

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DIYABETİK YARA TEDAVİSİNDE KULLANILMAK
ÜZERE NANOPARTİKÜLER STATİN VE KÖK HÜCRE
İÇEREN DOKU İSKELELERİNİN FORMÜLASYONU VE
İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Dilara ÖRGÜL

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2017

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DIYABETİK YARA TEDAVİSİNDE KULLANILMAK
ÜZERE NANOPARTİKÜLER STATİN VE KÖK HÜCRE
İÇEREN DOKU İSKELELERİNİN FORMÜLASYONU VE
İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Dilara ÖRGÜL

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU

ANKARA

2017

**DIYABETİK YARA TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
NANOPARTİKÜLER STATİN VE KÖK HÜCRE İÇEREN DOKU
İSKELELERİNİN FORMÜLASYONU VE İN VİTRO/İN VİVO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Dilara ÖRGÜL

Bu çalışma 23/11/2017 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Teknoloji Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof.Dr. Sevgi TAKKA
(Gazi Üniversitesi)



Tez Danışmanı:

Prof.Dr. Süeda HEKİMOĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye:

Prof.Dr. Fahriye Figen TIRNAKSIZ
(Gazi Üniversitesi)



Üye:

Prof.Dr. Erem BİLENSOY
(Hacettepe Üniversitesi)



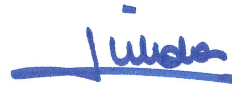
Üye:

Doç.Dr. Hakan EROĞLU
(Hacettepe Üniversitesi)



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

Tarih **13 Aralık 2017**



Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü

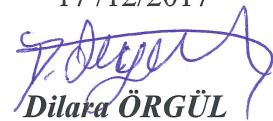
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

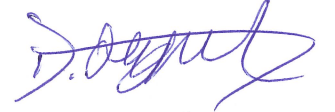
- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenkle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- Tezimin/Raporumun 17/12/2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

17 /12/2017


Dilara ÖRGÜL

ETİK BEYAN

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



Ecz. Dilara ÖRGÜL

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında bilimsel bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı sağlayan ve her konuda destek gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU'na, çalışmalarım süresince desteğini benden esirgemeyen, sorunlarımı çözerek bilgi, deneyim ve değerlendirmelerini benimle paylaşan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Hakan EROĞLU'na, FT-IR analizlerimin ve erime noktası tayininin yapılmasına ve yorumlanmasına yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Sevim DALKARA hocama ve Yrd Doç. Dr. Keriman ÖZADALI SARI ve Dr. Ecz. Peri AYTAÇ'a, sitotoksisite çalışmalarımın yürütülmesinde bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. İmran VURAL hocama ve Ecz. Naile ÖZTÜRK'e, kök hücre ve in vivo çalışmalarımın yürütülebilmesi için olanak sağlayan, planlanmasında ve yorumlanmasına yardımcı olan Sayın Uz. Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı gerçekleştirmem için 2211-A Yurt İçi Doktora Burs programı ile burs desteği ve 1003-Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı ile proje desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince bana yardımcı olan, anlayış gösteren ve aile sıcaklığı yaşatarak güç veren Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma, tüm asistan arkadaşlarıma, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, idari personelimize ve teknisyenimize teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini her daim hissettiren sevgili anneme, babama, ablalarıma, biricik eşim Gökçen ÖRGÜL'e ve tez çalışmamın son döneminde benimle birlikte çalışan, varlığıyla bana şimdiden güç verip destek olan doğacak olan oğlum Erim ÖRGÜL'e tüm kalbimle sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Örgül, D., Diyabetik Yara Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nanopartiküler Statin ve Kök Hücre İçeren Doku İskelelerinin Formülasyonu ve İn Vitro/İN Vivo Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. Son yıllarda yapılan çalışmalarla simvastatinin kolesterol düşürücü etki mekanizmasından bağımsız olarak yara iyileşmesini ve kök hücre tedavi etkinliğini desteklediği gösterilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkılarak diyabetik yara tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımının sunulması amacıyla simvastatin yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT) partiküller ve/veya mezenkimal kök hücre içeren, biyolojik polimerlerle hazırlanmış, doku iskelesi formülasyonları hazırlanarak 3 boyutlu ve biyolojik olarak parçalanabilen yeni bir yara iyileştirici sistem geliştirilmiştir. Simvastatin içeren NLT formülasyonları lipit matrisin %10 veya %20'si kadar simvastatin ile yüklenmiş olarak 50:50 veya 70:30 sıvı:kıta lipit oranlarında yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Formülasyonlarda, kıta lipit olarak Precirol ATO 5, sıvı lipit Maisine, hidrofilik yüzey etkin madde Tween 80 ve lipofilik yüzey etkin madde olarak da Lipoid S100 kullanılmıştır. Simvastatin içeren NLT formülasyonları 158 nm boyutlarında, 0,17 altında PDI değerleri ile homojen dağılım gösteren ve %99'un üzerinde yükleme kapasitesine sahip küresel partiküllerden oluşmaktadır. İn vitro salım çalışmaları sonucunda, NLT formülasyonlarından salımın başlangıçta simvastatinin patlama salımı nedeniyle hızlı gerçekleştiği daha sonra ise yavaş bir salım hızı ile devam ederek yaklaşık 12-24 saatte platoya ulaştığı gözlenmiştir. Simvastatin içeren NLT formülasyonları ile 25°C ve 4°C'de gerçekleştirilen stabilite çalışmalarında ise formülasyonların 4°C'de 90 gün boyunca 200 nm altında monodispers dağılımlarını korudukları ve simvastatinin 4°C'de 15 gün boyunca stabil olduğu bulunmuştur. NLT içine hapsedilmiş simvastatin içeren doku iskelesi formülasyonları konsantre edilmemiş veya 2 kat konsantre NLT formülasyonlarından hareketle 1:1 veya 2:1 kitosan:kollajen polimer kombinasyonlarında dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmışlardır. Hazırlanan formülasyonlar arasında %74,38 porozite değeri ve 20 µm-200 µm arasında değişen uygun por büyüklüğü dağılımı ile üç boyutlu poröz bir yapı, %710,88 yüksek su absorplama kapasitesi, %57,7 düşük kütle kaybı ve iyi bir mekanik dayanıklılık gösteren 2:1 kitosan:kollajen polimer oranında, 2 kat konsantre NLT formülasyonu ile hazırlanmış çapraz bağlı doku iskelesi formülasyonu in vivo çalışmalar için uygun bulunmuştur. Doku iskelelerine NLT formülasyonlarının eklenmesi simvastatin patlama salımını azaltarak daha kontrollü salım profilinin elde edilmesini sağlamıştır. L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmaları ile doku iskelelerinin sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Sıçanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmalar sonucunda lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelelerinin kontrol gruplarına göre yara kapanma hızını artırdıkları ve yaralı dokuda vaskülarizasyonu destekledikleri gözlenmiştir. Patolojik incelemelerde simvastatinin kök hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücreyi birlikte içeren doku iskelelerinde artmış epitelizasyon, proliferasyon ve vaskülarizasyon gözlenerek etkin yara iyileşmesi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: simvastatin, nanoyapılı lipit taşıyıcılar, doku iskelesi, yara iyileşmesi, kök hücreler

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK (213M686) nolu araştırma projesi

ABSTRACT

Örgül, D., Formulation of Tissue Scaffolds Containing Nanoparticulate Statin and Stem Cells for Diabetic Wound Healing and In Vitro/In Vivo Evaluation, Hacettepe University Institute of Health Doctorate Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara 2017. Simvastatin has been shown to support wound healing and stem cell treatment efficacy independent of cholesterol-lowering mechanism in recent studies. Under the light of these facts, in order to provide a new treatment approach in diabetic wound care, novel three dimensional and biodegradable wound healing system has been formulated by preparing tissue scaffolds consisting of biological polymers, simvastatin loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) and mesenchymal stem cells. NLC formulations containing simvastatin at the concentrations of 10% or 20% of lipid phase were prepared by high pressure homogenization technique at 50:50 or 70:30 liquid:solid lipid ratio. Precirol ATO 5 as solid lipid, Maisine as liquid lipid, Tween 80 as hydrophilic surfactant and Lipoid S100 as lipophilic surfactant were used in the formulations. Simvastatin loaded NLC formulations are prepared having 158 nm particle size, homogeneous spherical particles with PDI values below 0.17 and encapsulation efficiency above 99%. As a result of in vitro release studies, release of simvastatin from the NLC formulations has been characterized by a high burst release tendency that was followed by a slow release rate and finally reaching plateau at about 12-24 hours. In stability studies carried out at 25°C and 4°C, the formulations were found to maintain monodisperse distributions below 200 nm for 90 days at 4°C and simvastatin was observed to be stable for 15 days at 4°C. Tissue scaffold formulations containing simvastatin loaded NLCs were prepared by freeze drying method in a combination of 1:1 or 2:1 chitosan:collagen polymers with unconcentrated or 2-fold concentrated NLC formulations. The cross-linked tissue scaffold formulation prepared with 2:1 chitosan:collagen polymer ratio and 2-fold concentrated NLC formulation, having a three-dimensional high porous structure with a porosity value of 74.38% and sufficient large pore size distribution from 20 µm to 200 µm and with 710.88% high water absorption capacity, 57.7% low weight loss and good mechanical strength was found to be suitable for in vivo studies. Incorporation of NLCs into tissue scaffolds decreased the initial simvastatin burst release ratio and maintained a more controlled release profile. Cytotoxic effect of tissue scaffolds was not observed on L929 mouse fibroblast cells in cell culture studies. In vivo studies have indicated that tissue scaffolds containing simvastatin lipid nanoparticles increased wound closure rate and promoted the vascularization of injured tissue when compared to control groups. In pathological investigations, simvastatin has been shown to enhance viability and proliferation of stem cells. Thereupon, tissue scaffold formulation containing simvastatin lipid nanoparticles and stem cells together provided effective wound healing with increased epithelialization, proliferation and vascularization.

Key Words: simvastatin, nanostructured lipid carriers, tissue scaffold, wound healing, stem cells

Supported by TUBITAK (213M686) research project

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yara ve Yara İyileşmesi	3
2.2. Kronik Yaralar ve Tedavi Yaklaşımları	5
2.2.1 Diyabetik Yaralar	7
2.3. Diyabetik Yara Tedavisinde Kullanılan Etkin Maddeler	8
2.3.1. Statin Grubu İlaçlar ve Diyabetik Yara Tedavisindeki Önemi	8
2.4. Kök Hücrelerin Diyabetik Yara Tedavisindeki Yeri ve Uygulamaları	10
2.4.1. Mezenkimal Kök Hücreler	11
2.5. Katı lipit nanopartiküller (KLN) ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı (NLT) Sistemler	12
2.5.1. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Avantaj ve Dezavantajları	14
2.5.2. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Bileşimi	15
2.5.3. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlama Yöntemleri	17
2.5.4. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	20
2.5.5. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcıların Uygulama Alanları	32

2.6. Doku İskeleleri	38
2.6.1. Doku İskelesi Tanımı ve Fonksiyonu	38
2.6.2. Doku İskelesi Formülasyonu Hazırlamada Kullanılan Matriks Maddeleri	39
2.6.3. Doku İskelesi Hazırlama Yöntemleri	42
2.6.4. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	46
2.6.5. Doku İskelelerinin Yara Tedavisindeki Uygulamaları	52
2.7. Simvastatin	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM	62
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Malzemeler	62
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
3.1.2. Kullanılan Aletler	65
3.2. Yöntemler ve Deneyleler	67
3.2.1. Simvastatinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	67
3.2.2. Simvastatinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	68
3.2.3. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin (NLT) Ön Formülasyon Çalışmaları	73
3.2.4. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Çalışmaları	74
3.2.5. NLT Formülasyonlarının Hazırlanması	77
3.2.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	79
3.2.7. Doku İskelesi Formülasyon Çalışmaları	87
3.2.8. Doku İskelesi Formülasyonları	90
3.2.9. Doku İskelesi Formülasyonlarının Hazırlanması	91
3.2.10. Doku İskelesi Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu	93
3.2.11. Doku İskelesi Formülasyonlarının Sterilizasyonu	97
3.2.12. Sitotoksite Çalışmaları	97
3.2.13. İn Vivo Çalışmalar İçin Simvastatin Dozunun ve Doku İskelesi Formülasyonunun Belirlenmesi, Deneyle Hayvanlarının Seçimi ve Hayvanların Gruplandırılması	100
3.2.14. Epidermal Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi	102
3.2.15. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	103

3.2.16. Mezenkimal Kök Hücrelerin İn Vivo Deneyle İçin Hazırlanması	104
3.2.17. Doku İskelesi Formülasyonlarının İn Vivo Deneyle İçin Hazırlanması	105
3.2.18. İn Vivo Çalışmalar: Sıçanlarda Yara Oluşumu ve Takip Süreci	105
3.2.19. İn Vivo Çalışmalar: Yara İyileşmesinin İzlenmesi ve Değerlendirilmesi	107
3.2.20. İstatistiksel Analiz	109
4. BULGULAR	110
4.1. Simvastatinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	110
4.1.1. FT-IR Spektrumu	110
4.1.2. UV Spektrumu	112
4.1.3. Erime Derecesi Tayini	112
4.2. Simvastatinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Miktar Tayini	113
4.2.1. Kalibrasyon Doğrusu	113
4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu	114
4.3. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları	119
4.3.1. Katı Lipit Taraması	119
4.3.2. Sıvı Lipit Taraması	121
4.4. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	122
4.4.1. Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi Ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	123
4.4.2. Etkin Madde Yükleme Kapasitesi ve Hapsedilme Etkinliği Çalışmaları	127
4.4.3. DSC Analizi	129
4.4.4. FT-IR Analizi	133
4.4.5. Morfolojik İncelemeler	142
4.4.6. Viskozite Tayini	149
4.4.7. İn Vitro Salım Çalışmaları	151
4.4.8. Stabilite Çalışmaları	157
4.5. Doku İskelesi Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu	164
4.5.1. Çap- Kalınlık Tayini	164

4.5.2. Morfolojik Analizler	165
4.5.3. Porozite ve Por Büyüklüğü Dağılımı Tayini	170
4.5.4. Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi	174
4.5.5. İn Vitro Parçalanma	176
4.5.6. Mekanik Özelliklerin İncelenmesi	178
4.5.7. İn Vitro Salım Çalışmaları	180
4.5.8. Sitotoksosite Çalışmaları	184
4.6. İn Vivo Çalışmalar: Sıçanlarda Yara iyileşmesinin Takibi ve Değerlendirilmesi	187
4.6.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	187
4.6.2. Yara İyileşmesinin İzlenmesi ve Değerlendirilmesi	190
5. TARTIŞMA	215
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	264
7. KAYNAKLAR	266
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

3D	Üç Boyutlu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ASCs	İnsan Adipoz Türevi Mezenkimal Kök Hücre
ATR	Attenuated Total Reflectance
BY	Biyoyararlanım
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	Ekstraselüler Matris
ED	Erime Derecesi
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
HE	Hapsedilme Etkinliği
HLB	Hidrofilik Lipofilik Denge
HMG-KoA	3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
H&E	Hematoksilen-Eozin
IR	Kızılötesi Spektroskopisi
KLN	Katı Lipit Nanopartikül
LD	Lazer Difraksiyon
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LOD	Saptanabilirlik Sınırı
LOQ	Tayin Edilebilirlik Sınırı
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NLT	Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı
PB	Partikül Büyüklüğü

PBS	Izotonik Fosfat Tamponu
PCL	Polikaprolakton
PCS	Foton Korelasyon Spektroskopisi
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Polietilen Glikol
PGA	Poli(Glikolik Asit)
PLA	Poli(Laktik Asit)
PLGA	Poli(Laktid-Ko-Glikolid)
SAXS	Küçük Açılı X-Işını Saçılması
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	Standart Hata
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TPF	Sodyum Tripolifosfat
UV	Ultraviyole
VK	Varyasyon Katsayısı
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
XRD	X-Işını Difraksiyonu
\bar{X}	Ortalama
YK	Etkin Madde Yükleme Kapasitesi
ZP	Zeta Potansiyel

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	Yara iyileşmesinin fazları.	3
2.2.	Doku hasarı sonucu oluşan olası dört yanıt.	4
2.3.	KLN ve NLT sistemlerine ait lipit matris yapısı ve bileşimi.	13
2.4.	Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı (NLT) sistem tipleri.	16
2.5.	Düşük konsantrasyondaki KLN dispersiyonlarında agregasyon gerçekleşmesi ve yüksek konsantrasyondaki NLT dispersiyonlarında inci benzeri ağısı görünüm.	28
2.6.	Simvastatin kimyasal formülü.	59
3.1.	Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile NLT formülasyonlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.	79
3.2.	Doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasına ait şematik gösterim.	93
3.3.	Sıçanların dorsal bölgelerinde yara oluşturulması.	106
3.4.	Yara bölgesine doku iskelelerinin koban bandajı ile sabitlenmesi.	106
3.5.	Yara bölgesinin a) yakın ve b) uzak sabit bir mesafeden fotoğraflanması.	107
4.1.	Simvastatine ait a) örnek b) referans FT-IR spektrumu.	111
4.2.	Simvastatinin asetonitrildeki çözeltisine ait a) örnek b) referans UV spektrumu.	112
4.3.	Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki 0,5 µg/mL çözeltisinin enjeksiyonuyla elde edilen HPLC kromatogramı (Alıkonma zamanı: 6 dk.).	113
4.4.	Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6).	114
4.5.	a) Etkin madde yüklenmemiş NLT formülasyonu b) Asetonitril:Metanol:50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımı c) %0,5 SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu in vitro salım ortamı d) Etkin madde yüklenmemiş doku iskelesi formülasyonu ile gerçekleştirilen salım çalışmasına ait kromatogramlar.	117
4.6.	NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi grafiği (n=6).	124
4.7.	Simvastatinin DSC termogramı.	129

4.8.	Precirol ATO 5'in DSC termogramı.	130
4.9.	NLT formülasyon bileşenlerinin DSC termogramları.	130
4.10.	Simvastatin, Precirol ATO 5 ve Maisine kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarının DSC termogramlarının karşılaştırılması.	131
4.11.	Simvastatin, Precirol ATO 5 ve oleik asit kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarının DSC termogramlarının karşılaştırılması.	131
4.12.	Simvastatin, Precirol ATO 5 ve Fm-50-20 formülasyonuna ait lipit matriksin fiziksel ve eriyik karışımlarının DSC termogramlarının karşılaştırılması.	132
4.13.	Simvastatinin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı.	134
4.14.	Precirol ATO 5'in a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı.	134
4.15.	Maisine'nin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı.	135
4.16.	Oleik asitin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı.	135
4.17.	Tween 80'nin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı.	136
4.18.	Lipoid S100'ün a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı.	136
4.19.	Maisine kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fm-50-BOŞ b) Fm-50-10 c) Fm-50-20.	137
4.20.	Maisine kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fm-70-BOŞ b) Fm-70-10 c) Fm-70-20.	138
4.21.	Oleik asit kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fo-50-BOŞ b) Fo-50-10 c) Fo-50-20.	139
4.22.	Oleik asit kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fo-70-BOŞ b) Fo-70-10 c) Fo-70-20.	140
4.23.	Fm-50-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x49.000 büyütme, b) x98.000 büyütme, c) x150.000 büyütme, d) x150.000 büyütme.	143
4.24.	Fm-50-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x49.000 büyütme, b) x68.000 büyütme, c) x68.000 büyütme, d) x68.000 büyütme.	143
4.25.	Fm-50-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x30.000 büyütme, b) x30.000 büyütme, c) x30.000 büyütme, d) x68.000 büyütme.	144
4.26.	Fm-70-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x23.000 büyütme, b) x49.000 büyütme, c) x68.000 büyütme, d) x98.000 büyütme.	144
4.27.	Fm-70-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x18.500 büyütme, b) x68.000 büyütme, c) x98.000 büyütme, d) x98.000 büyütme.	145

- 4.28.** Fm-70-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x98.000 büyütme, b) x98.000 büyütme, c) x98.000 büyütme, d) x150.000 büyütme. 145
- 4.29.** Fo-50-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x49.000 büyütme, b) x49.000 büyütme, c) x49.000 büyütme, d) x68.000 büyütme. 146
- 4.30.** Fo-50-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x30.000 büyütme, b) x30.000 büyütme, c) x30.000 büyütme, d) x49.000 büyütme. 146
- 4.31.** Fo-50-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x49.000 büyütme, b) x98.000 büyütme, c) x120.000 büyütme, d) x120.000 büyütme. 147
- 4.32.** Fo-70-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x30.000 büyütme, b) x30.000 büyütme, c) x68.000 büyütme, d) x98.000 büyütme. 147
- 4.33.** Fo-70-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x30.000 büyütme, b) x30.000 büyütme, c) x30.000 büyütme, d) x49.000 büyütme. 148
- 4.34.** Fo-70-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri a) x30.000 büyütme, b) x49.000 büyütme, c) x49.000 büyütme, d) x120.000 büyütme. 148
- 4.35.** NLT formülasyonlarının 25°C'deki akış reogramları (n=3). 149
- 4.36.** NLT formülasyonlarından zamana karşı salınan kümülatif simvastatin miktarı (n=6). 154
- 4.37.** NLT formülasyonlarından simvastatinin salım profili (n=6). 155
- 4.38.** Farklı doku iskelesi formülasyonlarına ait görüntüler a) UF(+) \checkmark (-):2:1-B, b) UF(+) \checkmark (+):2:1-B, c) UF(+) \checkmark (-):2:1-SV, d) UF(+) \checkmark (+):2:1-SV. 166
- 4.39.** Ultrafiltrasyon uygulanmamış, etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(-) \checkmark (-):1:1-B, b) UF(-) \checkmark (+):1:1-B, c) UF(-) \checkmark (-):2:1-B, d) UF(-) \checkmark (+):2:1-B. 167
- 4.40.** Ultrafiltrasyon uygulanmamış, etkin madde içeren Fm-50-20 NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(-) \checkmark (-):1:1-SV, b) UF(-) \checkmark (+):1:1-SV, c) UF(-) \checkmark (-):2:1-SV, d) UF(-) \checkmark (+):2:1-SV. 167

- 4.41.** Ultrafiltrasyon uygulanmış, etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(+) ζ (-):1:1-B, b) UF(+) ζ (+):1:1-B, c) UF(+) ζ (-):2:1-B, d) UF(+) ζ (+):2:1-B. 168
- 4.42.** Ultrafiltrasyon uygulanmış, etkin madde içeren Fm-50-20 NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(+) ζ (-):1:1-SV, b) UF(+) ζ (+):1:1-SV, c) UF(+) ζ (-):2:1-SV, d) UF(+) ζ (+):2:1-SV. 168
- 4.43.** UF(+) ζ (+):2:1-SV doku iskelesi formülasyonunun aynı bölgeden elde edilmiş farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri a) x200 b) x1000 c) x20000 (beyaz oklar: nanoboyutlardaki lipit nanopartikülleri, siyah oklar: mikro boyutlardaki lipit nanopartikülleri göstermektedir). 170
- 4.44.** Etkin madde içermeyen farklı doku iskelesi formülasyonlarına ait por büyüklüğü dağılımları a) UF(-) ζ (-):1:1-B b) UF(-) ζ (+):1:1-B c) UF(-) ζ (-):2:1-B d) UF(-) ζ (+):2:1-B e) UF(+) ζ (-):1:1-B f) UF(+) ζ (+):1:1-B g) UF(+) ζ (-):2:1-B h) UF(+) ζ (+):2:1-B. 172
- 4.45.** Etkin madde içeren farklı doku iskelesi formülasyonlarına ait por büyüklüğü dağılımları a) UF(-) ζ (-):1:1-SV b) UF(-) ζ (+):1:1-SV c) UF(-) ζ (-):2:1-SV d) UF(-) ζ (+):2:1-SV e) UF(+) ζ (-):1:1-SV f) UF(+) ζ (+):1:1-SV g) UF(+) ζ (-):2:1-SV h) UF(+) ζ (+):2:1-SV. 173
- 4.46.** Doku iskelesi formülasyonlarının $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ 'de pH: 7,4 PBS tamponu içerisinde 24 saat sonunda elde edilen su absorpsiyon değerleri (n=6). 175
- 4.47,** Doku iskelesi formülasyonlarının $37\pm 0,5^\circ\text{C}$ 'de pH: 7,4 PBS tamponu içerisinde 28 gün süresince elde edilen in vitro parçalanma sonuçları (n=6). 177
- 4.48.** Doku iskelesi formülasyonlarına ait elastik modül değerleri (n=6). 179
- 4.49.** Doku iskelesi formülasyonlarından zamana karşı salınan kümülatif simvastatin miktarı (n=6). 181
- 4.50.** Doku iskelesi formülasyonlarından simvastatinin salım profili (n=6). 181
- 4.51.** Simvastatin çözeltilerinin L929 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksikite sonuçları (n=6). 185
- 4.52.** Simvastatin içeren ve içermeyen doku iskelelerinin L929 hücreleri üzerinde 12 ve 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksikite sonuçları (n=6). 186
- 4.53.** Mezenkimal kök hücrelerin flow-sitometri ile tanımlanması (CD45R, CD11b/c, CD90 ve CD44). 188

4.54.	Deri kökenli MKH adiposit farklılaşması (10X10) (Kırmızı=Stoplazmik yağ damlacıkları birikimi).	189
4.55.	Deri kökenli MKH kondrosit farklılaşması (10X10) (Mavi=Proteoglikan birikimi).	189
4.56.	Deri kökenli MKH osteosit farklılaşması (10X10) (Siyah:Kalsiyum Birikimi).	190
4.57.	14 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarında farklı doku iskelelerinin yara alanı üzerindeki etkileri.	191
4.58.	28 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarında farklı doku iskelelerinin yara alanı üzerindeki etkileri.	194
4.59.	14 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarına ait yara alanı görüntüleri.	196
4.60.	28 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarına ait yara alanı görüntüleri.	197
4.61.	Doku kesitine ait bcl-2 ile boyama görüntüsü, 10x10 büyütme (bcl-2 ile kahverengiye boyanan alan bulunmamaktadır).	205
4.62.	Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait Ki-67 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: Ki-67 ile kahverengiye boyanan çoğalan hücreler).	206
4.63.	Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grubuna ait Ki-67 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: Ki-67 ile kahverengiye boyanan çoğalan hücreler).	206
4.64.	Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait CD31 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: CD31 ile kahverengiye boyanmış damar endotel hücreleri).	208
4.65.	Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grubuna ait CD31 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: CD31 ile kahverengiye boyanmış damar endotel hücreleri).	208
4.66.	Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU boyama görüntüleri, 10x10 büyütme (kırmızı ok: epitelizasyon oluşumu, yeşil ok: epitelizasyon var var ancak tam olarak gelişmemiş epidermal ve dermal alan oluşumu).	211
4.67.	Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU boyama görüntüleri, 10x10 büyütme (kırmızı ok: iyi epitelizasyon oluşumu, yeşil ok: Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna göre daha iyi gelişmiş epidermal ve dermal alan oluşumu).	211

- 4.68.** Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU boyama görüntüleri, 10x10 büyütme (kırmızı ok: epitelizasyon oluşumu, yeşil ok: iyi gelişmiş epidermal ve subepidermal alanlar, sarı ok: hemen epitelin altındaki alanda başlamış vaskülarizasyon). 212
- 4.69.** Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 40x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+)]. 212
- 4.70.** Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 40x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+)]. 213
- 4.71.** Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 20x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+), %4 BrdU (+) hücre tespit edilmiştir]. 213
- 4.72.** Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 20x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+), %10 BrdU (+) hücre tespit edilmiştir]. 214

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kronik yara tipleri.	6
2.2. Katı lipid nanopartikül ve nanoyapılı lipid taşıyıcı formülasyonlarında sık kullanılan lipidler ve emülgatörler.	15
2.3. Doku iskelesi hazırlamada sık kullanılan doğal ve sentetik biyoparçalanabilir polimerler.	40
2.4. Statinlerin farmakokinetik özellikleri.	58
2.5. Simvastatin fizikokimyasal özellikleri.	59
3.1. Simvastatinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	68
3.2. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum NLT formülasyonu bileşimi.	74
3.3. NLT sistemlerinin formülasyon çalışmalarında kullanılan sıvı/katı lipid ve yüzey etkin maddelere ait özellikler.	75
3.4. Farklı lipidler, sıvı:katı lipid oranları ve etkin madde konsantrasyonları doğrultusunda oluşturulan NLT formülasyonları.	76
3.5. Ultrafiltrasyon uygulanmış, Maisine sıvı lipiti kullanılarak 50:50 sıvı:katı lipid oranlarında hazırlanan NLT formülasyonları.	77
3.6. Farklı lipidler, sıvı:katı lipid oranları ve etkin madde konsantrasyonları ile NLT formülasyonlarının bileşimleri (% , a/a).	78
3.7. Doku iskelesi ön formülasyon çalışmalarında kullanılan polimerler.	88
3.8. Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının bileşimleri ve kodları.	91
4.1. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki gün içi ve günler arası doğruluk sonuçları (n=6).	115
4.2. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).	116
4.3. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6).	116
4.4. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki stabilite sonuçları (n=3).	118

4.5.	Simvastatinin farklı katı lipidlerdeki gözlemsel çözünürlük sonuçları (80°C).	119
4.6.	Simvastatinin farklı katı lipidlerdeki mikroskobik çözünürlük sonuçları (60°C).	120
4.7.	Simvastatinin farklı sıvı lipidlerdeki gözlemsel çözünürlük sonuçları.	121
4.8.	NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü (PB), zeta potansiyel (ZP) ve PDI sonuçları (n=6).	123
4.9.	Ultrafiltrasyon uygulanmış NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI Sonuçları (n=6).	127
4.10.	Etkin madde ile yüklenmiş NLT formülasyonlarına ait serbest simvastatin konsantrasyonu, % etkin madde yükleme kapasitesi ve % hapsedilme etkinliği değerleri (n=6).	128
4.11.	NLT formülasyonlarına ait n (Eğim) değerleri ve 25°C'de 1500 sn ⁻¹ kayma hızında ölçülen viskozite sonuçları (n=3).	150
4.12.	Simvastatinin pH 7,4 PBS tamponu ve %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponundaki çözünürlük tayini sonuçları (n=3).	152
4.13.	İn vitro salım koşullarında simvastatinin stabilitesi (n=6).	153
4.14.	NLT formülasyonlarından 6 gün sonunda salınan kümülatif simvastatin miktarı ve salım hızları (t=12 saat).	156
4.15.	25°C ve 4°C sıcaklıkta saklanan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının partikül büyüklüğü. polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri (n=6).	160
4.16.	25°C ve 4°C sıcaklıklarda saklanan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının 25°C'de 1500 sn ⁻¹ kayma hızında ölçülen viskozite sonuçları (n=3).	161
4.17.	25°C ve 4°C sıcaklıklarda saklanan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının pH değerleri (n=3).	162
4.18.	25°C ve 4°C sıcaklıkta saklanan Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının 90 gün boyunca içerdikleri etkin madde yüzdesi (n=6).	163
4.19.	Doku iskelesi formülasyonlarının çap ve kalınlıkları (n=12).	165
4.20.	Doku iskelesi formülasyonlarına ait porozite ve por büyüklüğü dağılım sonuçları.	171
4.21.	Doku iskelesi formülasyonlarından 28 gün sonunda salınan kümülatif simvastatin miktarı ve salım hızları (t=96 saat).	183
4.22.	Simvastatin çözeltilerinin L929 hücrelerinde 24. saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen % hücre canlılığı değerleri (n=6).	185

4.23.	Simvastatin içeren ve içermeyen doku iskelelerinin L929 hücrelerinde 12. ve 24. saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen % hücre canlılığı değerleri (n=6).	186
4.24.	14 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait % yara alanı değerleri.	191
4.25.	28 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait % yara alanı değerleri.	193
4.26.	14 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait H&E boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.	198
4.27.	28 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait H&E boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.	201
4.28.	14 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait immünohistokimyasal boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.	203
4.29.	28 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait immünohistokimyasal boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.	204

1. GİRİŞ

Bozulmuş yara iyileşmesi diyabetin önemli bir komplikasyonudur ve endüstrileşmiş ülkelerde diyabetik yaralar, diyabetli hastaların %12'sini etkileyen önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Diyabetli hastalarda oluşan yaralar kronik enflamatuar fazda kalır ve zaman içerisinde iyileşme gösteremezler. Normal bir yara iyileşmesi sürecinde sistemli bir şekilde gerçekleşen anjiyogenezis ve granülasyon dokusu oluşumu gibi hücrel ve moleküler olaylar diyabet durumunda önemli derecede bozulduğundan diyabette yara iyileşmesi gecikerek zamanla kronik bir yaraya dönüşmektedir. Ne yazık ki diyabetik ülserlerin iyileştirilmesi için uygulanan mevcut tedaviler tatmin edici sonuçlar sunmamaktadır. Diyabetik yaralar gibi iyileşme sürecinin pek çok noktada aksadığı, uzun süre iyileşme göstermeyen yaraların tedavisinde tek yönlü bir tedavi yaklaşımı yetersiz olduğundan bu tip yaralarda çok yönlü bir yaklaşım gerekmektedir.

