimi

4.9. Hücre Kültürü Protein Miktar Tayini Sonuçları

Hücrelerdeki protein miktar tayinleri doğrudan hücre sayısı ile orantılı olup, yeterli miktarda bulunmaması durumunda türevlendirme işlemi sonunda GC/MS cihazı kromatogramlarından değerlendirilebilir pik bilgisi alınamamaktadır. Bu sebeple hücre kültürü uyarımları sonucunda, bikononinik asidin (BCA) reaktif olarak kullanıldığı protein miktarı analizi yapılmıştır. Bu yöntemde 562 nm'de absorbanı veren koyu mor renk oluşumu ile UV spektrumu analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen konsantrasyon değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir. Protein miktar değerleri, 101.63 ve 411.63 µg/mL arasında değişmekte olup, yeterli miktarda hücre bulunduğu kanısına varılarak bir sonraki adım olan GC/MS analizlerine geçiş yapılmıştır.

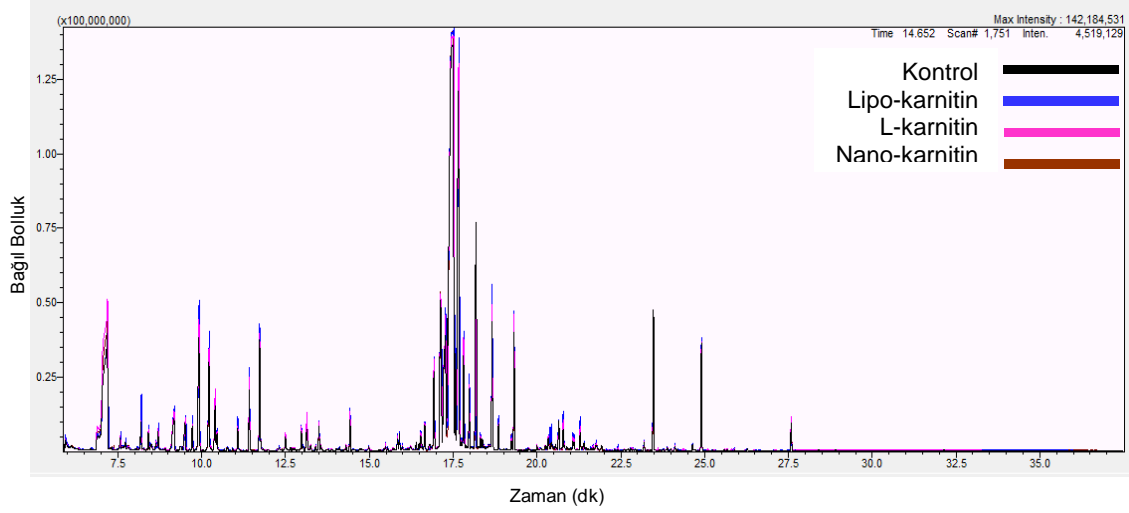
Çizelge 4.20. Hücre kültürü BCA protein miktar tayini analizi sonuçları

Numune Adı	Konsantrasyon (µg/mL)
Kontrol 1	190.38
Kontrol 2	179.13
Kontrol 3	154.13
L-Karnitin 1	305.38
L-Karnitin 2	311.63
L-Karnitin 3	322.88
Nano-karnitin / 1	110.38
Nano-karnitin / 2	176.63
Nano-karnitin / 3	101.63
Lipo-karnitin / 1	344.13
Lipo-karnitin / 2	411.63
Lipo-karnitin / 3	347.88

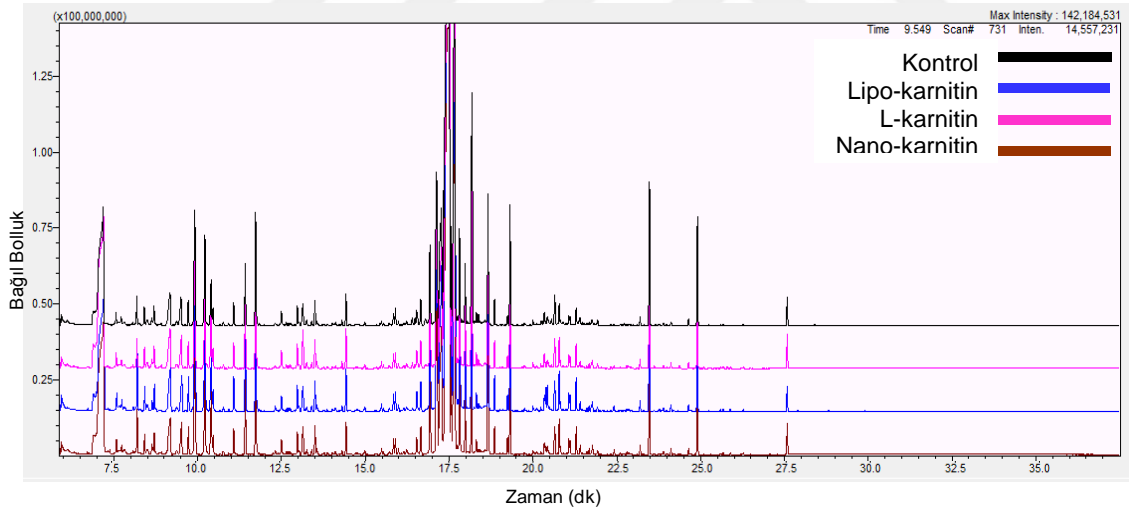
4.10. Metabolomik ve Yolak Analizi Sonuçları

4.10.1. GC-MS Temelli Metabolomik Analizi Sonuçları

Metabolomik analizi için, cihaz üzerinde kurulu olan Shimadzu LabSolution yazılımı ile veriler toplanmıştır, örnek kromatogramlar aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin ile uyarılmış kardiyak fibroblastların, uyarım sonrasında kazınarak türevlendirilmesiyle elde edilen GC/MS kromatogramları (kromatogramlar üst üste çakıştırılmıştır).



Şekil 4.19. Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin ile uyarılmış kardiyak fibroblastların, uyarım sonrasında kazınarak türevlendirilmesiyle elde edilen GC/MS kromatogramları

Yüksek çözünürlüklü GC/MS kromatogramlarına ait datalar MSDIAL yazılımı kullanılarak metabolitlere ait pikler ayrıştırılmış ve alıkonma zamanları düzeltilerek veri matrisleri oluşturulmuştur. Piklerin tanımlanmasında alıkonma indeksli kütüphanelerden yararlanılmıştır. Kardiyak fibroblast hücre hatlarından tanımlanabilmiş 128 tane olmak üzere toplam 760 metabolit elde edilmiştir. Metabolitler normalizasyon işlemlerinden sonra *t*-testi ile karşılaştırılmıştır. Besi yeri dışında hiç bir ortama maruz bırakılmamış kontrol, serbest L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonları gruplarına ait metabolit düzeyleri Çizelge 4.21'de özetlenmiştir.

Elde edilen veriler ile En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi (Partial Least Squares Discriminant Analysis, *PLS-DA*) grafikleriyle görselleştirilmiştir. Uygulama yapılan 4 gruba ait metabolit sonuçları *PLS-DA* grafikleriyle ayrı ayrı detaylı olarak incelenmiştir. *PLS-DA* grafikleriyle farklılaşmaya sebep olan metabolitlerin varlığı belirlenmiş, sonuçlar *VIP* (variable important in project) grafiklerine aktarılmıştır, metabolit ayırımında en büyük etkiye sahip 25 adet metabolit bu sayede ortaya konulmuştur. Karşılaştırılmalı (kontrol/L-karnitin, kontrol/Lipo-karnitin, kontrol/Nano-karnitin, L-karnitin/Lipo-karnitin, L-karnitin Nano-karnitin, Lipo-karnitin/Nano-karnitin) *PLS-DA* analizinde her gruba göre artış ve azalış göstererek farklılaşmanın en yüksek olduğu 25 metabolit belirteç olarak kabul edilerek değerlendirme yapılmıştır.

Çizelge 4.21. GC-MS Yöntemiyle Analiz Edilen Metabolitlere İlişkin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri ve İstatiksel Olarak Karşılaştırmalarına ait p Değerleri Sonuçları

Metabololit Adı	Normalize edilmiş pik alanları				p değerleri					
	Kontrol	L-karnitin	Lipo-karnitin	Nano-karnitin	Kontrol/LC	Kontrol/Lipo-karnitin	Kontrol/Nano-karnitin	LC/Lipo-karnitin	LC/Nano-karnitin	Lipo-karnitin/Nano-karnitin
1,3-dihydroxyacetone	-0.943±0.09	-0.229±0.40	0.470±0.43	0.702±0.57	0.225	0.058	0.080	0.383	0.333	0.803
1-methyl nicotinamide	-1.035±0.21	-0.189±0.41	1.001±0.32	0.222±0.43	0.207	0.013	0.098	0.137	0.603	0.304
2-amino-1-phenylethanol	-0.417±0.04	-0.102±0.26	-0.508±0.56	1.026±0.59	0.384	0.901	0.116	0.618	0.225	0.197
2-hydroxybutyric acid	-0.966±0.15	0.761±0.28	0.911±0.15	-0.706±0.39	0.011	0.002	0.640	0.717	0.067	0.034
2-ketoisocaproic acid	-0.208±0.02	0.955±0.15	-1.450±0.05	0.703±0.11	0.003	0.000	0.003	0.000	0.332	0.000
2-keto-L-gulonic acid	0.201±0.02	0.468±0.41	0.481±0.55	-1.150±0.38	0.623	0.700	0.044	0.989	0.077	0.118
3-hexenedioic acid	-1.189±0.18	0.987±0.48	-0.041±0.22	0.244±0.30	0.026	0.030	0.028	0.191	0.347	0.568
3-indolelactic acid	-0.769±0.12	1.394±0.25	-0.813±0.15	0.188±0.21	0.003	0.858	0.033	0.003	0.041	0.034
3-phenyllactic acid	-0.714±0.02	0.983±0.16	-1.142±0.02	0.873±0.12	0.001	0.000	0.000	0.000	0.679	0.000
4-hydroxy-L-proline	-1.230±0.14	0.657±0.32	0.858±0.29	-0.284±0.31	0.011	0.006	0.086	0.723	0.158	0.094
4-methyl-5-thiazoleethanol	-0.176±0.27	-0.210±0.66	-0.239±0.61	0.625±0.40	0.971	0.942	0.247	0.980	0.429	0.390
6-hydroxy caproic acid	-0.708±0.14	0.105±0.37	-0.267±0.68	0.869±0.39	0.172	0.631	0.038	0.715	0.315	0.303
6-hydroxyhexanoic acid	-0.992±0.14	0.020±0.29	0.217±0.62	0.755±0.44	0.064	0.198	0.036	0.827	0.318	0.595
Acetol	-0.564±0.09	-0.090±0.51	-0.118±0.80	0.772±0.06	0.495	0.674	0.001	0.982	0.242	0.417
Acetyl-L-serine	0.982±0.11	0.298±0.43	-0.180±0.42	-1.100±0.28	0.281	0.097	0.005	0.555	0.091	0.211
Aconitic acid	0.167±0.26	0.418±0.05	-1.246±0.54	0.660±0.36	0.483	0.126	0.420	0.065	0.620	0.075
Alanine	-0.583±0.12	0.236±0.27	1.321±0.06	-0.973±0.32	0.085	0.000	0.406	0.032	0.077	0.005
Allantoin	-0.917±0.10	-0.241±0.15	1.224±0.57	-0.067±0.24	0.038	0.040	0.059	0.114	0.645	0.166
Allose	-0.381±0.19	-0.523±0.40	1.081±0.67	-0.177±0.21	0.807	0.160	0.584	0.167	0.563	0.215
Allothreonine	-0.903±0.13	-0.393±0.45	0.928±0.45	0.368±0.38	0.426	0.033	0.059	0.167	0.351	0.480