Doku mühendisliğinin önemli hedeflerinden biri; normal iyileşme sürecini engelleyen; diyabet, vasküler hastalıklar, yaşlanma, geniş doku hasarı gibi belirli bir takım klinik bozukluklar durumunda doku yenilenmesinin tamamlanmasına yardımcı olacak stratejiler geliştirmektir. Bu sebeple son yıllarda ortak bir yaklaşım olarak araştırmacılar biyolojik olarak parçalanabilir, 3 boyutlu doku iskelelerine yönelmiştir. Doku iskeleleri, yara iyileşmesinde, ekstraselüler matriks (ECM) analogu olarak hareket eder ve hücrelerin yapışması, büyümesi ve deri fonksiyonlarına sahip yapılara farklılaşmasına ortam hazırlar. 3 boyutlu doku iskelelerinin yara örtülerinden farkı, sadece yarayı örterek enfeksiyonlara karşı fiziksel bir engel oluşturmaları değil, dermal fibroblastlara ve keratinositlere destek oluşturarak doku rejenerasyonunu sağlamalarıdır. Bununla birlikte yara iyileştirici etkinliği bulunan etkin maddeler, büyüme faktörleri ve kök hücreler gibi ajanlar doku iskelelerine ilave edilerek iskelelerin yara iyileştirici etkileri geliştirilmektedir.

Son zamanlarda yapılan bazı araştırmalarda; simvastatinin iyi bilinen kolesterol düşürücü etkisinin yanı sıra, kolesterol bağımlı/bağımsız mekanizmalar yoluyla birçok hücrel sürece dahil olarak immünmodülatör, anti-enflamatuar ve anjiyojenik etkilerine bağlı olarak yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir.

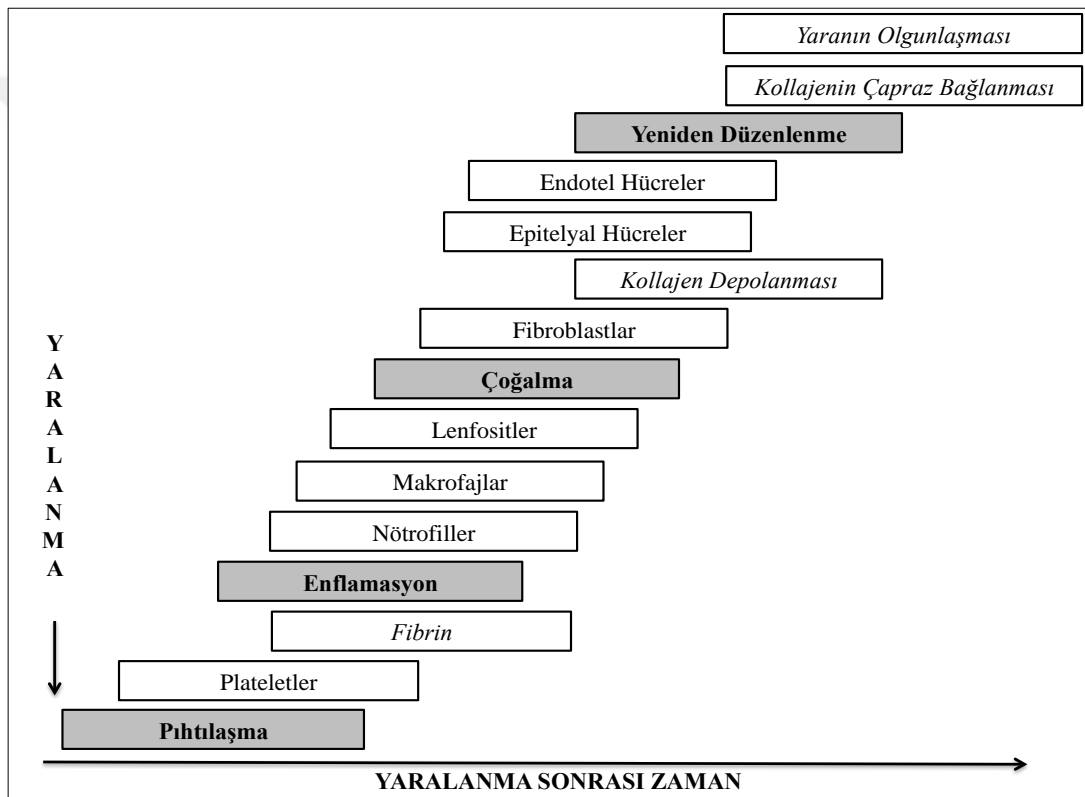
Bununla birlikte simvastatinin pek çok hücre fonksiyonunda önemli rol oynaması, araştırmacıları statinlerin kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesine yöneltmiştir. Yapılan çalışmalarla statinlerin progenitor hücrelerle beraber kök hücrelerin canlılığını, mobilizasyonunu, hasarlı dokuya yerleşimini, farklılaşmasını ve proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan simvastatin formülasyonları çözelti veya vazelin içinde merhem tipi klasik dozaj şekilleri olup, klasik dozaj şekilleri ile yara dokusunda uzun süreli temasın sağlanması ve sabit salım hızı elde edilmesi oldukça güçtür. Ayrıca statinlerin stabilitesinin de iyi olmaması etkinliği azaltabilir. Bu nedenle statinlerin stabilitesinin ve kontrollü ilaç salımının sağlanması için simvastatin yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır. Nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemler, fizyolojik olarak kabul edilebilir katı/sıvı lipitlerle hazırlanan nanopartiküler sistemler olup, etkin maddelerin stabilitesini artırma, kontrollü ilaç salımı sağlama gibi avantajlara sahiptir.

Tüm bu verilerden yola çıkılarak bu tez kapsamında, yaygın olarak kullanılan bir statin türeviden olan simvastatinin yüklenmiş nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemler hazırlanmış ve bu nanopartiküllerin hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına yüklenmesi, ayrıca statinlerin kök hücre tedavisindeki olumlu etkilerinden yola çıkılarak doku iskelelerine kök hücrelerin de ilave edilmesi ile diyabetik yara iyileşmesinde uygulanacak daha önce denenmemiş yeni bir topikal tedavi yönteminin oluşturulması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yara ve Yara İyileşmesi

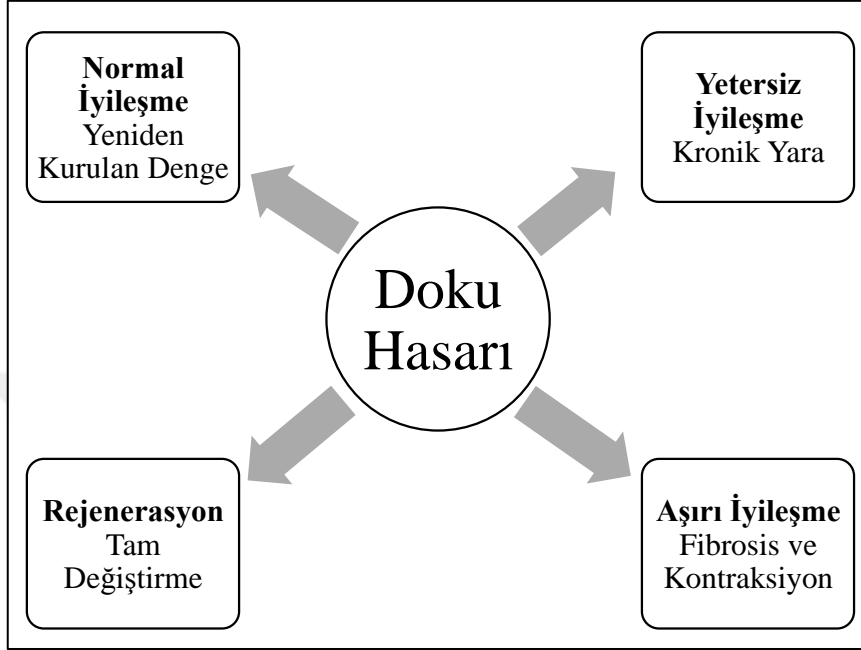
Yara; normal bir anatomik yapının ve daha önemlisi fonksiyonun bozulması olarak tanımlanmaktadır (1). Yaralanma sonucu; spesifik hücrelerin yara bölgesine taşınması ile karakterize olan ard arda gerçekleşen yara iyileşmesi fazları başlamaktadır. Yara iyileşmesi; pıhtılaşma, enflamasyon, çoğalma ve yeniden düzenlenme olmak üzere 4 ana fazdan oluşmaktadır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Yara iyileşmesinin fazları (2).

Pıhtılaşma fazında plateletler ve enflamasyon fazında ise nötrofiller ve makrofajlar yaralı dokuya ulaşan ilk hücrelerdir. Bu hücreler ilgili doku hücrelerinin girişi ve yeni kan akımının sağlanması için gerekli olan sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasında anahtar role sahiptir. Çoğalma fazında etkili olan fibroblastlar da yara iyileşmesi için gerekli olan kollajen birikimini sağlamaktadır. Oluşan kollajen matriks yeniden düzenlenme fazı boyunca çapraz bağlanarak düzenlenir (2, 3).

İnsan vücudunda, herhangi bir doku hasarı sonucu 4 olası yanıt meydana gelebilmektedir. Bunlar; normal iyileşme, yetersiz iyileşme, aşırı iyileşme ve rejenerasyon durumlarıdır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Doku hasarı sonucu oluşan olası dört yanıt (4).

Normal iyileşme sağlıklı çoğu insanın yaralanma sonrası gösterdiği tipik bir yanıttır. Normal iyileşme durumunda tüm iyileşme fazları oldukça düzenli ve yeterli şekilde gerçekleşerek, yara izinin yeniden düzenlenmesi ve iz oluşumu arasındaki denge tekrar kurulmaktadır. Akut yaralar normal olarak iyileşen yaralardır. Yeterli iyileşmenin gözlenmediği patolojik durumlarda ise normal iyileşmenin tersine doku hasarı tamir edilememektedir. Kronik yaralar bu yanıtın örneğidir. Aşırı iyileşme durumunda ise fazla miktarda doku birikimi gözlenmektedir. Bu durum ECM oluşumunun aşırı olması ve azalmış yeniden düzenlenme ile karakterize bir durumdur. Rejenerasyon, yapı ve fonksiyon kaybı oluşması sonucunda meydana gelen önemli bir süreçtir, hasar gören doku tam olarak tekrar yerine konabilmektedir. İnsanların rejenerasyon yeteneği sadece sınırlı miktarda hasar gören dokularda meydana gelebilmektedir. İnsanlarda karaciğer, epidermis ve bir dereceye kadar sinirler kısmen yaralanma sonrası yeniden oluşturulabilir (4).

2.2. Kronik Yaralar ve Tedavi Yaklaşımları

Kronik yaralar; onarımın düzenli ve zamanında ilermediği, anatomik ve fonksiyonel bütünlüğün üç aydan daha uzun bir süre boyunca düzelmediği yaralardır (5). Akut yaralar yara iyileşme sürecinin dört ana fazının birbiri ardına zamanında gerçekleştiği normal bir şekilde iyileşen yaralar iken kronik yaralar iyileşmenin belirli bir fazında, genellikle enflamasyon fazında kalarak ilerleme göstermeyen yaralardır. Doku hasarının gerçekleşmesinin ardından, bakteriyel kontaminasyon, enfeksiyon veya patolojik bozukluklar gibi nedenler yarada uzatılmış ve artmış bir enflamatuvar yanıt oluşturabilmektedir. Bu artmış enflamatuvar yanıt, hasar görmüş ECM proteinlerini parçalayarak dokunun rejenerasyonunu sağlayan, enflamatuvar sitokin ve proteaz enzimlerinin seviyesini yükseltmekte ve aşırı miktarda ECM yıkımı sonucunda, ECM yapımı ve yıkımı arasındaki denge bozularak yara kronik bir hal almaktadır (6).

Tüm yara tiplerinin kronikleşme ihtimali bulunmaktadır. Ancak kronik yaralar; ortaya çıkış nedenleri, özellikleri ve özel tedavi yaklaşımlarına göre sınıflandırılmaktadır. Yaygın ve nadir görülen kronik yara tipleri Tablo 2.1.'de verilmiştir. Venöz ve arteriyel yetmezlikler, diyabet ve lokal bası en sık görülen patofizyolojik nedenlerdendir. Beslenme ile ilgili durumlar, enfeksiyon ve değişen immünolojik durumlar gibi sistemik faktörlerde yara iyileşmesini zayıflatmaktadır (5, 7).

Geleneksel olarak kronik yara tedavisinde; topikal ve sistemik ilaç tedavisi, örtücü etki ve nemlenmeyi sağlayan örtüler/pansumanlar, debridman ve gerekli ise cerrahi yaklaşımlar uygulanmaktadır. Genel yara bakım prensipleri pek çok kronik yara tipine uygulanabilmektedir.

Tablo 2.1. Kronik yara tipleri (5).

Yaygın Kronik Yara Tipleri	Patoloji
Venöz Ülserler	Derin venöz yetmezlik, Post-Trombotik sendrom, Başlıca varisler
Arteriyel Ülserler	Makroanjyopati
Diyabetik Ülserler	Nöropati, Kılcal damar bozukluğu
Bası Yaraları	Hareketsizlik, Nöropati
Nadir Kronik Yara Tipleri	Patoloji
Vaskülit	Romatoid artrit, Skleroderma, Poliarteritis nodosa, Piyoderma gangrenozum
Hematolojik	Kriyoglobülinemi, Orak hücre anemisi, Hemolitik anemi, Waldenstrom makroglobülinemisi, Lösemi
Neoplastik	Marjolin ülser, Ülser rhodes basalioma, Spinalioma
Diğerleri	Travma, Kasten açılmış yaralar, Martorelli ülseri

Kronik yaraların enfeksiyonları, sıklıkla polimikrobialdır ve en yaygın görülen patojenler *Staphylococcus aureus* ve anaeroblardır. Topikal antibiyotik tedavisi kronik yaralarda bakteri sayısında azalma sağlamaktadır ancak kronik yara tedavisinde sistemik antibiyotik tedavisi uygulanması gerekmektedir. Mümkün olması durumunda, klinik enfekte yaraların kültürü alınarak, mikroorganizma duyarlılığı belirlenmeli ve daha sonra sistemik antimikrobiyal ajanlar reçete edilmelidir. Uygun bir yara pansumanının seçimi, nemli yara çevresinin sağlanması, mevcut iyileşme fazının ve o faza ait bileşenlerin desteklenmesi ve istenmeyen etkilerin giderilmesi açısından gereklidir. Kronik yara sıvısı fibroblast çoğalmasını engeller ve ECM bileşenlerini ve büyüme faktörlerini yok eden proteazlar içermektedir. Bu sebeple ideal yara örtüsü yarayı aşırı derecede kurutmadan bu eksudatı absorbe etmelidir. Yara yatağının hazırlanması herhangi bir kronik yaranın tedavisinde ilk aşamadır ve ilk olarak aşırı bakteriyel yük, nekrotik materyaller, devaskülarize dokular gibi iyileşmeye engel olan lokal geciktiriciler ortadan kaldırılır. Ölü, hasarlı veya enfekte dokunun temizlendiği bu işleme ölü doku temizliği (debridman) denilmektedir. Debridman; keskin aletler, enzimler, mekanik cihazlar veya biyolojik ajanlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Düzgün yapılan bir ölü doku temizliği hayati dokuları korur ve zayıf iyileşme gösteren yaraları akut yaraya dönüştürmektedir. Kemik, tendon, kan damarı veya sinir gibi fonksiyonel yapıları ortaya çıkaran kronik yaralarda sıklıkla koruma için cerrahi müdahale

gerekmektedir. Cerrahi kapatma tedavisi altta yatan yara oluşumunu destekleyen hastalığın tedavisi yapılmadığı takdirde başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (7-9).

2.2.1 Diyabetik Yaralar

Diyabet, insülin salgısındaki veya etkisindeki bozukluklardan veya her ikisinden kaynaklanan, karbonhidrat, lipit, protein metabolizmasındaki değişiklikler ve yüksek serum glikoz seviyesi ile karakterize bir metabolik bozukluktur (10). Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2015 verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 415 milyon diyabet hastası bulunmakta olup bu hastaların birçoğu henüz teşhis ve tedavi edilmemiştir. Giderek artan diyabet insidansının önüne geçilmediği takdirde bu rakamın 2040 yılında 642 milyona ulaşarak, her 10 yetişkinden birine yükseleceği tahmin edilmektedir. Diyabet, hastaların fiziksel ve ruhsal sağlığını bozmasının yanında sağlık hizmeti sistemleri için de önemli sorunlar yaratmaktadır (11). Hastalığın ilerlemesi veya vasküler hasarların oluşması; retinopati, nöropati, nefropati, kardiyovasküler komplikasyonlar ve ülserasyon gibi ciddi diyabetik komplikasyonlara neden olmaktadır (12).

Bozulmuş yara iyileşmesi (ülserasyon) diyabetin önemli bir komplikasyonudur ve diyabetli hastaların yaklaşık %25'ini tehdit eden önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Diyabetik yaralar, yara iyileşmesi fazlarında fonksiyon bozuklukları ile karakterize olan, yüksek sepsis riski bulunan ve nihayetinde amputasyonla sonuçlanan yaralardır (13).

Yara iyileşme fazları arasındaki geçiş genellikle, yara iyileşmesi sürecinde çok önemli olan hücrelerin (keratinositler, fibroblastlar, mast hücreleri ve makrofajlar) olgunlaşması ve farklılaşmasına bağlıdır (14). Diyabetli hastalarda oluşan yaralar kronik enflamatuar fazda kalır ve zamansal bir sıra içerisinde iyileşme gösteremezler. Enflamatuar hücrelerin bölgeye sürekli göçü ve enflamatuar mediyatörlerin oluşturulmasının desteklenmesi yara proteazları ve inhibitörleri arasında dengesizliğe neden olarak ECM sentezini ve normal yara iyileşmesi için gerekli olan yeniden düzenlenmeyi engeller. Diyabet, hücre adhezyonu, kemotaksis, fagositoz ve sitokin üretimi ve salgılanması gibi pek çok nötrofil ve makrofaj

fonksiyonlarını bozmaktadır. Diyabetik yaralarda, keratinositler ve fibroblastların göç kapasiteleri ve büyüme faktörlerine karşı gösterdikleri yanıtta azalma gözlenmekte iken apoptozlarında artma gözlenmektedir. Normal bir yara iyileşmesi sürecinde sistemli bir şekilde gerçekleşen anjiyogenezis ve granülasyon dokusu oluşumu gibi hücrel ve moleküler olaylar diyabet durumunda önemli derecede bozulduğundan diyabette yara iyileşme gecikerek zamanla kronik bir yaraya dönüşmektedir. Ne yazık ki diyabetik ülserlerin iyileştirilmesi için uygulanan mevcut tedavilerde tatmin edici sonuçlar sunmamaktadır. Bu nedenlerden dolayı diyabetik yaraların tedavisi günümüzde önemli bir klinik problem haline gelmiştir (6, 13, 15).

2.3. Diyabetik Yara Tedavisinde Kullanılan Etkin Maddeler

Günümüzde yara iyileşmesinde kullanılan pek çok etkin madde bulunmaktadır. Antibiyotikler (polimiksin B, gentamisin, fusidik asit, mupirosin ve kinolonlar), antiseptikler (heksaklorofen, povidon-iyot ve klorheksidin), steroidler, büyüme faktörleri sıklıkla kullanılan etkin madde gruplarıdır (16-18). Son zamanlarda statinlerin yara iyileşmesi üzerinde tedavi edici etkinliği olduğunu gösteren çalışmaların olması, bu grubun, özellikle diyabetik yaralarda yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

2.3.1. Statin Grubu İlaçlar ve Diyabetik Yara Tedavisindeki Önemi

Statinler, hiperkolesterolemi tedavisinde kan kolesterol seviyesinin düşürülmesi amacıyla kullanılan, günümüzde yaygın olarak reçetelenen bir grup ilaçtır. Statinler kolesterol düşürücü etkilerini, kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz enzimini yarışmalı olarak inhibe ederek, kolesterol sentezinin azaltılması yoluyla göstermektedir (19).

Statinler üzerinde son yıllarda yapılan çalışmalarla, statinlerin lipit düşürücü etkilerinden bağımsız olarak, yara iyileşmesinde yeni bir tedavi yaklaşımı oluşturacak potansiyel etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Statinlerin yara iyileşmesindeki bu düzeltici etkilerinin özellikle diyabetik yara tedavisindeki problemlerin ortadan kaldırılmasında oldukça etkili olacağı düşünülmektedir,

gerçekleştirilen farklı hayvan deneyi çalışmaları ile statinlerin diyabetik yara tedavisinde de olumlu etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır (20, 21).

Statinlerin inhibe ettiği HMG-KoA redüktaz enziminin yer aldığı reaksiyonun ürünü olan mevalonat, sterollerin sentezi için anahtar bir ara maddedir. Memeli hücrelerinde mevalonatın büyük bir kısmı kolesterole dönüştürülürken diğer kısmı ise steroid hormonları, safra asitleri ve D vitaminine dönüştürülmektedir. Bununla birlikte mevalonat sadece kolesterol biyosentezindeki bir ara molekül değil aynı zamanda hücre içi sinyal aktarımını sağlayan membran bağımlı proteinlerden farnesil pirofosfat (FPF) ve geranilgeranil pirofosfat (GGPF) gibi birçok izopren yapısındaki bileşikler için de aracı molekül olarak rol oynamaktadır (22). Bu nedenle statinler, kolesterol sentezi üzerindeki etkilerine ek olarak, farklı birçok yapısal maddenin sentezini düzenleyerek immünmodülatör, antienflamatuar ve anjiyojenik etkiler gibi çeşitli olumlu etkiler göstermektedir.

Anjiyojenik etkinin, statinlerin potansiyel anjiogenez modülatörleri gibi faaliyet göstermesinden kaynaklandığı öne sürülmektedir. Örneğin, statinler ile endotel hücrelerdeki anjiyojenik süreçleri düzenleyen serin/treonin protein kinaz ve anjiogenez stimülatörü olan nitrik oksitin üretimi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (23). Bununla birlikte, yaygın olarak kullanılan statinlerden biri olan simvastatinin, anjiyogenezisten, hücre proliferasyonuna, ECM oluşumuna kadar yara iyileşmesinin pek çok aşamasında görev alan Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörünün (VEGF) farklı hücre tiplerinden salımını artırdığı gösterilmiştir (20).

Statinlerin, C-reaktif peptidi ve çeşitli kemokin, sitokin ve adhezyon moleküllerini inhibe ederek antienflamatuar özellik sergiledikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte T-hücresi aktivitesinin düzenlenmesinde de rol oynayarak, immün-modülasyona katkı sağladıkları düşünülmektedir (24). Sonuç olarak, statinler enflamasyonu azaltmanın yanında, neovaskülarizasyonu desteklemesi ve bakteri yükünü azaltması nedeniyle kronik yara iyileştirici potansiyele sahiptir.

Kronik enflamasyon ve azalmış anjiyogenez diyabetik yaralar gibi kronik yaraların iyileşmesinin gecikmesinde rol oynayan önemli faktörlerdendir. Yoğun

araştırmalar ve teknolojik gelişmelere rağmen diyabetik yara tedavisi için henüz ölçülebilir bir klinik etkiye sahip uygun bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu durum tedavide yüksek maliyetlere ve zayıf uzun dönem tedavi sonuçlarına yol açarak endişe yaratmaktadır (13). Bu nedenle yara iyileşmesini pek çok yönden destekleyen statinlerin, diyabetik yara tedavisinde topikal uygulanması, diyabetik yara iyileşmesinde umut vermektedir.

2.4. Kök Hücrelerin Diyabetik Yara Tedavisindeki Yeri ve Uygulamaları

Diyabetik yara patofizyolojisi kompleks olup çok etkenlidir, iyileşmenin hızlandırılması için birçok seviyede müdahale edilmesi gerekmektedir. Diyabetik yaralar zayıf damarlanmalar ile karakterizedir, bu sebeple yara bölgesine besinlerin ve hücrelerin taşınmasının bozulduğu düşünülmektedir. Kök hücreler özellikle anjiogenezis sağladığından kronik yara tedavisinde olumlu sonuçlara yol açmaktadır (25).

Kök hücreler yara iyileşme sürecinde;

- Derinin fonksiyonu ve çeşitli bölümleri için gerekli olan spesifik yapılara farklılaşabilmektedir.
- İskemik ve yaralı dokularda kemokin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağlar.
- Salgılanan bu maddeler aracılığıyla anjiogenezise ve ECM'in yeniden düzenlenmesine yol açarlar.
- Tüm bunların sonucunda yara iyileşmesi için uygun ortam hazırlayarak, normal iyileşme süreci gerçekleştirirler (25, 26).

Kronik yaraların kök hücrelerle tedavisi üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda önemli sonuçlar elde edilmiştir. Hocking ve Gibran (27) mezenkimal kök hücrelerin (MKH) diyabetik yara iyileşmesindeki çoklu etkilerini kanıtlarken Lee ve ark. (28) endotelial progenitör hücrelerin neovaskülarizasyon ve yara iyileşme sürecini desteklediklerini göstermişlerdir. Benzer çalışmaların bir diğerinde ise, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile mononükleer hücrelerin diyabetik ayaklı

hastalarda yara iyileşmesi üzerine etkisi karşılaştırılmış; elde edilen sonuçlarda mezenkimal kök hücre verilen hasta grubunda mononükleer hücrelere kıyasla alt ekstremitte kan akımında daha fazla artış ve daha hızlı yara iyileşmesi gözlenmiştir (29).

Diyabetik yara tedavisi için farklı kök hücre tipleri kullanılmaktadır. Bunlar genel olarak allojenik ve otolog kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılabilirler. Allojenik kök hücreler; mezenkimal hücreler ve embriyonik kök hücreleri içermektedir. Otolog kök hücreler ise kemik iliği kaynaklı endotelyal progenitör hücreler, hematopoetik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreleri kapsamaktadır (30).

2.4.1 Mezenkimal Kök Hücreler

Son yıllarda mezenkimal kök hücreler kolay elde edilebilir olmaları, güçlü çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri ile rejeneratif tıbbın önemli elemanı haline gelmişlerdir. Mezenkimal kök hücrelerin heterojen bir grup oldukları ve birbirlerinden farklı yetenekleri olan hücre karışımı oldukları düşünülmektedir. Multipotent erişkin kök hücresi (*multipotent adult progenitor cells*, MAPC), çok küçük embriyonik hücre benzeri hücreler (*very small embryonic-like cells*, VSEL), erişkin kemik iliği kaynaklı indüklenebilir çok kökenli hücre (*human marrow-isolated adult multilineage-inducible cells*, MIAMI) ve insan kemik iliği kaynaklı kök hücresi (*human bone marrow stromal cells*, hBMSC) bu hücrelerin en tanınmış olanlarıdır ve mezenkimal kök hücre kolonilerinin %0.1-1'ini oluşturmaktadırlar. Mezenkimal kök hücrenin her üç germ yaprağından kaynaklanan hücrelere dönüşebildikleri çok çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (31).

Mezenkimal kök hücre tedavisi dermal rejenerasyonu ve yara kapanmasını hızlandırırken, inflamatuvar çevre düzenlemesi yaparak iyi vaskülarize matriks granülasyon dokusu oluşumunu uyarır. Bunun yanı sıra keratinosit migrasyonunu hızlandırıp, iyileşen yara hücrelerindeki apoptozu önler. Mezenkimal kök hücreler aynı zamanda diyabetik dokularda iyileşmeyi de hızlandırarak, iyileşmeyen ülser oluşumlarını da önleyebilmektedir (32). Bu hücrelerin birçok dokuda rejeneratif-

trofik özellikleri bulunmaktadır. İnflamatuvar medyatörlerden interferon-gama ve tümör nekrozis-alfa mezenkimal kök hücrelerin ortama gelmesini ve ekstrasellüler matrikse doğru hareketi sağlayarak, birçok sitokinin mezenkimal kök hücre migrasyonunu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir. Mezenkimal hücreler yara iyileşme fazlarının hepsinde yara yatağında tespit edilmiş, epidermal hücrelere, keratinositlere ve endotelial hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir (33). Özellikle yaralı bölgede kümeleşen mezenkimal kök hücreler deri bileşenlerinde yer alan çeşitli hücre tiplerine farklılaşarak yara iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Sasaki ve ark. (34) mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkisini in vitro hücre kültürü ve in vivo fare modelleri ile inceleyerek mezenkimal kök hücrelerin yara iyileşmesi sürecinde başta keratinositler, endotelial hücreler, perisitler olmak üzere çeşitli deri hücre tiplerine farklılaştığını göstermişlerdir.

Bu hücrelerle tedavi edilen yaralarda hasarın enflamatuvar fazı hızlı olup, granülasyon dokusu erken oluşur ve yeniden düzenlenme fazına çabuk geçilerek minimum skar dokusu gelişimi sağlanmaktadır (33).

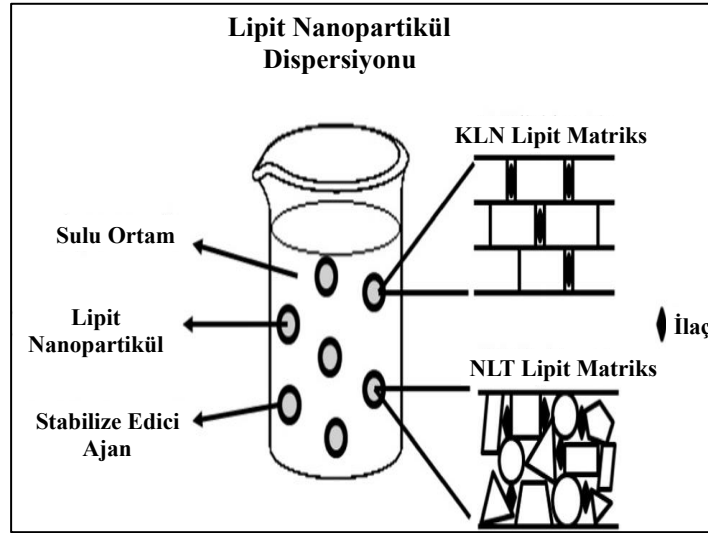
2.5. Katı lipit nanopartiküller (KLN) ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı (NLT) Sistemler

Miseller, lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, nanoyapılı lipit taşıyıcılar ve polimerik nanopartiküller de dahil olmak üzere günümüzde çok çeşitli gelişmiş ilaç taşıyıcı sistemler bulunmaktadır. Bu sistemler ilaçların yan etkilerini azaltmak ve tedavi etkinliğini artırmak için geliştirilmiştir (35).