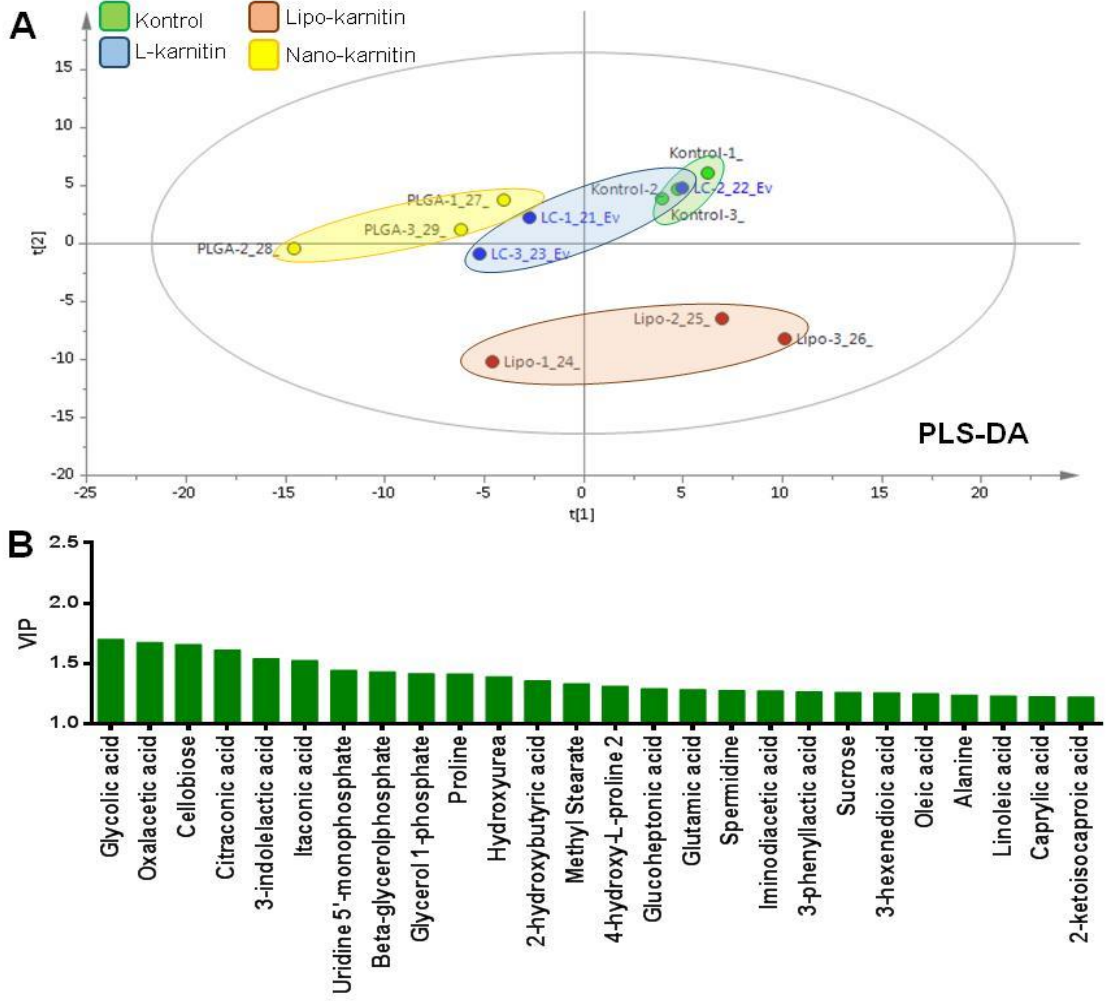
Alpha ketoglutaric acid	-0.347±0.06	0.911±0.23	-1.321±0.20	0.758±0.19	0.013	0.019	0.010	0.004	0.696	0.003
Alpha-D-glucosamine phosphate	0.169±0.38	-0.958±0.22	0.480±0.66	0.309±0.41	0.105	0.754	0.848	0.167	0.093	0.866
Alpha-glucosamine 1-phosphate	-0.131±0.01	0.427±0.69	0.571±0.56	-0.867±0.07	0.544	0.367	0.001	0.901	0.201	0.108
Arabitol	-0.333±0.81	0.304±0.10	-0.022±0.50	0.051±0.48	0.558	0.803	0.756	0.630	0.698	0.936
Aspartic acid	-0.870±0.04	0.534±0.27	-0.013±0.70	0.349±0.52	0.013	0.373	0.132	0.582	0.811	0.752
Benzoic acid	-0.958±0.08	-0.205±0.14	1.531±0.16	-0.368±0.15	0.019	0.000	0.048	0.003	0.554	0.002
Beta- alanine	-0.970±0.11	0.117±0.39	0.073±0.59	0.781±0.43	0.095	0.229	0.031	0.962	0.404	0.472
Beta-glycerolphosphate	-0.861±0.14	-0.854±0.16	1.047±0.21	0.669±0.36	0.978	0.004	0.031	0.004	0.033	0.498
Capric acid	-0.551±0.08	-0.844±0.44	1.001±0.52	0.394±0.16	0.620	0.074	0.012	0.092	0.097	0.415
Caprylic acid	-0.679±0.07	-0.567±0.04	1.629±0.12	-0.383±0.08	0.309	0.000	0.087	0.000	0.176	0.000
Cellobiose	-1.083±0.21	0.117±0.16	0.062±0.67	0.904±0.20	0.020	0.252	0.005	0.950	0.067	0.380
Cholesterol	0.001±0.13	0.509±0.13	-1.418±0.22	0.908±0.33	0.093	0.011	0.103	0.004	0.406	0.008
Cis-Aconitic acid	-1.144±0.18	0.343±0.48	0.242±0.48	0.559±0.37	0.076	0.091	0.027	0.908	0.784	0.690
Citraconic acid	0.815±0.09	-1.228±0.23	0.839±0.29	-0.427±0.24	0.003	0.952	0.016	0.010	0.120	0.051
Citric acid	-0.528±0.10	0.308±0.40	-0.574±0.61	0.794±0.48	0.175	0.955	0.091	0.383	0.559	0.225
Citrulline	-0.658±0.08	0.029±0.35	-0.286±0.65	0.916±0.47	0.194	0.668	0.054	0.745	0.282	0.288
Creatinine	-0.054±0.13	-0.250±0.29	1.206±0.51	-0.903±0.29	0.644	0.120	0.099	0.111	0.267	0.042
Cysteine	-0.942±0.10	0.140±0.83	0.229±0.24	0.573±0.18	0.351	0.021	0.004	0.937	0.699	0.404
Epsilon-caprolactam	0.338±0.09	-0.297±0.42	-0.368±0.80	0.327±0.50	0.292	0.514	0.987	0.952	0.478	0.580
Fumaric acid	-1.035±0.14	0.109±0.36	0.111±0.54	0.815±0.44	0.073	0.167	0.031	0.998	0.370	0.456
Galactose	0.087±0.08	0.510±0.57	0.410±0.62	-1.008±0.12	0.583	0.697	0.004	0.928	0.102	0.143
Glucoheptonic acid 2	-0.560±0.14	-0.015±0.26	-0.563±0.52	1.138±0.47	0.206	0.996	0.048	0.483	0.157	0.119
Gluconic acid	-0.788±0.25	0.657±0.59	-0.296±0.56	0.427±0.23	0.138	0.550	0.044	0.394	0.781	0.389
Gluconic acid lactone	-0.358±0.46	-0.300±0.57	0.549±0.19	0.108±0.69	0.952	0.209	0.670	0.311	0.728	0.642
Glucosaminic acid	-0.232±0.03	0.518±0.83	0.468±0.35	-0.754±0.19	0.503	0.181	0.087	0.966	0.290	0.066
Glucose	-0.567±0.10	-0.318±0.53	0.089±0.60	0.796±0.47	0.724	0.426	0.083	0.698	0.269	0.490

Glutamic acid	-0.293±0.09	0.924±0.17	0.461±0.17	-1.091±0.61	0.007	0.033	0.352	0.193	0.061	0.117
Glyceraldehyde	-0.353±0.36	-0.131±0.31	-0.148±0.72	0.632±0.55	0.723	0.845	0.286	0.987	0.376	0.518
Glyceric acid	-1.165±0.20	-0.006±0.43	0.492±0.37	0.679±0.41	0.119	0.033	0.030	0.517	0.402	0.797
Glycerol	-1.120±0.13	-0.040±0.35	0.324±0.44	0.836±0.45	0.078	0.060	0.027	0.624	0.281	0.543
Glycerol 1-phosphate	0.166±0.19	-1.253±0.23	1.250±0.01	-0.163±0.26	0.019	0.010	0.453	0.001	0.064	0.012
Glycine	-0.805±0.07	0.250±0.31	-0.513±0.51	1.068±0.40	0.052	0.669	0.019	0.355	0.254	0.117
Glycolic acid	-0.623±0.01	-0.600±0.02	-0.412±0.02	1.634±0.16	0.423	0.003	0.000	0.005	0.000	0.000
Heptadecanoic acid	-0.423±0.13	-0.196±0.13	0.888±0.74	-0.269±0.53	0.360	0.229	0.828	0.306	0.918	0.359
Histidine	-1.252±0.18	0.864±0.32	0.115±0.47	0.273±0.25	0.010	0.091	0.015	0.346	0.303	0.821
Hydroxyurea	1.119±0.17	-0.612±0.24	-0.827±0.57	0.320±0.07	0.009	0.056	0.024	0.791	0.039	0.179
Hypotaurine	-0.704±0.23	-0.029±0.52	0.050±0.58	0.684±0.49	0.390	0.381	0.103	0.938	0.461	0.532
Hypoxanthine	0.039±0.04	0.704±0.63	0.297±0.51	-1.040±0.08	0.438	0.702	0.001	0.703	0.088	0.103
Iminodiacetic acid	0.448±0.10	1.059±0.16	-1.119±0.15	-0.389±0.50	0.059	0.002	0.255	0.001	0.090	0.321
Isoleucine	-0.640±0.02	-0.253±0.31	0.173±0.71	0.720±0.53	0.369	0.402	0.106	0.676	0.267	0.641
Isomaltose	-1.038±0.16	-0.081±0.39	0.403±0.58	0.715±0.35	0.138	0.122	0.021	0.601	0.283	0.726
Itaconic acid	0.693±0.19	-1.253±0.15	0.483±0.53	0.078±0.35	0.003	0.775	0.277	0.061	0.045	0.629
Lactamide	-0.941±0.53	-0.130±0.17	0.326±0.22	0.744±0.59	0.296	0.144	0.157	0.250	0.310	0.617
Lactic acid	-0.595±0.23	0.601±0.23	-0.807±0.32	0.800±0.59	0.039	0.685	0.144	0.045	0.809	0.122
Lactose	0.172±0.02	0.076±0.33	0.739±0.76	-0.987±0.12	0.825	0.576	0.002	0.550	0.070	0.141
Lactulose	0.248±0.04	-0.030±0.28	0.804±0.75	-1.022±0.04	0.466	0.576	0.000	0.441	0.045	0.117
Lauric acid	0.128±0.13	-0.887±0.38	-0.301±0.24	1.059±0.58	0.105	0.269	0.269	0.344	0.083	0.152
Leucine	-0.683±0.04	-0.202±0.33	0.165±0.72	0.720±0.49	0.299	0.394	0.079	0.726	0.269	0.631
Linoleic acid	-0.626±0.04	-0.596±0.04	1.649±0.04	-0.426±0.04	0.669	0.000	0.038	0.000	0.058	0.000
Lysine	-0.604±0.04	0.080±0.29	-0.444±0.67	0.969±0.43	0.129	0.856	0.040	0.590	0.233	0.221
Lyxose	0.381±0.05	-0.390±0.36	-0.903±0.57	0.912±0.34	0.159	0.142	0.275	0.569	0.098	0.090
Lyxosylamine	-1.171±0.25	0.103±0.35	0.628±0.55	0.441±0.29	0.070	0.072	0.025	0.546	0.573	0.818
Malic acid	-0.974±0.12	0.277±0.43	0.068±0.64	0.630±0.38	0.084	0.260	0.029	0.835	0.641	0.568
Malonic acid	-0.858±0.08	0.006±0.44	-0.068±0.64	0.919±0.29	0.186	0.376	0.009	0.941	0.227	0.317

Maltose	-0.590±0.12	-0.291±0.55	0.038±0.59	0.844±0.43	0.685	0.440	0.058	0.755	0.253	0.416
Mannitol	-1.157±0.05	0.144±0.47	0.414±0.42	0.599±0.44	0.088	0.038	0.032	0.744	0.595	0.815
Methionine	-1.033±0.21	0.263±0.43	1.142±0.26	-0.372±0.24	0.095	0.006	0.170	0.232	0.356	0.026
Methyl Stearate	0.714±0.20	0.725±0.34	-1.278±0.17	-0.161±0.37	0.983	0.003	0.164	0.013	0.225	0.088
Methyl-beta-D-galactopyranoside	0.361±0.03	0.333±0.38	0.482±0.67	-1.176±0.09	0.956	0.890	0.000	0.883	0.035	0.116
Myo-inositol	-0.846±0.13	0.334±0.53	-0.089±0.47	0.601±0.55	0.153	0.277	0.104	0.652	0.789	0.480
Myristic acid	-0.405±0.04	-0.505±0.17	1.425±0.53	-0.515±0.10	0.659	0.048	0.446	0.046	0.967	0.042
N-acetyl-D-glucosamine	-0.361±0.03	-0.272±0.27	-0.528±0.45	1.161±0.58	0.804	0.778	0.098	0.712	0.141	0.133
N-acetyl-D-mannosamine	-1.136±0.43	0.068±0.42	0.382±0.41	0.686±0.23	0.180	0.104	0.038	0.685	0.356	0.624
Oleic acid	-0.629±0.02	-0.680±0.01	1.634±0.07	-0.324±0.08	0.069	0.000	0.038	0.000	0.023	0.000
O-phosphocolamine	0.058±0.06	0.088±0.25	-1.210±0.26	1.065±0.47	0.928	0.019	0.155	0.043	0.205	0.026
Ornithine	-1.041±0.02	0.201±0.50	0.704±0.65	0.136±0.11	0.112	0.092	0.001	0.641	0.923	0.518
Oxalacetic acid	-0.541±0.00	-0.538±0.00	-0.547±0.02	1.626±0.22	0.498	0.830	0.001	0.721	0.001	0.001
Oxalic acid	-0.182±0.10	-0.822±0.45	1.291±0.39	-0.287±0.20	0.321	0.040	0.729	0.044	0.426	0.042
Palatinose	-0.112±0.05	-0.049±0.30	0.978±0.76	-0.817±0.03	0.871	0.310	0.001	0.364	0.103	0.128
Palmitic acid	-0.729±0.11	-0.717±0.19	0.860±0.27	0.587±0.63	0.968	0.011	0.166	0.017	0.179	0.760
Pantothenic acid	-0.484±0.12	-0.239±0.68	0.119±0.71	0.604±0.14	0.787	0.529	0.009	0.780	0.379	0.612
Phenylalanine	-0.546±0.04	0.045±0.26	-0.494±0.60	0.995±0.53	0.145	0.946	0.078	0.537	0.262	0.203
Phenyl-beta-glucopyranoside	0.189±0.01	-0.083±0.21	0.871±0.77	-0.977±0.04	0.360	0.509	0.000	0.384	0.029	0.121
Phosphoric acid	-0.477±0.07	-0.186±0.20	-0.443±0.53	1.106±0.58	0.326	0.962	0.090	0.730	0.159	0.182
Porphine	-0.651±0.08	-0.337±0.08	-0.484±0.37	1.471±0.30	0.088	0.739	0.005	0.769	0.009	0.029
Proline	-0.736±0.05	1.295±0.28	-0.980±0.03	0.421±0.14	0.005	0.027	0.003	0.003	0.087	0.001
Pyridoxine	-0.902±0.08	-0.230±0.62	0.585±0.48	0.548±0.31	0.430	0.066	0.021	0.444	0.413	0.961
Pyroglutamic acid	-0.738±0.04	1.064±0.28	-0.867±0.25	0.541±0.42	0.007	0.697	0.067	0.014	0.443	0.077
Ribitol	-0.496±0.02	-0.211±0.07	-0.208±0.08	0.915±0.91	0.037	0.039	0.272	0.985	0.369	0.370
Sedoheptulose	-0.218±0.02	0.130±0.58	-0.687±0.67	0.775±0.24	0.649	0.601	0.027	0.494	0.445	0.170