Katı lipit nanopartiküller (KLN) ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı (NLT) sistemler; lipozomlar ve polimerik nanopartiküller gibi iyi bilinen taşıyıcı sistemlerde görülen bazı problemlerin üstesinden gelmek için alternatif olarak geliştirilmişlerdir. KLN ve NLT sistemlerin, fizyolojik lipitlere benzer yapıdaki lipitlerden oluşması, çeşitli avantajlar sağlayarak, bu yapıları ideal bir taşıyıcı sistem haline getirmektedir. Bu sistemler çeşitli deri hastalıkları ve kanser tedavisinden, santral sinir sistemi, akciğer ve karaciğere hedeflendirmeye kadar çok geniş bir

uygulama alanı sunmaktadır (36-39). Ayrıca, biyolojik olarak parçalanabilmeleri, düşük toksisiteleri ve iyi tolere edilebilirlik özellikleri sayesinde, parenteral, oküler, oral, pulmoner ve topikal uygulama gibi çok çeşitli yollarla uygulanabilmektedir (38-41).

1990'larda üç çalışma grubu Müller, Gasco, Westesen ve ark. (42-44) tarafından birinci jenerasyon lipit nanopartiküller olan KLN'ler geliştirilmiştir. Katı lipit nanopartiküller, yağ/su emülsiyonlarındaki sıvı yağ yerine katı lipit veya katı lipit karışımlarının bulunduğu sistemlerdir. Bu sebeple KLN'lerin lipit matriksi oda ve vücut sıcaklığında katı haldedir. KLN'ler stabilize edici ajan olarak yüzey etkin maddenin %0,5-%5 (a/a) oranlardaki sulu çözeltisi içerisinde, %0,1-%30 (a/a) oranında lipitin disperse edildiği sistemlerdir, KLN'lerin ortalama partikül büyüklükleri yaklaşık olarak 40 ila 1000 nm arasındadır (45), NLT'ler ise katı lipitin yanısıra sıvı lipitlerin de bileşime girmesiyle, katı lipit, sıvı lipit, emülgatörler ve sudan oluşan nanopartiküllerdir. NLT'ler, KLN'lerin daha sonraki jenerasyonu olup, yapıya sıvı lipitlerin girmesiyle etkin madde yükleme kapasitesi artırılmıştır. Daha stabil olmaları da avantajlarıdır. Şekil 2.3.'de KLN ve NLT sistemlerinin lipit matriks yapıları arasındaki farklar gösterilmektedir (46).



Şekil 2.3. KLN ve NLT sistemlerine ait lipit matriks yapısı ve bileşimi (46).

2.5.1. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Avantaj ve Dezavantajları

KLN'ler diğer ilaç taşıyıcı sistemlerin sağladığı avantajların kombinasyonunu içermektedir. Özellikle fiziksel olarak stabil olmaları, hapsedilen ilacın degradasyondan korunması, kontrollü salım sağlanması, düşük sitotoksositeye sahip olması, organik çözücü gerektirmemesi ve hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçların hapsedilmesine olanak vermesi en önemli avantajlarından (47). Tüm bunların yanında yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemiyle KLN'ler büyük ölçekte üretilmektedir. Ancak KLN'lerin önemli dezavantajları da bulunmaktadır. KLN'ler nispeten düşük ilaç yüklenme kapasitesine sahiptir ve saklama sırasında polimorfik geçişler nedeniyle ilacın taşıyıcıdan dışarı sızmasına yol açmaktadır. Bu durum KLN'lerin üretilmelerinin ardından partiküler matriksin lipit modifikasyonunun daha düzensiz bir polimorfik formdan oldukça düzenli bir yapı olan β -modifikasyon formlarına dönüşmesinden kaynaklanmaktadır. β -modifikasyon yapısı bir kaç düzensiz yapının yanında kusursuz bir kristal kafes yapısı ile karakterizedir. Bu gibi dezavantajlar KLN'lerin uygulama alanlarını kısıtlamaktadır (48).

KLN ile ilgili bu problemleri çözebilmek için, ikinci jenerasyon lipit nanopartiküller olan NLT'ler geliştirilmiştir. NLT'lerde lipit matriks katı ve sıvı lipitin karışımından oluşmaktadır ve KLN'lerdeki gibi oda ve vücut sıcaklığında katı haldedirler. NLT formülasyonlarında farklı türden katı ve sıvı lipitlerin karıştırılmasıyla, KLN'lere göre daha az düzenli, kısmen kristalize veya amorf bir lipit matriks yapısı oluşmaktadır. Bu düzensizlik, etkin maddenin hapsedilmesi için daha çok oda oluşumuna yol açmıştır. Ayrıca etkin maddelerin büyük kısmı sıvı lipitlerde daha çok çözünürlük göstermektedir. Bu nedenle NLT formülasyonları KLN'lere göre daha yüksek ilaç yüklenme kapasitesi ile optimum bir kontrollü salım sistemi sağlamaktadır (48).

Sonuç olarak NLT'ler KLN'lerin dezavantajlarını ortadan kaldırmakla birlikte KLN ve diğer lipit nanotaşıyıcıların tüm avantajlarına sahip olan sistemlerdir.

2.5.2. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Bileşimi

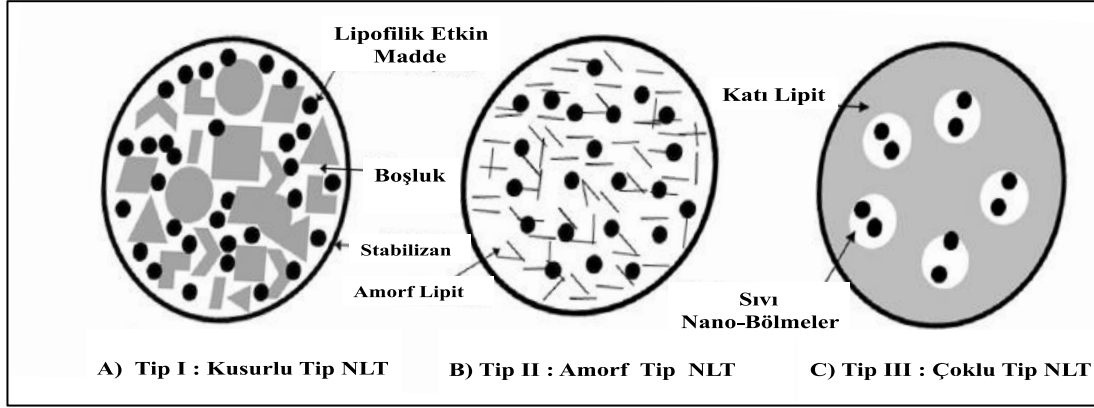
KLN ve NLT formülasyonları genel olarak, katı lipit veya katı ve sıvı lipit karışımı, emülgatör ve sudan oluşmaktadır. Emülgatör olarak noniyonik yüzey etkin maddeler tercih edilmektedir. Kullanılan lipitler ise genel olarak güvenilir kabul edilen (*Generally Recognized as Safe*, GRAS) özelliğine sahip fizyolojik ve biyoparçalanabilir bileşiklerdir. KLN ve NLT formülasyonlarında sık kullanılan katı lipitler, sıvı lipitler ve emülgatörler Tablo 2.2.'de özetlenmiştir (49).

Tablo 2.2. Katı lipit nanopartikül ve nanoyapılı lipit taşıyıcı formülasyonlarında sık kullanılan lipitler ve emülgatörler.

Katı Lipit	Sıvı Lipit	Emülgatör
<ul style="list-style-type: none"> • Stearik asit • Karnaubamumu (<i>cera karnoba</i>) • Gliseril tristearat / tristearin • Gliseril monostearat • Setil palmitat • Gliseril monokaprat • Gliseril palmitostearat • Gliseril behenat • Propilen glikol monostearat 	<ul style="list-style-type: none"> • Soya yağı • Orta zincirli trigliseri / kaprilik ve kaprik-trigliseritler • Oleik asit • Propilen glikol • A-tokoferol / e vitamini • Mısır yağı • Skualen 	<ul style="list-style-type: none"> • Tween 80 • Lesitin • Poloksamer 188 • Myverol 18-04K • Poligliseril 3-metilglükoz distearat • Sodyum dodesil sülfat • Sodyum deoksikolat • Tween 20

Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistem Tipleri

Formülasyon bileşimi ve üretim parametrelerine bağlı olarak üç tip NLT yapısı bulunmaktadır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı (NLT) sistem tipleri.

Tip I, kusurlu bir lipit matriks yapısına sahip olan NLT yapılarıdır. İyi bir etkin madde hapsedilebilirliği için önemli bir ön koşul olan lipit nanopartikül yapısındaki genel kristal kusurları ve gliseritler ile yağ asidi zincirleri arasındaki mesafeler çok farklı yağ asitlerinden oluşan gliseritlerin kullanılması ile artırılabilir. Bu yüksek oranda düzensizlikler bulunan, kusurlu kristal yapısı, KLN'lerdeki gibi katı lipit kullanımından daha çok NLT yapılarındaki gibi katı lipitlerle kimyasal olarak çok farklı olan sıvı lipitlerin birlikte kullanımı ile elde edilebilir. Kusurlu NLT tipinde yapıdaki bu kusurlar/boşluklar ilacın moleküler formda ve amorf kümeler halinde yerleşmesini sağlayarak yüklenen ilaç miktarını artırmaktadır (50).

Tip II NLT'ler amorf tiptedir, bu yapıda lipit çekirdek kristal halden daha çok amorf bir yapı oluşturacak şekilde katılaşmaktadır. Plansız bir katı amorf matriks yapısı görülmektedir. Bu tip NLT'ler, hidroksi oktakosanol hidroksitearat, izopropilmiristat veya orta zincirli trigliseridler gibi spesifik lipitlerin karışımı ile üretilmektedir (50).

Çoklu tip (Tip III) NLT'ler, lipofilik etkin maddelerin katı lipitlerle karşılaştırıldığında sıvı lipitlerdeki çözünürlüğünün daha yüksek olmasına bağlı olarak III. Tip çoklu NLT'ler geliştirilmiştir. Bu tip NLT'lerde katı matriks yapısı, sıvı lipitlerden oluşan küçük sıvı nano-bölmeler içermektedir. Bu sıvı lipit nano-bölmelerinde etkin maddenin çözünürlüğü daha yüksektir bu nedenle etkin maddenin yüklenme kapasitesi artırılmaktadır. Ayrıca nano-bölmelerin katı lipitlerle çevrilmiş

olması kontrollü ilaç salımına imkan vermektedir. Çoklu tipte NLT'ler katı bir lipit ile daha fazla miktardaki bir sıvı lipitin karışımından üretilebilmektedir (50, 51).

2.5.3. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlama Yöntemleri

KLN ve NLT sistemleri yaygın olarak; sıcak veya soğuk yüksek basınçlı homojenizasyon, mikroemülsiyon, çözücü emülsifikasyon-eyaporasyon ve yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon yöntemleri ile hazırlanmaktadır.

Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi

Yüksek basınçlı homojenizasyon, KLN üretimi için güvenilir ve etkili bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Yüksek basınçlı homojenizatörler, sıvıyı birkaç mikron genişliğindeki dar bir delikten, yüksek bir basınçla (100-2000 bar) iterler. Sıvı, çok kısa bir mesafede çok yüksek bir hıza (1000 km/saat'in üzerinde) ulaşır ve partiküller nanometre düzeyine kadar küçülür.

Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, sıcak homojenizasyon ve soğuk homojenizasyon olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Sıcak homojenizasyonda lipitlerin erime noktasının üzerinde homojenizasyon gerçekleştirilirken soğuk homojenizasyon yönteminde bu sıkıntılar gözlenmez. Etkin madde, erime noktasının 5-10°C üzerinde bir sıcaklıkta eritilmiş olan lipit içerisinde çözülür veya disperse edilir. Etkin madde içeren erimiş lipit, aynı sıcaklıktaki sulu emülgatör çözeltisi içinde yüksek hızda karıştırma ile disperse edilir. Elde edilen sıcak pre-emülsiyon homojenizatörden geçirilir ve sonuçta oluşan sıcak Y/S nanoemülsiyonu oda sıcaklığına kadar soğutulur. Bu şekilde lipit katılaşır ve katı KLN ve NLT'ler elde edilir. Sıcak homojenizasyon yöntemi, sıcağa dayanıklı etkin maddeler için uygundur. Yüksek sıcaklığa karşı duyarlı olan bileşikler için soğuk homojenizasyon yöntemi tercih edilmektedir (52, 53).

Kovacevic ve ark. (52) yaptıkları bir çalışmada KLN ve NLT üretimi için sıcak basınçlı homojenizasyon yöntemini kullanmışlardır. Formülasyonların tümünde %10 (a/a) lipit faz oranı sabit tutularak, KLN'ler için lipit faz olarak setil

palmitat (Cutina CP), NLT'ler için ise farklı oranlarda setil palmitat ve Miglyol 812 karışımları kullanılmıştır. Hazırlama aşamasında lipit faz 75°C'de eritilip, sıcak sıvı yüzey etkin madde çözeltisi ile birleştirilerek 8000 rpm'de yüksek hızlı karıştırıcıda 1 dk. süresince karıştırılmış ardından yüksek basınçlı homojenizatöre alınan ön emülsiyon için homojenizasyon işlemi 500 barda 75°C'de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tüm KLN ve NLT'lerin ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 170 nm-200 nm olarak bulunmuştur.

Mikroemülsiyon Yöntemi

Gasco ve ark.'nın (54) geliştirdiği bir KLN hazırlama tekniği olan mikroemülsiyon yöntemi, mikroemülsiyonların seyreltilmesi temeli ile hazırlanmaktadır. Etkin madde eritilmiş lipit içinde çözündürülür ve 70°C'ye kadar ısıtılır. Yüzey etkin madde yardımcı yüzey etkin madde içeren su fazı da aynı sıcaklığa kadar ısıtıldıktan sonra, su fazı yağ fazına ilave edilerek mikroemülsiyon elde edilir. Sıcak mikroemülsiyonun 1:25-1:50 oranlarında soğuk su (2-4°C) ile dilüsyonu sonucunda lipit nanopartiküller elde edilir. Aşırı miktardaki suyun uzaklaştırılması gerektiğinden ultrafiltrasyonla veya liyofilizasyon işlemleri uygulanarak KLN veya NLT formülasyonları elde edilir (54, 55).

Fadda P. ve ark. (55) tarafından yapılan bir çalışmada, lipit faz olarak tripalmitin (Dynasan 116), yüzey etkin madde olarak ise soya fasulyesi lesitini (Epikuron 200) ve sodyum taurocholate, Solutol HS15 yardımcı yüzey etkin madde kullanılarak mikroemülsiyon yöntemi ile KLN formülasyonları hazırlanmıştır. Mikroemülsiyonlar, lipit ve su fazının 70±0,1°C'de 7000 rpm'de yüksek hızlı karıştırıcı altında 20 dk. süresince karıştırılması ile hazırlanmıştır. Elde edilen mikroemülsiyon daha sonra 4±0,1°C sıcaklığındaki sıvı faz içerisine damla damla ilave edilerek disperse edilmiş ve KLN'ler elde edilmiştir.

Çözücü Emülsifikasyon-Evaporasyon Yöntemi

Bu yöntemde lipit faz suda çözünmeyen bir organik çözücü içerisinde çözündürülüp sulu faz içerisinde emülsifiye edilir. Daha sonra çözücünün vakum altında buharlaştırılmasıyla nanopartiküller oluşur ve çökerler. Bu yöntem ısı kullanılmadığı için avantajlı iken organik çözücü kullanılması dezavantaj yaratır (48).

Tiwari ve ark. (56) çözücü emülsifikasyon-evaporasyon yöntemini kullanarak simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonları hazırlamışlardır. Katı ve sıvı lipit olarak seçilen gliserol mono stearat ve oleik asit karışımı izopropil alkol organik çözücüde çözündürülmüş daha sonra Poloxamer 407 yüzey etkin maddesini içeren sulu faz içerisinde manyetik karıştırıcı altında disperse edilerek lipit nanopartiküller oluşturulmuştur. Elde edilen formülasyonların partikül büyüklüğü 180 nm-260 nm arasında değişmektedir.

Yüksek Hızda Karıştırma ve / veya Ultrasonikasyon Yöntemi

Yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon işlemleri genellikle bir arada kullanılmakta ve belli bir süre boyunca yüksek sıcaklıkta karıştırma işlemi devam etmektedir. Bu yöntem katı lipit nanopartiküllerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan kolay bir yöntemdir. Bu yöntemin en önemli dezavantajı dispersiyon kalitesinin mikropartiküllerin varlığı ile tehlikeye düşmesi ve bu durumun fiziksel stabilite de problemlere yol açmasıdır (57).

İşcan ve ark. (58) DEET'in deriden emilimin azaltmak amacıyla mikrometre boyutunda lipit partiküller hazırlamak için sadece yüksek hızda karıştırmayı tercih ederken, Anwar ve ark. (59) salisilik asit içeren NLT'lerin hazırlanmasında her iki tekniği birlikte kullanarak, yaklaşık 200nm boyutunda nanopartiküller elde etmişlerdir.

2.5.4. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

KLN ve NLT'ler, kontrollü bir şekilde oluşturulmuş nano boyuttaki lipit bir matriksten meydana gelmektedir. Kompleks bir kolloidal ilaç taşıyıcı sistem olan KLN ve NLT sistemlerin, fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ve elde edilen dispersiyonun seçilen uygulama yolu doğrultusunda beklenen özelliklere sahip olduğunun değerlendirilmesi amacıyla detaylı bir karakterizasyon çalışması yapılmalıdır.

KLN/NLT sistemlerin karakterizasyonu;

- Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Analizi,
- Zeta Potansiyel Analizi,
- Kristalizasyon ve Lipit Modifikasyon Analizi,
- Morfolojik Analiz,
- Stabilite Çalışmaları,
- Reolojik Analiz,
- Etkin Madde Yükleme Kapasitesi ve Hapsedilme Etkinliği,
- İn Vitro Salım Çalışmalarından oluşmaktadır.

Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Analizi

Ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı, fiziksel ve kimyasal stabilite, biyolojik yanıt, salım hızı ve çözünürlüğü kontrol eden bir parametre olduğundan nanodispersiyonların en önemli karakterizasyon parametreleri arasında yer almaktadır (60).

Genel olarak, tüm kolloidal partiküller için tanımlandığı gibi KLN ve NLT sistemlerinin de partikül büyüklüğü 1000 nm'den küçüktür. KLN ve NLT'lerin, partikül büyüklüğündeki değişikliklerin belirlenmesi, fiziksel stabilitelerinin izlenmesi açısından en uygun yöntemdir. Partikül büyüklüğündeki artış gözlenmesi genellikle stabil olmayan sistemlerde görülmektedir. Bu nedenle partikül büyüklüğü formülasyon stabilitesi için önemli bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Lipitler,

yüzey etkin maddeler, dispersiyon ortamı ve diğer eksipiyanlar gibi formülasyon parametreleri ve hazırlama yöntemi, homojenizasyon veya sonikasyon işlemi için; uygulanan basınç, sıcaklık ve zaman, üretim ekipmanları, sterilizasyon ve liyofilizasyon gibi işlem parametreleri KLN ve NLT'ler için ana kalite parametreleri olarak kabul edilmektedir. Bu parametrelerin tümü, oluşan partiküllerin büyüklüğünü ve kristalizasyonunu doğrudan etkilediğinden, her bir parametrenin partikülün karakterizasyonu üzerine etkisi sıklıkla partikül büyüklüğünün ölçülmesi ile incelenmektedir (61).

KLN ve NLT'lerin partikül büyüklükleri sıklıkla Foton Korelasyon Spektroskopisi (PCS) ve/veya lazer difraksiyonu gibi ışık saçma yöntemleri ile ölçülmektedir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) olarak da isimlendirilen PCS, bir dispersiyon içindeki KLN ve NLT'lerin partikül büyüklüklerinin ölçümünde en sık kullanılan yöntemdir. PCS kapsamlı bir örnek hazırlama sürecine gerek olmadan, çok az miktarlardaki örneklerle, örneğe zarar vermeden ölçüm yapabilen hızlı bir yöntemdir. PCS, yaklaşık olarak 3 nm-3000 nm aralığındaki partikülleri tespit edebilmektedir, KLN ve NLT dispersiyonlarının partikül büyüklükleri de bu aralığa girdiğinden KLN ve NLT formülasyonları için en uygun yöntemdir. PCS, seyreltik bir dispersiyon ortamında süspende olmuş partiküllerin rastgele gerçekleştirdikleri termal ve brown hareketlerinin analizi esasına dayanmaktadır (62, 63). PCS yönteminin ölçüm sınırlarından daha büyük partikül büyüklüğü dağılımına sahip KLN ve NLT dağılımlarının partikül büyüklüğü ölçümünde Lazer Difraksiyon (LD) yöntemi çok daha geniş bir saptama aralığına (20 nm-2000 μ) sahip olduğundan tercih edilmektedir.

LD yöntemi ile PCS yöntemi, kombinasyon halinde de kullanılabilir. İki yöntemin kombinasyonundan, özellikle çok küçük partiküllerden büyük partiküllere kadar değişen geniş dağılımların analizinde yararlanılmaktadır (64). LD metodu, lazer ışığı ile aydınlatılmış partiküllerden saçılan ışık dizisinin, partiküllerin büyüklüklerine bağlı olarak oluşturdukları saçılım açısı dağılımının ve açılan ışığın yoğunluğunun analizine dayanmaktadır. Küçük partiküller daha büyük partiküller ile karşılaştırıldığında daha yoğun ve geniş bir saçılım açısı ile saçılım oluşturmaktadır (65).

PCS, partikül büyüklüğü sonuçlarını yoğunluk ağırlıklı hidrodinamik çap ortalaması ve polidispersite indeksi (PDI) olarak vermektedir. PDI, partikül büyüklüğü dağılımının genişliğinin bir ölçüsüdür. PDI değeri, dağılımın genişliğine bağlı olarak 0-1 arasında değişmektedir. PDI, KLN ve NLT formülasyonlarının fiziksel stabilitesi açısından önemli bir etkiye sahiptir, uzun süre stabil bir sistem için PDI değerinin mümkün olduğu kadar küçük bir değerde olması gerekmektedir. PDI değerinin 0,1-0,25 arasında bir değer olması oldukça dar bir büyüklük dağılımının olduğunu gösterirken, 0,5 ve üzerindeki değerler çok geniş bir dağılım olduğunu belirtmektedir (60).

Zeta Potansiyel Analizi

Zeta potansiyel, partikülün yükü ile zıt yüke sahip iyonların güçlü bir şekilde partikül yüzeyine bağlandığı düzlem ile bu düzlemden uzak mesafelerde iyon yükünün nötrleştiği bölge arasında oluşan elektriksel potansiyel olarak tanımlanmaktadır. Zeta potansiyel, KLN ve NLT formülasyonlarının fiziksel stabilite ve in vivo davranışını etkileyen önemli bir yüzey karakterizasyonudur. Nanopartikül dispersiyonunda tüm partiküllerin yüksek bir pozitif veya negatif bir yüke sahip olması durumunda, partiküller birbirlerine sürekli olarak itme kuvveti uyguladığından, agregasyonun önüne geçilmekte ve elektrostatik stabilizasyon sağlanmaktadır. Elektrostatik olarak stabilize edilmiş KLN ve NLT'lerin zeta potansiyel değerinin minimum ± 30 mV olması beklenirken, hem elektrostatik hemde sterik stabilizasyonun sağlandığı sistemler için ± 20 mV zeta potansiyel arzu edilmektedir (60, 66).

Zeta potansiyel, pH, iyonik kuvvet ve dispersiyon ortamındaki iyon tiplerinden etkilenmektedir. Zeta potansiyel ölçümleri elektroforetik / elektroakustik hareketliliğe dayanan uygun analitik cihazlarla ölçülmektedir. Partikül büyüklüğü ölçümlerinde olduğu gibi, çoklu saçılma etkisini önlemek için seyreltilmiş örneklerle ölçüm yapılmalıdır (67).

Kristalizasyon ve Lipit Modifikasyon Analizi

KLN ve NLT formülasyonlarının hazırlama yöntemlerinin çoğunda lipit matriks erime derecesinin üzerinde bir sıcaklığa ısıtılmakta ve ardından sulu faz içerisinde kollidal boyutlarda disperse edilerek katılaştırılmaktadır. Bu süreçte lipitlerin bir kısmı erime derecesine ulaşmadan kristalize olabilirken, bir kısmı kollidal dağılım durumunda kristalleşmeden kalabilmektedir. Bu gibi durumlarda, dispersiyonlar lipit nanopartikül olarak değil süper-soğutulmuş eriyikler (*super-cooled melts*) olarak kabul edilmektedir. Kristalize katı lipitler, koloidal emülsiyon damlacıklarının lipitin kritik kristalizasyon sıcaklığının altına soğutulması ile elde edilmektedir. Kritik kristalizasyon sıcaklığı, lipite spesifik olmasının yanında formülasyondaki diğer bileşenlerden de etkilenmektedir. KLN ve NLT sistemlerinin rekristalizasyonu, lipit matriksin yapısında bulunan kısa trigliserid zincirlerinde oluşmaktadır. Trigliseridlerin, en az kararlı α -form, meta kararlı β' -formu ve en stabil β -formu olmak üzere üç polimorfik formu bulunmaktadır (48, 68, 69).

KLN ve NLT sistemleri, genellikle ısıtma ve saklama sırasında daha kararlı olan kristal yapıdaki polimorfik formuna (β -modifikasyon) dönüşme eğilimindedir. Bu durum etkin maddenin nanopartikülden dışarı sızmasına yol açarak yüklenen ilaç miktarını azaltmaktadır. İstenmeyen bu polimorfik geçişi engellemek amacıyla nanoyapılı lipit taşıyıcıların formülasyonunda katı lipitle beraber sıvı bir lipit kullanılarak daha az düzenli, kısmen kristalize veya amorf bir lipit matriks yapısı elde edilerek yüksek bir ilaç yükleme kapasitesi sağlanmaktadır (48).

KLN ve NLT formülasyonlarında, polimorfik değişiklikleri, erime davranışlarını, etkin maddenin lipit içerisindeki durumunu ve lipitlerin yapısal organizasyonunu analiz etmek amacıyla en sık kullanılan yöntemler; Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), X-Işını Difraksiyonu (XRD), Küçük Açılı X-Işını Saçılması (SAXS), Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR)'dır.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC- Differential Scanning Calorimetry)

DSC, maddenin enerji durumunu araştırmak amacıyla kontrollü sıcaklık taraması ile maddenin ısı akışının izlendiği termoanalitik bir tekniktir. DSC grafikleri, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak numunenin gramı başına ısı akışını göstermektedir. Bu grafikler, geçiş sıcaklığı ve entalpik değişimler sonucu oluşan kristalleşme ve polimorfik geçişleri değerlendirmek için kullanılmaktadır (70).

DSC analizi KLN ve NLT formülasyonlarında, ısıtma sırasında erime geçişlerinin gözlenmesi ile lipit nanopartikülün katı yapıda olduğunu doğrulamak ve erime entalpisinden yola çıkarak numunede kristal bir madde olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu değerlendirilmelerin yapılması için KLN ve NLT formülasyonuna giren saf materyaller ve formülasyon üretimi sonucu elde edilen ürünler DSC analizi ile incelenmektedir. DSC, KLN ve NLT sistemleri için özellikle, formülasyonda kullanılan lipit ile yüklenen etkin maddenin etkileşimini araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (71, 72).

X-Işını Difraksiyonu (XRD- X-ray Diffraction)

XRD, rastgele yerleşmiş olan moleküllerin kristal kafesleri ile etkileşen X-ışınlarının difraksiyon modellerinin analizine dayanmaktadır. XRD analizi sonucu elde edilen difraktogram, X-ışın demetlerinin açısız pozisyonuna göre yansıyan X-ışınlarının yoğunluğunu göstermektedir. Difraktogram, belirli bir kristal yapısı için karakteristik olan XRD modelini göstermektedir. Yapıya karakteristik olması nedeniyle polimorfik formların tanımlanması ve ayırımında kullanılabilir (73).

XRD, KLN ve NLT'lerin karakterizasyonunda; katı halin doğrulanması, partiküllerin kristal özelliklerinin ve lipit matrisin polimorfik formunun tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır. DSC analizi ile polimorfik formun doğru bir şekilde tanımlanması genellikle zordur ancak, XRD analizi polimorfik formların daha doğru tanımlanması için ek bilgiler sağladığından polimorfik formlar için daha ayrıncı bir tekniktir.

Küçük Açılı X-Işını Saçılması (SAXS- *Small Angle X-ray Scattering*)

SAXS, DSC analizi ile birlikte KLN ve NLT'lerin polimorfik formlarının ve/veya kristal yapısının anlaşılmasında yardımcı olan bir yöntemdir. SAXS, nanoyapılı sistemlerin foton korelasyon spektroskopisi gibi partikül büyüklüğü analizi ve morfolojik analiz sonuçlarını desteklemek için de kullanılabilir. Bunun yanında SAXS modelleri sıklıkla, lipit matriksin iç düzenlenmesinin anlaşılması, enkapsüle olmuş etkin madde ile lipit matriks arasındaki etkileşimin doğrulanması ve sisteminin stabilitesini öngörülmesi için kullanılan yararlı bir yöntemdir (74, 75).

Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FT-IR- *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Kızılötesi spektroskopisi [infrared spectroscopy (IR)], moleküler seviyede polimorfizm yapısının incelemesini sağlayan, fiziksel karakterizasyon amacıyla sıklıkla kullanılan spektroskopik bir tekniktir (76).

KLN/NLT formülasyonlarında FT-IR analizinden, lipit matriks ile etkin madde arasında kimyasal etkileşimi incelemek ve etkin maddenin nanopartiküller içerisine hapsedilme etkinliğini değerlendirmek için yararlanılmaktadır (77, 78).

Morfolojik Analiz

KLN ve NLT formülasyonlarının yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği, salım hızı, fiziksel ve kimyasal stabilitesi, etkin maddenin nanopartikül içerisine yerleşimi gibi pek çok karakterizasyonu morfolojik özelliklerinden önemli ölçüde etkilenebilmektedir. Küresel olmayan KLN ve NLT'ler küresel partiküller ile karşılaştırıldığında, daha yüksek bir yüzey alanı ve daha kısa difüzyon yollarına sahip olup, daha az sayıda lipit tabakalardan oluşmaktadır. PCS veya LD gibi analitik yöntemler partiküllerin küresel şekle sahip olduğunu varsayarak partikül büyüklüğü analizini gerçekleştirmektedir. Bu nedenle küresel şekle sahip olmayan ve agregasyon gerçekleşmiş KLN ve NLT sistemlerinin partikül büyüklüğü analizleri için bu teknikler yeterli değildir (48, 79).