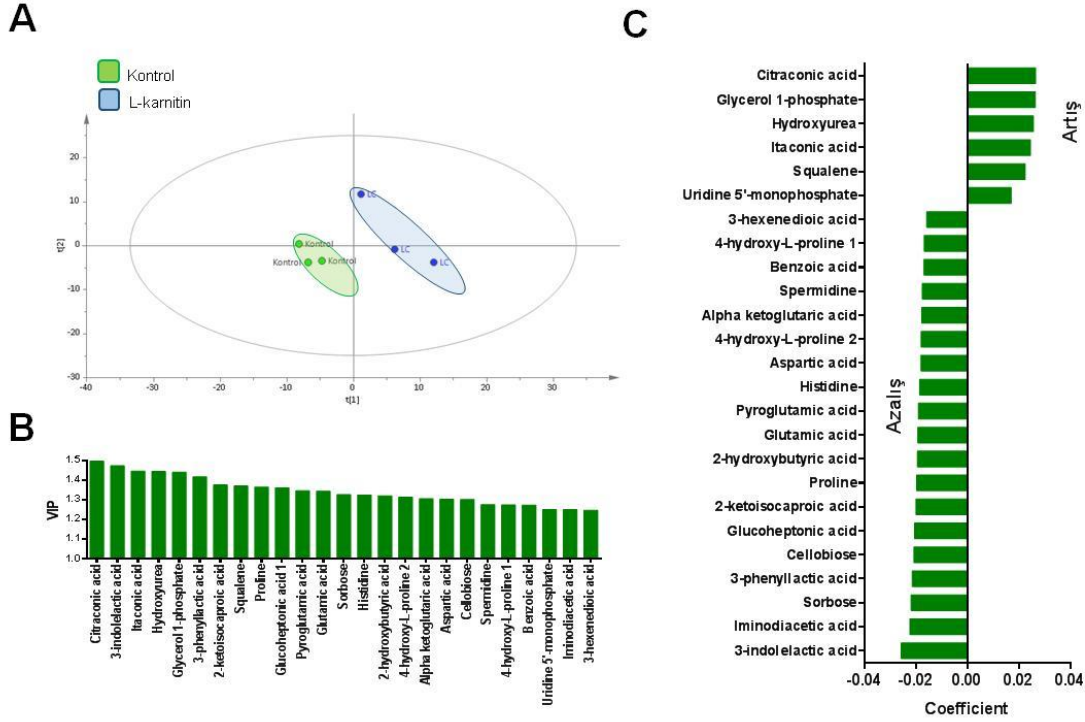
Serine	-0.383±0.06	-0.329±0.31	-0.065±0.78	0.777±0.48	0.895	0.755	0.123	0.809	0.189	0.494
Sophorose	-0.797±0.12	-0.037±0.47	0.174±0.72	0.660±0.30	0.273	0.341	0.022	0.852	0.369	0.640
Sorbitol	-0.427±0.38	0.807±0.46	0.134±0.68	-0.514±0.19	0.164	0.588	0.874	0.540	0.094	0.496
Sorbose	-1.003±0.03	0.519±0.32	0.714±0.46	-0.230±0.54	0.018	0.038	0.312	0.790	0.387	0.340
Spermidine	-0.218±0.20	1.058±0.18	-1.270±0.33	0.431±0.22	0.019	0.092	0.152	0.007	0.148	0.025
Squalene	-0.219±0.07	-0.751±0.06	-0.131±0.15	1.101±0.76	0.009	0.689	0.231	0.036	0.118	0.264
Stearic acid	-0.496±0.06	-0.300±0.18	0.089±0.41	0.708±0.86	0.454	0.311	0.317	0.518	0.401	0.623
Succinic acid	-1.205±0.14	-0.082±0.33	0.866±0.45	0.421±0.31	0.062	0.023	0.018	0.238	0.417	0.543
Sucrose	0.766±0.37	-0.237±0.32	0.731±0.10	-1.260±0.22	0.171	0.945	0.019	0.077	0.098	0.003
Tagatose	-0.673±0.05	-0.042±0.34	-0.344±0.40	1.059±0.61	0.211	0.544	0.083	0.665	0.270	0.193
Talose	-0.172±0.04	-0.675±0.80	0.132±0.40	0.715±0.27	0.637	0.572	0.058	0.504	0.252	0.381
Tartaric acid	0.003±0.13	-0.441±0.47	-0.320±0.63	0.758±0.55	0.496	0.702	0.336	0.905	0.247	0.351
Threitol	-1.151±0.15	0.274±0.42	0.324±0.51	0.553±0.41	0.059	0.084	0.032	0.954	0.716	0.787
Threonine	-1.237±0.18	0.166±0.48	0.640±0.46	0.431±0.15	0.091	0.037	0.004	0.595	0.691	0.745
Threose	-0.385±0.52	-0.017±0.61	0.986±0.23	-0.584±0.20	0.726	0.120	0.784	0.279	0.511	0.014
Trehalose	-0.624±0.07	-0.197±0.47	-0.006±0.59	0.827±0.53	0.505	0.445	0.090	0.847	0.302	0.438
Tryptophane	-1.002±0.14	0.552±0.41	0.378±0.71	0.072±0.19	0.044	0.197	0.021	0.871	0.437	0.752
Tyrosine	-0.594±0.10	0.078±0.31	-0.385±0.67	0.900±0.48	0.165	0.814	0.068	0.635	0.305	0.272
Uracil	-0.224±0.13	-0.160±0.27	-0.014±0.70	0.398±0.75	0.872	0.821	0.542	0.881	0.599	0.759
Urea	-1.243±0.16	0.112±0.46	0.826±0.40	0.306±0.23	0.085	0.017	0.010	0.391	0.772	0.406
Uridine 5'-monophosphate	0.991±0.24	-0.266±0.17	0.621±0.22	-1.347±0.07	0.025	0.402	0.002	0.057	0.008	0.002
Valine	-1.152±0.14	-0.017±0.43	0.855±0.49	0.313±0.26	0.108	0.032	0.015	0.334	0.617	0.467
Xanthine	-0.362±0.14	0.103±0.18	1.174±0.60	-0.916±0.14	0.178	0.112	0.088	0.236	0.024	0.051
Xylitol	-1.016±0.56	0.108±0.13	0.456±0.42	0.452±0.48	0.187	0.163	0.179	0.557	0.599	0.996

Kontrol, etkin madde ve etkin madde yüklü formülasyon gruplarından elde edilen metabolit veri setlerinde, herhangi bir sistematik hata olup olmadığının tespiti için, PLS-DA skrolama tekniği uygulanarak genel bir grafik üzerinde irdelenmiştir.



Şekil 4.20. A) Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait GC/MS yöntemiyle elde edilen metabolit düzeylerine ilişkin PLS-DA skrolama grafiği, B) Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarına ait GC/MS yöntemiyle elde edilen derişimi en yüksek 25 metabolite ilişkin VIP veri grafiği

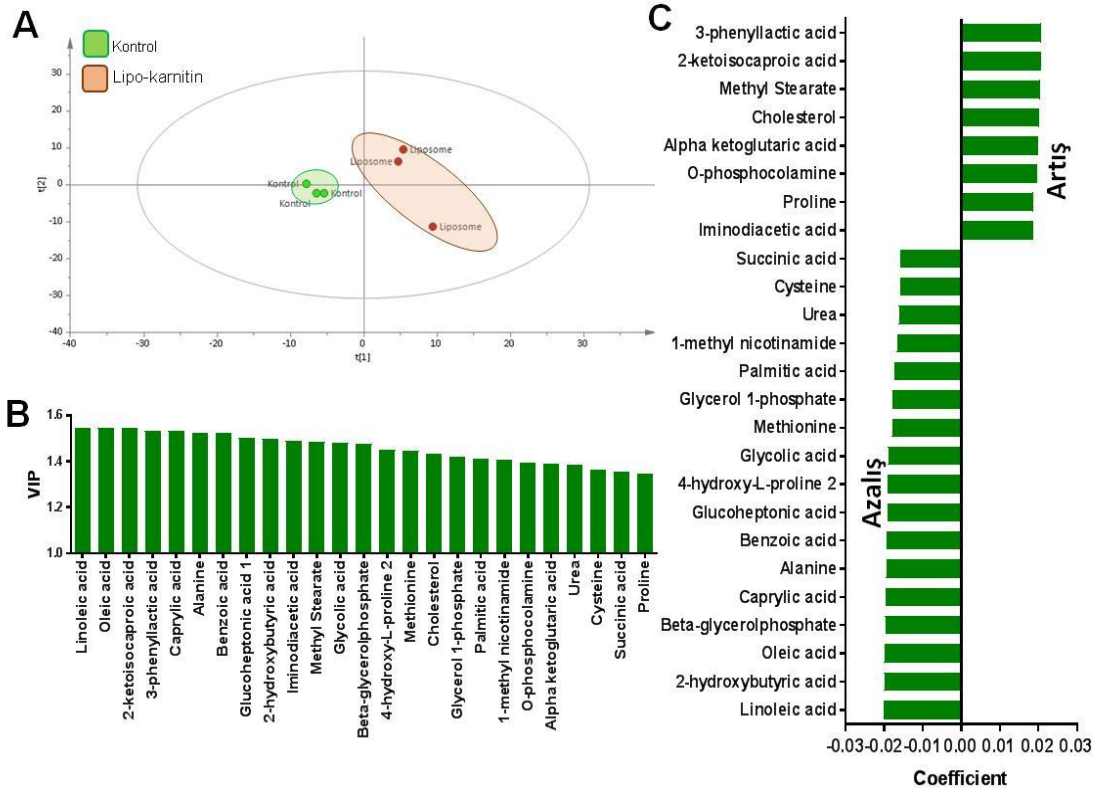
PLS-DA analizlerindeki (Şekil 4.20. A) gruplar arasında belirgin bir ayrışma olduğu tespit edilmiştir. Ayrımına neden olan metabolitler, VIP (variable important in project) grafiklerinde (Şekil 4.20. B) en yüksek VIP değerine sahip metabolitten (ayrımında en büyük etkiye sahip molekül) en düşüğe doğru sıralanarak belirtilmiştir.



Şekil 4.21. Kontrol ve L-karnitin gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) Kontrol grubuna göre L-karnitin grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.

Şekil 4.21. A'da PLS-DA analizi ile kontrol ve L-karnitin gruplarına ait bölgelerdeki metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir. Ayrım sağlayan metabolitler VIP grafikleriyle belirtilmiştir. VIP grafiklerinden belirteç olarak öne çıkan metabolitler miktarlara göre grafiklendirilmiş (Şekil 4.21. B), hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon katsayıları grafikleriyle gösterilmiştir (Şekil 4.21. C). Şekil 4.21. C'de yapılan regresyon analizi verilerine göre L-karnitin ile uyarılmış hücre hatlarıyla kontrol grubunun karşılaştırılması sonucunda; sırasıyla sitrakonik asit, gliserol 1-fosfat, hidroksiüre, itakonik asit, skualen, üridin 5-monofosfat

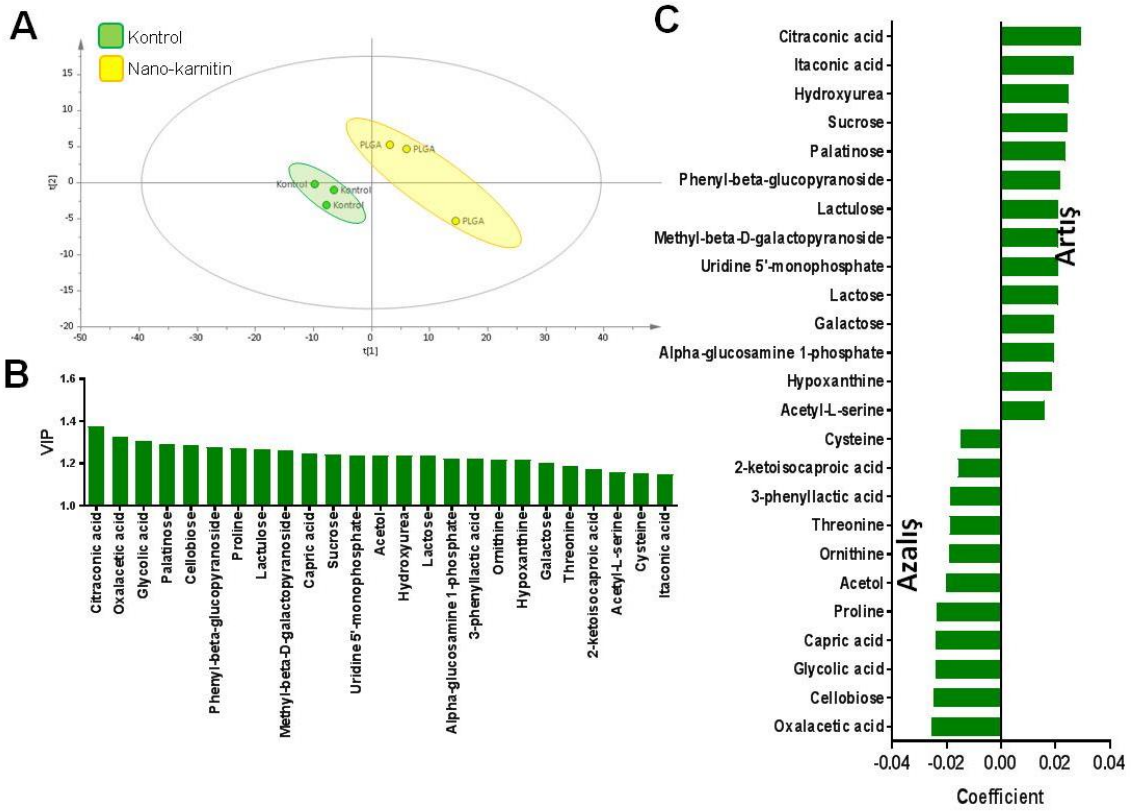
metabolitleri L-karnitin grubunda azalış gösterirken, sırasıyla 3-indolelaktik asit, iminodiasetik asit, sorboz, 3-fenillaktik asit, sellobiyoz, glukheptonik asit, 2-ketoizokaproik asit, prolin, 2-hidroksibütirik asit, glutamik asit, piroglutamik asit, histidin, arpartik asit, 4-hidroksi L-proline, alfaketoglutarik asit, spermidin, benzoik asit, 3-heksandioik asit L-karnitin grubunda artış göstermiştir.



Şekil 4.22. Kontrol ve Lipo-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Değişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) Kontrol grubuna göre Lipo-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.

Şekil 4.22. A'da PLS-DA analizi ile kontrol ve Lipo-karnitin gruplarına ait bölgelerdeki metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir. Ayrım sağlayan metabolitler VIP grafikleriyle belirtilmiştir. VIP grafiklerinden belirteç olarak öne çıkan metabolitler miktarlara göre grafiklendirilmiş (Şekil 4.22. B), hangi metabolitin değişiminin arttığı veya azaldığı regresyon katsayıları grafikleriyle gösterilmiştir (Şekil 4.22. C). Şekil

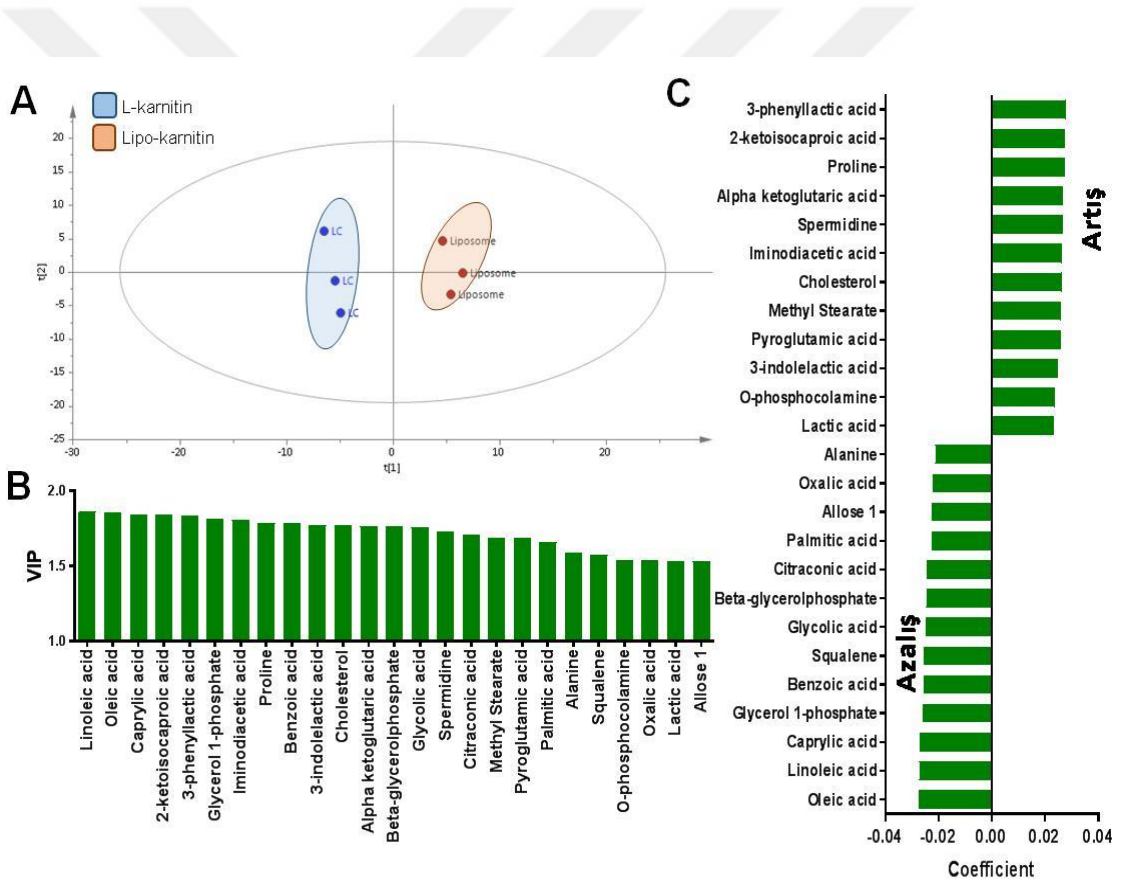
4.22. C'de yapılan regresyon analizi verilerine göre Lipo-karnitin formülasyonu ile uyarılmış hücre hatlarıyla kontrol grubunun karşılaştırılması sonucunda; sırasıyla 3-fenillaktik asit, 2-ketokaproik asit, metil stearat, kolesterol, alfa ketoglutarik asit, o-fosfokomalini prolin, iminodiasetik asit Lipo-karnitin formülasyonunda azalış gösterirken; linoleik asit, 2-hidroksibutirik asit, oleik asit, beta-gliserolfosfat, kaprilik asit, alanin, benzoik asit, glukohexpanik asit, 4-hidroksi-L-prolin, glikolik asit, metyonin, gliserol 1-fosfat, palmitik asit, 1-metil nikotamid, üre, sistein, süksinik asit Lipo-karnitin grubunda artış göstermiştir.



Şekil 4.23. Kontrol ve Nano-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Değişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) Kontrol grubuna göre Nano-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.

Şekil 4.23. A'da PLS-DA analizi ile kontrol ve Nano-karnitin gruplarına ait bölgelerdeki metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir. Ayrım sağlayan metabolitler VIP grafikleriyle belirtilmiştir. VIP

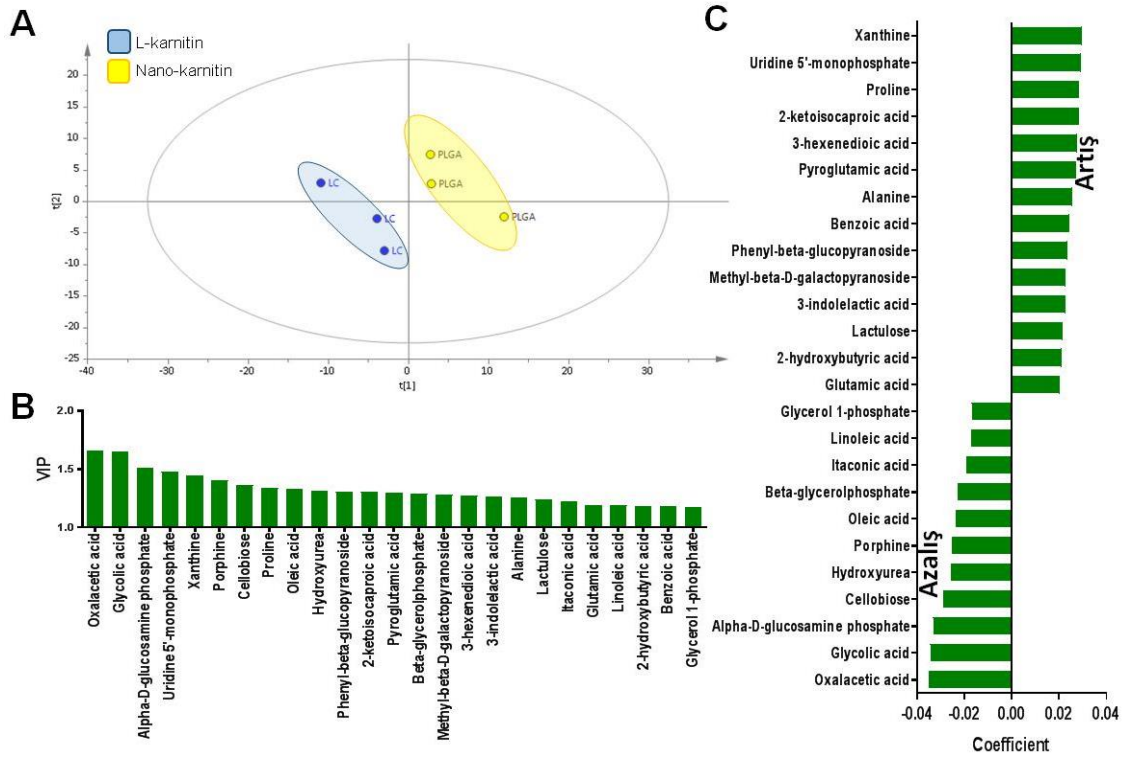
grafiklerinden belirteç olarak öne çıkan metabolitler miktarlara göre grafiklendirilmiş (Şekil 4.23. B), hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon katsayıları grafikleriyle gösterilmiştir (Şekil 4.23. C). Şekil 4.23. C'de yapılan regresyon analizi verilerine göre Nano-karnitin formülasyonu ile uyarılmış hücre hatlarıyla kontrol grubunun karşılaştırılması sonucunda; sitrakonik asit, itakonik asit, hidroksiüre, sukroz, palatinoz, fenil-beta-glukopiranozit, laktuloz, metil-beta-D-galaktopiranozit, üridin-5-monofosfat, laktoz, galaktoz, alfa-glukosamin 1- fosfat, hipoksantin, asetil-L-serin Nano-karnitin formülasyonunda azalış gösterirken; sistein, 2-ketoizokaproik asit, 3-fenillaktik asit, treonin, ornitin, asetol, prolin, kapri asit, glikolik asit, sellobiyoz, oksalaasetik asit Nano-karnitin grubunda artış göstermiştir.



Şekil 4.24. L-karnitin ve Lipo-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) L-karnitin grubuna göre Lipo-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.

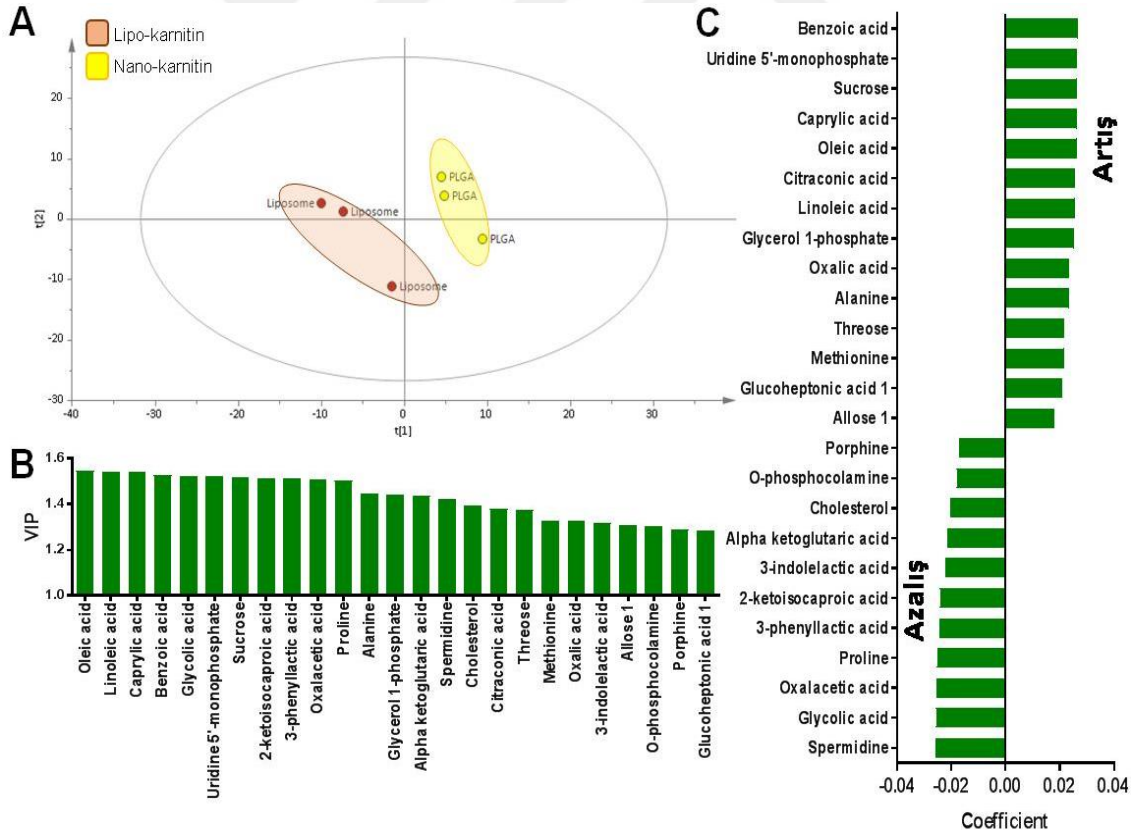
Şekil 4.24. A'da PLS-DA analizi ile L-karnitin ve Lipo-karnitin gruplarına ait bölgelerdeki metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı

gösterilmiştir. Ayrım sağlayan metabolitler VIP grafikleriyle belirtilmiştir. VIP grafiklerinden belirteç olarak öne çıkan metabolitler miktarlara göre grafiklendirilmiş (Şekil 4.24. B), hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon katsayıları grafikleriyle gösterilmiştir (Şekil 4.24. C). Şekil 4.24. C'de yapılan regresyon analizi verilerine göre Lipo-karnitin formülasyonu ile uyarılmış hücre hatlarıyla L-karnitin grubunun karşılaştırılması sonucunda; 3-fenillaktik asit, 2-ketoizokaproik asit, prolin, alfa ketoglukarik asit, spermidin, iminodiasetik asit, kolesterol, metil stearat, piroglutamik asit, 3-indilolaktik asit, o-fosfokaloamin ve laktik asit Lipo-karnitin fomülasyonunda azalış gösterirken; alanin oksalik asit, alloz, palmitik asit, sitrakonik asit, betagliserolfosfat, glikolik asit, skualen, benzoik asit, gliserol-1-fosfat, kaprilik asit, linolenik asit, oleik asit Lipo-karnitin grubunda artış göstermiştir.



Şekil 4.25. L-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25 metabolite ait VIP grafiği, C) L-karnitin grubuna göre Nano-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.

Şekil 4.25. A'da PLS-DA analizi ile L-karnitin ve Nano-karnitin gruplarına ait bölgelerdeki metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir. Ayrım sağlayan metabolitler VIP grafikleriyle belirtilmiştir. VIP grafiklerinden belirteç olarak öne çıkan metabolitler miktarlara göre grafiklendirilmiş (Şekil 4.25. B), hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon katsayıları grafikleriyle gösterilmiştir (Şekil 4.25. C). Şekil 4.25. C'de yapılan regresyon analizi verilerine göre Nano-karnitin formülasyonu ile uyarılmış hücre hatlarıyla L-karnitin grubunun karşılaştırılması sonucunda ksantin, üridin 5-monofosfat, prolin, 2-ketoizokaproik asit, piroglutamik asit, alanin, benzoik asit, fenil-beta-glukopiranzid, metil-beta-D-galaktopiranozid, 3-indilolaktik asit, laktulozi 2- hidroksibutirik asit, glutamik asit Nano-karnitin formülasyonunda azalış gösterirken; gliserol-1-fosfat, linoleik asit, itakonik asit, beta-gliserolfosfat, oleik asit, porpin, hidroksiüre, sellobiyoz, alfa-Dglukozamin fosfat, glikolik asit, oksalasetik asit Nano-karnitin grubunda artış göstermiştir.



Şekil 4.26. Lipo-karnitin formülasyonu ve Nano-karnitin formülasyonu gruplarına ait A) PLS-DA skor grafiği, B) Derişim bazında en fazla farklılığa sahip 25

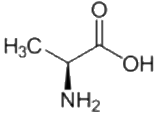
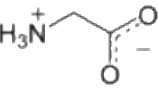
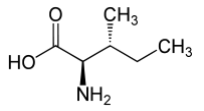
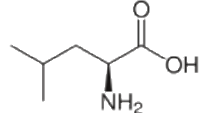
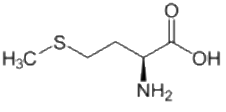
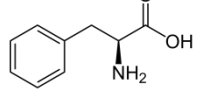
metabolite ait VIP grafiği, C) Lipo-karnitin grubuna göre Nano-karnitin formülasyonunu grubunda artan ve azalan metabolitlerin VIP regresyon grafiği.

Şekil 4.26. A'da PLS-DA analizi ile Lipo-karnitin ve Nano-karnitin gruplarına ait bölgelerdeki metabolit profilinin ayrılmasını sağlayan metabolitlerin varlığı gösterilmiştir. Ayrım sağlayan metabolitler VIP grafikleriyle belirtilmiştir. VIP grafiklerinden belirteç olarak öne çıkan metabolitler miktarlara göre grafiklendirilmiş (Şekil 4.26. B), hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon katsayıları grafikleriyle gösterilmiştir (Şekil 4.26. C). Şekil 4.26. C'de yapılan regresyon analizi verilerine göre Nano-karnitin formülasyonu ile uyarılmış hücre hatlarıyla Lipo-karnitin grubunun karşılaştırılması sonucunda benzoik asit, üridin 5-monofosfat, sukroz, kaprilik asit, oleik asit, sitrakonik asit, linoleik asit, gliserol 1-fosfat, oksalik asit, alanin, teroz, metiyonin, glukohেptonik asit, alkoz Nano-karnitin formülasyonunda azalış gösterirken; porpin, o-fosfokolamin, kolesterol, alfa ketoglutarik asit, 3-indilolaktik asit, 2-ketoizokaproik asit, 3-fenillaktik asit, prolin, oksalasetik asit, glikolik asit, spermidin Nano-karnitin formülasyonunda artış göstermiştir.