Bu nedenle taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi gelişmiş mikroskopik teknikler, KLN ve NLT'lerin partikül büyüklüğü ve dağılımı, morfolojisi, yüzey topografisi ve iç yapısı hakkında önemli bilgiler sağladığından sıklıkla kullanılmaktadır.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (*TEM- Transmission Electron Microscopy*)

TEM, kolloidal taşıyıcı sistemlerin morfolojisi ve partikül büyüklüğü, şekli, farklı kolloidal yapıların araştırılması gibi detaylı yapısal incelemeleri değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. TEM, elektron ışın demetlerinin örnek üzerine transferi sonucunda iki boyutlu görüntülerin elde edildiği bir elektron mikroskobu yöntemidir. Elektron yoğunluğunun düşük olduğu bölgelere daha fazla elektron iletilmekte ve bu bölgeler daha koyu renkte görüntüler oluşturmaktadır. Bu nedenle farklı elektron yoğunluklarındaki örnekler farklı koyuluktaki bölgeler halinde görüntülenmektedir. TEM analizinde örnekler genellikle çeşitli ağır metal tuzları ile boyanarak bileşenler arasındaki yoğunluk kontrastı belirginleştirilmeye çalışılmaktadır. TEM analizinin başlıca dezavantajı, daha küçük partiküller yönünde eğiliminin olmasıdır bu nedenle partikül büyüklüğü dağılımı hakkında kesin bir sonuç elde edilememektedir (57, 80, 81).

Taramalı Elektron Mikroskobu (*SEM- Scanning Electron Microscopy*)

SEM, örnekler hakkında üç boyutlu morfolojik ve yüzey bilgisi sağlamaktadır. Örnekler odaklı bir elektron ışını bombardımanına maruz bırakılmakta ve ardından örnek yüzeyinden yansıyan ikincil elektronlar elde edilerek yüzey özellikleri hakkında bilgi edinilmektedir (82).

SEM, TEM analizine göre daha düşük çözünürlük gücüne sahip olduğundan detaylı bir iç yapı incelemesi yapılamamaktadır ancak önemli bir avantajı daha geniş bir alanda derinlemesine incelemeler sağladığından diğer yöntemlere göre nispeten daha büyük yapıları görüntüleyebilmektedir (82, 83).

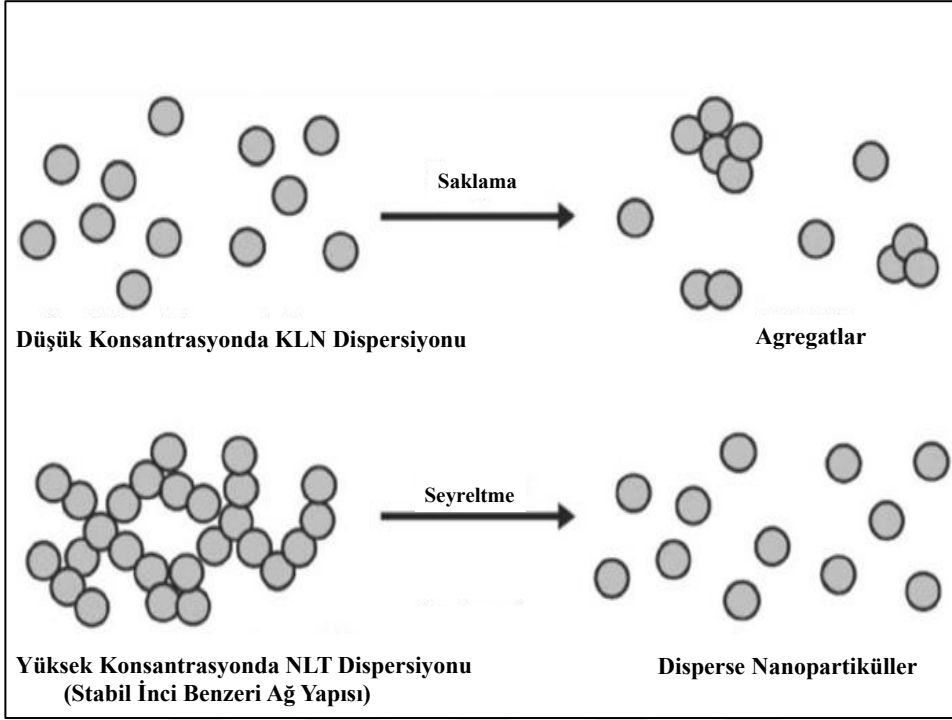
Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM- Atomic Force Microscopy)

AFM, partikül yüzeyinin yüksek çözünürlükle görüntülenmesini sağlar ve sulu ortamda görüntülemelerin yapılmasına olanak sağladığından hem partiküler hemde biyolojik örneklerin karakterizasyonunda önemli bir yöntemdir. AFM analizinde, genel olarak atmosfer koşulları veya sıvı bir ortam altında herhangi bir kaplama işlemine gerek olmadan, iletken olmayan örneklerin yüzey profilleri üç boyutlu olarak görüntülenebilmektedir (82).

Stabilite Çalışmaları

Stabilite, ilacın etkinliğini ve güvenilirliğini sağlayan önemli bir parametredir. Stabilite sorunları, saklama sırasında veya nakliye sırasında ortaya çıkabilmektedir. KLN ve NLT sistemleri gibi lipit dispersiyonların stabilitesi, emülsifiye edici ajanın lipit-su ara yüzeyindeki dengesi ve lipit fazın yapısına dayanmaktadır (84). KLN ve NLT formülasyonlarının uzun süre saklanmaları esnasında sedimentasyon, agregasyon, jelleşme, flokülasyon ve partikül büyümesi gibi fiziksel stabilite sorunları gözlenebilmektedir.

Düşük konsantrasyonlardaki dispersiyonlarda tek başına bulunan partiküller dispersiyon ortamında difüzyon hareketleri sırasında, brown hareketinden dolayı diğer partiküllerle çarpışarak agregasyona yol açabilmektedir. Ancak yüksek yoğunluktaki NLT dispersiyonlarında partiküller inci gibi ağ yapısı oluşturmakta ve çarpışma gerçekleşmediğinden agregasyon oluşmamaktadır (Şekil 2.5.) (51).



Şekil 2.5. Düşük konsantrasyondaki KLN dispersiyonlarında agregasyon gerçekleşmesi ve yüksek konsantrasyondaki NLT dispersiyonlarında inci benzeri ağı görünüm (51).

Sıvı bir dispersiyon halinden yarı katı sisteme dönüşme (jelleşme), KLN ve NLT formülasyonlarında çok hızlı ve beklenmedik bir şekilde gelişebilmektedir. Jelleşme koloidal partikül büyüklüğü kaybının gerçekleştiği geri dönüşümsüz bir olaydır. Jelleşmenin mekanizması henüz tam olarak açıklanamamış olsa da Freitas ve Müller (85, 86) yüksek sıcaklık, ışık, mekanik stresin amorf lipit nanopartiküllerin, β -modifikasyonu olarak bilinen kristal formlarına dönüşmesine neden olarak jelleşmenin meydana geldiğini savunmaktadır.

KLN ve NLT formülasyonlarında stabil olmama göstergesi olan flokülasyon, agregasyon ve jelleşme durumları gözlemsel olarak da farkedilebilmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda KLN ve NLT sistemlerinin fiziksel stabilitesi sıklıkla, oda sıcaklığı veya buzdolabı saklama koşulları altında belirlenen süre boyunca formülasyonların partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve kristalizasyon analizleri ile değerlendirilmektedir (62, 72, 87, 88). KLN ve NLT formülasyonlarının farmakolojik etkinlik gösterebilmesi için, enkapsüle edilmiş etkin maddenin kimyasal olarak stabil olması gerekmektedir. Bu nedenle partikül büyüklüğü, zeta

potansiyel ve kristalizasyon analizleri gibi karakterizasyonların yanında kimyasal stabilitenin değerlendirilmesi için KLN ve NLT'lerin etkin madde yükleme kapasitesi ve etkin madde hapsedilme etkinliği hesaplanmaktadır (72, 88, 89).

Reolojik Analiz

Farmasötik ürünlerin reolojik analizleri genellikle; üretim parametrelerinin, sıcaklığın, ürünün saklama süresince stabilitesinin ve kullanılan ekşiyanların etkisini incelemek amacıyla yapılmaktadır. KLN ve NLT'ler gibi kompleks koloidal materyaller, tek noktalı viskozite ölçüm yöntemleri ile karakterize edilememektedir. Bunun yerine, çeşitli koşullarda ölçümler yapılmalı ve koloidal parametreler ile deneysel reolojik ölçümler karşılaştırılarak tutarlı sonuçlar elde edilmelidir. KLN ve NLT'lerin baskın reolojik özellikleri ve parametre değerleri ölçüm sırasında uygulanan stres ve stres süresine bağlı olarak değişmektedir. Kayma hızı ve kayma gerilimi değerleri ile çizilen akış eğrilerinden KLN ve NLT dispersiyonlarının reolojik davranışları gözlenmektedir. Viskoz ve elastik özellikleri bir arada gösteren viskoelastik davranışa sahip KLN ve NLT dispersiyonlarında yapısal hasar oluşturmadan gerçekleştirilen reolojik analizler ile moleküller arası ve partiküller arası kuvvetler hakkında bilgi sağlanabilmektedir (90).

Lippacher ve ark.'nın (91) gerçekleştirdiği bir çalışmada, hazırlanan KLN formülasyonlarının lipit faz yüzdesinin reolojik özellikler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, tüm formülasyonlar plastik ve tiksotropik bir akış özelliği göstermiştir, lipit konsantrasyonunun artmasıyla viskozitenin arttığı ve formülasyonların viskoz bir solüsyondan daha elastik bir jel yapısına dönüşerek viskoelastik özelliklerin dramatik bir şekilde değiştiği gözlenmiştir.

Yang ve ark. (92, 93), NLT partiküllerinin sıvı lipit içeriğinin ve/veya formülasyondaki yüzey etkin madde miktarının artırılması ile agregasyonun azaltılarak stabilitenin artırılabilirdiğini gösterdikleri daha önceki çalışmalarından yola çıkarak, NLT dispersiyonlarının viskozitesinin agregasyona uğramış ağsı partikül yapısına bağlı olduğunu ve bunun sonucunda NLT sistemlerinin reolojik özelliklerinin kontrollü bir agregasyonla ayarlanabileceğini göstermişlerdir.

Etkin Madde Yükleme Kapasitesi Ve Etkin Madde Hapsedilme Etkinliği

Etkin madde yükleme kapasitesi nanopartikül içerisinde enkapsüle edilmiş etkin madde miktarının, formülasyona ilave edilen total etkin madde miktarına oranı olarak tanımlanmaktadır. Genel olarak yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği, KLN ve NLT formülasyon tasarımına, hazırlama yöntemi ve koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Yükleme kapasitesi, enkapsüle edilen veya serbest haldeki etkin madde miktarının belirlenmesi ile hesaplanabilmektedir. Enkapsüle edilmeyen serbest haldeki etkin madde sulu fazda çözünmüş olarak veya kristalize halde bulunabilmektedir (94, 95).

Hapsedilme etkinliği ise; nanopartikül içerisinde enkapsüle edilmiş etkin madde miktarının, formülasyona ilave edilen total lipit faz veya formülasyondaki lipit nanopartikül miktarına oranı olarak tanımlanmaktadır (94, 95). KLN ve NLT formülasyonlarında hapsedilme etkinliğini ağırlıklı olarak etkileyen faktörler; etkin maddenin lipitteki çözünürlüğü ve karışabilirliği, lipit matriksin fiziksel, kimyasal yapısı ve polimorfik formudur. Yeterli bir hapsedilme etkinliğinin elde edilebilmesi için en önemli önkoşul, etkin maddenin lipit fazda yüksek çözünürlüğünün olmasıdır. Özellikle, lipit faz soğutulduğunda etkin maddenin çözünürlüğü azalacağından, eriyik lipitteki çözünürlüğün gerekli olan çözünürlükten daha yüksek olması istenmektedir (65).

Yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği analizinde, nanopartikülleri sulu dispersiyon ortamından ayırmak amacıyla ultrafiltrasyon, ultrasantrifüj veya boyut dışlama kromatografisi (*size exclusion chromatography*) gibi yöntemler kullanılmakta olup bu ayırım sayesinde serbest ve enkapsüle haldeki etkin madde miktarı ölçülebilmektedir. Bununla birlikte sulu dispersiyon fazı içerisinde çözünmüş olan serbest etkin madde miktarı, organik solventle ekstraksiyon yöntemi ile de belirlenebilmektedir (94-98).

İn Vitro Salım Çalışmaları

Etkin madde salım profilleri dispersiyon sistemlerinin, sürekli ve uzatılmış salım özelliklerinin değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır. KLN ve NLT sistemlerinin salım çalışmaları genellikle diyaliz torbası veya Franz difüzyon hücresi kullanılarak yapılmaktadır (56, 99).

KLN ve NLT sistemlerinden etkin madde salımı patlama salımı (*burst release*) ve uzatılmış salım (*sustained release*) olarak iki farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. KLN ve NLT sistemlerinden salım etkin maddenin lipit matriksle sulu sürfaktan fazı arasındaki partisyonuna bağlı olarak değişmektedir. NLT sistemlerinde ise bu duruma ek olarak etkin maddenin lipit matriksteki katı lipit ile sıvı lipit bölmeleri arasındaki dağılımıda önemlidir (100). NLT sistemlerinde sıvı lipitin, katı lipit matriksine gömülmüş veya katı matriksin yüzeyine yerleşmiş olabileceği gibi sulu sürfaktan fazında da bulunabileceği gözlenmiştir (101). Yüksek sürfaktan konsantrasyonu ve üretim sırasında sulu fazın sıcaklığının artması etkin maddenin sulu fazdaki çözünürlüğünde artışa neden olarak bu fazdaki partisyonunu artırmaktadır. Ancak üretim sonunda sulu fazın sıcaklığının azalması ile etkin maddenin çözünürlüğü de azalacağından etkin madde molekülleri lipit matrikse doğru partiyon göstermektedir. Sıcaklığın düşmesi sonucu kristalize olan lipit partikül çekirdeği etkin maddenin girişine izin vermediğinden ilaç halen sıvı olan partikülün dış kabuğunda, sıvı lipit bölmelerinde veya partikülün yüzeyinde birikmektedir. Sulu fazda, partikül dış kabuğunda ve yüzeyinde yer alan bu ilaç molekülleri difüzyonla hızla salım ortamına salınarak patlama salımına neden olmaktadır. Lipit çekirdeğine yerleşmiş olan etkin madde ise difüze olarak ve lipitlerin vücutta parçalanması sonucunda uzatılmış bir salımla salınmaktadır (65, 102). Lipit çekirdeğin oda sıcaklığında sahip olduğu katı hal nedeniyle etkin maddenin hareketliliği kısıtlandığından etkin maddeler çekirdekten kontrollü bir şekilde salınmaktadır. Etkin madde açısından zengin çekirdek modeline sahip partiküllerde salım Fick'in difüzyon kuralları doğrultusunda membran kontrollü olarak gerçekleşmektedir (103).

Genel olarak KLN ve NLT'lerden etkin madde salımı için geçerli olan prensipler aşağıda sıralanmıştır (104):

- Partisyon katsayısı yüksek olan etkin maddelerin lipit çözünürlükleri yüksek olduğundan bu maddelerin lipit matrikse olan ilgisi artmaktadır. Bu nedenle etkin maddenin salımı ile partisyon katsayısı arasında ters bir ilişki bulunmaktadır.
- Daha küçük partikül büyüklüğü daha yüksek bir yüzey alanına sahip olduğundan daha yüksek bir etkin madde salımı sağlamaktadır.
- Etkin madde lipit matriks içinde homojen bir şekilde dağıtıldığında daha yavaş bir salım hızı elde edilebilmektedir.
- Daha az kristal forma sahip lipit taşıyıcı sistemlerde etkin madde yüksek hareketlilik gösterebildiğinden daha hızlı bir ilaç salımı oluşmaktadır.

NLT formülasyonlarının yapılarındaki sıvı lipitlerin katı lipitlere oranla etkin maddeyi daha yüksek oranlarda çözmesi ve düzensiz lipit organizasyonu oluşturması, yüksek bir hapsedilme etkinliğine sahip olmasına neden olarak bu sistemlere kontrollü bir salım özelliği sağlamaktadır. Özellikle kusurlu ve amorf tip NLT sistemleri, istenilen şekilde uzatılmış bir salım sunabilme esnekliğine sahiptir (51, 102).

Sonuç olarak, KLN ve NLT formülasyonlarının salım karakterizasyonu; hazırlama yöntemine, formülasyon bileşenlerine, etkin maddenin lipit matriks içindeki ve partikül yüzeyindeki lokalizasyonuna bağlı olarak değişmekte ve farklı salım profilleri elde edilebilmektedir (86).

2.5.5. Katı lipit nanopartiküller ve Nanoyapılı Lipit Taşıyıcıların Uygulama Alanları

KLN ve NLT sistemleri üzerinde, başta parenteral, pulmoner, oral, oküler ve dermal uygulamalar olmak üzere, birçok alanda çalışmalar yapılmaktadır.

Parenteral Uygulama

KLN ve NLT sistemleri intravenöz, intramüsküler, subkütan, intraperitonel ve intraartiküler enjeksiyon yoluyla uygulanabilmektedir. Nano boyutlardaki partikül yapılarından dolayı bu formülasyonlar minimum emboli riski taşıyarak sistemik dağılım için kullanılabilir. İntramüsküler, subkütan uygulamalarda ya da mononükleer fagositik sistemde biriktiklerinde ise uzatılmış bir salımla depo etki gösterebilmektedirler. Enjekte edilebilir KLN ve NLT'ler bugüne kadar yapılan çalışmalarda, antikanser ajanları, görüntüleme maddeleri, antiparkinson, antiHIV, antipsikotikler, antiromatizmal ajanlar, antiparazitikler, antihipertensifler ve antibiyotikler ile enkapsüle edilmiştir (47, 105).

Tsai ve ark. (87) tarafından baicalein içeren NLT formülasyonlarının hazırlandığı çalışmada intravenöz uygulama ile beyne hedeflendirme amaçlanmıştır. NLT formülasyonunun bileşiminde tripalmitin, Gelucires, vitamin E, fosfolipit ve poloxamer 188 kullanılmış olup yaklaşık 100 nm'lik küresel nanopartiküller elde edilmiştir. Baicalein yüklü NLT formülasyonunun sıçanlara intravenöz uygulama sonrası baicalein plazma düzeyi ve beyindeki dağılımı incelendiğinde, baicalein plazma seviyesinin ve yarılanma ömrünün NLT formülasyonlarında, baicalein çözeltisinin uygulandığı kontrol grubuna göre çok daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte beyindeki baicalein birikiminin beyin tüm bölümlerinde NLT formülasyonunun uygulandığı sıçanlarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Liu ve ark. (39) intravenöz uygulama amacıyla, suda çözünürlüğü çok düşük olan akut lösemi tedavisinde kullanılan tamibarotene etkin maddesini taşıyan PEG'lenmiş nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemler geliştirmişlerdir. Hazırlanan formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, hapsedilme etkinliği ve zeta potansiyel değerleri sırasıyla 178,9 nm–201,6 nm, %89,8–%94,3 ve -37,74 mV–20,1 mV olup parenteral uygulama için uygunluk göstermektedir. Farelerde gerçekleştirilen biyodağılım çalışmalarında etkin madde yüklenmiş NLT formülasyonlarının intravenöz uygulama sonrası kandaki dolaşım süresi uzatılarak etkin maddenin böbreklerdeki birikimi azaltılmıştır.

Pulmoner Uygulama

Nanotayışyıcı sistemlerin pulmoner yoldan uygulanması son yirmi yılda oldukça ilgi çekici bir hal almıştır. KLN ve NLT taşıyıcı sistemlerin pulmoner uygulama yolu açısından çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bu sistemler nano boyutlarından dolayı kolaylıkla taşıyıcı parçacıklara tutunabilir veya aerodinamik olarak uygun özelliklere sahip damlacıklar içinde aerosol haline getirilebilirler. Böylelikle aktif bileşiğin yeterli derin akciğer birikimi sağlanmaktadır. Bununla birlikte nanoboyutlu partiküller küçük boyutlarından ötürü büyük boyutlara göre daha uzun bir süre boyunca akciğerin mukozal yüzeyine yapışmaktadır. Ancak KLN ve NLT'lerin pulmoner uygulamalarına ilişkin yapılan araştırmalar hala başlangıç aşamasındadır (46).

Patlolla ve ark. (38) ortalama partikül büyüklüğü 217 nm olan ve %90'nın üzerinde hapsedilme etkinliğine sahip celecoxib etkin maddesini içeren NLT sistemleri hazırlayarak fareler üzerinde akciğer dispoziyonu ve biyoyararlanımını incelemiştir. Celecoxib çözeltisi ve celecoxib yüklü NLT formülasyonunun karşılaştırılması sonucunda NLT formülasyonunun ilacın çözeltisine göre uzatılmış terapötik etki sağlayarak dört kat daha fazla biyoyararlanım gösterdiği ve sistemik klirensinin de azaldığı gözlenmiştir.

Oral Uygulama

Katı matriks yapısındaki KLN ve NLT sistemler, özellikle lipofilik yapıdaki maddelerin gastrointestinal absorpsiyon ve oral biyoyararlanımlarını artırmaları nedeniyle oral ilaç taşıyıcı sistemler içerisinde giderek ilgi çekmeye başlamıştır. KLN ve NLT formülasyonlarında kullanılan lipitler fizyolojik lipitlerden olduğundan bu sistemler biyolojik olarak uyumlu ve biyoparçalanabilir özelliklere sahip olup oral uygulama açısından toksisite problemleri taşımamaktadır. Bununla birlikte KLN ve NLT formülasyonları katı matriks yapılarından dolayı diğer nanotayışyıcı sistemlere göre daha stabil sistemlerdir ve uzatılmış bir etkin madde salım profili sunabilmektedirler (106).

KLN ve NLT'ler oral yoldan sulu dispersiyon halinde veya tablet, pellet veya kapsül gibi geleneksel oral dozaj formlarına dönüştürülerek uygulanabilmektedir (104). Literatürde farklı etkin maddelerle (apomorfin, simvastatin, digoksin ve vinpocetine gibi) yüklenmiş KLN ve NLT formülasyonlarının oral uygulanmasına yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır (56, 107-109).

Luan ve ark. (41) tarafından baicalin etkin maddesi ile yüklenmiş oral NLT formülasyonlarının hazırlandığı çalışmada lipit faz olarak gliserol monostearat ve orta zincirli bir trigliserit ve yüzey etkin madde olarak poloxamer F68 ve soya lesitini kullanılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 244,7 nm iken yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği değerleri ise %3,54 ve %59,51 olarak bulunmuştur. Baicalin yüklü NLT formülasyonu ve baicalin süspansiyonunun sıçanlara oral uygulama sonrası farmakokinetik parametreleri incelendiğinde, kandaki maksimum ilaç konsantrasyonu (C_{max}), ortalama kalış süresi (*Mean Residence Time*, MRT) ve plazma konsantrasyon eğrisindeki eğri altı alan (*Area Under The Curve*, AUC) değerlerinin NLT formülasyonunda, ilacın süspansiyonuna göre önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç, baicalin etkin maddesinin NLT formülasyon tasarımı ile oral biyoyararlanımının artırıldığını göstermektedir.

Oküler Uygulama

Oküler dozaj formları gözyaşı, verimsiz absorpsiyon ve kornea epitel membranın göreceli geçirmezliği gibi prekorneal kayıp faktörleri nedeniyle oldukça düşük biyoyararlanıma sahiptir. Göz hastalıklarının tedavisinde pekçok ilaç topikal olarak uygulanmaktadır. Uygulanan etkin maddenin iç dokulara geçebilmesi için öncelikle prekorneal alanda tutunarak etki göstermesi beklenir. Bu yol, uygulaması kolay ve sistemik uygulamaya göre daha yüksek ilaç konsantrasyonu sağlayabilmektedir. Bu nedenle etkili bir tedavi için uygulanan ilacın prekorneal alanda yeterli süre kalması gerekmektedir (110, 111).

Küçük partiküller, yüksek adhezif özellik gösterdiklerinden gözyaşı dinamiği ile gözden uzaklaştırılmaları azalarak prekorneal alanda daha uzun süre

kalabilmektedir. Bu durum ilacın oküler biyoyararlanımı artırmaktadır. Nanoyapılı lipit nanopartilüller sistemler de, yüksek etkin madde hapsedilme etkinliği ve istenilen partikül büyüklüğünde tasarlanabilmeleri gibi özellikleri ile oküler uygulama yolu için uygun ilaç taşıyıcı sistemler arasındadır (112).

Araujo ve ark. (77) oküler antianjiyojenik uygulama amacıyla triamsinolon asetonid ile yüklenmiş NLT formülasyonu geliştirmişlerdir. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanılarak %95 hapsedilme etkinliğine sahip 200 nm'nin altında, 45 mV negatif yüzey yüklü homojen boyut dağılımı gösteren lipit nanopartilüller elde edilmiştir. İn vivo draize toksisite testi sonucunda formülasyonun göz için biyouyumluluğu kanıtlanmıştır.

Attama ve ark. (113) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise, fosfolipit ile birleştirilen diklofenak sodium yüklü KLN formülasyonları ile diklofenak sodyumun kornea permeasyonunun arttığı gösterilmiştir.

Dermal ve Kozmetik Uygulama

KLN ve NLT sistemleri, sahip oldukları avantajlar nedeniyle farmasötik ve kozmetik dermal sistemler içinde oldukça ilgi çekici olup birçok çalışmada incelenen nanopartilüller sistemler haline gelmişlerdir. Yapılarındaki lipit matriks, küçük çaptaki partikül büyüklüğü ve bunlara bağlı gelişen adeziv özellikleri nedeniyle deriden etkin madde absorpsiyonu artırdıkları kontrollü ilaç salımı sağladıkları, ilacın stabilitesini artırıp, dermal toksisiteyi azalttıkları için deriye ilaç uygulamalarındaki önemleri artmaktadır (52, 86).

KLN ve NLT sistemleri deri üzerine uygulandıklarında örtücü film tabakası oluşturarak derinin nemini artırmaktadır. Artan nem hapsedilen etkin maddelerin penetrasyonu artmaktadır (114, 115). Souto ve ark. (116) aynı lipit miktarına sahip KLN ve NLT formülasyonlarının örtücü etkisini karşılaştırdıklarında KLN sistemlerinin daha yüksek bir örtücü etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Teeranachaideekul ve ark. (117) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise farklı sıvı lipit içeriğine sahip NLT formülasyonlarında, sıvı lipit miktarının artması ile örtücü etkinin azaldığı gösterilmiştir.

Deri üzerinde KLN ve NLT sistemleri tarafından oluşan lipit tabakanın deri hidrasyonunu artırması, korneositler arasındaki boşlukların boyutunu artırmakta ve korneosit paketlenmesini azaltmaktadır. Bu durum, perkütan absorpsiyonu kolaylaştırarak, hapsedilen etkin maddenin derinin daha derin tabakalarına kadar inmesine olanak sağlamaktadır (86).

Chen-yu ve ark. (40) topikal ilaç taşıyıcı sistem olarak quercetin yüklenmiş NLT formülasyonu geliştirmiş ve bu formülasyonun permeasyon özelliklerini in vitro ve in vivo olarak değerlendirmişlerdir. NLT sistemleri çözücü emülsifikasyon- evaporasyon yöntemi ile hazırlanmış ve 215,2 nm partikül büyüklüğü, $-20,10 \pm 1,22$ mV zeta potansiyel, 4,65 pH özelliklerine sahip formülasyonlar elde edilmiştir. İn vitro ve in vivo permeasyon çalışmaları sonucunda, quercetin yüklenmiş NLT formülasyonu, quercetin propilen glikol çözeltisine göre epidermis ve derimde önemli derecede daha yüksek quercetin birikimi göstermiştir. Bu sonuç quercetin NLT formülasyonunun stratum korneumun bariyer fonksiyonunu azaltarak, etkin maddenin deriden permeasyonunu kolaylaştırdığını göstermektedir.

KLN ve NLT sistemlerin ultraviyole (UV) bloke edici özelliklerinin bulunması ile lipit nanopartikül bazlı güneş koruyucu sistemlerin geliştirilmesinin önü açılmıştır. KLN ve NLT sistemlerin UV bloke edici özellikleri katı lipit partiküler yapıları nedeniyle UV ışığı yansıtmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte KLN ve NLT sistemleri moleküler güneş koruyucu ajanları ile yüklendiğinde sinerjistik etki oluşturarak güneş koruyucu etkinliği artırmaktadır. Moleküler güneş koruyucu ajanların KLN ve NLT'lere yüklenmesi ile permeasyonunun azaltılarak deri üzerinde daha uzun süre etkili olması ve toksik etkilerinin önüne geçilmesi amaçlanmaktadır(48, 51, 118).

Puglia ve ark. (119) kimyasal UV-A ve UV-B güneş filtreleri olan etilheksil triazon, dietilamino hidroksibenzoil heksil benzoat, bemotrizinol, oktil metoksisinamat ve avobenzon ile yüklenmiş NLT ve nanoemülsiyon formülasyonları hazırlayarak insan derisi üzerinde in vitro perkütan absorpsiyon özelliklerini incelemişlerdir. Formülasyonlarda yüzey etkin madde olarak poloxamer F68, lipit faz olarak da NLT formülasyonları için Compritol 888 ATO ve Miglyol 812

kullanılırken, nanoemülsiyon formülasyonları için Miglyol 812 kullanılmıştır. İn vitro perkütan absorpsiyon çalışmaları sonucunda sadece NLT formülasyonlarında güneş filtrelerinin permeasyonu önemli ölçüde azaltılmış olup deri yüzeyinde lokalize olmaları sağlanmıştır. Bu sonuç doğrultusunda, NLT formülasyonlarının kimyasal UV filtreleri için uygun taşıyıcı sistemler olduğu belirtilmiştir.

Piyasada NLT formülasyonlarından oluşan çeşitli kozmetik ürünler bulunmaktadır. İlk piyasa preparatları, 2005 yılında Almanya’da Dr. Rimpler GmbH firması tarafından üretilen ‘NanoRepair Q 10 Cream and Serum’ ve ‘Nanovital’ dir. Bu ürünleri 2006 yılında Güney Kore’deki AmorePacific firması tarafından üretilen ‘IOPE’ isimli ürün takip etmiştir. Günümüzde birçok şirket NLT formülasyonlarını ürünlerinde kullanmaktadır, ancak INCI isimlendirmesinde taşıyıcı sistemin ticari adını değil, nanopartiküllerin yapıldığı bileşenleri listelediği için, ürün sayısı tam olarak izlenememektedir (120, 121).

2.6. Doku İskeleleri

Doku mühendisliği terimi ilk olarak 1990’lı yıllarda Langer ve Vacanti tarafından tanımlanmıştır (122). Doku mühendisliğinin önemli hedeflerinden biri; normal iyileşme sürecini engelleyen; diyabet, vasküler hastalıklar, yaşlanma, geniş doku hasarı gibi belirli bir takım klinik bozukluklar durumunda doku yenilenmesinin tamamlanmasına yardımcı olacak stratejiler geliştirmektir. Doku mühendisliği ürünleri tanımlandıkları günden günümüze kadar, araştırmacılar tarafından doku yenilenmesi sağlayacak bioaktif bir çevre oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ortak bir yaklaşım olarak araştırmacılar biyolojik olarak parçalanabilir, üç boyutlu (3D) doku iskelelerine yönelmiştir (123-125).