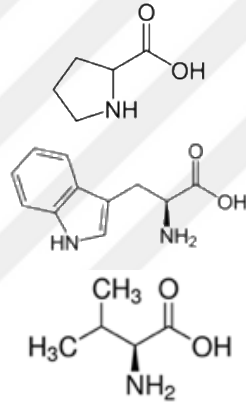
Bu bilgiler iŐıđında saptanan metabolitlerin hangi metabolizmalar üzerinde etkili olduklarının değerlendirilebilmesi için; amino asit, karbonhidrat ve lipit metabolizmalarına ait metabolitler ve metabolitlerin gruplar içerisindeki farklılaşma oranları aşağıdaki çizelgelerde sınıflandırılmıŐ, elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Amino asit Metabolizması

Çizelge 4.22. Amino asit Metabolizması-1'de Etkili olan Metabolitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri

Amino asit Metabolizması-1	Moleküler Yapı	Amino asit Adı	Kontrol	L-karnitin	Lipo-karnitin	Nano-karnitin
Apolar yan zincire sahip amino asitler		Alanin	-0.583±0.12	0.236±0.27	1.321±0.06	-0.973±0.32
		Glisin	-0.805±0.07	0.250±0.31	-0.513±0.51	1.068±0.40
		Izolösin	-0.640±0.02	-0.253±0.31	0.173±0.71	0.720±0.53
		Lösin	-0.683±0.04	-0.202±0.33	0.165±0.72	0.720±0.49
		Metiyonin	-1.033±0.21	0.263±0.43	1.142±0.26	-0.372±0.24
		Fenilalanin	-0.546±0.04	0.045±0.26	-0.494±0.60	0.995±0.53

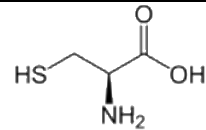
Polar yan zincire sahip amino asitler



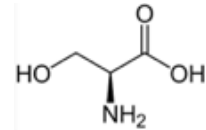
Prolin -0.736 ± 0.05 1.295 ± 0.28 -0.980 ± 0.03 0.421 ± 0.14

Triptofan -1.002 ± 0.14 0.552 ± 0.41 0.378 ± 0.71 0.072 ± 0.19

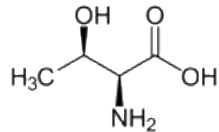
Valin -1.152 ± 0.14 -0.017 ± 0.43 0.855 ± 0.49 0.313 ± 0.26



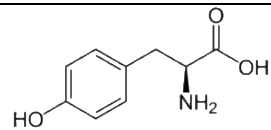
Sistein -0.942 ± 0.10 0.140 ± 0.83 0.229 ± 0.24 0.573 ± 0.18



Serin -0.383 ± 0.06 -0.329 ± 0.31 -0.065 ± 0.78 0.777 ± 0.48

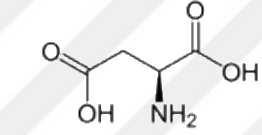


Treonin -1.237 ± 0.18 0.166 ± 0.48 0.640 ± 0.46 0.431 ± 0.15

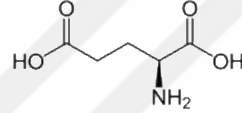


Tirozin -0.594 ± 0.10 0.078 ± 0.31 -0.385 ± 0.67 0.900 ± 0.48

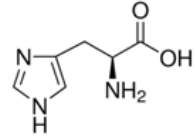
Yüklü yan zincire sahip amino
asitler



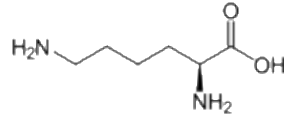
Aspartik asit -0.870±0.04 0.534±0.27 -0.013±0.70 0.349±0.52



Glutamik asit -0.293±0.09 0.924±0.17 0.461±0.17 -1.091±0.61



Histidin -1.252±0.18 0.864±0.32 0.115±0.47 0.273±0.25

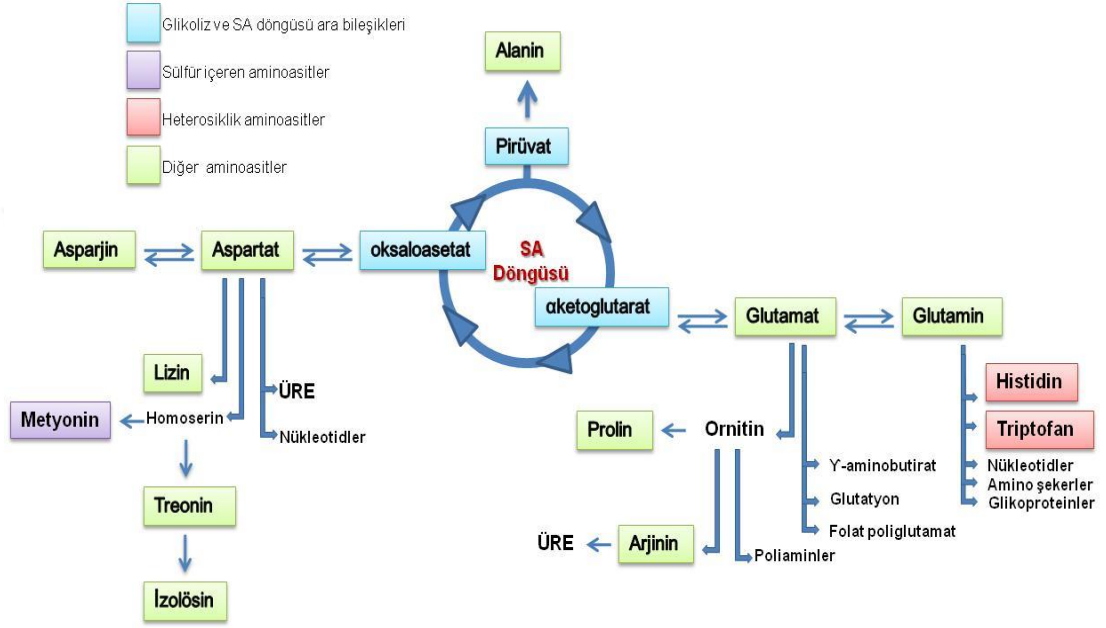


Lizin -0.604±0.04 0.080±0.29 -0.444±0.67 0.969±0.43

Çizelge 4.23. Amino asit Metabolizması-2'de Yer Alan Amino asitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri

Amino asit Metabolizması-2	Bileşik Adı	Kontrol	L-karnitin	Lipo-karnitin	Nano-karnitin
Amino asit metabolizmasında yer alan bileşikler	2-hidroksibütirat	-0.966±0.15	0.761±0.28	0.911±0.15	-0.706±0.39
	3-indollaktik asit	-0.769±0.12	1.394±0.25	-0.813±0.15	0.188±0.21
	3-fenillaktik asit	-0.714±0.02	0.983±0.16	-1.142±0.02	0.873±0.12
	2-ketoizokaproik asit	-0.208±0.02	0.955±0.15	-1.450±0.05	0.703±0.11
	4-hidroksi-L-prolin	-1.230±0.14	0.657±0.32	0.858±0.29	-0.284±0.31

Amino asitler vücutta veya hücrelerde depo edilmemektedir. Ancak hipotetik bir amino asit havuzunun metabolizmadaki varlığı varsayılmaktadır. Hücreler kendi amino asit havuzlarını, beslenme sırasında diyet ile gelen amino asitlerden veya kullanılmayan proteinlerin degradasyonu yoluyla açığa çıkan amino asitlerden oluştururlar. Bu hipotetik havuzun içeriğini, havuza giren ya da kullanılarak havuzdan çıkan amino asitler belirler. Bu nedenle, havuzun içeriği oldukça değişkendir.



Şekil 4.27. Amino asit metabolizması şematik gösterimi.

Tez kapsamında model ilaç olarak seçilen L-karnitin, endojen olarak lizin aminoasidinden sentezlenen bir amino asittir ve bu nedenle hipotetik amino asit havuzunun içeriğini etkilemesi beklenmektedir. Çalışmamızda kontrol amaçlı kullanılan L-karnitin çözeltisi ile Lipo-karnitin ve Nano-karnitin kodlu formülasyonların amino asit düzeylerinde artışa yol açtığı belirlenmiştir (Çizelge 4.22. ve Çizelge 4.23.).

Amino asitlerin taşıdıkları yan zincirlerin yapısı göz önüne alınarak (apolar, polar veya yüklü); genel olarak Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarının, apolar yan zincire sahip amino asit düzeylerinde çözelti formuna kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur. Şekil 4.27.'de görüldüğü üzere

Aspartat yolağı sonucunda ortaya çıkan Metiyonin ve treonin amino asitlerinin düzeyinin arttırılmasında en etkili grubun Lipo-karnitin formülasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu etkiyi doğrular nitelikte; bu amino asitlerin her ikisinde katabolizma ürünü olan 2-hidroksibütirat düzeyinin, yine Lipo-karnitin formülasyonu ile diğer iki gruba kıyasla daha fazla arttığı tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışıkında, bu amino asitlerin Lipo-karnitin etkisi ile yapımının arttığı, buna paralel olarak da katabolizmasının arttığı sonucuna varılmıştır.

Polar yan zincire sahip amino asit düzeylerinin artışında ise en etkili formülasyonun Nano-karnitin formülasyonu olduğu saptanmıştır.

Nano-karnitin formülasyonunun fenilalanin anabolizmasını arttırmada, Lipo-karnitin formülasyonunun ise 3-fenillaktik asit oluşumunu dolayısıyla fenilalanin katabolizmasını inhibe etmede etkin oldukları saptanmıştır.

Çizelge 4.23.'te görüldüğü üzere, 2-ketoizokaproik asit Lipo-karnitin formülasyonunda anlamlı derecede düşüş göstermiş, Nano-karnitin formülasyonunda ise etkin biçimde artış göstermiştir. 2-ketoizokaproik asit, lösin amino asitinin metabolizmasında yer alan bir ara bileşiktir. Dolayısıyla, Nano-karnitin formülasyonunun lösin anabolizmasını en etkin şekilde arttırdığı, Lipo-karnitin formülasyonunun ise katabolizmasını en etkin şekilde azalttığı sonucuna varılmıştır.

Prolin ve prolinin posttranslasyonel modifikasyonu sırasında prolin hidroksilaz enzim aktivitesi ile oluşan hidroksi prolin, glisin amino asiti ile beraber, ekstraselüler matriksin temel bileşeni olan kollajen yapısında yer alan yapı taşlarıdır. Serbest L-karnitin ve formülasyonların, kollajen sentezi üzerine etkinliği karşılaştırıldığında ise, her bir grubun kollajenin farklı yapı taşları üzerinde daha etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Serbest L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarının sırasıyla prolin, 4-hidroksi-L-prolin ve glisin amino asit düzeyini arttırmada etkin oldukları belirlenmiştir.

Karbonhidrat Metabolizması

Çizelge 4.24. Karbonhidrat Metabolizmasında Etkili olan Metabolitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri

Karbonhidrat Metabolizması		Kontrol	L-karnitin	Lipo-karnitin	Nano-karnitin
Monosakkaritler	Glukoz	-0.567±0.10	-0.318±0.53	0.089±0.60	0.796±0.47
	Galaktoz	0.087±0.08	0.510±0.57	0.410±0.62	-1.008±0.12
Disakkaritler	Maltoz	-0.590±0.12	-0.291±0.55	0.038±0.59	0.844±0.43
	Laktoz	0.172±0.02	0.076±0.33	0.739±0.76	-0.987±0.12
Fermentasyon	Laktik asit	-0.595±0.23	0.601±0.23	-0.807±0.32	0.800±0.59
	Sitrik asit	-0.528±0.10	0.308±0.40	-0.574±0.61	0.794±0.48
Sitrik Asit Döngüsü	Akonitik asit	-1.144±0.18	0.343±0.48	0.242±0.48	0.559±0.37
	αketoglutarat	-0.347±0.06	0.911±0.23	-1.321±0.20	0.758±0.19
	Süksinik asit	-1.205±0.14	-0.082±0.33	0.866±0.45	0.421±0.31
	Fumarik asit	-1.035±0.14	0.109±0.36	0.111±0.54	0.815±0.44
	Malik asit	-0.974±0.12	0.277±0.43	0.068±0.64	0.630±0.38
	Okzaloasetik asit	-0.541±0.00	-0.538±0.00	-0.547±0.02	1.626±0.22

Hücreler yeteri kadar oksijen olmayan ortamda oksijensiz solunum yaparak yalnızca karbohidratları okside etmek suretiyle enerji elde edebilirler. Bu solunum sırasında glukoz, glikoliz ile okside olur ve yolakta açığa çıkan H^+ iyonları, NAD^+ 'lara aktarılır. Dolayısıyla NAD^+ 'lar ortamda $NADH+H^+$ konumunda redükte formda bulunurlar. Hücrenin NAD^+ havuzu sınırlı olduğundan glikolizin devam edebilmesi için $NADH$ 'ların tekrar okside forma dönmesi gerekir, ki bu durum insan hücrelerinde laktik asit fermentasyonu ile mümkün olmaktadır.

L-karnitin ise yağ oksidasyonu yolu ile enerji elde edilebilmesi için yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasında görev yapar. Dolayısıyla yağ asitlerinden enerji elde edebilmesi için oksijene ihtiyacı vardır. Yağ asitlerinin β -oksidasyonu sırasında ise, glikoliz ve laktik asit fermentasyonu gerçekleşmez. Bunun yerine yağ asitleri mitokondride asetil-KoA'ya kadar parçalanır ve oluşan asetil-KoA'lar, sitrik asit (SA) döngüsüne girerek okside olurlar. Dolayısıyla yağ oksidasyonunun gerçekleştiği bir hücrede laktik asit düzeyinin azalması, glikoliz prekürsörleri olan karbohidratların tüketilmiyor olması ve SA döngüsü ara bileşenlerinin düzeyinde ise artış olması beklenmektedir. SA döngüsü amfibolik bir yol olup ara bileşenleri yapım ya da yıkım yollarına gidebilir. Bu nedenle metabolomik çalışmalarda SA döngüsünü yorumlayabilmek için döngünün ara ürünlerinin dahil olduğu bütün yollar göz önünde bulundurulmalıdır.

Çizelge 4.24.'te görüldüğü üzere, monosakkaritlerden glukoz düzeyi kontrole kıyasla, serbest L-karnitin ve L-karnitin yüklü formülasyonlar ile uyarılan hücrelerde artmış, en fazla etki ise Nano-karnitin formülasyonunda gözlenmiştir. Glukozun glikozidik bağ ile bağlanması sonucu oluşan maltoz düzeyinde ise benzer şekilde, Nano-karnitin formülasyonu ile en yüksek artış saptanmıştır. SA döngüsü için elde edilen metabolomik profillerden Nano-karnitin formülasyonunun α -ketoglutarat hariç diğer SA döngüsü ara ürünlerini arttırmada en etkili formülasyon olduğu saptanmıştır. α -ketoglutarat düzeyini arttırmada ise, serbest L-karnitinden sonra ikinci en etkili formülasyonun yine Nano-karnitin olduğu bulunmuştur.

Lipit Metabolizması

Çizelge 4.25. Lipit Metabolizmasında Etkili olan Metabolitlerin Normalize Edilmiş Pik Alan Değerleri

Lipit metabolizması	Molekül Adı	Kontrol	L-karnitin	Lipo-karnitin	Nano-karnitin
Doymuş yağ asitleri	Laurik asit 12:0	0.128±0.13	-0.887±0.38	-0.301±0.24	1.059±0.58
	Palmitik asit 16:0	-0.729±0.11	-0.717±0.19	0.860±0.27	0.587±0.63
	Stearik asit 18:0	-0.496±0.06	-0.300±0.18	0.089±0.41	0.708±0.86
Doymamış yağ asitleri	Oleik asit 18:1 ^{Δ9}	-0.629±0.02	-0.680±0.01	1.634±0.07	-0.324±0.08
	Linoleik asit 18:2 ^{Δ9,12}	-0.626±0.04	-0.596±0.04	1.649±0.04	-0.426±0.04
	Kolesterol	0.001±0.13	0.509±0.13	-1.418±0.22	0.908±0.33
	Skualen	-0.219±0.07	-0.751±0.06	-0.131±0.15	1.101±0.76

Fizyolojik şartlarda serbest yağ asitlerinin yer aldığı farklı metabolik yollar (triasil gliserol sentezi, lipoprotein sentezi, steroid sentezi ve biyolojik membranların yapısında yer almak) bulunmaktadır. Ancak her metabolik yol her hücrede meydana gelmemektedir. Örneğin triasil gliserol sentezi adipoz dokuya özgü iken; lipoprotein sentezi enterosit ve hepatositlerde baskın yoldur. Bu nedenle bütün metabolik yollarda olduğu gibi lipid metabolizmasını da yorumlayabilmek için çalışılan hücrenin özelliklerine göre yorum yapmak gerekmektedir. Bu tez kapsamında kullanılan hücreler kardiyak fibroblastlar olduğundan lipid metabolizması açısından etkin olan yollar biyolojik membran sentezi, kolesterol sentezi ve yağ asitlerinin β -oksidasyonudur.