2.6.1 Doku İskelesi Tanımı ve Fonksiyonu

Doku iskeleleri, kademeli olarak parçalanırken hücre/doku büyümesini kolaylaştıran ve ECM bileşenlerinin taşınmasını sağlayan biyomateryallerden yapılmış 3D yapılarıdır. Büyük doku kayıplarının görüldüğü ağır yanıklar, kronik yaralar gibi durumlarda yara iyileşmesini desteklemek amacıyla tasarlanmıştır (126).

Doku iskelelerinin ana fonksiyonları;

- Ekstraselüler matriks analogunu oluşturmak,
- Poroz yapıları içerisinde hücrelerin, adhezyonuna, büyümesine, göçüne ve farklılaşmasına yol göstermek,
- Hücrelerle ve biyolojik aktif moleküllerle bir araya gelerek doku rejenerasyonu ve tamirini desteklemek,
- Yarayı dış enfeksiyonlara karşı koruyacak yara örtüsü gibi bir fiziksel bariyer sağlamaktadır (127).

2.6.2. Doku İskelesi Formülasyonu Hazırlamada Kullanılan Matriks Maddeleri

Doku iskeleleri doğal olarak oluşturulanlardan, sentetik olarak üretilenlere kadar değişen materyallere bağlı olarak üretilmektedir. Doğal ECM'in mekanik ve yapısal özelliklerinin ve biyoaktivitesinin taklit edilebilmesi için, doku iskelesi üretiminde uygun materyallerin seçimi oldukça önemlidir (128).

İdeal Doku İskelesi Materyali (129) ;

- Hücre tutunması, proliferasyonu ve indükleyici hücrel yanıtı desteklemeli,
- Stabil bir yapı ve mekanik güce sahip olmalı,
- Biyoparçalanabilir ve yüksek derecede işlenebilir,
- Sterilize edilebilir,
- Poroz bir yapı oluşturabilmeli ve yüzey/hacim oranı yüksek olmalıdır.

Polimerler; medikal cihazların ve doku mühendisliği ürünü olan doku iskelelerinin üretiminde sıklıkla kullanılan biyomateryallerdir. Doku mühendisliği ve biyomateryal bilimcileri arasında polimerik doku iskelelerine olan ilgi giderek artmaktadır (124, 127, 128).

Doku iskelelerinin üretiminde sık kullanılan doğal ve sentetik polimerler Tablo 2.3.'de özetlenmiştir. Doğal polimerler, pekçok hücre tipiyle iyi etkileşim

sağlamaları ve immün yanıtı neden olmamaları nedeniyle klinikte ilk kullanılan doku iskelesi materyalleridir. Bununla birlikte, sentetik polimerler, immün yanıt veya toksisite potansiyellerine rağmen, özellikle bazı polimer kombinasyonlarının kullanımı ile, doğal polimerlere kıyasla daha işlenebilir ve ucuzdur (128).

Tablo 2.3. Doku iskelesi hazırlamada sık kullanılan doğal ve sentetik biyoparçalanabilir polimerler (16, 125, 127, 128, 130, 131).

Sentetik Polimerler	Doğal Polimerler
<ul style="list-style-type: none"> • Poli(α-hidroksiester) PLA, PGA, PLGA • Polianhidrid • Poli(propilen fumarat) • Polikaprolakton (PCL) • Polietilen glikol (PEG) • Poliüretan 	<p>A) Protein</p> <ul style="list-style-type: none"> • Kollajen • Jelatin • İpek • Fibrin
	<p>B) Polisakkaritler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aljinatlar • Agaroz • Kitosan • Glikozaminoglikan

Sentetik polimerler arasında poli(α -hidroksiester)'ler; poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit) (PLA) ve bunların ko-polimeri poli(laktid-ko-glikolid) asit (PLGA) doku iskelesi formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan polimerlerdir. Çünkü bu polimerler işlenebilirlik, biyoyumluluk özelliklerinin iyi olması ve kontrol edilebilir biyoparçalanabilirlik özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Doku iskelesi formülasyonlarında en sık kullanılan diğer sentetik polimerler Polianhidrid, Poli(propilen fumarat), Polikaprolakton, Polietilen glikol ve Poliüretan'dır (127, 128, 130). Sentetik polimerler ayrıca doku iskelesinin hidrofilitiklik, hücre tutunması ve biyoparçalanabilirlik özelliklerini geliştirmek amacıyla doğal polimerlerle kombinasyon halinde de kullanılabilir.

Doku iskelesi formülasyonlarında en sık kullanılan doğal polimerler, kollajen, jelatin, ipek ve fibrinden oluşan proteinler ve aljinat, agaroz, kitosan ve glikozaminoglikandan oluşan polisakkaritler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Doğal polimerler, biyolojik olarak kabul edilebilirlikleri daha iyi olduğundan hücrelerle

daha iyi etkileşmektedir, bu durumda hücreler arasındaki etkileşimi ve biyolojik sistemin performansını artırmaktadır. Biyoyumlu doğal biyomateryaller, uygulandıkları bölgede minimum enflamatuvar yanıt oluşturmaktadır (128).

Doğal polimerler arasında kollajen, memeli dokularında bulunması ve doğal ECM'in major proteini olması nedeniyle önemli bir yere sahiptir. Kollajenin ECM'deki görevi etkileşimde bulunduğu doku hücrelerinin hücre göçünü, çoğalmasını, farklılaşmasını ve canlılığını düzenleyen hücresel sinyalleri indüklemektir. Bunun bir sonucu olarak doku mühendisliğinde biyoyumluluk problemlerinin gözlendiği yenilenmesi zor olan doku ve organların oluşumunda etkili bir biyomalzeme olarak kullanılmaktadır (131, 132). Yara iyileşmesi sürecinde ise kollajen yara alanında yeni oluşan kollajen fibrilleri ve granülasyon dokusunun düzenlenmesini sağlayarak yeni doku oluşumunu ve yara debridmanını artırmaktadır (133). Kollajen bu iyi bilinen bu etkilerinin yanı sıra biyoyumluluk, biyoparçalanabilirlik ve üretim yöntemlerinin çeşitliliği gibi olumlu özelliklere de sahiptir bu nedenle son yıllarda özellikle yara tedavisinde doku iskelesi materyali olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (124, 125, 127). Ancak, kollajen bazlı sistemlerin mekanik gücü düşüktür ve diyabetik yaralar gibi enflamatuvar yanıtın arttığı durumlarda kollajen enzimler tarafından hızla parçalanmaktadır (132). Bu nedenle, doku iskelesinin biyoparçalanabilirliğini ve mekanik özelliklerini iyileştirmek için doku iskelesi formülasyonlarında kollajen genellikle glikosaminoglikanlar, aljinat, pullulan ve kitosan gibi diğer biyopolimerlerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır (124, 125, 134).

Doğal polimerlerden en yaygın kullanılan diğer bir polimer ise kitinin kısmen veya tamamen deasetillenmiş şekli olan kitosandır. Kitosan biyoyumlu, biyoparçalanabilir, antibakteriyel ve hemostatik özelliklerinden dolayı yara iyileşmesinde doku iskelesi materyali olarak tercih edilmektedir (131, 135). Kitosanın, nötrofiller ve makrofajların infiltrasyonunu ve göçünü indükleyerek hasarlı dokuda enfeksiyon ve hipertrofi oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte kitosan dermal fibroblastların proliferasyonunu ve büyüme faktörlerinin salımını artırarak yara iyileşmesini desteklemektedir. Bu nedenle kitosan yara iyileşmesinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kitosan özellikle yara

iyileşmesinde oluşan asidik ortamda hızla biyolojik olarak parçalanmaktadır. Bu nedenle çeşitli çapraz bağlama işlemleri ile kitosanın yapısal stabilitesi artırılmaktadır (136).

2.6.3. Doku İskelesi Hazırlama Yöntemleri

Kronik yara iyileşmesi amacıyla hazırlanan doku iskeleleri genel olarak aşağıdaki yöntemlerle hazırlanmaktadır;

- Dondurarak Kurutma (*Freeze drying*)
- Çözücü Dökümü - Parçacık Uzaklaştırma (*Solvent-casting particulate-leaching*)
- Faz Ayrımı (*Phase separation*)
- Gaz Köpüklendirme (*Gas foaming*)
- Eriyik Kalıplama (*Melt molding*)
- Elektro-eğirme (*Electro spinning*)

Dondurarak Kurutma Yöntemi (*Freeze drying*)

Seçilen polimerin uygun bir çözücüdeki çözeltisi hazırlanarak tüm materyalin donmuş olduğu sıcaklığa kadar çözelti soğutulur. Böylece çözelti içerisinde oluşan buz kristalleri arasından polimer molekülleri agregasyona uğrayarak ağ yapısı oluşturmaktadır. Dondurma işleminin tamamlanmasının ardından ortam basıncı düşürülerek, çözücü polimer çözeltisinden süblimasyonla uzaklaştırılır. Süblimasyon tamamlandığında, birbirine bağlı mikroporoz yapıya sahip doku iskeleleri oluşmaktadır. Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerinin, porozitesi, polimer çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olup por büyüklüğü dağılımı ise dondurma derecesinden etkilenmektedir (137, 138).

Dondurarak kurutma koşullarının doku iskelesi formülasyonları üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, 0,1-6,5 mbar arasında değişen 5 farklı dondurarak kurutma basıncı uygulanarak doku iskelesi formülasyonları hazırlanmıştır. Doku iskelelerinin karakterizasyon analizleri ile, basınç arttıkça por büyüklüğü, % porozite ve şişme oranı değerlerinin azaldığı gösterilmiştir (139).

Ninan ve ark. (140, 141) yaptıkları bir çalışmada pektin/karboksimetilselüloz/mikrofibril selüloz polimerleri ile farklı mikrofibril selüloz konsantrasyonlarında doku iskelelerini dondurarak kurutma yöntemi hazırlamışlardır. Bu doku iskelesi formülasyonları arasında optimum mekanik güç, camsı geçiş sıcaklığı, kontrollü degradasyon ve hücre canlılığı özellikleri gösteren formülasyonlar dorsal bölgelerinde yara oluşturulmuş erkek sıçanlar üzerinde yara iyileşmesi açısından incelenmiştir. On gün süren tedavi sonlandırıldığında, doku iskelesi ile tedavi edilen grubun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha iyi bir iyileşme gösterdiği kanıtlanmıştır.

Çözücü Dökümü - Parçacık Uzaklaştırma (*Solvent-casting particulate-leaching*)

Doku iskelesi formülasyonu için seçilen polimerin çözeltisi hazırlanarak, tuz, şeker gibi por yapıcı ajan partikülleri ile karıştırılır. Çözücünün ortamdaki uzaklaştırılması ile por yapıcı ajan partikülleri içeren polimer matriks yapısı oluşmaktadır. Bu matriks por yapıcı ajanları çözen bir çözücü örneğin su ile etkileştirildiğinde por yapıcı ajan partiküller çözünerek matriksten ayrılır ve poroz bir polimerik doku iskelesi elde edilir. Bu yöntemle, ortalama 500 µm çapında %93'e kadar poroziteye sahip yüksek derecede poroz doku iskeleleri üretilebilmektedir. Bu yöntemin bir dezavantajı ise bu tekniğin sadece maksimum 3 mm kalınlığında, ince iskelelerin üretiminde kullanılabilmesidir (142, 143).

Lee ve ark. (143) dondurarak kurutma ve çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yöntemleri ile hazırlanmış jelatin doku iskelelerinin in vitro karakterizasyonlarını karşılaştırmışlardır. Karakterizasyon sonuçları incelendiğinde, çözücü dökümü-parçacık uzaklaştırma yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerinde por yapıcı ajan partikül konsantrasyonunun artması poroziteyi artırmıştır. Bununla birlikte oluşan porların büyüklüğü por yapıcı ajan partiküllerin ortalama partikül büyüklüğü olan 300 µm-500 µm ile uyumlu bulunmuştur. Dondurarak kurutma yönteminde ise jelatin konsantrasyonunun artması poroziteyi azaltmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, çözücü dökümü – parçacık uzaklaştırma yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerinde, eklenen por yapıcı ajanın miktarı ve por büyüklüğü ile porozite

ve por büyüklüğü dondurarak kurutma yöntemine göre istenilen seviyede ayarlanabilmiştir.

Gaz Köpüklendirme (*Gas foaming*)

Gaz köpüklendirme yönteminde, viskoz bir polimer çözeltisi hazırlanarak çözeltiye, CO₂ ve azot gibi gaz köpüklendirici bir ajan yüksek basınçla çözelti gaza doyuncaya kadar uygulanmaktadır. Polimer çözeltisi gazla doygunluğa ulaştığında 100 µm-500 µm arasında değişen boyutlarda gaz kabarcıkları polimer içerisinde çekirdeklenerek büyümektedir. Bu yöntemin en önemli avantajı, organik çözücü ihtiyacının bulunmamasıdır. Dezavantajı ise bu yöntemle çoğunlukla bağlantısız porların ve poröz olmayan bir yüzeyin elde edilmesidir (144-146).

Ji ve ark. (144) tarafından yapılan bir çalışmada, poli-DL-laktit / polietilen glikol polimer karışımı kullanılarak, farklı üretim koşullarında doku iskeleleri gaz köpüklendirme yöntemi ile hazırlanmıştır. Karbondioksit (CO₂) gaz köpüklendirici ajanının 60 bar, 120 bar ve 160 bar uygulama basıncı ve 25°C, 45°C ve 55°C üretim sıcaklıklarındaki üretim koşullarının por büyüklüğü üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, sıcaklık sabit tutulduğunda, gaz basıncı arttıkça por büyüklüğünün azaldığı görülmektedir. Basınç sabit tutulup sıcaklık değiştirildiğinde ise, sıcaklık arttıkça por büyüklüğünün arttığı görülmüştür.

Eriyik Kalıplama (*Melt molding*)

Bu yöntemde çözücü kullanılmadan, polimer tozu ve bir por yapıcı ajan katı halde iken bir kalıba dökülerek, polimer camsı geçiş sıcaklığının üzerine kadar ısıtılarak, polimer eriyik hala getirilir, Elde edilen doku iskelesi por yapıcı ajanı uzaklaştıracak çözücü ile etkileştirilerek, poroz yapıda bir doku iskelesi elde edilir. Bu yöntemin avantajı, solvent içermeyen bir teknik olduğundan doku iskelelerinin şekli ve morfolojisi kontrol edilebilmekte, dış yüzeyi istenilen eksternal şekle sahip doku iskeleleri oluşturulabilmektedir. Yöntemin dezavantajı ise artık por yapıcı ajan kalma olasılığı ve uygulanan ısı nedeniyle biyoaktif moleküllerin dahil edilmesini sınırlamasıdır (126, 147).

Faz Ayrımı Yöntemi (*Phase separation*)

Doku iskelesi materyali olarak seçilen polimerin uygun bir çözücüdeki çözeltisi hazırlanarak, çözelti termal olarak veya non-solvent çözücü ilavesi ile faz ayrımına uğratılmaktadır. Oluşan sıvı-sıvı faz ayrımında, fazlardan biri polimerce zengin iken diğeri fakirdir. Polimerce fakir olan faz uzaklaştırılır, bu sırada polimerce zengin olan faz katılaşmaya başlar. Sonuçta yüksek oranda poroz polimer ağı oluşturulur. Faz Ayrımı yönteminde toksik kimyasallar ve yüksek sıcaklıklar uygulanmadığından, ilaçlar gibi biyoaktif moleküllerin doku iskelelerine eklendiği formülasyonların üretimi için daha uygun bir yöntemdir. Faz ayrımı yöntemi ile nano boyutlu fibroz doku iskeleleri üretimi gerçekleştirilebilmektedir (130, 148, 149).

Liu ve ark. (148) jelatin polimeri ile termal olarak indüklenmiş faz ayrımı yöntemi kullanarak nanofibröz yapıda doku iskelesi formülasyonları hazırlamışlardır. Jelatin konsantrasyonu (%5, %7,5 ve %10) ve non-solvent/solvent (10/90, 20/80 ve 60/40) oranları değiştirilerek hazırlanan doku iskelelerinin yapısal özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan doku iskelelerinde, 10/90 non-solvent/solvent oranında mikron boyutunda boncuklar oluşmakta iken, 60/40 oranında ise jelatin ancak 70°C üzerinde çözünerek, mikroküre yapıları oluşturmaktadır. Nanofibröz yapıda doku iskelesi formülasyonuna 20/80 etanol/su oranında ulaşılmıştır. Farklı jelatin konsantrasyonlarındaki doku iskelelerinde, jelatin konsantrasyonunun artması ile fiber çapında hafif düzeyde azalma gözlemlense de bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Ancak jelatin konsantrasyonu arttıkça fiber uzunluğu ve porozitenin azaldığı gösterilmiştir.

Elektro-eğirme (*Electro-spinning*)

Elektro-eğirme, çeşitli sentetik ve doğal polimerler kullanılarak 2 nm'den mikron boyutuna kadar değişen lif çaplarında doku iskelelerinin seçici olarak üretildiği, mekanik olmayan, polimer çözeltisinden lifli bir yapının oluşturulması için bir elektrik alanı kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem çok küçük çapta liflerin oluşmasına olanak sağlamaktadır. ECM'in biyolojik fonksiyonlarını ve yapısını taklit eden nanofibröz yapıdaki doku iskelelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (138).

Tipik bir elektro-eğirme düzeneği 3 parçadan oluşmaktadır (150):

- 1) Polimerik materyali içeren bir şırınga pompası
- 2) Eğirme için yüksek bir elektriksel alan oluşturacak voltaj kaynağı
- 3) Oluşan lifleri toplanması için bir toplayıcı bölüm (*Collector*)

Bu yöntemde polimer çözeltisi damlatılmak üzere bir enjektörde bekletilir. Polimerik çözelti ve toplama plakasına yüksek gerilim uygulanarak eğirme işlemi başlar. Bu aşamada polimer çözelti damlasına iki farklı kuvvet grubu etki eder: damlacığın damlamasını engelleyen yüzey gerilim kuvvetleri ve damlacığı harekete geçirip eğilmesini sağlayan elektriksel kuvvetler. Elektriksel kuvvetler yüzey gerilim kuvvetini yendiğinde polimerik çözelti eğilir ve toplama panelinde fiber formunda ürün birikir (150, 151).

Katti ve ark. (16) tarafından yapılan bir çalışmada elektro-eğirme prosesine etki eden iğne ucu çapı, polimer çözelti konsantrasyonu ve elektro-eğirme voltajı parametrelerinin üretilen doku iskelelerinin morfolojisi ve nanofiber çapı üzerindeki etkisi belirlenmiştir. İğne ucu çapı azaldıkça, doku iskelelerinin ortalama nanofiber çapıda azalmıştır. Polimer konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde, polimer konsantrasyonunun artması nanofiber ortalama çapını artırdığı görülmüştür. 0,375 kV/cm-1,5 kV/cm aralığında kullanılan elektro-eğirme voltajlarında, voltaj arttıkça nanofiber çapı da azalma eğilimindedir. Sonuç olarak, elektro-eğirme yönteminde proses parametrelerinin modifikasyonu ile istenilen özelliklerde nanofiber doku iskelesi formülasyonları tasarlanabilmektedir.

2.6.4. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Doku iskeleleri, sadece önemli bileşenlerin ve hücrelerin taşınması amacıyla değil aynı zamanda hücrelere yol göstererek yeni doku oluşumunu etkili bir şekilde desteklemeleri için üretilmektedir. Başarılı bir doku iskelesi üretimi için doku iskelelerinin kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinin uygunluğu mutlaka incelenmelidir. Bu amaçla doku iskeleleri üzerinde morfolojik analiz, porozite ve por büyüklüğü, in vitro parçalanma, su absorplama ve mekanik güç gibi çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır.

Morfolojik Analiz

Doku iskeleleri dokunun yeniden yapılanması için uygulandığından, fiziksel özellikleri dikkate alınması gereken önemli bir karakterizasyondur. Uygun fiziksel özelliklere sahip olan iskeleler doku oluşumunda önemli bir destek materyali olan ECM’i taklit etme yeteneğine sahiptir. Hücrelerin iskeleye tutunma bölgeleri, hücrelerin çoğalması, farklılaşması, doku oluşumu ve yenilenmesi ile oldukça ilişkilidir. Üç boyutlu nano ve mikro ölçekli doku iskeleleri hücrelerin tutunması için uygun yüzeyler sağlayarak canlı dokularda doğal ECM’i taklit edebilmekte ve doku ve organların normal fizyolojik şekillerinde yenilenmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, birbiri ile bağlantılı porlardan oluşan poröz ve yüksek yüzey yoğunluğuna sahip doku iskeleleri son derece yüksek bir yüzey/hacim oranına sahip olduklarından hücre tutunması ve çoğalmasını iyi bir şekilde desteklemektedir (126, 152).

Doku iskelelerinin morfolojik özellikleri geleneksel olarak kullanılan optik ve elektron görüntüleme yöntemleri ile incelenmektedir. Işık mikroskopları ve taramalı elektron mikroskobu bu amaçla sık kullanılan mikroskoplardır (152).

Porozite ve Por Büyüklüğü

Hücrelerin iskele içinde büyüyerek homojen bir şekilde dağılması ve yeni damar oluşumunun sağlanması için geniş bir yüzey alanı gerekmektedir. Bu nedenle doku iskeleleri geniş yüzey alanı sunan tamamen birbirine bağlı açık gözeneklerden oluşan çok gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır (153). Bununla birlikte yeni doku oluşumu için önemli olan besin maddeleri, büyüme faktörleri, sitokinler ve diğer çözünür maddelerin kütle transferinin sağlanması da iskelelerin kimyasal bileşimi ve por büyüklüğü, porozite, por bağlantıları ve yüzey alanı gibi yapısal parametreleri ile ilişkilidir. Aktif maddelerin salınması için tasarlanmış doku iskelelerinde, maddenin salım profili doku iskelesinin kütle transfer özelliğinden dolayısıyla porozite ve por büyüklüğünden etkilenmektedir. Sonuç olarak, porların yapısal özellikleri hücre dağılımı, organizasyonunu ve kütle transferini düzenleyen birincil değişkenlerdir. Bu nedenle bir iskele tasarlanırken, por büyüklüğü ve dağılımı, por bağlantıları, porozite ve por şekli göz önüne alınması gereken önemli parametrelerdir (154).

Tek başına por büyüklüğü dahi doku iskelesi formülasyonları için oldukça önemli bir parametredir. İskelenin çok küçük porlardan oluşması halinde hücreler tarafından porlar tıkanarak hücrelerin penetrasyonu, ECM üretimi ve iskele iç bölgelerinde yeni damar oluşumu engellenecektir. Yenilenmesi amaçlanan her bir doku çeşidi için doku iskelesinin sahip olması gereken optimum bir por büyüklüğü aralığı daha önce yapılmış deneysel çalışmalarla önerilmiştir. Örneğin, çeşitli optimum por büyüklükleri, yeni damar oluşumu için 5 µm, fibroblast büyümesi için 5 µm-15 µm, hepatositlerin büyümesi için 20 µm, osteokondüksiyon için 200 µm-350 µm ve yetişkin memeli derisinin rejenerasyonu için 20 µm-125 µm'dir (155-158).

Doku iskelelerinin porozite ve por büyüklüğünü ölçmek için çeşitli ekipmanlar ve bilgisayar yazılımları kullanılmaktadır. Sıvı sızdırma yöntemleri de porozitenin dolaylı olarak ölçülmesinde kullanılan yöntemlerdir. Fiziksel karakterizasyon yöntemlerinin yanısıra porozite ölçümleri için görüntüleme teknikleri de kullanılabilir. Doku iskelesi formülasyonlarında porozite ve por büyüklüğünü ölçmek amacıyla en sık kullanılan yöntemler; gravimetrik yöntem, civa porozimetresi, sıvı yer değiştirme yöntemi, taramalı elektron mikroskobu analizi, mikro-bilgisayarlı tomografi görüntülemeleri, geçirgenliğe dayalı yöntem ve kapiler akım porozimetresi'dir (159).

İn Vitro Parçalanma

Biyoparçalanabilir polimerlerin, ilaç taşıyıcı sistemler ve doku mühendisliği uygulamalarında biyomateryal olarak kullanılması bu alanlarda devrim etkisi yaratmış ve bu sistemlerin parçalanma özelliğini öne çıkarmıştır. Doku iskelelerinin parçalanması fiziksel, kimyasal ve enzimler gibi biyolojik ajanların rol aldığı biyolojik mekanizmalar yoluyla gerçekleşmektedir (122).

Doku iskelelerinin parçalanma hızı (153, 154, 160);

- Kullanılan polimerlere ait özellikler; polimerin kimyasal yapısı, hidrofilitik/hidrofobiklik seviyesi, hidrolitik olarak stabil olmayan bağlarının varlığı, kristal veya amorf morfolojisi, camsı geçiş sıcaklığı, kopolimer oranı ve molekül ağırlığı
- Doku iskelesinin yapısal ve geometrik özellikleri; porozite, por büyüklüğü, por duvarı kalınlığı, çapraz bağ yoğunluğu, doku iskelesi boyutu ve homojenliği
- Çevresel koşullar; ortamın pH'sı, sıcaklığı ve su içeriği gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Parçalanma üzerine çok sayıda faktörün etki etmesi bu faktörler üzerinde yapılacak modifikasyonlar ile optimum doku rejenerasyonu için gerekli parçalanma hızının ayarlanmasını mümkün kılmaktadır. Biyoparçalanabilir doku iskeleleri bir taraftan kademeli olarak parçalanırken, diğer taraftan iskele üzerine tutunmuş hücreler tarafından oluşturulan yeni doku ile yer değiştirmelidirler. Bu nedenle ideal bir kontrollü parçalanma planlanan doku iskelesi formülasyonunda iskelenin parçalanma hızı hedeflenen dokunun büyüme hızıyla eşleştirilmelidir. Özellikle yara iyileşmesi amacıyla tasarlanan doku iskeleleri, yara iyileşme sürecinde granülasyon dokusu oluşumu ve/veya yeniden düzenlenme fazı sırasında in vivo parçalanma gösterecek şekilde tasarlanmalıdır (122, 154).

Parçalanma, doku iskelesinin gövdesinde veya yüzeyinde yapının dağılması, iskele materyalinin çözünmesi veya rezorpsiyonu ile sonuçlanmaktadır. Doku iskelelerinin yüzey parçalanma hızı genellikle sabittir ve yüzey parçalandıkça doku iskelesi boyutu küçülmesine rağmen esas yapı korunmaktadır. Bu nedenle bu özelliği gösteren doku iskeleleri dokunun yeniden oluşması için daha uzun bir mekanik stabilite sağlamaktadır (153).

Doku iskelelerinin in vitro parçalanma çalışmaları literatürde genellikle iskelenin in vivo ortamı taklit eden bir ortamda belirli sürelerde inkübasyonu ve bu inkübasyon sonunda doku iskelesinin ağırlığında meydana gelen değişimin ölçülmesi

ile tayin edilmektedir. Ölçülen ağırlıklar analize başlamadan önceki ölçümlerle ile oranlanarak parçalanma hızına bağlı olarak oluşan kütle kayıpları hesaplanmaktadır (123, 161, 162).

Su Absorplama

Doku iskelelerinin su absorplama davranışı ve yapısal kararlılığı, doku mühendisliğindeki elverişli kullanımları açısından kritik önem taşımaktadır. Doku iskeleleri hasarlı bölgeye erken döneminde uygulandığından ve hasarlı dokuda vaskülerizasyonun tamamlanması uzun zaman aldığından doku iskelesinde kolonize olmuş hücreler tarafından tüketilen besinler tamamen vücut sıvısından temin edilmektedir. Bu nedenle doku iskelelerinin su absorpsiyon kapasiteleri formülasyon aşamasında mutlaka değerlendirilmelidir (163, 164).

Su absorplama kapasitesi, doku iskelsinin üç boyutlu poröz yapısının ve por büyüklüğünün artma miktarının bir göstergesidir. Absorpsiyon sonucu büyüyen porlar sayesinde hücrelerin doku iskelesi içine göçü ve tutunmasının kolaylaşmasının yanı sıra hücrelerin büyümesi ve yeni doku gelişimi de desteklenmektedir (165). Bununla birlikte, absorplama kapasitesi arttıkça doku iskelesinin mekanik gücü azalmaktadır. Bu nedenle doku iskeleleri için ideal olan kontrollü bir absorpsiyon kapasitesidir (166).

Doku iskelelerinin su absorplama kapasitesi, kullanılan materyalin fizikokimyasal özellikleri, şişme ortamı, iskelenin yüzey ıslanabilirliği ve çapraz bağlama yöntemi gibi birçok faktörden etkilenmektedir (167). Özellikle şişme ortamının veya implantasyon bölgesinin pH değeri su absorpsiyonunu etkileyen başlıca faktörlerden biridir. Bu nedenle doku iskelelerinin su absorpsiyon kapasitesi genellikle fizyolojik pH ve koşulları taklit eden çözeltileri içerisinde değerlendirilmektedir (166). Kuru ağırlıkları ölçülerek uygun ortamda belirli bir süre şişmeye bırakılan iskeleler, şişme tamamlandığında ortamdaki çıkarılarak tartılmakta ve absorplanan su miktarı belirlenmektedir. Doku iskelesinin kendi ağırlığına oranla absorpladığı su miktarı ise su absorplama kapasitesi olarak değerlendirilmektedir (123, 124).

Mekanik Güç

Bir dokunun genel mekanik özellikleri, hücrelerin ve onları çevreleyen makromoleküler destek matrisinin bağlı kompozit davranışına bağlıdır. Farklı dokuların ECM'si, mekanik özellikleri açısından geniş ölçüde değişmektedir. ECM'in belirli bir aralıkta olması gereken esnekliği normal fizyolojik işlev için çok önemlidir. Hücreler, onları çevreleyen ECM ortamıyla dinamik bir ilişki içerisinde ve bu ilişkinin dokunun yenilenmesi ve işlevsel hale gelmesi için oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle doku iskelesi formülasyonlarının yerine geçeceği dokuya özgü olan ECM ile uyumlu bir mekanik özellik göstermesi beklenmektedir. Bununla birlikte doku iskelesine tutunan hücreler tarafından uygulanan gerilme kuvvetleri nedeniyle meydana gelebilecek değişikliklerin de hesaba katılması gerekmektedir. Mekanik güç doku iskelesinin mikroyapısı ve porozite gibi tasarım parametreleri ile esneklik ve sertlik gibi doku iskelesi materyaline ait özelliklere bağlı olarak değişmektedir. Ancak doku iskelelerinin mekanik özelliklerini ve yapısal bütünlüğünü belirleyen ana faktör por hacmi, büyüklüğü, şekli ve bağlantılarını içeren por yapısı özellikleri ve porozitedir (153, 168).

Doku mühendisliği uygulamasında kullanılacak bir doku iskelesi için uygun mekanik özellikler tedavinin başarısı için kritik öneme sahiptir. Pek çok doku iskelesinin biyostabilitesi, iskelenin mekanik gücü, elastikliği, absorpsiyonu ve parçalanmasına bağlıdır. Özellikle kemik ve kırıkta gibi sert, yük taşıyan dokuların yeniden yapılandırılması için implantasyondan sonra iskele yapılarının mekanik dayanımının korunması son derece önemlidir (153, 169).