Doymamış yağ asitleri yapılarında bir veya daha fazla sayıda çift bağ taşırlar ve oda sıcaklığında sıvı halde bulunurlar. Doymamış yağ asitlerinin membran yapısında yer alması, membranın sıvı mozaik modele uygun şekilde akışkan olmasını ve fizyolojik fonksiyonlarını etkin şekilde yerine getirmesini sağlar. Doymuş yağ asitleri ise bunun aksine biyolojik membranların akışkanlığını bozarlar, membranın daha katı hal almasına yol açarak fizyolojik fonksiyonunu engellerler. Ayrıca doymuş yağ asitleri kolesterol yapımını artırırlar. Formülasyonların doymuş yağ asitleri ve doymamış yağ asitleri üzerine etkileri ayrı ayrı incelendiğinde, Lipo-karnitin formülasyonunun daha etkili olmak üzere Nano-karnitin formülasyonunun da özellikle doymamış yağ asiti düzeyinde artışa neden oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.25.). Serbest L-karnitin ise doymamış yağ asitleri üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Çizelge 4.25.'te görüldüğü üzere, Lipo-karnitin formülasyonu ile doymamış yağ asidi miktarı artmakla kalmamış, kolesterol miktarı da anlamlı derecede düşmüştür ($p < 0.05$). Skualen, kolesterol sentez basamağında yer alan izopren birimlerinin kondenzasyonu sonucu meydana gelen 15 karbonlu 2 molekül farnesil pirofosfatın bir araya gelmesi ile oluşur. Sonuçta skualen, kolesterolün sahip olduğu 30 karbonluk karbon iskeletinin temelini oluşturur. Çalışmamızda, Nano-karnitin formülasyonunun hem kolesterol hem de skualen düzeylerini paralel olarak arttırmış olması, skualenlerin kolesterol sentezine yönlendirilmesine dayandırılmıştır.

4.10.2. Yolak Analizi Sonuçları

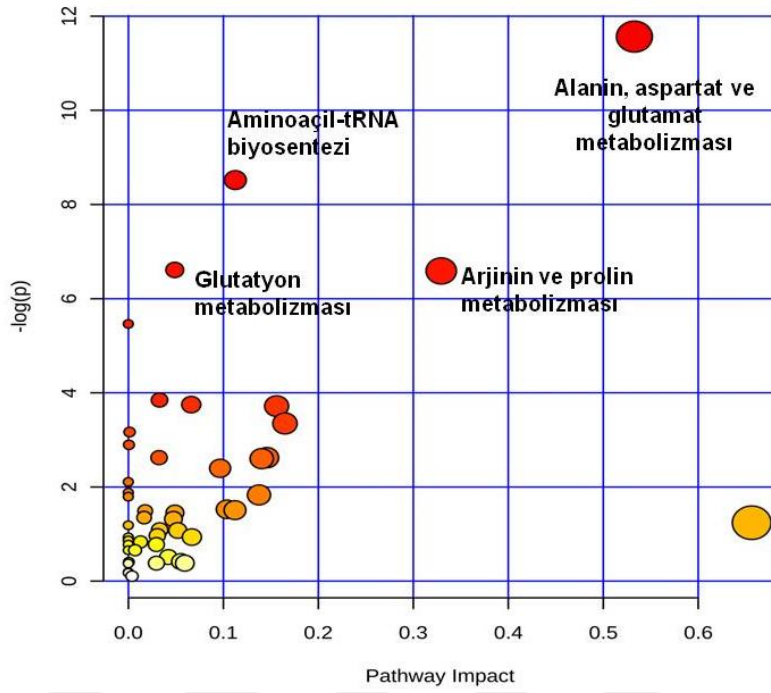
Metabolom profillerinde hem *t*-testleri hem de anova analizleri sonucunda anlamlı fark bulunan ($p < 0,05$) metabolitlerin yolak analizleri değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda tanımlanan metabolitler birçok yolakla ilişkili olmasına rağmen istatistiksel ($p < 0,05$) olarak anlamlı bulunan yolaklar Çizelge 4.26.'da sunulmuştur. Çizelge 4.26.'da eşleşme durumuna ait sütunda alanin, aspartat ve glutamamat metabolizması için 24 adet metabolit bulunduğu bunlardan 6 tanesinin, aynı şekilde aminoasit-tRNA biyosentezi için 75 adet metabolit bulunduğu ve 8 tanesinin, glutatyon metabolizması için 38 adet metabolit bulunduğu bunlardan 5 tanesinin, arjinin ve prolin metabolizması için ise 77 metabolit bulunduğu bunlardan 7 tanesinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bilgisi yer almaktadır.

Çizelge 4.26. Tanımlanan Metabolitlerin İlişkili Oldukları Biyokimyasal Yolaklar

Yolak Adı	Eşleşme Durumu	p değeri	FDR	Etki değeri
1 Alanin, aspartat ve glutamat metabolizması	6/24	$9.49e^{-6}$	$7.59e^{-6}$	0.5328
2 Aminoasit-tRNA biyosentezi	8/75	$1.99e^{-4}$	0.008	0.1127
3 Glutatyon metabolizması	5/38	0.001	0.028	0.0490
4 Arjinin ve prolin metabolizması	7/77	0.001	0.028	0.3294

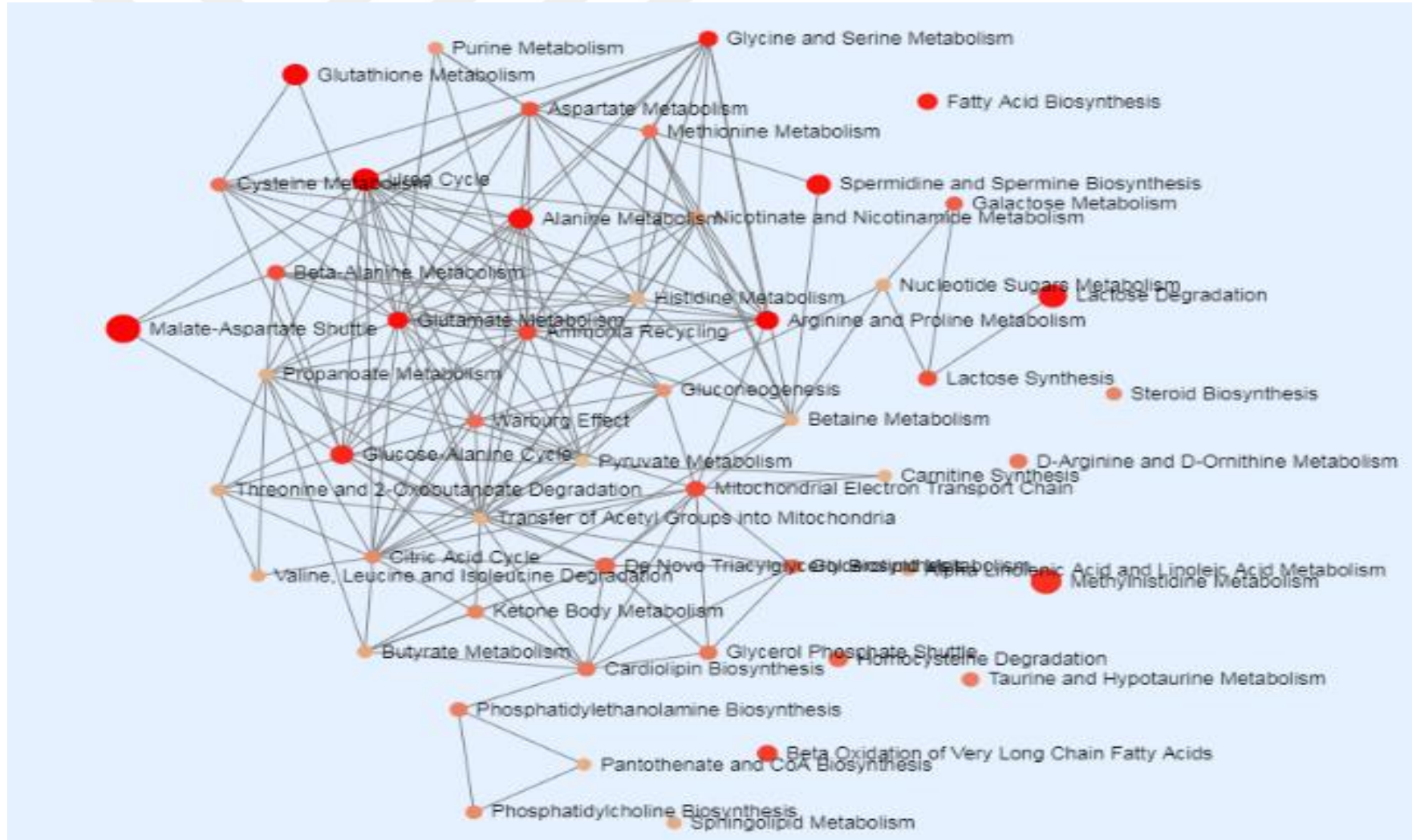
VIP skoruna sahip metabolitlerle ilişkili olan yolaklar analiz edildiğinde alanin, aspartat ve glutamat metabolizması, aminoasit-tRNA biyosentezi, glutatyon metabolizması ve arjinin-prolin metabolizmasıyla anlamlı derecede ilişkili oldukları bulunmuştur.

Metabolom profillemesinde anlamlı fark olan metabolit setlerinin ilişkili olduğu yolakların etki grafiği çizilmiştir (Şekil 4.28.), kırmızı noktaların büyüklüğü etki sırasını belirtmektedir.



Şekil 4.28. Yolak analizine ait metabolitlerin etki grafiği

Şekil 4. 27.'de belirtilen aminoasit metabolizması gözönüne alındığında, sitrik asit döngüsü ara bileşenlerinden α -ketoglutarat'ın glutasyon ve arjinin, prolin metabolizmalarıyla, oksaloasetik asitin ise aspartat asparjin metabolizmalarıyla ilişkili olduğu açıkça görülmektedir. Metabolomik analizlerde, metabolitlerin anlık düzeyleri hakkında bilgi aldığımız gerçeği ışığında, Çizelge 4.24. karbonhidrat metabolizması incelenir ise Lipo-karnitin formülasyonunun α -ketoglutarat düzeyinde anlamlı derece düşüşe sebep olması, bu bileşiğin fazlaca sentezlenmesi sonucu ilişkili olduğu yolakları harekete geçirdiğini göstermektedir. Oksaloasetik asitin ise Nano-karnitin formülasyonunda anlık düzeyinin anlamlı dercede artış göstermesi yine aynı şekilde bu bileşiğin bağlı olduğu yolakları (aspartat asparjin metabolizmaları) harekete geçirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.29. Kontrol, L-karnitin, Lipo-karnitin ve Nano-karnitin kardiyak hücre hatlarında etkileşen yollar

Şekil 4.29.'da kardiyak hücre hatlarında etkileşen yolaklar işaretli noktaların büyüklükleriyle doğru orantılı olarak etki sıralarıyla belirtilmiştir. Grafik üzerinde glutatyon metabolizması, üre döngüsü, uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonu, metilhistidin metabolizması, malat aspartat mekiği, spermin ve spermidin biyosentezi vb. mekanizmalarının etkili olduğu görülmektedir. Spermin ve spermidin biyosentezi hücrenin bölünmeye hazırlandığının bir göstergesidir [85]. Şekil 4.28.'de belirtilen etkili yolakların istatikselsel olarak en anlamlı 4 tanesi Çizelge 4.27.'de detaylandırılmıştır.

Çizelge 4.27. Hücre Hatlarında İstatikselsel Olarak Önemli Değişen Metabolitlerin Yer Aldıkları Yolaklar

Metabolit Seti	Toplam	Anlamlı bulunan metabolit sayısı	Beklenti	p değeri
Üre Döngüsü	29	6	1.7	0.00518
Arjinin ve Prolin Metabolizması	53	8	3.11	0.00948
Malat-Aspartat Mekiği	10	3	0.586	0.0171
Glutatyon Metabolizması	21	4	1.23	0.0301

Çizelge 4.27.'de, glutatyon metabolizmasının, arjinin prolin metabolizmasının, malat aspartat mekiğinin aktive olduğu görülmektedir. Şekil 4.27. aminoasit metabolizması incelendiğinde, hem aspartat bileşiği üzerinden hem de glutamat, ornitin, arjinin bileşikleri üzerinden üre oluştuğu görülmektedir. Bu durumda üre döngüsünün aktive olması ve istatikselsel olarak anlamlı derecede öne çıkması etkili olan diğer metabolizmaların sonucunu da destekleyen bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

5. YORUM

Bu tez kapsamında, polimer ve lipit bazlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin, salım mekanizmalarının ve hücre düzeyindeki farklı etkinliklerinin metabolomik düzeyde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Model ilaç olarak; gerek teknolojik gelişime, gerekse yaşam standartlarının değişimine paralel olarak ortaya çıkan obezite/bölgesel yağlanma ve sporcularda kas yapımını artıran takviyelerin bilinçsizce kullanılması gibi günümüz problemlerine çözüm olabilecek L-karnitin seçilmiştir. L-karnitin'in en önemli kaynakları, kırmızı et ve süt ürünleridir. Günümüzde hayvanların yeterince ve doğal beslenememesi, suni yemleme ve seri üretimin artışı, yiyeceklerle alınan L-karnitin'in vücuttaki miktarının yetersiz kalmasına sebep olmakta, buna bağlı olarak obezite oranları artmaktadır. Bu sebeple L-karnitin, sporcular ve kilo kontrolü isteyen kişiler tarafından sıklıkla takviye olarak alınmaktadır. Ancak, L-karnitin'in düşük biyoyararlanıma sahip olması (%14-18), vücutta depolanamaması ve yarılanma ömrünün kısa olması (30-60 dk) nedeniyle, etkin tedavi sağlanabilmesi için sık doz uygulama gerektirmektedir. Ayrıca, L-karnitin'in Avrupa ve Amerikan Farmakope Monograflarında tanımlı impüriteleri bulunmaktadır. Bu nedenle, içerisinde safsızlık varlığı bilinen L-karnitin'in yüksek miktarda ve sık aralıklarla uygulanması toksik ve yan etkileri arttıracığından, kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesi kaçınılmazdır [43, 86]. Taşıyıcı sistemler olarak nanolipozom (lipit bazlı) ve PLGA nanopartiküller (polimer bazlı) ile çalışılmış, formülasyon etkinliklerini değerlendirmek için *in-vitro* salım profilleri incelenmiş ve hücre kültürü deneyleriyle hücrelerde biriken metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak teşhis ve tayini yapılmıştır [19, 34, 36, 87]. Bu doğrultuda;

- **İlk aşamada;** etkin madde miktar tayini çalışmaları ve analitik yöntem validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen HPLC yönteminin özgünlük, doğrusallık, doğruluk, geri elde edilebilirlik ve kesinlik kriterlerini karşıladığı ispatlanmıştır.