Doku iskelelerinin mekanik özelliklerini ölçmek için kullanılan geleneksel tekniklerde gerilme (*tensile*) ve sıkıştırma (*compression*) testi gibi tahrip edici yöntemler uygulanmaktadır (152). Gerilme testlerinde belirli boyutlarda kesilmiş olan doku iskeleleri iki uçundan sıkıştırılarak sabit bir hız ve kuvvette gerilime maruz bırakılıp kopma gerçekleşene kadar çekilmektedir (170). Sıkıştırma testlerinde ise belirli boyutlardaki doku iskeleleri üzerine sabit bir hız ve kuvvette basınç uygulanarak doku iskelelerinin sıkıştırılması sağlanmaktadır (171). Her iki test sonunda oluşan çekme veya basma stresine tepki olarak ölçülen kuvvet değeri yani

elastik modül değerleri hesaplanmakta ve doku iskelelerinin sahip oldukları mekanik güç değerlendirilmektedir (153).

2.6.5. Doku İskelelerinin Yara Tedavisindeki Uygulamaları

Yara tedavisinde enfeksiyonun önlenmesi, su/kan kaybının azaltılması ve ağrının kontrol altına alınabilmesi için epidermal kaplama yani, dış bariyerin sağlanması çok önemlidir. Literatürde yer alan çalışmalar etkili bir yara iyileşmesi için her zaman cilt ikameleri içerisinde dermis tabakasının da var olması gerektiğini göstermektedir. Bu nedenle, doku mühendisliği yara tedavisinde üç boyutlu doku iskelelerinin oluşturulmasına yönelmiştir (9, 127, 172, 173).

Doku iskelelerinin yara iyileştirme performansı, bir takım faktörlerin doku iskelelerine eklenmesi ile düzenlenebilmektedir. Yara tedavisinde, bugüne kadar; doğal faktörlerden büyüme faktörleri, antibiyotikler, antiinflamatuvarlar ve yara iyileştirici etkisi bulunan diğer ilaçlar olmak üzere çeşitli etkin maddeler ve kök hücreler doku iskelesi formülasyonlarına doğrudan işlenerek araştırılmıştır (174-178).

Doğal Faktör İçeren Doku İskeleleri

Doku iskelesi formülasyonları yara tedavisinin desteklenmesi amacıyla çeşitli doğal faktörlerle yüklenebilmektedir. Bu amaçla yaygın olarak büyüme faktörlerinden yararlanılmaktadır (175).

Kronik yara iyileştirici potansiyelleri bulunan çok çeşitli büyüme faktörleri bulunmaktadır;

- Epidermal büyüme faktörü (*Epidermal growth factor*, EGF)
- İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (*Insulin-like growth factor-1*, IGF-1)
- Transforme edici büyüme faktörü (*Transforming growth factor*, TGF)
- Keratinosit büyüme faktörü (*Keratinocyte growth factor*, KGF)
- Fibroblast büyüme faktörü (*Fibroblast growth factor*, FGF)

- Vasküler endotelial büyüme faktörü (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF)
- Trombosit türevli büyüme faktörü (*Platelet-derived growth factor*, PDGF) bu faktörlerden bazılarıdır (175).

Normal yara iyileşmesi sırasında, ECM'in bileşenleri ile ECM'i çevreleyen hücre sinyal molekülleri arasındaki dinamik ve karşılıklı etkileşimlerden, büyüme faktörleri ve sitokinler sorumludur. Bu etkileşimler neticesinde, yeni doku oluşumu gerçekleşmektedir. Bu sebeple anjiyogenezisten, hücre proliferasyonuna, ECM oluşumuna kadar yara iyileşmesinin pek çok aşamasında büyüme faktörleri rol oynamaktadır (179).

Sheridan ve ark. (180) tarafından yapılan bir çalışmada anjiyogenezisi desteklediği kanıtlanmış olan büyüme faktörlerinin, doku iskelesi matrisi yapısı içerisinde, lokal, kontrollü bir şekilde salımının gerçekleştirileceği ve bu sayede çok daha iyi bir anjiyogenezis yanıtının sağlanacağı öne sürülmüştür. Bu amaçla ısı ve organik solvan içermediğinden büyüme faktörü yapısını bozmayan gaz köpüklendirme yöntemi ile 75:25, D,L-laktid:glükolid (PLGA) polimeri kullanılarak, I¹²⁵ ile radyoaktif olarak işaretlenmiş VEGF içeren poroz doku iskeleleri hazırlanmıştır.

Losi ve ark. (181) diyabetik deri ülserlerinde endojen büyüme faktörlerinin seviyesinde ve aktivitesinde azalma olması nedeniyle yara iyileşmesinin gecikmesinden yola çıkarak VEGF ve bFGF büyüme faktörlerinin kontrollü ve uzatılmış salımını sağlayan bir doku iskelesi formülasyonu tasarlayarak, yara iyileşmesini in vivo yara modellerinde incelemiştir. Kontrollü salım sağlamak için VEGF ve bFGF'leri içeren PLGA nanopartikülleri hazırlanarak, Polieter üreten, Polimetilsiloksan/fibrin doku iskelesi formülasyonu ile birleştirilmiştir. İn vivo deneylerde kontrol grubunun yanında boş lipid nanopartikül içeren doku iskelesi, serbest VEGF ve bFGF içeren doku iskelesi ve nanopartiküller VEGF ve bFGF içeren doku iskelesi olmak üzere üç tedavi grubunda incelenmiştir. Tedavi sonucunda, serbest VEGF ve bFGF içeren doku iskelesi, nanopartiküller VEGF ve bFGF içeren doku iskelesi ile benzer iyileşme oranları vermiştir. Bunun sebebinin nanopartiküller

VEGF ve bFGF içeren doku iskelesinin büyüme faktörlerini serbest büyüme faktörü içeren doku iskelesine göre daha yavaş salmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

FGF içeren kitosan/kollajen doku iskelelerinin diyabetik yara iyileşmesindeki terapötik etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulmuş diyabetik yara modelleri üzerinde çalışılmıştır. Sadece doku iskelesi veya FGF uygulanan tedavi gruplarının, kontrol grubuna göre iyileşme süresini hafif derecede azalttığı gözlemlenirken, FGF içeren kitosan/kollajen doku iskelesi uygulamalarında ise iyileşme süresinde kontrol grubuna göre önemli derecede kısalma gerçekleşmiştir (182).

Etkin Madde İçeren Doku İskeleleri

Doku iskeleleri, çeşitli etkin madde ve doğal faktörlerin sistemik uygulamaya göre daha düşük dozlarda uygulanmalarında dahi etkin doz salımını mümkün kılmaktadır. Etkin maddelerin kronik yara tedavisinde konvansiyonel uygulama yolları arasında oral ve parenteral uygulamalar bulunmaktadır. Enjeksiyonla uygulama, etkin maddenin doku onarımına yardımcı olacak bir bolus dozunu sağlasa da, tüm yara iyileşmesi süreci boyunca bu ajanların etkinliğinin sağlanması mümkün olamamaktadır. Üç boyutlu doku iskeleleri ile, doku rejenerasyonu için yararlı olan faktörlerin, kısa, orta veya uzun vadeli lokalize salımı sağlanabilmektedir. Buna ek olarak, doku iskeleleri ile kontrollü bir şekilde lokal uygulama yapıldığından daha az terapötik ajan kullanılmakta, maliyet düşürülmektedir (183).

Gentile ve ark. (123) kemik oluşumu üzerindeki pozitif etkileri gösterilmiş simvastatin ile yüklenmiş poli(DL-laktit-ko-glikolit) asit (PLGA) nanopartiküllerini içeren kitosan-jelatin doku iskelesi formülasyonları hazırlamışlardır. Hazırlanan doku iskeleleri ile lokal olarak kontrollü simvastatin salımı sağlanmış ve yapılan hücre kültürü deneyleri sonucunda ise doku iskelelerinde osteoblast hücrelerin proliferasyonunun arttığı gözlemlenmiştir.

Perumal ve ark. (184) antibakteriyel ajan olan, mupirosin etkin maddesi ile yüklenmiş mikroküreler içeren kollajen doku iskelelerinin yara iyileşmesindeki etkinliğini değerlendirmiştir. Sıçanlarda oluşturulan in vivo yara modellerinde boş

kollajen doku iskelesi ve mupirosin mikroküreleri içeren kollajen doku iskelesinin tedavi etkinliği kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Mupirosin mikroküreleri içeren kollajen doku iskeleleri, boş kollajen doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında kademeli olarak artan bir yara kapanması göstermiştir. Ancak bu kapanma yalnızca yara iyileşmesinin başlangıç periyodunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Mupirosin mikroküreleri içeren kollajen doku iskelesi ile tedavi sonucunda yapılan histolojik incelemelerde sonucunda ise diğer gruplara göre daha yüksek oranda granülasyon dokusu oluşumu gözlenmiştir. Bu etkinin mupirosin yüklü mikroküreler ve kollajen doku iskelesinin sinerjik etkisiyle oluştuğu düşünülmüştür.

Hücre proliferasyonu ve anjiyogenezis üzerindeki olumlu etkileri yayınlanmış olan nikotinin düşük konsantrasyonlarda yara tedavisinde topikal uygulanmasının iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir (185). Bu sonuçlar üzerine Liem ve ark. (186) düşük dozda nikotin ve bFGF içeren kollajen doku iskelesi formülasyonu geliştirerek, fare yara modelleri üzerinde in vivo yara iyileştirici etkinliği değerlendirmiştir. Sadece nikotin veya büyüme faktörü içeren doku iskelesi uygulanan farelerde yara alanı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede azalmıştır. Bununla birlikte, nikotin ve bFGF birlikte içeren doku iskelesi formülasyonunun uygulandığı tedavi grubunda ise diğer tüm gruplara göre yara alanında önemli derecede azalma gözlenmiştir.

Kök Hücre İçeren Doku İskeleleri

Doku iskelelerine hücre ekiminin gerçekleştirilmesi ile yetersiz olan hücrelerin ve hücrelerce üretilen faktörlerin tamamlanmasını hedeflenmiştir. Kronik kütanöz yaraların tedavisi için doku iskeleleri öncelikle fibroblastlar, keratinositler gibi farklılaşmış yetişkin deri hücreleri ile kombine edilmiştir. Daha sonraki aşamada ise farklılaşmış hücrelerin yanında kök hücrelerin de yara iyileştirici etkileri düşünülerek deri yenilenmesi ve kronik yara tedavisi için araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Kronik yaralar zayıf damarlanmalar ile karakterizedir, bu sebeple yara bölgesine besinlerin ve hücrelerin taşınmasının bozulduğu düşünülmektedir. Kök hücreler özellikle anjiogenezis sağladığından kronik yara tedavisinde olumlu sonuçlara yol açmaktadır (25, 187).

Yara tedavisinde geleneksel tekniklerle kök hücre tedavisi; lokal enjeksiyon, topikal uygulama ve periferik dolaşım içine enjeksiyon yoluyla gerçekleştirilmektedir. Yeni uygulama yollarından doku iskeleleri ise, hücresele tedavilerde terapötik potansiyeli maksimum düzeyde tutmakta ve kök hücre fonksiyonlarını optimize etmektedir.

Başarılı bir kök hücre tedavisinde en önemli noktalar, kök hücrelerin canlılıklarını koruyarak hasarlı bölgeye stabil bir şekilde yerleşmesi ve istenilen yönde farklılaşarak çoğalmasıdır. Sistemik veya lokal enjeksiyonla tedavinin önemli dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle kök hücrelerin sistemik olarak uygulanması, hücreleri vücutta yaygın bir şekilde dağıtarak az sayıda kök hücrenin istenilen bölgeye ulaşmasına neden olmaktadır. Sistemik veya lokal enjeksiyonla yara bölgesine ulaşan kök hücreler ise korunmasız hücrelerin çoğalmasına karşıt olan proteolitik, kronik inflamatuvar bir ortamla karşı karşıya geldiklerinden, hücreler yara yatağına tutunamayarak ölmekte ve istenilen terapötik etki sağlanamaktadır. Kronik yaraların bu olumsuz çevre koşulları, sistemik veya lokal enjeksiyonun dezavantajları nedeniyle sınırlı kullanımları gibi olumsuz nedenler, kök hücreleri lokal olarak hapseden koruyucu bir kök hücre taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi gerekli kılmıştır. Bu sebeple, günümüzde doku mühendisliği çalışmalarında yaygın bir yaklaşım olarak, doku rejenerasyonu ve yenilenmesinin doğal bir şekilde başlatılması için üç boyutlu poröz, biyoparçalanabilir doku iskelelerine spesifik hücreler yüklenmektedir (30, 188).

İnsan Adipoz türevi mezenkimal kök hücrelerin (ASCs) PLGA/Kitosan doku iskelelerine ekimi ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonunun, bozulmuş yara iyileşmesi üzerindeki etkinliği streptozosin ile indüklenmiş diyabetik farelerde araştırılmıştır. Bu çalışmada in vitro olarak, ASCs doku iskelelerine ekiminin ardından 1,7,14, ve 21. günlerdeki ASCs'lerce oluşturulan VEGF ve TGF-B1 konsantrasyonu belirlenmiştir. Her iki büyüme faktörü de kök hücrelerin ekiminden sonraki günlerde yüksek seviyelerde doku iskelesinde bulunmaktadır. İn vivo deneyler, diyabetik kontrol ve diyabetik olmayan kontrol grupları ile boş PLGA/Kitosan doku iskelesi (ASCs) PLGA/Kitosan doku iskelesinin uygulandığı dört grupta gerçekleştirilmiştir. Genel bir gözlem olarak ASC içeren doku iskeleleri

(ASCs PLGA/ Kitosan) ile tedavi edilen grup, transplantasyondan sonraki 7 gün içerisinde tamamen iyileşme göstermiştir. Sadece doku iskelesi (PLGA/ Kitosan) veya tedavi uygulanmayan diyabetik kontrol grubunda 7 gün sonunda önemli derecede iyileşme olmamıştır. 14. Günün sonunda ise ASCs PLGA/ Kitosan grubu % 94,4 iyileşme göstererek diyabetik olmayan kontrol grubu dışında diğer gruplara göre yine önemli derecede iyileşme göstermiştir (189).

2.7. Simvastatin

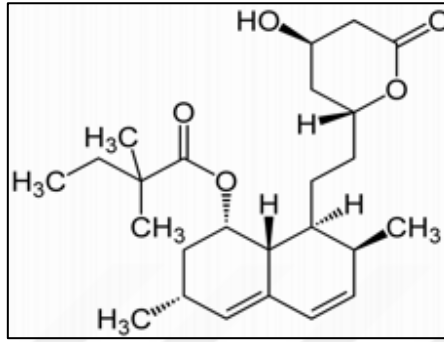
Simvastatin, HMG-KoA redüktaz enzim inhibitörleri olan statin grubu ilaçların bir üyesidir. Statinler oral yoldan alındığında kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basmağında yer alan HMG-KoA redüktaz enzimini inhibe ederek, kolesterol seviyesini azaltırlar. HMG-KoA'nın HMG-KoA redüktaz enzimi tarafından mevalonata dönüşümü kolesterol biyosentezinin ilk basamaklarından. HMG-KoA redüktaz inhibisyonu karaciğerde kolesterol sentezini azaltırken ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörlerinin sentezini artırmaktadır. Bu durum kan dolaşımındaki LDL klirensinin artmasına yol açmaktadır (190). Statinler fermentasyon yoluyla doğal olarak veya sentetik olarak üretilebilmektedir. Doğal statinler; Mevastatin, Lovastatin, Pravastatin ve Simvastatin iken, sentetik statinler; Pitavastatin, Fluvastatin, Rosuvastatin, Atorvastatin ve Cerivastatin'dir. Buna ek olarak statinler, lipofilik (Atorvastatin, Lovastatin, Simvastatin ve Fluvastatin) ile lipofobik (Pravastatin ve Rosuvastatin) statinler olarak sınıflandırılmaktadır (191).

Simvastatin ve Lovastatin inaktif lakton yapısında, ön ilaç olarak uygulanmaktadır. Bu statinler oral olarak alındıklarında karaciğer ve plazmadaki, karboksiesterazlar tarafından, inaktif lakton formlarından aktif hidroksi-asit formlarına dönüşmektedir. Diğer statinler ise aktif hidroksi-asit formunda uygulanmaktadır. Statinlerin kimyasal yapıları birbirleri ile ilişkili olmasına rağmen farmakokinetik özellikleri farklılık göstermektedir. Tablo 2.4.'de statinlerin farmakokinetik özellikleri özetlenmiştir (19).

Tablo 2.4. Statinlerin farmakokinetik özellikleri.

Parametre	Atorvastatin	Fluvastatin	Lovastatin	Pravastatin	Simvastatin	Rosuvastatin	Pitavastatin
Biyoyararlanım (BY) %	12	24	5	18	5	20	80
Yiyecek Etkisi	BY azalır	BY azalır	BY artar	BY azalır	Etkisi yoktur	Etkisi yoktur	-
Proteine Bağlanma %	98	>98	>95	50	95-98	90	96
Aktif Metabolit	+	-	+	-	+	minör	minör
Eliminasyon Yararlanma Ömrü (saat)	14	1,2	3	1,8	2	19	11
CYP450 metabolizması ve izoenzim	+ 3A4	+ 2C9	+ 3A4	-	+ 3A4	Sınırlı derece	Sınırlı derece
Renal ekskresyonu (%)	<5	6	10	20	13	10	-

Simvastatin, *Aspergillus terreus* mantarının fermantasyonu ile elde edilen, beyaz, nonhigroskopik kristal toz şeklindedir. Simvastatin kapalı formülü 'C₂₅H₃₈O₅', açık kimyasal formula ise; (1 S, 3R, 7S, 8S, 8aR) -1,2,3,7,8,8a-heksahidro-3, 7-dimetil-8- {2 - [(2R, 4R) -tetrahidro-4-hidroksi-6-okso-2H-piran-2-il] etil} -1-naftil-2,2-dimetil butirat'tır (Şekil 2.6.) (19, 192).



Şekil 2.6. Simvastatin kimyasal formülü (193).

Lipofilik yapıdaki simvastatinin sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Simvastatinin çeşitli fizikokimyasal özellikleri ve çözünürlükleri Tablo 2.5.'de özetlenmiştir (193-195).

Tablo 2.5. Simvastatin fizikokimyasal özellikleri (193-195).

Molekül Ağırlığı	418,56 g/mol	
Oktanöl/Su Partisyon Katsayısı (logP_{Oct/su})	4,68	
Buhar Basıncı (25°C)	6,4x10 ⁽⁻¹³⁾ mm Hg	
Erime Derecesi	135-138°C	
pKa	5,5	
Spektral özellikler	UV max (asetonitril)	231- 238-247 nm
Çözünürlük	Kloroform	610 mg/mL
	Metanol	200 mg/mL
	Etanol	160 mg/mL
	Su (25°C)	0,765 mg/mL
	Polietilenglikol-400	70 mg/mL
	Propilenglikol	30 mg/mL

Simvastatin, oral yoldan uygulandığında, aktif hidroksi asit formunun biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Biyoyararlanımının düşük olması, gastrointestinal sıvılardaki çözünürlüğünün ve mukozal membranlardan permeabilitesinin düşük olmasına, barsak duvarı ve karaciğer CYP3A4 enzimleri aracılığıyla ilk geçiş

etkisine uğramasına bağlanmaktadır. Ayrıca, P-glikoproteine bağlı sekresyonunun da biyoyararlanımının düşük olmasında rol oynadığı düşünülmektedir (196, 197).

Simvastatinin çözünürlüğünün az olması, düşük oral biyoyararlanım ve stabilite sorunu taşıması, bu ilacın biyoyararlanımını artırmak ve stabilitesini sağlamak amacıyla farklı yapılarıdaki nanopartiküllerinin hazırlanmasını gündeme getirmiştir. Gerçekleştirilen bir çalışmada mezoselüler köpük nanopartiküller içine yüklenen simvastatinin çözünme hızının ve ilaç yükleme kapasitesinin arttığı gösterilmiştir (198). Harisa ve ark. (199) hiperlipidemi tedavisinde oral biyoyararlanımını artırmak amacıyla simvastatin yüklü NLT formülasyonları tasarlamıştır. Hazırlanan nanopartiküller simvastatin süspansiyonu ile karşılaştırılarak *in vivo* hiperlipidemik sıçan modelleri üzerinde simvastatin biyoyararlanımını ve hiperlipidemi tedavisi üzerindeki etkinliği açısından incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda simvastatin süspansiyonuna kıyasla NLT formülasyonlarında simvastatin biyoyararlanımının daha yüksek olduğu ve bunun sonucu olarak hiperlipidemik koşullarda kan lipit seviyeleri ve eritrositlerin aterosjenik riski üzerindeki avantajlı etkilerinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde Tiwari ve ark. (56) ve Zhang ve ark. (200) da simvastatin içeren katı lipit nanopartiküllerin ve nanoyapılı lipit taşıyıcıların, simvastatinin oral biyoyararlanımını artırdığını *in vivo* çalışmalarla açıklamışlardır. İmanparast ve ark. (201) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise simvastatinin nitrik oksit sentaz enziminin aktivasyonunu artırıcı etkisinden yola çıkılarak simvastatinin endotel disfonksiyon tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır. Simvastatinin düşük olan suda çözünürlüğü ve biyoyararlanımını nedeniyle PLGA nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve endotel hücrelere hedeflendirme amacıyla nanopartiküller mZD7349 peptidi ile konjuge edilmiştir. İnsan göbek kordonu vasküler endotel hücreleri üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* etkinlik çalışmaları sonucunda da hazırlanan nanopartiküllerin nitrik oksit sentaz enziminin salımını önemli derecede artırdığı gösterilmiştir. Yasasvini ve ark. (21) ise yara tedavisi amacıyla simvastatin yüklü kitosan mikropartiküllerini içeren polivinil alkol hidrojel doku iskelesi formülasyonlarını hazırlayarak kontrollü salım sağlayan yeni bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmişlerdir. Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* yara

iyileşmesi çalışmalarında doku iskelesi formülasyonları kontrol grubu ve simvastatinin konvansiyonel merhem dozaj formu ile karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlarda hazırlanan doku iskelelerinin kontrol ve simvastatin merhem grubuna göre önemli derecede daha yüksek iyileşme sağladığı gösterilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler, Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Adipocyte Differentiation Basal Medium ve Supplement Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD
Alcian Blue Boyası	Diagnostic BioSystem, ABD
Asetonitril	Sigma-Aldrich, Almanya
Apifil	Gattefosse, Fransa
bcl-2 Antikoru	Merck Milipore, Almanya
Biotinli Anti-İmmünglobulin ve Streptavidin-Peroksidaz Konjugatı	Nichirei, Japonya
BrDU Boyası	Diagnostic BioSystem, ABD
BrDU Saptama Kiti	BD-Pharmingen, ABD
CD31 Antikoru	Lab Vision, Thermo Fisher Scientific, ABD
CD45R, CD11b/c, CD90 ve CD44 Antikorları	BD-Pharmingen, ABD
Compritol 888 ATO	Gattefosse, Fransa
Chondrocytes Differentiation Basal Medium ve Supplement Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD
DAB (3,3'-diaminobenzidin) Kit	Dako Laboratories, ABD
Dimethyl Sulfoxide	Sigma-Aldrich, Almanya

Disodyum Hidrojen Fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom, Almanya Lonza, Belçika
Fare Fibroblast Hücresi (L929 Hücre Hattı)	American Type Culture Collection (ATCC), ABD
Fetal Sığır Serumu	Biochrom, Almanya Lonza, Belçika
Geleol	Gattefosse, Fransa
Gelot 64	Gattefosse, Fransa
Hidroklorik asit (HCL)	J.T.Baker, ABD
Jelatin (Sığır Derisi Jelatini, Tip B)	Sigma-Aldrich, Almanya
Ketamin	Ketalar, Pfizer, ABD
Kitosan (Orta Molakül Ağırlıklı)	Sigma-Aldrich, Almanya
Kitosan Klorür (Protasan UP CL 213)	NovaMatrix, Norveç
Ki67 Antikoru	Merck Milipore, Almanya
Kollajen (Dana Derisi Kollajeni, Tip III)	Sigma-Aldrich, Almanya
Ksilazin	Alfazyn, Ege Vet, Türkiye
Labrafac Lipophile	Gattefosse, Fransa
Labrafil M 1944 CS	Gattefosse, Fransa
L-Gultamine (Sitetoksisite Çalışmaları)	Biochrom, Almanya
L-Gultamine	Lonza, Belçika

(Kök Hücre Çalışmaları)

Maisine	Gattefosse, Fransa
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	AppliChem, Almanya
Oil Red boyası	Diagnostic BioSystem, ABD
Oleik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Osteocyte Differentiation Basal Medium ve Supplement Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD
Peceol	Gattefosse, Fransa
Penisilin/Streptomisin (10000U/ 10000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Biochrom, Almanya
Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin B	Biological Industries, İsrail
Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4)	Riedel de Haen, Almanya
Precirol ATO 5	Gattefosse, Fransa
Potasyum Klorür (KCL)	Merck, Almanya
Simvastatin	Teva, İsrail
Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH_2PO_4)	Merck, Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Klorür (NaCL)	Merck, Almanya
Sodyum Tripolifosfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Soya Fasulyesi Lesitini (Lipoid-S100)	LIPOID GmbH, Almanya

Streptozotosin	Sigma-Aldrich, Almanya
Tripan Blue	Sigma-Aldrich, Almanya
Tween 80	Merck, Almanya
Von Kossa boyası	Diagnostic BioSystem, ABD

3.1.2. Kullanılan Aletler

Civalı Porozimetre	Poremaster 60, Quantachrome Corporation, ABD
Countess® Automated Cell Counter	Invitrogen, ABD
Erime Derecesi Tayin Cihazı	Thomas Hoover, ABD
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre	DSC Q 100, TA Instruments, ABD
Dijital Fotoğraf Makinesi	Nikon, Japonya
Flow Sitometri Cihazı	FACS-ARIAIII, BD, ABD
FT-IR	Perkin Elmer, İngiltere
Hücre Kültürü Plağı (6, 12, 24 ve 96 kuyucuklu)	Greiner, Almanya
HPLC Kolonu	Hypercil, ABD
HPLC Sistemi	Agilent 1200 Series, Almanya
İnkübatör	Sanyo MCO-18AIC, Japonya
Invert Mikroskop	Leica, Almanya
Işık Mikroskobu	Leica, Almanya

Koni/Plak Viskometresi	Brookfield DV2T RV, ABD
Laminar Hava Akımlı Kültür Kabini	BHG 2000 S/D, D: Group Company, İtalya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL 3000, Thermo Fisher, Danimarka
Manyetik Karıştırıcı	Telesystem 15, Thermo Fisher, Danimarka
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Mikroplak Okuyucu	VERSAmax, Molecular Devices, ABD
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı	Zetasizer Nanoseries-ZS, Malvern Ins., İngiltere
Peristaltik Ultrafiltrasyon Pompası	Masterflex L/S Series, ABD
pH Metre	Sartorius, Almanya
Plastik Tüp (2 mL)	Isolab, Almanya
Polarize Işık Mikroskobu	Leica, Almanya
Santrifüj Cihazı	Hettich, Almanya
Selüloz Şırınga Filtresi (0,45 µm)	Sartorius, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu	Quanta 400F, Field Emission, Almanya
Texture Analyser	TA-XTPlus, Stable Microsystems, İngiltere
Geçirimli Elektron Mikroskobu	FEI Tecnai G2 Series, Hollanda

Ultrafiltrasyon Filtresi [Vivaflo 50, <i>Molecular Weight Cut-Off</i> (MWCO) 100 kDa]	Sartorius, Almanya
Ultra Santrifüj Cihazı	Hermle Z323K, Almanya
Ultrasonik Banyo	Branson, ABD
UV Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Yatay Çalkalayıcı Su Banyosu	WNE14, Memmert, Almanya
Yüksek Hızlı Karıştırıcı	Ultraturrax T25 Basic, IKA, Almanya
Yüksek Basıncılı Homojenizatör	APV 2000, APV Homogenizer, Almanya

3.2. Yöntemler ve Deneyler

3.2.1. Simvastatinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Simvastatinin, kaynaklarda yer alan fizikokimyasal özelliklere sahip olduğunu kanıtlamak amacıyla FT-IR, UV spektrumu ve erime derecesi tayini analizleri yapılmıştır.

FT-IR Spektrumu

Katı özellikteki simvastatinin FT-IR spektrumu, Perkin Elmer FT-IR cihazında *Attenuated Total Reflectance* (ATR) aparatı kullanılarak alınmış ve dalga sayısı (cm^{-1}) cinsinden değerlendirilmiştir.

UV Spektrumu

Simvastatin UV spektrumu, 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki simvastatinin asetonitrildeki çözeltisi kullanılarak, kuvars spektrofotometre küvetleri içerisinde 200 – 400 nm dalga boyları arasında çekilmiştir. Elde edilen spektrumdan, simvastatinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları (λ_{maks}) saptanmıştır.

Erime Derecesi Tayini

Kılcal tüpler içerisine yaklaşık 1cm yüksekliğinde doldurulan toz haldeki simvastatinin erime noktası, Thomas Hoover kılcal erime derecesi tayin cihazı kullanılarak saptanmıştır. Simvastatinin beklenen erime derecesinin 10°C altına kadar cihazın ısınması beklenildikten sonra, içinde simvastatin bulunan kılcal tüpler cihaza yerleştirilmiştir. Cihazın standart ısıtma hızına göre sıcaklık yükseltilecek, simvastatinin erimeye başladığı sıcaklık ile erimenin tamamlandığı sıcaklık aralığı kaydedilmiştir. Erime derecesi tayini, altı kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Simvastatinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Simvastatinin kantitatif analizi ve analitik yöntem validasyonu çalışmaları amacıyla UV dedektörlü Agilent 1200 Series HPLC cihazı kullanılmıştır. Simvastatinin miktar tayininin gerçekleştirilmesi için Eroğlu ve ark. (202) tarafından atorvastatin için geliştirilmiş olan HPLC miktar tayini yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Tablo 3.1.'de simvastatinin HPLC miktar tayini için kullanılacak yönteme ait bilgiler verilmiştir.

Tablo 3.1. Simvastatinin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

Alet	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (Agilent 1200 Series)
Yöntem	Ters Faz Kromatografi / İzokratik Elüsyon
Kolon	C ₁₈ , 150x4,6 mm; 5 µm (Hypersil)
Mobil Faz	Asetonitril : Metanol : 50mM NaH ₂ PO ₄ (pH 4,5) (6:1:3)
Akış Hızı	1 mL/dk.
Dedektör	UV
Dalga Boyu	238 nm
Sıcaklık	45°C
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Retensiyon zamanı	6 dk.

Kalibrasyon Doğrusu

Simvastatinin kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi amacıyla, simvastatinin metanol içinde 100 µg/mL konsantrasyonda ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözelti kullanılarak 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL ve 16 µg/mL konsantrasyonda simvastatin içerecek şekilde mobil faz ile seyreltme yapılmış ve 6 farklı seri oluşturulmuştur. Çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi elde edilmiştir.

Analitik Yöntem Validasyonu

Simvastatinin in vitro miktar tayini için yukarıda bahsedilen HPLC yöntemi kullanılmadan önce validasyon çalışmaları gerçekleştirilerek yöntemin güvenilirliği gösterilmiştir.

Analitik yöntem validasyonu, analiz maddesinin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirtilen koşullarda doğru, özgül, duyarlı ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. HPLC analitik yönteminin değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

- Doğrusallık (*Linearity*)
- Doğruluk (*Accuracy*)
- Kesinlik (*Precision*)
- Duyarlılık (*Sensitivity*)
- Özgünlük (*Specificity*)
- Stabilite (*Stability*)

Doğrusallık (*Linearity*)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının doğrudan orantılı olmasını sağlama özelliğidir. Analitik yöntemin çalışılan aralık boyunca doğrusal bir ilişkisi olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi elde

edilmiştir. Yöntemin doğrusallığı, verilen aralıkta, değişik konsantrasyonlarda simvastatin içeren örneklerin elde edilen pik alanları ile konsantrasyonun doğru orantılı olması ile değerlendirilmiştir.

Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade etmektedir. Simvastatinin miktar tayini validasyonu için doğruluk parametresi, gün içi ve günler arası olarak çalışılmıştır. Kullanılan yöntemin doğruluğunun değerlendirilmesi için metanolde hazırlanan stok çözeltiden (100 µg/mL) hareketle düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyonda (0,5 µg/mL, 2 µg/mL ve 16 µg/mL) simvastatin standart çözeltileri mobil faz ile 6 seri hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümler gerçekleştirilmiştir. Günler arası doğruluk analizi için tüm bu işlemler birbirini izleyen 3 gün boyunca tekrarlanmıştır. Örneklerin analizi sonucu bulunan değerler kalibrasyon doğrusunda yerine konarak Ortalama (\bar{X}), Standart Hata (SH), Varyasyon Katsayısı (VK) (%), % Bağlı Hata ve % Geri Kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçların gerçek değerlere yakınlıklarının değerlendirilmesi için aşağıda verilen % Bağlı Hata ve % Geri Kazanım formülleri kullanılmıştır (Formül 3.1. ve 3.2.). Her üç konsantrasyon için de, %Bağlı Hata'nın %1,5'ten küçük olması, VK değerinin %2'den küçük olması ve %Geri Kazanım değerinin %98-%102 arasında olması önerilmektedir.

$$\% \text{Bağlı Hata} = \frac{[(\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon} - \text{İlave edilen konsantrasyon}) / (\text{İlave edilen konsantrasyon})] \times 100}{\quad} \quad (3.1.)$$

$$\% \text{Geri Kazanım} = \frac{(\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon} / \text{İlave edilen konsantrasyon}) \times 100}{\quad} \quad (3.2.)$$

Kesinlik (Precision)

Kesinlik, bir analitik yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesi olarak tanımlanmaktadır. Kesinlik parametresi sonuçları yöntemin tekrarlanabilirliğini ifade etmektedir. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda

numune ardı ardına ölçülerek, örnekler için VK hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrar edilebilirlik (*repeatability*) ve tekrar elde edilebilirlik (*reproducibility*) olarak ifade edilir.

- Tekrar Edilebilirlik (*repeatability*)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır. Tekrar edilebilirliğin tespiti için, metanolde hazırlanan stok çözeltilerden hareketle (100 µg/mL) kalibrasyon eğrisinde yer alan düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyonda (0,5 µg/mL, 2 µg/mL ve 16 µg/mL) mobil fazla seyreltmeler yapılarak standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile arka arkaya altı kez analiz edilip, hesaplanmıştır. Günler arası doğruluk analizi için tüm bu işlemler birbirini izleyen 3 gün boyunca tekrarlanmıştır. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için \bar{X} , SH ve VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın %2'den küçük olması önerilmektedir.

- Tekrar Elde Edilebilirlik (*Reproducibility*)

Tekrar elde edilebilirlik parametresinde, belirlenen konsantrasyondaki çözeltilerden hareketle, belirli koşullarda gerçekleştirilen aynı ve farklı günlerdeki ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyonda (0,5 µg/mL, 2 µg/mL ve 16 µg/mL) mobil fazla seyreltmeler yapılarak hazırlanan 6 farklı örnek aynı gün ve farklı günlerde tayin edilmiştir. Örnekler, gün içi tekrar elde edilebilirlik tayini için aynı gün içinde arka arkaya, günler arası tekrar elde edilebilirlik tayini için ise birbirini takip eden üç gün analiz edilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için \bar{X} , SH ve VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında VK %2'den küçük olmalıdır.

Duyarlılık (*Sensitivity*)

Analiz yönteminin duyarlılığının incelenmesi amacıyla, saptanabilirlik sınırı (*Limit of Detection*, LOD) ve tayin edilebilirlik sınırı (*Limit of Quantification*, LOQ) belirlenmiştir. LOD, analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. LOQ ise analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir. Saptanabilirlik ve tayin edilebilirlik sınırının hesaplanması için kalibrasyon doğrusunun eğiminden ve y-kesişim değerlerine ait standart sapma değerlerinden (σ) yararlanılarak Formül 3.3. ve 3.4.'de verilen denklemler kullanılmıştır.

$$\text{Saptanabilirlik Sınırı (LOD)} = 3,3 \times (\sigma/\text{Kalibrasyon doğrusunun eğimi}) \quad (3.3.)$$

$$\text{Tayin Edilebilirlik Sınırı (LOQ)} = 10 \times (\sigma/\text{Kalibrasyon doğrusunun eğimi}) \quad (3.4.)$$

Özgünlük (*Specificity*)

Özgünlük, bir analitik yöntemin, ortamda bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir. Özgünlüğün değerlendirilmesi için etkin madde dışındaki diğer formülasyon bileşenleri ve analizde kullanılan ortamların bulunduğu örnekler hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC ile analiz edilerek, elde edilen kromotogramların etkin madde ile aynı koşullarda pik verip vermedikleri incelenmiştir.

Stabilite (*Stability*)

Simvastatinin analiz boyunca stabilitesini göstermek amacıyla 0,5 µg/mL, 2 µg/mL ve 16 µg/mL konsantrasyonlarında 3 farklı standart çözeltisi hazırlanmıştır. Örnekler hazırlamadan hemen sonra ve ardından 37°C'de 72 saat boyunca bekletilerek her 24 saatte bir analiz edilmiştir. Sonuçlar arasındaki fark; SH ve VK incelenerek değerlendirilmiştir.

3.2.3. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin (NLT) Ön Formülasyon Çalışmaları

NLT formülasyonlarında, lipit nanopartikül yapısı katı ve sıvı lipit karışımından oluşmakta ve bu yapı yüzey etkin madde veya yüzey etkin madde karışımları ile stabilize edilerek su içerisinde dağıtılmaktadır. Seçilen etkin maddenin nanopartikül yapısını oluşturan lipitler içerisindeki çözünürlüğü ne kadar yüksekse elde edilen NLT formülasyonuna etkin madde hapsedilme etkinliğide o kadar yüksek olmaktadır. Bu sebeple NLT formülasyonunda kullanılacak lipitlerin seçimi oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında, NLT formülasyonlarının hazırlanması aşamasından önce, simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonları için en uygun lipit bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla katı ve sıvı lipitlerde, lipit taraması (*lipid screening*) çalışmaları yapılmıştır.

Katı Lipit Taraması

Katı lipit taraması deneyleri için seçilen katı lipitler içerisinde simvastatinin %5, %10 ve %20'lik (a/a) çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerdeki, simvastatin çözünürlüğü gözlemsel olarak ve polarize ışık mikroskopunda incelenmiş ve en yüksek çözünürlük sağlayan lipitler belirlenmiştir.

Katı lipit taraması amacıyla, Precirol ATO 5 (Erime Derecesi (ED): 53-57°C), Compritol 888 ATO (ED: 69-74°C), Apifil (ED: 60-65°C), Gelot 64 (ED: 59-65°C) ve Geleol (ED: 55-59°C), lipitleri seçilmiştir. Katı lipitler 80°C'deki su banyosunda, tamamen eriyene kadar bekletilmiştir. Erimenin gerçekleşmesinin ardından %5, %10 ve %20 (a/a) simvastatin içerecek miktardaki simvastatin sıvı haldeki lipitler üzerine eklenerek 80°C'de su banyosunda aynı hızda karıştırılmıştır. Simvastatinin eklenmesinden itibaren tamamen çözününceye kadar geçen süre kaydedilmiş ve çözünürlük gözlemsel olarak incelenmiştir. Gözlemsel değerlendirmenin ardından simvastatin kristallerinin varlığını incelemek amacıyla çözeltiler ısıtıcı tablalı polarize ışık mikroskobu altında 60°C'de incelenmiştir.

Sıvı Lipit Taraması

Katı lipitler ile yapılan lipit tarama deneylerinin ardından simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonu için uygun sıvı lipitin belirlenmesi amacıyla oleik asit, Labrafac Lipophile, Labrafil M 1944 CS, Maisine ve Peceol sıvı lipitleri kullanılarak sıvı lipit taraması yapılmıştır.

Sıvı lipit taraması için seçilen lipitlerin %2, %5, %10 ve %20 (a/a) simvastatin konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanarak 25°C’de ve 80°C’deki su banyosunda aynı hızda karıştırma uygulanmış ve çözünürlükleri gözlemsel olarak incelenmiştir.

3.2.4. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Çalışmaları

Simvastatinin, sıvı ve katı lipitlerdeki çözünürlüğünün değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen lipit taraması deneylerinde uygun çözünürlük gözlenen sıvı ve katı lipitlerin seçilmesinin ardından çeşitli optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda ulaşılan optimum formülasyon Tablo 3.2.’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum NLT formülasyonu bileşimi.

Formülasyon Bileşimi	Konsantrasyon (%) (a/a)
Total lipit (Katı lipit+ Sıvı lipit)	2
• Precirol ATO 5	1/0,6
• Maisine/Oleik asit	1/1,4
Yüzey Etkin Madde	3
• Tween 80	2,5
• Lipoid S100	0,5
Distile su	km 100

Bu bulgulardan yola çıkılarak; farklı lipitler, sıvı:katı lipit oranları ve etkin madde konsantrasyonları kullanılarak detaylı formülasyon ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Simvastatinin yüksek çözünürlük gösterdiği Precirol ATO 5 ve Gelot 64 katı lipitleri seçilerek gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda en uygun partikül büyüklüğü ve dağılımı Precirol ATO 5 kullanılan formülasyonlarda elde edilmiştir. Bununla birlikte %20 (a/a) simvastatin çözünürlüğü katı lipitler arasında sadece Precirol ATO 5’de gözlemlendiğinden NLT formülasyonlarında katı lipit olarak Precirol ATO 5’in kullanılması kararlaştırılmıştır. Sıvı lipit seçiminde ise lipit taraması deneyleri sonucunda simvastatinin yüksek çözünürlük gösterdiği Maisine ile düşük çözünürlük gösterdiği oleik asit sıvı lipitlerinin seçilmesine karar verilmiştir. Böylelikle simvastatinin yüksek çözünürlük ile daha fazla ilgi gösterdiği ve daha düşük çözünürlükle daha az ilgi duyduğu iki farklı lipit matriks yapısı oluşturulmuştur. Formülasyonlarda kullanılan lipitler ve yüzey etkin maddelere ilişkin bilgiler Tablo 3.3.’de özetlenmiştir.

Tablo 3.3. NLT sistemlerinin formülasyon çalışmalarında kullanılan sıvı/katı lipit ve yüzey etkin maddelere ait özellikler.

Ticari İsim	Kimyasal İsim	Erime Derecesi (°C)	Hidrofilik Lipofilik Denge (HLB)
Katı Lipit			
Precirol ATO 5	Glyceryl Palmitostearate	53-57	2
Sıvı Lipitler			
Oleik asit	cis-9-Octadecenoic acid, Elainic acid	-	1
Maisine	Glycerol Monolinoleate EP / Glyceryl Monolinoleate NF	-	1
Yüzey Etkin Maddeler			
Tween 80	Polyoxyethylenesorbitan monooleate, Polysorbate 80	-	15
Lipoid S100	Hydrogenated Phosphatidylcholine	-	3

Farklı sıvı lipitlerin ve sıvı lipit oranlarının formülasyonlar üzerine etkisini incelemek amacıyla da, Maisine:Precirol ATO 5 ve Oleik asit:Precirol ATO 5 lipit kombinasyonlarının 50:50 ve 70:30 sıvı:katı lipit oranları çalışılmıştır. Elde edilen bu formülasyonlar, total lipit miktarının %10’u ve %20’si (a/a) kadar simvastatin ile yüklenerek ve boş formülasyon şeklinde hazırlanmıştır (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. Farklı lipitler, sıvı:katı lipit oranları ve etkin madde konsantrasyonları doğrultusunda oluşturulan NLT formülasyonları.

Formülasyon Kodu	Lipit Matriks	Sıvı:Katı Lipit Oranı	Total Lipit Miktarındaki Simvastatin Yüzdesi % (a/a)
Fm-50-BOŞ	Maisine:Precirol ATO 5	50:50	-
Fm-70-BOŞ	Maisine:Precirol ATO 5	70:30	-
Fo-50-BOŞ	Oleik asit:Precirol ATO 5	50:50	-
Fo-70-BOŞ	Oleik asit:Precirol ATO 5	70:30	-
Fm-50-10	Maisine:Precirol ATO 5	50:50	% 10
Fm-70-10	Maisine:Precirol ATO 5	70:30	% 10
Fm-50-20	Maisine:Precirol ATO 5	50:50	%20
Fm-70-20	Maisine:Precirol ATO 5	70:30	%20
Fo-50-10	Oleik asit:Precirol ATO 5	50:50	% 10
Fo-70-10	Oleik asit:Precirol ATO 5	70:30	% 10
Fo-50-20	Oleik asit:Precirol ATO 5	50:50	%20
Fo-70-20	Oleik asit:Precirol ATO 5	70:30	%20

*m: Maisine, o: Oleik asit.

Hazırlanan NLT formülasyonları çalışmanın ilerleyen basamaklarında ultrafiltrasyona uğratarak formülasyonun su fazı uzaklaştırılıp konsantre edilecektir. Elde edilen su fazı, yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği analizinde, konsantre edilmiş NLT formülasyonları ise daha yüksek simvastatin ve nanopartikül içeren doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılacaktır. Bu nedenle ultrafiltrasyonun NLT formülasyonlarının karakterizasyonlarında önemli bir değişikliğe yol açıp açmadığının gösterilmesi gerekmektedir. Ultrafiltrasyon işleminin etkisi incelemek amacıyla, Maisine sıvı lipiti kullanılarak 50:50 sıvı:katı lipit oranlarında hazırlanan NLT formülasyonları ultrafiltrasyonla 2 ve 5 kat konsantre edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan formülasyonlar Tablo 3.5.'de gösterildiği gibi adlandırılmıştır.

Tablo 3.5. Ultrafiltrasyon uygulanmış, Maisine sıvı lipiti kullanılarak 50:50 sıvı:kati lipit oranlarında hazırlanan NLT formülasyonları.

Formülasyon Kodu	Total Lipit Miktarındaki Simvastatin Yüzdesi % (a/a)	Ultrafiltrasyon ile Konsantrasyon Sayısı
Fm-50-BOŞ	-	-
Fm-50-BOŞ-UF(2KAT)	-	2
Fm-50-BOŞ-UF(5KAT)	-	5
Fm-50-10	%10	-
Fm-50-10-UF(2KAT)	%10	2
Fm-50-10-UF(5KAT)	%10	5
Fm-50-20	%20	-
Fm-50-20-UF(2KAT)	%20	2
Fm-50-20-UF(5KAT)	%20	5

* m: Maisine, UF: ultrafiltrasyon, UF(2KAT): 2 kat ultrafiltrasyon, UF(5KAT): 5 kat ultrafiltrasyon.

3.2.5. NLT Formülasyonlarının Hazırlanması

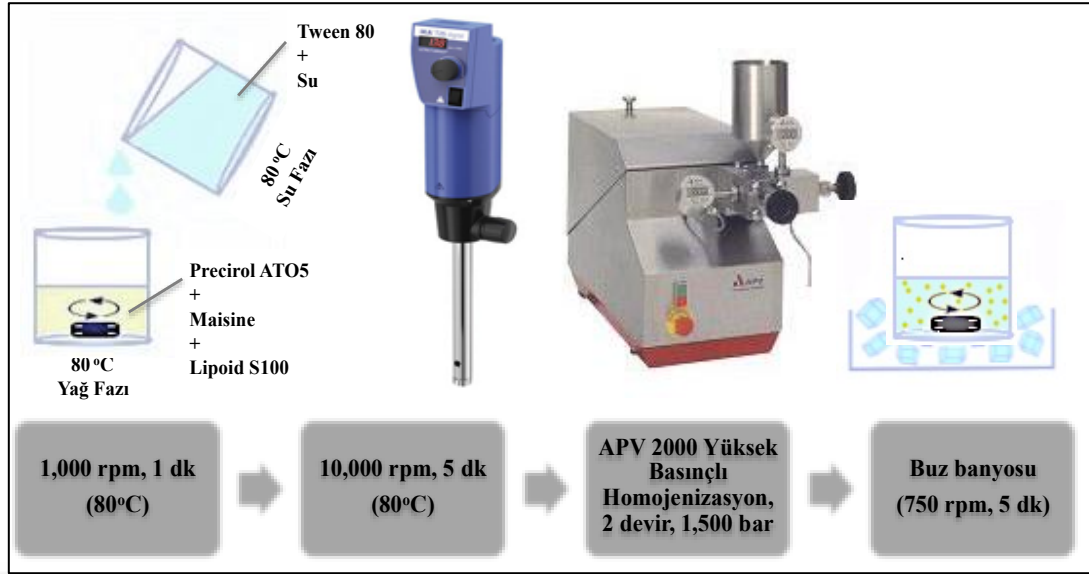
NLT formülasyonları, Vitorino ve ark. (203) tarafından kullanılan yöntemin modifiye edilerek geliştirildiği yeni bir yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Katı lipit (Precirol ATO 5), sıvı lipit (Maisine veya oleik asit) ve Lipoid S100 yağ fazını oluşturmakta iken Tween 80 nin sudaki çözeltisi su fazını oluşturmaktadır. Tüm formülasyon bileşenlerinin oranları Tablo 3.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Farklı lipitler, sıvı:katı lipit oranları ve etkin madde konsantrasyonları ile NLT formülasyonlarının bileşimleri (% a/a).

Formülasyon Kodu	SV (%)	Katı Lipit (%)	Sıvı Lipit (%)	Tween 80 (%)	Lipoid S100 (%)	Su k.m
Fm-50-BOŞ	-	1,000	1,000	2,500	0,500	100
Fm-70-BOŞ	-	0,600	1,400	2,500	0,500	100
Fo-50-BOŞ	-	1,000	1,000	2,500	0,500	100
Fo-70-BOŞ	-	0,600	1,400	2,500	0,500	100
Fm-50-10	0,20	0,998	0,998	2,495	0,499	100
Fm-70-10	0,20	0,599	1,397	2,495	0,499	100
Fm-50-20	0,40	0,996	0,996	2,490	0,498	100
Fm-70-20	0,40	0,598	1,394	2,490	0,498	100
Fo-50-10	0,20	0,998	0,998	2,495	0,499	100
Fo-70-10	0,20	0,599	1,397	2,495	0,499	100
Fo-50-20	0,40	0,996	0,996	2,490	0,498	100
Fo-70-20	0,40	0,598	1,394	2,490	0,498	100

* m: Maisine, o: Oleik asit.

Yağ ve su fazı su banyosunda manyetik bir karıştırıcı üzerinde 80°C'ye kadar ısıtılarak karıştırılmıştır. İki faz aynı sıcaklığa geldiğinde, 80°C'de su banyosu içerisinde su fazı yağ fazının üzerine yavaş bir şekilde ilave edilmiş ve 1,000 rpm'de manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya devam edilmiştir. Elde edilen NLT dispersiyonu, yüksek hızlı karıştırıcı (Ultraturrax T25 Basic) kullanılarak 80°C'de 10,000 rpm'de 5 dk, karıştırılmıştır. Daha sonra NLT dispersiyonu hızla, daha önceden içerisinde kaynar su geçirilerek ısıtılmış homojenizatörün (APV 2000) haznesine dökülüp 1,500 bar basınç altında iki kez devir edilerek homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon sonucu elde edilen NLT formülasyonu hemen manyetik karıştırıcı üzerindeki buz banyosuna alınmış ve 5 dk. boyunca 750 rpm'de karıştırılarak soğutulması sağlanmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile NLT formülasyonlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.

Hazırlanan NLT formülasyonlarından Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonları Tablo 3.5.'de verilen ultrafiltrasyonla 2 ve 5 kat konsantre edilmiş karşılıklarının elde edilmesi amacıyla hazırlanmalarının hemen ardından ağırlıkları kaydedilerek peristaltik pompa ve ultrafiltreden oluşan ultrafiltrasyon sisteminde ultrafiltre edilmişlerdir. Bilinen ağırlıktaki formülasyonlar ultrafiltrasyon filtresine (Vivaflow 50, Sartorius, MWCO 100 kDa), peristaltik ultrafiltrasyon pompası (Masterflex L/S Series) yardımıyla bağlanarak hedeflenen ağırlığa ulaşılan kadar ultrafiltre edilmiştir. Ultrafiltrasyon sonucu filtre edilen dispersiyon fazı filtrat çıkışında toplanırken, filtreden geçemeyen nanopartikül dispersiyonu ise formülasyon kabında toplanarak konsantre edilmiş NLT formülasyonları elde edilmiştir.

3.2.6. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

NLT formülasyonları partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri, etkin madde yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği çalışmaları, DSC ve FT-IR analizleri, morfolojik incelemeler, viskozite tayini, in vitro salım çalışmaları ve stabilite çalışmaları ile karakterize edilmiştir.

Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi Ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri foton korelasyon spektroskopisi ve lazer doppler anemometri esasına göre çalışan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazında (Zetasizer Nanoseries-ZS) yapılmıştır. Ölçümler Tablo 3.4.'de bahsedilen NLT formülasyonların yanı sıra ultrafiltrasyon işleminin formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel sonuçları üzerindeki etkisini göstermek amacıyla Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Her formülasyon için altı ölçüm yapılarak, ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 173° olacak şekilde ayarlanmıştır.

Etkin Madde Yükleme Kapasitesi ve Hapsedilme Etkinliği Çalışmaları

Simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonları Bölüm 3.2.5.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile hazırlama aşamasında NLT formülasyonundan madde kayıpları olması nedeniyle homojenizasyon sonucu elde edilen formülasyonun ağırlık ölçümleri yapılarak kaydedilmiş ve bu değerler yardımıyla formülasyondaki total simvastatin miktarı ve total lipit miktarı belirlenmiştir. Ardından NLT formülasyonları, peristaltik ultrafiltrasyon pompası ve ultrafiltrasyon filtresi (MWCO 100 kDa) kullanılarak ultrafiltre edilmiştir. Ultrafiltrasyon sonucu elde edilen filtrat formülasyonun dispersiyon fazını oluşturmakta olup serbest simvastatin içermektedir. Serbest simvastatin miktarının belirlenmesi amacıyla filtrattan HPLC miktar tayini analizi yapılarak simvastatin miktarı belirlenmiştir. Tüm bu analizler sonucu elde edilen total simvastatin miktarı, total lipit miktarı ve serbest simvastatin miktarı kullanılarak aşağıda formüllerle gösterilen %etkin madde yükleme kapasitesi (%YK) ve %hapsedilme etkinliği (%HE) değerleri hesaplanmıştır (Formül 3.5. ve 3.6.). Ölçümler altı kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir.

$$\%YK = [(Total\ SV\ Miktarı - Serbest\ SV\ Miktarı) / (Total\ SV\ Miktarı)] \times 100 \quad (3.5.)$$

$$\%HE = [(Total\ SV\ Miktarı - Serbest\ SV\ Miktarı) / (Total\ Lipit\ Miktarı)] \times 100 \quad (3.6.)$$

DSC Analizi

NLT formülasyonlarının polimorfik ve termal özellikleri gözlemek ve etkin maddenin lipit içerisindeki durumunu ve lipitlerin yapısal organizasyonunu analiz etmek amacıyla DSC çalışmaları yapılmıştır. Analizler Bölüm 3.2.4'de bahsedilen NLT formülasyonları ve formülasyonların yapısına giren saf maddeler; simvastatin, Precirol ATO 5, Maisine, oleik asit, Tween 80, Lipoid S100 üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte Fm-50-20 formülasyonuna ait lipit matriksin fiziksel karışım ve eriyik haldeki karışımı da hazırlanarak DSC çalışmaları yapılmıştır.

NLT formülasyonlarının yüksek oranda su içermesi sıvı halde DSC analizinin gerçekleştirilmesini engellediğinden tüm formülasyonlar analiz öncesinde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon lipit karışımların fiziksel durumunu koruduğundan lipit nanopartiküllerin DSC analizlerinde tercih edilmektedir (204). Liyofilizasyon işlemi için NLT formülasyonları ultrafiltrasyona uğratarak sulu fazın büyük bir kısmı uzaklaştırılmış, formülasyonlar 10 mL'ye kadar konsantre edilmiştir. Konsantre NLT formülasyonları da -20°C'de bir gece boyunca dondurma işleminin uygulanmasının ardından 24 saat boyunca liyofilizatörde (Heto PowerDry PL 3000), dondurarak kurutulmuş ve DSC analizi için uygun hale getirilmiştir.

Simvastatinin lipit matriks içerisinde çözünerek moleküler olarak disperse halde bulunup bulunmadığını, etkin madde-lipit etkileşimi ve etkin maddenin lipit matriks içerisindeki polimorfizm ve kristalizasyon derecesini daha net bir şekilde gözlemek amacıyla NLT formülasyonlarının yanında fiziksel karışım ve eriyik halde bulunan matriks karışımlarının da DSC çalışmaları yapılmıştır. Bölüm 3.2.4.'de bahsedilen Fm-50-20 formülasyonu örnek alınarak Precirol ATO 5 ve Maisine lipitlerinden hareketle 50:50 sıvı:katı lipit oranında ve %20 SV içeren lipit matriks karışımları fiziksel ve eriyik olarak iki farklı şekilde hazırlanmıştır. Lipit matriksin fiziksel karışımı Precirol ATO 5, Maisine ve simvastatinin belirlenen oranlarda yalnız fiziksel olarak karıştırılması ile hazırlanmıştır. Eriyik karışımlar ise hazırlanan fiziksel karışımın 60°C'ye kadar ısıtılarak simvastatinin çözündürülmesi ile analizden bir gece önce hazırlanmıştır (72).

DSC analizleri, 10°C/dk. ısıtma hızında, 20 – 200°C aralığında diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC Q100) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler 5 mg tartılarak çalışılmış, katı haldeki örnekler için alüminyum kaplar, sıvı haldeki örnekler için ise alüminyum hermetik kaplar kullanılmıştır. Kaplar içerisinde tartım yapılmasının ardından kapaklar preslenerek kapatılmıştır. Referans olarak boş alüminyum ve alüminyum hermetik kaplar kullanılmıştır. Sıcaklıktaki artışa bağlı olarak örneklerde meydana gelen ısı değişimi ölçülmüştür.

FT-IR Analizi

Bölüm 3.2.4.'de bahsedilen NLT formülasyonlarının yapısına katılan; simvastatin, Precirol ATO 5, Lipoid S100 ve sıvı özellikteki Maisine, oleik asit, Tween 80 formülasyon bileşenlerinin ve DSC analizinde anlatıldığı gibi liyofilize edilen NLT formülasyonlarının FT-IR spektrumu, Perkin Elmer FT-IR cihazında *Attenuated Total Reflectance* (ATR) aparatı kullanılarak alınmış ve dalga sayısı (cm^{-1}) cinsinden değerlendirilmiştir.

Morfolojik İncelemeler

NLT formülasyonlarının şekil ve yapı özelliklerinin incelenmesi amacıyla Bölüm 3.2.4'de bahsedilen NLT formülasyonları TEM ile görüntülenmiştir. 10 μL NLT dispersiyonu, 400 mesh karbon film kaplı bakır ızgara üzerine damlatılarak, 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Izgaralar daha sonra geçirimli elektron mikroskopunda (FEI Tecnai G2 Series), 80 kV'de görüntülenmiştir.

Viskozite Tayini

NLT formülasyonlarının reolojik özelliklerinin incelenmesi ve formülasyonun ultrafiltrasyonla iki ve beş kat konsantre edilmesi ile etkin madde yüklenmesinin reolojik özellikler üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi hazırlanan Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-10, Fm-50-10-UF(2KAT), Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20, Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları, koni/plak viskometresi (Brookfield DV2T RV) ile CPE-40 nolu koni kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm ölçümler oda sıcaklığında 25°C'de, 0,5 mL örnek hacmi ile üç kez

tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir. 1500 sn^{-1} kayma hızında elde edilen viskozite ölçümleri, karşılaştırma amacıyla, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

İn Vitro Salım Çalışmaları

NLT formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları amacıyla öncelikle etkin maddenin in vitro salım ortamındaki çözünürlüğü ve stabilitesi incelenmiş ardından in vitro salım çalışmalarına geçilmiştir.

- **Simvastatinin İn Vitro Salım Ortamlarındaki Çözünürlüğünün Tayini**

Literatürde yer alan Simvastatin lipit nanopartikülleri ile gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarında, salım ortamı olarak sıklıkla pH 7,4 izotonik fosfat tamponu (*Phosphate-buffered saline*, PBS) veya çözünürlüğü artırmak amacıyla bu tampona %0,5 (a/h) Sodyum Dodesil Sülfatın (SDS) ilave edildiği salım ortamları kullanılmıştır (56, 78, 205). Bu nedenle in vitro salım çalışmaları öncesinde, sink koşulun sağlandığı salım ortamının belirlenmesi amacıyla simvastatinin bu salım ortamlarındaki çözünürlüğü incelenmiştir. PBS çözeltisi (pH 7,4), literatürle uyumlu olarak, 137 mmol/L NaCL, 2,7 mmol/L KCL, 10 mmol/L Na_2HPO_4 ve 2 mmol/L KH_2PO_4 tuzları kullanılarak hazırlanmış ve HCL çözeltisi ile pH ayarı yapılmıştır (206).

Çözünürlüğün değerlendirilmesi amacıyla, 15 mL hacimdeki deney tüplerine aşırı miktarda simvastatin tartılmış ve üzerine 10 mL pH 7,4 PBS tamponu veya %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu ilave edilerek tüplerin ağzı sıkıca kapatılmıştır. Tüplerin dışı alüminyum folyo ile sarılarak, yatay çalkalayıcı su banyosunda (WNE14, Memmert) $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'de, 120 spm (*stroke per minute*) hızda belirlenen zaman noktalarına (1, 3, 5 ve 8 saat) kadar çalkalanmıştır. Her zaman noktası için üç örnek hazırlanmış ve analiz sonunda örnekler $0,45 \mu\text{m}$ 'lik selüloz şırınga filtrelerinden (Sartorius) süzüldükten sonra HPLC ile miktar tayini gerçekleştirilerek simvastatinin çözünürlüğü belirlenmiştir.

- **İn Vitro Salım Süresince Simvastatinin Stabilitesinin İncelenmesi**

İn vitro salım süresince simvastatinin stabil olup olmadığı, %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponunda, 1,6 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan altı farklı simvastatin çözeltisi ile incelenmiştir. Çözeltiler, 2 mL'lik ependorf tüpler içerisinde, ışık almayacak şekilde $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'deki yatay çalkalayıcılı su banyosunda, 120 spm'de çalkalanmıştır. 0, 24, 48 ve 72. saatler sonunda alınan örneklerden HPLC ile miktar tayini yapılmıştır.

- **Salım Çalışmaları**

Simvastatinin in vitro salım çalışmaları, formülasyonların salım profilleri hakkında ön bir bilgiye sahip olmak ve etkin madde konsantrasyonunun salım profiline olan etkisini incelemek amacıyla Bölüm 3.2.4.'de bahsedilen NLT formülasyonlarından Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir.