➤ **İkinci aşamada;** formülasyon ve yöntem optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Farklı lipit türevlerinin ve konsantrasyonlarının, formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkilerini gözlemek amacıyla, iki farklı lipit türevi (Lipoid S100 ve Fosfolipon 90G) ve farklı oranları (50, 100, 500 mg) kullanılarak nanolipozomlar hazırlanmıştır. Lipit konsantrasyonu arttıkça partikül büyüklüğü'nün arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Nanolipozomların partikül büyüklüğü dağılımının homojen (monodispers) olduğu gözlenmiştir. Hazırlanan nanolipozomların ZP'sinin belirlenmesi sistemin dayanıklılığı hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Çalışmamızda, kullandığımız lipitlerin anyonik/katyonik karakterde olmaması nedeniyle nanolipozomların ZP değerleri yüksek negatif/pozitif bir değer göstermemiş olup, elde edilen sonuçların nötral nanolipozomlar ile yapılan çalışmalara uyumlu olduğu bulunmuştur [74, 76]. Enkapsülasyon etkinliğini arttırmak için hazırlama aşamasında yüzey aktif ajan olarak Tween 80 ilave edilmiş ve L-karnitin miktarının arttığı gözlenmiştir. Ortama eklenen Tween 80, nanolipozomların hidrofilik kısımlarıyla hidrojen bağı oluşturup, nanolipozom yapısında bulunan fosfolipitlerin arasındaki esnekliği artırarak, yüzey geriliminin azaltılmasına yardımcı olur ve sonuç olarak etkin maddenin nanolipozom içerisine enkapsüle olma verimi ve dayanımı yükselir [88].

Nanopartikül formülasyon çalışmaları kapsamında ise; farklı polimer konsantrasyonlarının, formülasyon karakterizasyon parametreleri üzerine etkilerini gözlemek amacıyla, PLGA'nın farklı oranları (5, 10, 15 mg) kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır. Ayrıca, farklı yöntemlerin (nanoçöktürme ve çift emülsiyon oluşturma) enkapsülasyon kapasitesi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan polimer bazlı formülasyonlarda enkapsülasyon gözlenmezken, çift emülsiyon yöntemiyle ~%25 enkapsülasyon etkinliği değerine ulaşılmıştır. Bu durum, hidrofilik ilaçların nanoçöktürme yöntemiyle de enkapsüle edilebilmelerine rağmen [89, 90], emülsiyon yöntemiyle daha etkin bir şekilde enkapsüle edildiği bilgisiyle örtüşmektedir [91, 92]. Emülsiyon oluşturma yönteminde ortama eklenen Pluronic F68 yüzey aktif ajanı, su-yağ arayüzeyine tutunarak

yüzey gerilimini düşürmekte böylece etkin maddenin polimere bağlanma derecesini arttırmakta ve sonuç olarak daha yüksek enkapsülasyon elde edilebilmektedir [93, 94]. PLGA polimer konsantrasyonu arttıkça partikül büyüklüğü'nün arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Nanolipozomların partikül büyüklüğü dağılımının homojen (monodispers) olduğu gözlenmiş olup, SEM görüntüleme sonuçları ile küresel formları doğrulanmıştır. Formülasyonların kimyasal karakterizasyon çalışmaları kapsamında, FT-IR/ATR analizleriyle molekül bağ yapıları, DTG termogramlarıyla da termodinamik özellikleri aydınlatılmıştır.

İdeal olduğu belirlenen nanolipozom (Lipo-karnitin) ve PLGA nanopartikül (Nano-karnitin) formülasyonları ile stabilite çalışmaları tamamlanmış ve tüm formülasyonların $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 2 ay süre boyunca stabil kaldıkları bulunmuştur.

- **Üçüncü aşamada;** *in-vitro* salım çalışmaları, diyaliz membran yöntemi ile yürütülmüş olup, kontrol grubuna (etkin madde çözeltisi) kıyasla, Nano-karnitin ve Lipo-karnitin formülasyonları ile uzatılmış bir salım profili gözlenmiştir. Salım sonuçlarına, kinetik modeller uygulanarak formülasyonların salım mekanizmaları aydınlatılmıştır.

Nanolipozom formülasyonu için, birinci dereceden kinetik modele uyum elde edilmiş olup, çözünme hızının yüksek olduğu etkin maddenin salımının konsantrasyona bağlı olduğu ve etkin madde salımının uzun süre zamanla salıverildiği görülmüştür. İlk aşamada gözlenen ani salım, nanolipozom yüzeyine tutunan ve çeper kısmında yer alan etkin maddenin hızla çözünme ortamına geçmesine dayandırılmıştır. Daha sonra gözlenen kontrollü salım ise, çekirdek kısmında yer alan etkin maddenin lipit tabakalar arasından sızarak/difüze olarak ortamda salıverilmesi sonucu daha yavaş bir salım göstermesine dayandırılmıştır [95, 96]. Çalışmamızda, enkapsülasyon etkinliğini arttırmak amacıyla eklenen Tween 80, stabile arttırıcı ajan olarak eklenen kolesterol ve fosfolipit arasındaki etkileşimi azaltarak, lipit tabakaların gevşemesi sonucunda etkin maddenin difüzyonunu sağlamış ve lipit

veziküller erozyona uğradıkça sürekli salım profili gözlenmiştir [97]. Polimerik nanopartiküler sistemlerden ilaç salımı ise; etkin maddenin çözünürlüğü, partikül büyüklüğü, polimer özellikleri, yüzey yükü, etkin madde/polimer oranı, hazırlama yöntemi gibi özelliklerle ilişkilidir [97, 98]. Küresel formda hazırlanan PLGA nanopartiküllerden gözlenen ani salım, penetre olan reseptör faz sıvısının nanopartikül yüzeyine adsorbe olan ilacı hemen salıvermesine dayandırılmıştır. Zamanla nanopartikül içine penetre olan sıvı ile matriks üzerinde oluşan porlar, polimerin degrade olmasına/erozyonuna ve ilacın polimer matriksten difüze olmasına imkan vererek, kontrollü bir salım profili gözlenmiştir [99, 100].

- **Son aşamada;** formülasyonların hücre düzeyindeki etkilerini değerlendirmek için, kardiyak fibroblast hücre hatları kullanılarak anlık metabolom düzeyleri hakkında bilgi sağlayan bir omik teknolojsi olan metabolomik ve yolak analizleri yapılmıştır. Kardiyak hücreler çok sayıda mitokondri içermelerinden dolayı analizlerde kullanılmıştır. Metabolitlerin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için GC-MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Tanımlanabilmiş 128 tane olmak üzere toplam 760 tane metabolit belirlenmiştir. Saptanan metabolitlerin hangi metabolizmalar üzerinde etkili olduklarının değerlendirilebilmesi için; amino asit, karbonhidrat ve lipit metabolizmalarına ait metabolitler ve gruplar içerisindeki farklılaşma oranları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Amino asit metabolizmasında; genel olarak Lipo-karnitin ve Nano-karnitin formülasyonlarının, apolar yan zincire sahip amino asit düzeylerinde çözelti formuna kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur. Polar yan zincire sahip amino asit düzeylerinin artışında ise en etkili formülasyonun Nano-karnitin formülasyonu olduğu saptanmıştır.

Karbonhidrat metabolizmasında; formülasyonların monosakkarit ve disakkaritler üzerinde etkili oldukları gözlenmiştir. SA döngüsü için elde edilen metabolomik profillerden en etkili formülasyonun α -ketoglutarat hariç

Nano-karnitin formülasyonu olduğu saptanmıştır. Lipo-karnitin formülasyonu ile α -ketoglutarat düzeyinde, tüm gruplara kıyasla anlamlı bir düşüş izlenmiştir ($p<0.05$). α -ketoglutarat, SA döngüsünden glutamat yolağına geçerek glutamat oluşumuna neden olmakta, oluşan glutamat da glutamin, prolin, arjinin sentezi için kullanılmaktadır. Lipo-karnitin formülasyonu ile glutamat düzeyinde artış tespit edilmiş olup, α -ketoglutarat düzeyindeki bu düşüş, α -ketoglutaratın bir miktarının glutamat yapımı için kullanılmasına dayandırılmıştır.

Lipit metabolizmasında; doymuş ve doymamış yağ asitleri bakımından değerlendirmeler yapılmıştır. Lipo-karnitin formülasyonunun özellikle doymamış yağ asiti düzeyinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Lipozomal yapılar hücre zarına benzer yapıdadırlar, Lipo-karnitin hücre içerisine alınırken membran yapısının genişlediği ve bozulduğu düşünülmektedir. Bu sebeple doymamış yağ asitlerinin sentezinin Lipo-karnitin formülasyonunda aktive olması, bu bileşiklerin membran yapısını tekrar düzenlemekte kullanılmak üzere sentezlendiğini göstermektedir. Serbest L-karnitin ise doymamış yağ asitleri üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Çalışmamızda, Lipo-karnitin formülasyonu ile doymamış yağ asidi miktarı artmakla kalmamış, kolesterol miktarı da anlamlı derecede düşmüştür ($p<0.05$). Serbest L-karnitin ve Lipo-karnitin formülasyonu, doymuş yağ asitlerinden laurik asitin düzeyini kontrol grubuna kıyasla azaltmıştır. Bu durum, laurik asiti mitokondriye yönlendirmesi ve laurik asidin de β -oksidasyon yolu ile enerji eldesinde kullanılmasına dayandırılmıştır.

Yolak analizi çalışmalarında ise, kardiyak hücre hatlarında tanımlanan metabolitlerin ilişkili oldukları biyokimyasal yollar belirlenmiş ve alanin, aspartat ve glutamat metabolizması, aminoasit-tRNA biyosentezi, glutatyon metabolizması ve arjinin-prolin metabolizmasıyla anlamlı derecede ilişkili oldukları bulunmuştur. Arjinin metabolizmasında çok farklı yollar eş zamanlı çalışmaktadır. Ornitin ve poliaminlere metabolize olarak, siyalizasyon görevi

üstlenmekte ve hücre çoğalmasında rol oynamaktadır. Poliaminlerin bağlı olduğu yolak analizlerinde etkili bulunan metabolizmalardan bir diğeri ise spermidin ve spermin biyosentezidir, bu metabolitler hücre büyümesinden sorumlu bileşiklerdir.

Sonuç olarak; Lipo-karnitin formülasyonun doymamış yağ asitleri sentezi üzerinde, Nano-karnitin formülasyonun ise aminoasit metabolizması ve oketoglutarat dışında sitrik asit döngüsü ara bileşenlerinin düzeylerini artırma üzerinde oldukça etkili olduğu bulguları edinilmiştir. L-karnitin'in yağ asidi oksidasyonu metabolizması ve fiziksel performans üzerine etkilerine ait pekçok çalışma yer almasına rağmen, L-karnitin'in kontrollü salımını sağlayan formülasyonları geliştirerek, hücre üzerine etkilerinin metabolik düzeyde incelendiği bir çalışma ilk defa tarafımızdan sunulmaktadır. Kontrollü salımını gerçekleştirdiğimiz formülasyonlar ile ilaç alım sıklığı düşürülmüş, L-karnitin'in yarılanma ömrü uzatılmış, impüriteye bağlı yan etkileri azaltılmıştır. Ayrıca, piyasada bulunan konvansiyonel preparatlara alternatif olabilecek nanoformülasyonlar geliştirilmiş ve bu formülasyonların etkinliği *in-vitro* şartlarda ispatlanmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] K. Seline, H. Johein, The determination of L-carnitine in several food samples, *Food Chemistry*, 105 (2007) 793-804.
- [2] İ. Gülçin, Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life Sciences*, 78 (2006) 803-811.
- [3] J. Demarquoy, B. Georges, C. Rigault, M.C. Royer, A. Clairet, M. Soty, S. Lekounougou, F. Le Borgne, Radioisotopic determination of L-carnitine content in foods commonly eaten in Western countries, *Food Chemistry*, 86 (2004) 137-142.
- [4] V. Marin, M. Azocar, M. Molina, J. Guerrero, R. Ratner, F. Cano, Total carnitine and acylated carnitine ratio: relationship of free carnitine with lipid parameters in pediatric dialysis patients, *Advances in Peritoneal Dialysis. Conference on Peritoneal Dialysis*, 2006, pp. 130-135.
- [5] L. Hernández-Sánchez, M. Castro-Puyana, C. García-Ruiz, A.L. Crego, Determination of L- and D- carnitine in dietary food supplements using capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *Food Chemistry*, 120 (2010) 921-928.
- [6] M. Yeste, S. Sancho, M. Briz, E. Pinart, E. Bussalleu, S. Bonet, A diet supplemented with L-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase, *Theriogenology*, 73 (2010) 577-586.
- [7] Ö. Kurt, S.N. El, Biyoaktif bir gıda bileşeni l-karnitin: Beslenme ve sağlık açısından önemi ve biyoyararlılığı, 4 (2011) 97-102.
- [8] Monograph L-Carnitine, *Alternative Medicine Review*, 10 (2005) 42-50.
- [9] G. Traina, G. Federighi, M. Brunelli, Up-regulation of kinesin light-chain 1 gene expression by acetyl-L-carnitine: Therapeutic possibility in Alzheimer's disease, *Neurochemistry International*, 53 (2008) 244-247.
- [10] I. Swart, J. Rossouw, J.M. Loots, M.C. Kruger, The effect of L-carnitine supplementation on plasma carnitine levels and various performance parameters of male marathon athletes, *Nutrition Research*, 14 (1997) 405-414.
- [11] L. Vecchiet, D.L. F, G. Pieralisi, v. diğerleri, Influence of L-carnitine administration on maximal physical exercise. , *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, 61 (1990) 486-490.
- [12] S. Georgala, K.H. Schulpis, C. Georgala, T. Michas, L-carnitine supplementation in patients with cystic acne on isotretinoin therapy., *J. Eur. Acad. Dermatology Venereology*, 13 (1999) 205-209.
- [13] C.J. Rebouche, L-Carnitine, in: J.W. Erdman, MacDonald, J. U. A., Zeisel, S. H. (Ed.) *Present Knowledge in Nutrition*, Wiley-Blackwell 2012.

- [14] C.J. Rebouche, Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism, *Ann N Y Acad Sci.*, 1033 (2004) 30-41.
- [15] S.S. Davis, L. Ilium, *Colloidal Carriers and Drug Targeting*, *Acta Pharm. Technol.*, 32 (1986) 4-9.
- [16] E. Tomlinson, C. Livingstone, *Selective Drug Delivery and Targeting*, *Pharm. J.*, 1 (1989) 619-621.
- [17] R.L. Juliano, *Targeted Drug Delivery*, Springer:-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991.
- [18] S.S. Sarabjeet, H. Fenniri, B. Singh, Nanotechnology-based drug delivery systems, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2 (2007).
- [19] A. Gürsoy, *Lipozomlar, Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler*, Tekno Grafik, İstanbul, 1989.
- [20] M. Samadzadeha, M. Peikaria, S.M. Kasirihab, A. Ashrafic, A review on self-healing coatings based on micro/nanocapsules, *Progress in Organic Coatings*, 68 (2010) 159-164.
- [21] R. Dubey, T.S. Hami, K.U. Bhasker Rao, Microencapsulation Technology and Application, *Defence Science Journal*, 59 (2009) 82-95.
- [22] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers*, 3 (2011) 1377-1397.
- [23] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Preat, PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *Journal of Controlled Release*, 161 (2012) 505-522.
- [24] J.C. Middleton, A.J. Tipton, Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials*, 21 (2000) 2335-2346.
- [25] A. Rajeev, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*, 21 (2000) 2475-2490.
- [26] Y.Y. Yang, T.S. Chung, Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *Biomaterials*, 22 (2001) 231-241.
- [27] D.V. Bazile, C. Ropert, P. Huve, T. Verrecchia, M. Marlard, A. Frydman, M. Veillard, G. Spenlehauer, Body distribution of fully biodegradable [¹⁴C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats, *Biomaterials*, 13 (1992) 1093–1102.
- [28] R. Jalil, J.R. Nixon, Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties, *Microencapsulation*, 7 (1990) 297-325.

- [29] D.L. Wise, G.J. McCormick, G.P. Willet, L.C. Anderson, Sustained release of an antimalarial drug using a co-polymer of glycolic/lactic acid, *Life Sciences*, 19 (1976) 867-874.
- [30] S. Takada, Y. Uda, H. Toguchi, Y. Ogawa, Application of a spray drying technique in the production of TRH-containing injectable sustained-release microparticles of biodegradable polymers, *PDA J Pharm Sci Technol*, 49 (1995) 180-184.
- [31] J.P. Rao, K.E. Geckeler, Polymer nanoparticles: preparation techniques and size control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36 (2011) 887-913.
- [32] Y.P. Sun, M.J. Meziani, P. Pathak, L. Qu, Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution, *Chemistry-A European Journal*, 11 (2004) 1366-1373.
- [33] A.J. Thote, R.B. Gupta, Formation of nanoparticles of a hydrophilic drug using supercritical carbon dioxide and microencapsulation for sustained release, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1 (2005) 85-90.
- [34] A. Gürsoy, *Kontrollü Salım Sistemleri*, 2 ed., Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 2014.
- [35] T.S. Li Z, Li S, Shen , Wang K., Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives, *Oncology Reports*, 38 (2017) 611-624.
- [36] A. Gürsoy, *Nanolipozomlar, Nanofarmasötikler ve Uygulamaları, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*, İstanbul, 2014, pp. 53-61.
- [37] A.D. Bangham, R.W. Horne, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *Molecular Biology*, 8 (1964) 660-668.
- [38] T.M. Allen, Solving drug delivery problems with liposomal carriers in controlled drug delivery *Designing Technologies for Future*, American Chemical Society, Washington DC, 2000, pp. 100-109.
- [39] S.G. Ingebrigtsen, N. Škalko-Basnet, C.D.A.C. Jacobsen, A.M. Holsæter, Successful co-encapsulation of benzoyl peroxide and chloramphenicol in liposomes by a novel manufacturing method - dual asymmetric centrifugation, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (2017) 192-199.
- [40] M.D. Joshi, R.H. Müller, Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives, *Eur J Pharm Biopharm*, 71 (2009) 161-172.
- [41] C.J. Rebouche, L-Carnitine, acetyl -L-carnitine, and propionyl -L-carnitine, *Encyclopedia of Dietary Supplements*, Informa Healthcare, NewYork, 2010, pp. 107-114.
- [42] J.J. Bahl, R. Bressler, The pharmacology of carnitine, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 27 (1987) 257-277.

- [43] A.M. Evans, G. Fornasini, Pharmacokinetics of L-carnitine, *Clinical Pharmacokinetics*, 42 (2003) 941-967.
- [44] Y. Cao, H.-j. Qu, P. Li, C.-b. Wang, L.-x. Wang, Z.-w. Han, Single dose administration of L-carnitine improves antioxidant activities in healthy subjects, *The Tohoku journal of experimental medicine*, 224 (2011) 209-213.
- [45] D.J. Raiten, J.M. Talbot, J.H. Waters, Assessment of nutrient requirements for infant formulas, *Journal of Nutrition*, 128 (1998) (Suppl) 2120-2121.
- [46] E.P. Brass Carnitine and sports medicine. Use or abuse? , New York Academy Sciences, 1033 (2004) 67-78.
- [47] W.J. Kraemer, J.S. Volek, C. Lewis, L - Carnitine supplementation: influence upon physiological function *Current Sports Medical Reports*, 7 (2008) 218-223.
- [48] Y. Toya, H. Shimizu, Flux analysis and metabolomics for systematic metabolic engineering of microorganisms., *Biotechnol Adv.* , 31 (2013) 818-826.
- [49] M.A. Keibler, S.M. Fendt, G. Stephanopoulos, Expanding the concepts and tools of metabolic engineering to elucidate cancer metabolism., *Biotechnol Prog.*, 28 (2012) 1409-1418.
- [50] J.M.v.d. Buescher, A roadmap for interpreting ¹³C metabolite labeling patterns from cells, *Curr Opin Biotechnol.* , 34 (2015) 189–201.
- [51] M. Cascante, S. Marin, Metabolomics and fluxomics approaches, *Essays In Biochemistry*, 45 (2008) 67-82.
- [52] G. Winter, J.O. Krömer, Fluxomics – connecting ‘omics analysis and phenotypes, *Environmental Microbiology*, 15 (2012) 1901-1916.
- [53] G.J. Patti, O. Yanes, G. Siuzdak, Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy, *Nature reviews Molecular cell biology*, 13 (2012) 263.
- [54] T. Moyon, F. Le Marec, E.M. Qannari, E. Vigneau, A. Le Plain, F.v.d. Courant, Statistical strategies for relating metabolomics and proteomics data: a real case study in nutrition research area., *Metabolomics*, 8 (2012) 1090-1101.
- [55] J.J. Jansen, E. Szymanska, H.C. Hoefsloot, A.K. Smilde, Individual differences in metabolomics: individualised responses and between-metabolite relationships., *Metabolomics*, 8 (2012) 94-104.
- [56] Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics., U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration., New Hampshire: US FDA, 2015.
- [57] Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). in: I.H.t. guideline (Ed.), 2005.
- [58] Guidance for industry. Bioanalytical method validation in: C.f.D.E.a. Research. (Ed.), U.S. Food and Drug Administration., Washington, DC: U.S. FDA., 2001.

- [59] Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration 1996.
- [60] E. Pharmacopoeia, European directorate for the quality of medicines, Strasbourg, 2007.
- [61] I.C.o.H.I.o.T.R.f.t.R.o.P.f.H. Use, Validation of analytical procedures: Text and Methodology, ICH-Q2B Geneva, 1996.
- [62] A. Shrivastava, V.B. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists*, 2 (2011) 21.
- [63] G.H.D. Kashappa, J.P. Hyun, Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying Technology*, 23 (2005) 1361–1394.
- [64] G.P. Kumarn, P. Rajeshwarrao, Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1 (2011) 208–219.
- [65] T.D. Dziubla, A. Karim, V.R. Muzykantov, Polymer nanocarriers protecting active enzyme cargo against proteolysis, *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 102 (2005) 427-439.
- [66] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, D.F. Hasanzadeh, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics*, 10 (2018) 57-74.
- [67] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential – What they are and what they are not?, *Journal of Controlled Release*, 235 (2016) 337-351.
- [68] J.L. Flanagan, P.A. Simmons, J. Vehige, M.D. Willcox, Q. Garrett, Role of carnitine in disease, *Nutrition Metabolism*, 7 (2010) 30.
- [69] W. Weckwerth, K. Morgenthal, Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation, *Drug Discovery Today*, 10 (2005) 1551-1558.
- [70] P. Puchalska, X. Huang, S.E. Martin, X. Han, G.J. Patti, P.A. Crawford, Isotope Tracing Untargeted Metabolomics Reveals Macrophage Polarization-State-Specific Metabolic Coordination across Intracellular Compartments, *Science*, 9 (2018) 298-313.
- [71] T.M. Taylor, J. Weiss, P.M. Davidson, B.D. Bruce, Liposomal nanocapsules in food science and agriculture, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (2005) 587-605.
- [72] M. Grit, J.A. Crommelin, Chemical stability of liposomes - implications for their physical stability. , *Chemistry and Physics of Lipids* 64 (1993) 3-18.
- [73] Lipoid, Lipoid, Phospholipon, in: <http://www.lipoid.com/en/node/105> (Ed.), Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany, 2019.

- [74] E. Yael, Formulation and Biopharmaceuticals Evaluation of Lipid Nanocarriers with Incorporated Lidocaine Hydrochloride, Faculty of Pharmacy, Lithuanian University of Health Sciences, 2017, pp. 52.
- [75] C.K. Song, P. Balakrishnan, C.-K. Shim, S.-J. Chung, S. Chong, D.-D. Kim, A novel vesicular carrier, transtethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 92 (2012) 299-304.
- [76] S. Duangjit, B. Pamornpathomkul, P. Opanasopit, T. Rojanarata, Y. Obata, K. Takayama, T. Ngawhirunpat, Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes, *International journal of nanomedicine*, 9 (2014) 2005.
- [77] H. Refai, D. Hassan, R. Abdelmonem, Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate, *Drug Delivery*, 24 (2017) 278-288.
- [78] S. Mura, H. Hillaireau, J. Nicolas, B. Le Droumaguet, C. Gueutin, S. Zanna, N. Tsapis, E. Fattal, Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells, *International Journal of Nanomedicine*, 6 (2011) 2591.
- [79] C. Sengel Türk, Z. Sezgin Bayindir, U. Badilli, Preparation of polymeric nanoparticles using different stabilizing agents, *J. Fac. Pharm. Ankara*, 38 (2009) 257-268.
- [80] H. Farzaneh, Ebrahimi Nik, M., Mashreghi, M., Saberi, Z., Jaafari, M. R., Teymouri M., A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: From liposomal preparation to therapy., *International Journal of Pharmaceutics.*, 551 (2018) 300-308.
- [81] S. Hong, S.H. Kim, S. Lim, Effects of triglycerides on the hydrophobic drug loading capacity of saturated phosphatidylcholine-based liposomes., *International Journal of Pharmaceutics.*, 483 (2015) 142-150.
- [82] B. Darvishi, S. Manoochehri, G. Kamalinia, N. Samadi, M. Amini, S.H. Mostafavi, S. Maghazei, F. Atyabi, R. Dinarvand, Preparation and antibacterial activity evaluation of 18- β -glycyrrhetic acid loaded PLGA nanoparticles, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (2015) 373-383.
- [83] D.J.S. Dias, G. Joanitti, R.B. Azevedo, L.P. Silva, C.N. Lunardi, A.J. Gomes, Chlorambucil encapsulation into PLGA nanoparticles and cytotoxic effects in breast cancer cell, *Journal of Biophysical Chemistry*, 6 (2015) 1-13.
- [84] G. Ertan, H. Karasulu, E. Karasulu, M. Ege, T. Köse, T. Güneri, A new in vitro/in vivo kinetic correlation method for nitrofurantoin matrix tablet formulations, *Drug Development Industrial Pharmacy*, 26 (2000) 737-743.
- [85] I. Lamster, R.D. Mandella, S. Zove, D. Harper, The polyamines putrescine, spermidine and spermine in human gingival crevicular fluid, *Archives of Oral Biology*, 32 (1987) 329-333.

- [86] Y. Cao, Y.-x. Wang, C.-j. Liu, L.-x. Wang, Z.-w. Han, C.-b. Wang, Comparison of pharmacokinetics of L-carnitine, Acetyl-L-carnitine and Propionyl-Lcarnitine after single oral administration of L-carnitine in healthy volunteers, *Clinical Investigative Medicine*, 32 (2009) 13-19.
- [87] W. Yan, Q. Wen, H.C. Stephanie, FDA's regulatory science program for generic PLA/ PLGA-based drug products, in: C.f.D.E.a. Research (Ed.), FDA, 2016.
- [88] B.-S. Chu, S. Ichikawa, S. Kanafusa, M. Nakajima, Preparation and characterization of β -carotene nanodispersions prepared by solvent displacement technique, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 55 (2007) 6754-6760.
- [89] L. Peltonen, J. Aitta, S. Hyvönen, M. Karjalainen, J. Hirvonen, Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly (l) lactide nanoparticles, *J Aaps Pharmscitech*, 5 (2004) 115.
- [90] J.M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Development Industrial Pharmacy*, 25 (1999) 471-476.
- [91] U. Bilati, E. Allemann, E. Doelker, Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of proteins into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues, *Aaps Pharmscitech*, 6 (2005) E594-E604.
- [92] E. Cohen-Sela, S. Teitlboim, M. Chorny, N. Koroukhov, H.D. Danenberg, J. Gao, G. Golomb, Single and double emulsion manufacturing techniques of an amphiphilic drug in PLGA nanoparticles: formulations of mithramycin and bioactivity, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (2009) 1452-1462.
- [93] I. Baysal, G. Ucar, M. Gultekinoglu, K. Ulubayram, S. Yabanoglu-Ciftci, Donepezil loaded PLGA-b-PEG nanoparticles: their ability to induce destabilization of amyloid fibrils and to cross blood brain barrier in vitro, *Journal of Neural Transmission*, 124 (2017) 33-45.
- [94] M. Tuncay, S. Caliş, H. Kaş, M. Ercan, I. Peksoy, A. Hincal, Diclofenac sodium incorporated PLGA (50: 50) microspheres: formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 195 (2000) 179-188.
- [95] M. Nounou, L.K. El-Khordagui, N.A. Khalafallah, S.A. Khalil, In vitro drug release of hydrophilic and hydrophobic drug entities from liposomal dispersions and gels, *Acta Pharmaceutica*, 56 (2006) 311-324.
- [96] Z. Miao, Y. Deng, H. Du, X. Suo, X. Wang, X. Wang, L. Wang, L. Cui, N. Duan, Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin, *Experimental Therapeutic Medicine*, 9 (2015) 941-946.
- [97] J. Joseph, V.H. B.N., R.D. D., Experimental optimization of Lornoxicam liposomes for sustained topical delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112 (2018) 38-51.

[98] A. Jain, S.K. Jain, In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight, European Journal of Chemistry physics of lipids, 201 (2016) 28-40.

[99] L.C. Chibas, P.P. Cintra, M.R. Moreira, M.O. Goulart, S.R. Ambrósio, R.C.S. Veneziani, J.K. Bastos, R.A. dos Santos, Polyalthic acid in polymeric nanoparticles causes selective growth inhibition and genotoxicity in MCF-7 cells, Natural Product Communications, 14 (2019) 1934578X19842702.

[100] D.J. Hines, D.L. Kaplan, Poly (lactic-co-glycolic acid) controlled release systems: experimental and modeling insights, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 30 (2013) 257.





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 10/06/2019

Tez Başlığı: L-Karnitin Yüklü Polimerik ve Lipit Bazlı Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması ve *İn-Vitro* Değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 111 sayfalık kısmına ilişkin, 10/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

10.06.2019

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Merve Yaşacan

Öğrenci No: N10248426

Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp

Programı: Nanoteknoloji ve Nanotıp

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. İpek Eroğlu

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Merve Yaşacan
Doğum yeri : Ankara
Doğum tarihi : 30.05.1984
Medeni hali : Evli
Yazışma adresi : Varlık Mah. Yürekli Sok. 8/4 Yenimahalle Ankara
Telefon : +90 505 563 7296
Elektronik posta adresi : mervarsev@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üni., Fen Fak., Kimya Bölümü (İngilizce)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üni., Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD.
Doktora : Hacettepe Üni., Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD.

İş Tecrübesi

04/2017-04/2018 Laboratuvar Şef Yardımcısı, Elixir İlaç ARGE A.Ş.,
Hacettepe Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Bölgesi,
Üniversiteler Mah. 1596. Cad. No. 6E/1001, 06800
Çankaya/Ankara

11/2013-04/2017 Ar-Ge Uzmanı, Drogosan İlaçları San. ve Tic. A.Ş., Gazi
Üniversitesi Gölbaşı Yerleşkesi, Teknoplaza
Binası, Gölbaşı/Ankara