Literatürde yer alan simvastatin ile yüklenmiş lipit nanopartikül formülasyonları ile gerçekleştirilen in vitro salım deneylerinde diyaliz torbası, Franz difüzyon hücresi veya herhangi bir diyaliz membran kullanılmadan nanopartikül dispersiyonundan salımın incelendiği yöntemlerin kullanıldığı görülmüştür (56, 72, 78, 203, 207). Bu tez çalışmasının in vivo deneylerinde simvastatin NLT partikülleri üç boyutlu bir doku iskelesi formülasyonu içerisinde tam kalınlıktaki yara bölgelerine uygulanacaktır. Lipit nanopartiküller üç boyutlu doku iskelesinin tüm yüzeylerinden salınacağından, genellikle topikal uygulama yolunu taklit etmek amacıyla kullanılan ve salımın tek bir yüzeyden gerçekleştirildiği Franz difüzyon hücreleri yerine herhangi bir diyaliz membran kullanılmadan gerçekleştirilen, salım ortamının her zaman noktasında analiz için toplanarak, taze ortamla değiştirildiği yöntemin, in vivo koşulları daha iyi yansıtması nedeniyle kullanılmasına karar verilmiştir (72, 123). Ayrıca bu yöntemde salım ortamının taze ortamla değiştirilmesi, simvastatinin 48 saatten daha uzun süre salım ortamında kalmasını engelleyerek stabilite sorunu olmadan salım çalışmasının 48 saatten daha fazla sürdürülebilmesini sağlamaktadır.

Simvastatinin salım ortamındaki çözünürlük tayini çalışmasında sink koşulu sağladığı gösterilen %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu, salım çalışmalarının tümünde difüzyon ortamı olarak kullanılmıştır. Salım deneyleri öncesinde ortamdaki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla salım ortamı 30 dk. boyunca ultrasonik banyoda (Branson) degaze edilmiştir. Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonları Bölüm 3.2.5.'de anlatıldığı gibi hazırlanmasının ardından ultrafiltrasyon işlemi uygulanarak konsantre edilmişlerdir. Ultrafiltrasyon öncesinde Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarında simvastatin konsantrasyonu sırasıyla %0,2 ve %0,4 (a/a) iken, ultrafiltrasyon sonucunda ise Fm-50-10-UF(5KAT) için %1 (a/a), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) için ise sırasıyla %0,8 ve %2 (a/a)'dir.

Diyaliz membran kullanılmadan, nanopartiküllerin salım ortamında disperse edildiği salım çalışmalarında, ultrafiltre edilmiş NLT formülasyonlarından 0,1 mL alınarak 37°C'deki 1,9 mL %0,5 SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu bulunan 2 mL'lik plastik tüplere (Isolab) eklenmiştir. Salım başlamadan önce tüpler iki kez alt üst edilerek çalkalanmış ve nanopartiküller homojen olarak dağıtılmıştır. Her formülasyon için altı farklı tüp hazırlanmasından sonra, tüpler 37±0,5°C sıcaklığa ayarlanmış yatay çalkalayıcılı su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve salım süresince 120 spm hızda yatay çalkalanmıştır. Örnek alma saatleri olarak 1, 6, 12, 24, 48, 96 ve 144. saatler belirlenmiştir. Örnek alma saatlerinde tüpler su banyosundan çıkartılarak 13.500 rpm'de 1 saat boyunca 4°C'de ultra santrifüj cihazında (Hermle Z323K) santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda, lipit nanopartiküller tamamen çökmekte ve üst kısımda berrak bir süpernatant oluşturmaktadır. Süpernatantlar enjektör yardımıyla tamamen alınarak, 0,45 µm'lik selüloz şırınga filtrelerinden süzülmuş ve HPLC ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Toplanan süpernatantlar yerine tüplere 37±0,5°C'de, 2 mL taze salım ortamı eklenmiş ve çöken nanopartiküller tekrar disperse edilerek salıma devam edilmiştir.

Stabilite Çalışmaları

NLT formülasyonlarının stabilite çalışmaları, optimum formülasyonlar olarak seçilen Bölüm 3.2.4.'de bahsedildiği gibi 50:50 sıvı:kati lipit oranı ve Maisine ile

hazırlanmış, etkin madde içermeyen ve total lipit miktarının %10 veya %20'si kadar etkin madde içeren Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonları üzerinde 4°C ve 25°C'de 90 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlar 50 mL'lik flakonlara alınarak 4°C için buzdolabında, 25°C için ise 25±2°C ve %60±5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabinlerinde bekletilmiştir. Stabilite çalışmaları için belirlenen zaman noktaları ise formülasyonların hazırlandıkları gün, 3, 7, 15, 30, 60 ve 90. günlerdir. Farklı sıcaklıklarda saklanan NLT formülasyonlarının stabilitesi belirlenen zaman noktalarında makroskobik özellikler, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, PDI, pH, viskozite ve formülasyondaki etkin madde stabilitesi açısından incelenmiştir.

- **Makroskobik İnceleme**

Hazırlanan NLT formülasyonlarının stabilite süresi boyunca fiziksel görünüşlerinde agregasyon, sedimentasyon ve renk değişimi gibi değişimlerin olup olmadığı makroskobik olarak incelenmiştir.

- **Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Ölçümleri**

Formülasyonların partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri NLT formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarında bahsedildiği gibi partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazında 25°C'de, 173° ışık saçılım açısında her formülasyon için altı ölçüm yapılarak gerçekleştirilmiştir.

- **Viskozite Ölçümü**

Formülasyonların viskoziteleri, karakterizasyon çalışmalarında gerçekleştirildiği gibi koni/plak viskometresi ile CPE-40 nolu koni kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm ölçümler oda sıcaklığında 25°C'de, 0,5 mL örnek hacmi ile üç kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir.

- **pH Tayini**

Formülasyonların pH değerleri pH metre cihazı (Sartorius) ile üç tekrarlı olarak 25°C’de ölçülmüştür.

- **Etkin Madde Stabilitesi**

Etkin madde içeren NLT formülasyonlarında etkin madde stabilitesi, formülasyona yüklenen simvastatin miktarı tayin edilerek incelenmiştir. Elde edilen simvastatin miktarları sıfırcı günde yüklenen simvastatin miktarına göre % olarak hesaplanmış ve sonuçlar % simvastatin (a/a) halinde verilmiştir.

NLT formülasyonundaki simvastatin tayini için 1 g formülasyon tartılıp, bir miktar metanolde çözündürülmesinin ardından balon jode 50 mL’ye metanolle tamamlanmıştır. Elde edilen çözeltiler ultrasonik banyoda 30 dk. boyunca sonikasyona uğratılmış ve daha sonra 0,45 µm’lik selüloz şırınga filtrelerinden süzülerek HPLC ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Ölçümler altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Doku İskelesi Formülasyon Çalışmaları

Uygun doku iskelesi materyali, üretim yöntemi, çapraz bağlayıcı ajan ve NLT formülasyonu ve konsantrasyonunun seçimi amacıyla öncelikle doku iskelsi ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır.

Ön Formülasyon Çalışmaları

- **Doku İskelesi Materyali Seçimi:**

Doğal polimerler, biyolojik olarak kabul edilebilirlikleri daha iyi olduğundan hücrelerle daha iyi etkileşmektedir, bu durumda hücreler arasındaki etkileşimi ve biyolojik sistemin performansını artırmaktadırlar. Bu nedenle doku iskelelerinin formülasyon çalışmalarında literatürde de yaygın olarak kullanılan doğal yapıdaki biyoparçalanabilir polimerlerden; kollajen, kitosan ve jelatinin kullanılması planlanmıştır (123, 125, 135, 208). Kitosanın farklı çözünürlük ve molekül

ağırlıklarına sahip iki farklı tipi ön formülasyon çalışmaları için seçilmiştir. Tablo 3.7.'de kullanılan polimerlere ait özellikler özetlenmiştir.

Tablo 3.7. Doku iskelesi ön formülasyon çalışmalarında kullanılan polimerler.

Polimer	Çözünürlüğü	Molekül Ağırlığı (kDa)	Deasetilasyon Derecesi (%)
Kitosan Klorür	Suda çözünür	150-400	>75-90
Orta Molakül Ağırlıklı Kitosan	Asitte çözünür	190-310	75-85
Dana Derisi Kollajeni, Tip III	Asitte çözünür	300	-
Sığır Derisi Jelatini, Tip B	Sıcak suda ve asitte çözünür	40-50	-

Literatürde yer alan polimer konsantrasyonları ve polimer karışım oranlarından hareketle polimerlerin %1 veya %2 (a/h) konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin veya bu çözeltilerin 1:1, 2:1, 1:9 ve 9:1 (h/h) oranlarındaki ikili polimer kombinasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Seçilen polimer veya polimer kombinasyonlarının optimum NLT formülasyonu olarak belirlenen Fm-50-20 dispersiyonu içerisinde jelleri hazırlanarak, ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (164, 209, 210). Ön formülasyon çalışmalarında seçilen polimerler %1 veya %2 (a/h) konsantrasyonları sağlayacak şekilde gerekli miktarlarda tartılarak NLT dispersiyonlarına eklenmiştir. Jel yapısı oluşması için elde edilen dispersiyonlar 200 rpm'de yaklaşık 1 saat karıştırılmış daha sonra manyetik karıştırıcı üzerinden alınarak 1 saat dinlenmeye bırakılmıştır. 1:1, 2:1, 1:9 ve 9:1 (h/h) polimer oranları için farklı polimerlerle oluşturulan jellerden gerekli hacimler alınarak karıştırılmıştır. Ardından oluşturulan jel karışımları her bir kuyucukda 0,5 mL bulunacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara eklenmiş ve liyofilize edilmiştir.

Elde edilen doku iskelelerinin mekanik ve yapısal özelliklerinin uygunluğu değerlendirildiğinde sığır derisi jelatini ve orta molakül ağırlıklı kitosan kullanılan

formülasyonlarda düzgün fiziksel yapı ve dayanıklılığın sağlanamadığı görülmüştür. En uygun yapısal özellikler ise %2 (a/h) polimer konsantrasyonunda, 1:1 ve 2:1 (h/h) oranlarında kitosan (Protasan UP CL 213) ve kollajen (Dana Derisi Kollajeni, Tip III) karışımları ile gözlendiğinden çalışmalara bu doku iskeleleri ile devam edilmesine karar verilmiştir.

- **Üretim Yöntemi Seçimi:**

Doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasında dondurarak kurutma yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için yapılan literatür taramaları sonucunda farklı dondurma ve süblimasyon süreleri denenerek optimum mekanik ve yapısal özellik sağlanan 24 saat -20°C 'de dondurma ve 24 saat liyofilizasyon süreleri ile çalışmalara devam edilmiştir (209, 211).

- **Çapraz Bağlayıcı Ajan Seçimi:**

Kitosan yara iyileşmesi sürecinde yaralı bölgede meydana gelen asidik ortamda biyolojik olarak hızla parçalanmaktadır (136). Bununla birlikte kollajenin de mekanik gücü düşük olup, yara bölgesindeki enflamatuar enzimler tarafından parçalanabildiğinden sıklıkla diğer polimerlerle kombinasyon halinde kullanılmaktadır (132). Bu nedenle literatürdeki çalışmalar incelenmiş ve kitosanın uygun bir çapraz bağlayıcı ajan yardımıyla çapraz bağlanarak doku iskelelerinin yapısal stabilitesinin artırılmasına karar verilmiştir (127, 209, 212-214). Kitosan ile iyonik bağlar kurarak çapraz bağlama işlemini gerçekleştiren sodyum tripolifosfat (TPF) molekülü diğer çapraz bağlayıcı ajanlar ile karşılaştırıldığında düşük toksisite göstermektedir. Bu nedenle literatürde yer alan doku iskelelerinin %5 (a/h) TPF çözeltisi içinde 2 saat bekletilmesi ile çapraz bağlandığı yöntemin çapraz bağlama için kullanılmasına karar verilmiştir (214).

- **Nanopartikül Formülasyonunun Seçimi ve Konsantrasyonunun Etkisi:**

NLT formülasyonları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri açısından diğer NLT formülasyonlarına göre en uygun özelliklere sahip olduğu görüldüğü için in vitro salım çalışmaları ve stabilite

çalışmaları bu formülasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda Fm-50-20 formülasyonu ve 2 veya 5 kat konsantre edilmiş karşılıkları yüksek hapsedilme etkinliği, yüksek salım hızı ile istenilen salım profiline sahip olması ve stabilite çalışmaları sonucunda çalışmanın ilerleyen basamaklarını etkileyecek bir stabilite sorunu oluşturmaması nedeniyle doku iskelesi formülasyon çalışmaları için en uygun NLT formülasyonu olarak seçilmiştir.

Doku iskelesi materyali olarak seçilen polimerler, sulu dispersiyon halinde bulunan, optimum etkin madde içeren ve içermeyen, optimum NLT formülasyonu içerisinde çözündürülerek doku iskeleleri hazırlanmaktadır. NLT formülasyonu ultrafiltrasyona uğratarak sulu faz uzaklaştırıldığında formülasyondaki nanopartikül ve dolayısıyla simvastatin konsantrasyonu artırılabilir. Nanopartikül konsantrasyonunun ve yüklenen simvastatin miktarının doku iskelesi formülasyonları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 2 veya 5 kat konsantre edilmiş Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları ile konsantre edilmemiş Fm-50-BOŞ ve Fm-50-20 formülasyonlarında seçilen polimerler ile doku iskeleleri hazırlanarak mekanik ve yapısal özellikleri incelenmiştir. Yapılan bu çalışmalarda beş kat konsantre edilen formülasyonlarla hazırlanan doku iskeleleri yüksek lipit partikül konsantrasyonu nedeniyle yapısal bütünlüğünü koruyamadığından kalıptan çıkarılamamıştır. Bu sebeple 2 kat konsantre ve konsantre edilmemiş nanopartikül dispersiyonlarında doku iskelelerinin hazırlanmasına karar verilmiştir.

3.2.8. Doku İskelesi Formülasyonları

Doku iskelesi formülasyonları, Fm-50-20 veya Fm-50-BOŞ formülasyonlarından hareketle ve bu formülasyonların ultrafiltrasyona uğratarak iki kat konsantre edilmiş Fm-50-BOŞ-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) dispersiyonları kullanılarak hazırlanmıştır. Biyoparçalanır ve biyoyumlu özellikteki kitosan (Protasan UP CL 213) ve kollajen (Dana Derisi Kollajeni, Tip III) polimerlerinin %2 (a/h) konsantrasyonda NLT formülasyonları içerisinde çözeltileri hazırlanarak 1:1 veya 2:1 (h/h) kitosan:kollajen oranlarında karıştırılmıştır. Ardından

dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskeleleri elde edilmiştir. Hazırlanan formülasyonların kodları Tablo 3.8.'de verilmiştir.

Tablo 3.8. Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının bileşimleri ve kodları.

Formülasyon Kodu	Kitosan: Kollajen Polimer Oranı (h/h)	NLT Formülasyonu	Çapraz Bağlama
UF(-)Ç(-)1:1-B	1:1	Fm-50-BOŞ	-
UF(-)Ç(+1:1-B	1:1	Fm-50-BOŞ	+
UF(-)Ç(-)2:1-B	2:1	Fm-50-BOŞ	-
UF(-)Ç(+2:1-B	2:1	Fm-50-BOŞ	+
UF(+Ç(-)1:1-B	1:1	Fm-50-BOŞ-UF(2KAT)	-
UF(+Ç(+1:1-B	1:1	Fm-50-BOŞ-UF(2KAT)	+
UF(+Ç(-)2:1-B	2:1	Fm-50-BOŞ-UF(2KAT)	-
UF(+Ç(+2:1-B	2:1	Fm-50-BOŞ-UF(2KAT)	+
UF(-)Ç(-)1:1-SV	1:1	Fm-50-20	-
UF(-)Ç(+1:1-SV	1:1	Fm-50-20	+
UF(-)Ç(-)2:1-SV	2:1	Fm-50-20	-
UF(-)Ç(+2:1-SV	2:1	Fm-50-20	+
UF(+Ç(-)1:1-SV	1:1	Fm-50-20-UF(2KAT)	-
UF(+Ç(+1:1-SV	1:1	Fm-50-20-UF(2KAT)	+
UF(+Ç(-)2:1-SV	2:1	Fm-50-20-UF(2KAT)	-
UF(+Ç(+2:1-SV	2:1	Fm-50-20-UF(2KAT)	+

*UF(-): ultrafiltrasyon uygulanmamış, UF(+): ultrafiltrasyon uygulanmış, Ç(+): çapraz bağlı Ç(-): çapraz bağımsız, B: boş, SV: simvastatin.

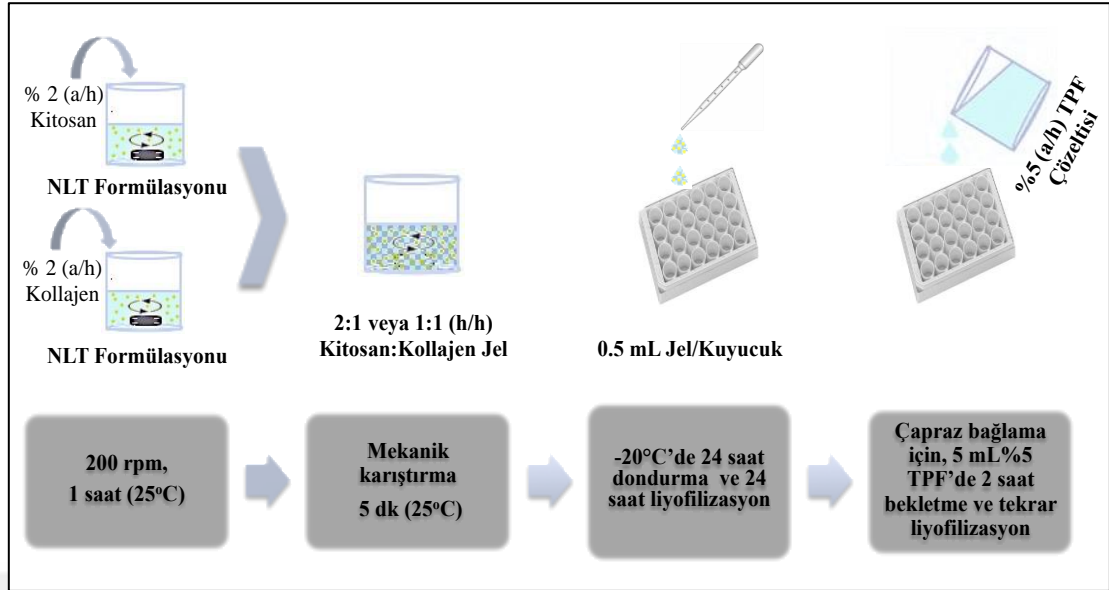
3.2.9. Doku İskelesi Formülasyonlarının Hazırlanması

Doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasında ilk olarak Bölüm 3.2.4'de yer alan NLT formülasyonlarından etkin madde içermeyen doku iskeleleri için Fm-50-BOŞ ve Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), simvastatin ile yüklenmiş doku iskeleleri için ise Fm-50-20 ve Fm-50-20-UF(2KAT) formülasyonları Bölüm 3.2.5'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Fm-50-BOŞ-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) NLT formülasyonları kullanılarak hazırlanan doku iskelelerinde, Fm-50-BOŞ ve Fm-50-20 formülasyonları ile hazırlananlara göre boş doku iskeleleri için nanopartikül konsantrasyonu, etkin madde yüklenmiş doku iskeleleri için ise nanopartikül ve

simvastatin konsantrasyonu iki katına çıkarılmıştır. UF(-) kodlu konsantre edilmemiş NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelelerinde simvastatin konsantrasyonu %0,4 (a/a) iken UF(+) kodlu iki kat konsantre edilmiş NLT formülasyonu ile hazırlanan iskeleler için bu konsantrasyon iki katına çıkarak %0,8'e (a/a) yükselmiştir.

NLT formülasyonlarının hazırlanmasının ardından kitosan ve kollajenin %2 (a/h) konsantrasyonda uygun NLT formülasyonu içerisindeki çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler jel kıvamı alana kadar manyetik karıştırıcı üzerinde 200 rpm'de yaklaşık 1 saat karıştırılmış daha sonra manyetik karıştırıcı üzerinden alınarak 1 saat dinlenmeye bırakılmıştır. Elde edilen kitosan ve kollajen jelleri hazırlanacak doku iskelesi formülasyonuna göre 1:1 veya 2:1 (h/h) kitosan:kollajen oranlarında mekanik olarak yaklaşık 5 dk. karıştırılmıştır. Hazırlanan kitosan-kollajen jel formülasyonları, her bir kuyucuğa 0,5 mL jel içerecek şekilde 24 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına (Greiner) dökülmüştür. Daha sonra -20°C'de 24 saat süreyle dondurulmuş ve ardından 24 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonucunda çapraz bağırsız doku iskelesi formülasyonları elde edilmiştir. Çapraz bağlı doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanması için öncelikle çapraz bağlayıcı ajan olan TPF'nin %5 (a/h) konsantrasyonda sudaki çözeltisi hazırlanmıştır. Liyofilizasyon sonucu elde edilen çapraz bağırsız doku iskeleleri her bir kuyucukta bir doku iskelesi olacak şekilde 12 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına alınarak üzerlerine 5 mL %5 (a/h) TPF çözeltisi eklenmiş ardından 2 saat süreyle ışıktan korunarak bekletilmiştir. İki saatin sonunda doku iskeleleri üzerinden TPF çözeltisi uzaklaştırılarak iskeleler iki kez distile su ile yıkanmış ve tekrar -20°C'de 24 saat süreyle dondurulmanın ardından 24 saat liyofilize edilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasına ait şematik gösterim.

3.2.10. Doku İskelesi Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonları; çap-kalınlık tayini, morfolojik analizler, porozite ve por büyüklüğü dağılımı, su absorplama, in vitro parçalanma, mekanik özellikleri, in vitro salım ve sitotoksosite özelliklerinin incelenmesi ile karakterize edilmiştir.

Çap- Kalınlık Tayini

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının çap ve kalınlık ölçümleri mekanik bir kumpas kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir doku iskelesi formülasyonu için 12 adet doku iskelesi üzerinde ölçümler yapılmıştır.

Morfolojik Analizler

Doku iskelelerinin yüzey özellikleri SEM (Quanta 400F Field Emission) kullanılarak incelenmiştir. Analiz öncesi doku iskeleleri metal levhalar üzerine iki tarafı yapışkan bantlarla yapıştırılmasının ardından altın-palladyum ile kaplanmıştır.

Doku iskelelerinin genel şekilsel özelliklerinin incelenmesi amacıyla konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile 2:1 kitosan:kollajen polimer oranlarında hazırlanan, etkin madde içermeyen veya simvastatin yüklenmiş doku iskelelerinin

çapraz bağlı ve bağısız örneklerine ait görüntüler dijital fotoğraf makinesi (Nikon) ile fotoğrafları çekilmiştir.

Porozite ve Por Büyüklüğü Dağılımı Tayini

Doku iskelelerinin porozite ve por büyüklüğü dağılımları civalı porozimetre (Poremaster 60, Quantachrome Corporation) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Yüzey gerilimi 480 erg/cm^2 olan civa örnekler üzerine 140° temas açısı ile düşük basınçta (0-50 psi) uygulanmıştır.

Civalı porozimetre cihazı ile por büyüklüğü dağılımlarının ölçümünde, civanın porlar içerisine girebilmesi için belirli bir basınç aralığında civa uygulanmakta ve civa basınçla ilişkili olarak farklı boyutlardaki porlar içerisine penetre olmaktadır. Küçük por çapları için yüksek basınçta civa uygulanması gerekirken büyük por çaplarına penetrasyon düşük basınçla gerçekleşmektedir. Bu nedenle uygulanan herbir basınç noktasına karşılık gelen bir por çapı bulunmaktadır. Sabit bir civa basıncı veya por çapı için gram örnek başına penetre olan civa hacmi (cc/mL) değeri cihaz tarafından hesaplanmaktadır. Sonuçlar por çapına (μm) karşılık, penetre olan civa hacmi (cc/mL) değerleri ile por büyüklüğü dağılımı ve % porozite olarak elde edilmektedir (215).

Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.8.'de belirtilen konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonları ile birlikte konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV doku iskelelerinin su absorplama özelliklerinin tayini amacıyla örnekler başlangıç ağırlıklarının (D_0) kaydedilmesinin ardından 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yerleştirilmiştir. Ardından her bir örnek üzerlerine 5 mL $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'deki pH 7,4 PBS tamponu eklenerek plakların üzerleri sıkıca kapatılmış ve $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'deki su banyosuna yerleştirilmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda doku iskeleleri plaklardan çıkarılarak filtre kağıtları üzerine alınıp 1 dk. boyunca fazla suyun absorbe olmasına izin verilmiş ve ıslak doku iskelelerinin ağırlıkları tartılarak belirlenmiştir (D_1). Tüm ölçümler altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Doku iskelelerinin 24 saat sonundaki % su absorplama değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.7.) (214).

$$\% \text{ Su Absorplama} = [(D_1 - D_0) / D_0] \times 100 \quad (3.7.)$$

İn Vitro Parçalanma

Konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonlarının ve konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV doku iskelelerinin in vitro parçalanma özellikleri pH 7,4 PBS tamponu içerisinde 28 gün süreyle altı tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri, başlangıç ağırlıklarının (D_0) kaydedilmesinin ardından 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yerleştirilerek her bir kuyucuğa 5 mL $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'deki pH 7,4 PBS tamponu eklenmiş ve plaklar sıkıca kapatılarak $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ 'deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 7, 14 ve 28. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki parçalanma ortamı uzaklaştırılarak örnekler -20°C 'de 24 saat süreyle dondurulmuş ve ardından 24 saat liyofilize edilerek kurutulmuştur. Kurutulan her bir doku iskelesi tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir (D_t). Tartımları takiben doku iskeleleri üzerine taze pH 7,4 PBS tamponu eklenerek bir sonraki ölçüme kadar tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Doku iskelelerinin başlangıç ağırlıkları ile parçalanma analizi sonucu elde edilen ağırlık değişimleri kullanılarak % kütle kaybı değerleri aşağıda yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.8.) (123, 216).

$$\% \text{ Kütle Kaybı} = [(D_0 - D_t) / D_0] \times 100 \quad (3.8.)$$

Mekanik Özelliklerin İncelenmesi

Bölüm 3.2.8.'de yer alan konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonları ve konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV doku iskelesi formülasyonlarının mekanik dayanıklılıkları Texture Analyser (TA-XTPlus, Stable Microsystems) cihazı kullanılarak incelenmiştir. 1,52 cm çap ve 0,26 cm kalınlığında hazırlanan doku iskeleleri üzerine 5 mm/dk. sabit hızda, 5 N ağırlığında kuvvet uygulanarak doku iskelelerinde meydana gelen gerilim (MPa) ve gerinim (%)

değerleri hesaplanmış ve gerinime karşı gerilim eğrileri elde edilmiştir. Gerilim, uygulanan kuvvetin örneğin kesit alanına bölünmesi ile ifade edilmektedir. Gerinim ise kuvvet uygulaması sırasında örnekte oluşan uzunluk değişiminin, kuvvet uygulamadan önceki boyuna bölünmesi ile bulunmaktadır (171).

Elde edilen gerinim/gerilim eğrilerindeki doğrusal bölgenin eğiminden doku iskelelerine ait elastik modüller hesaplanmıştır. Ölçümler 6 tekrarlı olarak yapılmıştır.

İn Vitro Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları, Bölüm 3.2.8.'de bahsedilen simvastatin yüklenmiş doku iskelesi formülasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmaları ile doku iskelesi formülasyonlarının polimer oranı, çapraz bağlama ve yüklenen simvastatin miktarı değişkenlerinin simvastatin salımı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Doku iskelesi formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları, Bölüm 3.2.6.'da bahsedilen NLT formülasyonlarının salım çalışmalarında olduğu gibi diyaliz membran kullanılmadan yapılmıştır. Literatürde doku iskelesi formülasyonları ile diyaliz membran kullanılmadan gerçekleştirilmiş salım çalışmaları yaygın olarak bulunmakta olup bu yöntemlerden yola çıkılarak salım çalışmaları düzenlenmiştir (123, 217, 218). Salım çalışmalarında, doku iskelesi formülasyonları Bölüm 3.2.9.'da anlatıldığı gibi hazırlanmış ve Bölüm 3.2.6.'da bahsedildiği gibi hazırlanan %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu difüzyon ortamı olarak kullanılmıştır. Salım çalışmaları öncesinde ortamdaki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla salım ortamı 30 dk. boyunca ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonları altı tekrarlı olarak, her bir kuyucukta bir doku iskelesi bulunacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yerleştirilmiştir. Daha sonra formülasyonların üzerine 5 mL $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'deki salım ortamı eklenerek $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'deki yatay çalkalayıcı su banyosu içerisine yerleştirilmiş ve salım süresince 120 spm hızda yatay çalkalanmıştır. Örnek alma zamanları 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ve 28. gün olarak belirlenmiştir. Örnek alma sırasında plaklar su banyosundan çıkarılmış ve doku

iskelesine zarar verilmeden salım ortamı enjektör yardımıyla tamamen alınarak örnekler toplanmıştır. Doku iskeleleri üzerinden alınan örnek hacmi yerine 5 mL $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'deki taze salım ortamı eklenerek plaklar tekrar su banyosuna yerleştirilmiş ve bir sonraki örnek alma zamanına kadar 120 spm hızda yatay çalkalamaya devam edilmiştir. Toplanan örnekler $0,45\ \mu\text{m}$ 'lik selüloz şırınga filtrelerinden süzülmuş ve ardından HPLC ile simvastatin miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

3.2.11. Doku İskelesi Formülasyonlarının Sterilizasyonu

İn vitro sitotoksisite çalışmaları ve in vivo etkinlik çalışmaları öncesinde mikrobiyolojik kontaminasyonun önlenmesi amacıyla hazırlanan doku iskelesi formülasyonları UV sterilizasyon yöntemi ile sterilize edilmiştir (171). Tüm sterilizasyon işlemleri steril koşulların sağlandığı laminar hava akımlı kültür kabini altında (BHG 2000 S/D, D: Group Company) gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri steril 12 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa bir doku iskelesi gelecek şekilde yerleştirilmiş ve laminar hava akımlı kültür kabininde yer alan UV lambalar kullanılarak her iki yüzeyi 30'ar dk. boyunca UV ışığa maruz bırakılmıştır. Sterilizasyon işlemi sonunda 12 kuyucuklu plaklar steril kapakları ile laminar hava akımlı kültür kabini içerisinde sıkıca kapatılarak alüminyum folyo kağıtlarına sarılıp in vitro sitotoksisite ve in vivo etkinlik çalışmalarına kadar saklanmıştır.

3.2.12. Sitotoksisite Çalışmaları

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının, hücreler üzerindeki toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla in vitro sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Hücre toksisitesi ve hücre canlılığının değerlendirilmesi etkin madde yüklenmiş ve yüklenmemiş doku iskelesi formülasyonları üzerinde L929 fare fibroblast hücre hattı (American Type Culture Collection, ATCC) kullanılarak MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile gerçekleştirilmiştir.

L929 fare fibroblast hücreleri ile yapılan sitotoksisite çalışmalarının tüm aşamalarında kültür ortamı olarak, %10 fetal sığır serumu (FBS), L-glutamin (%1) ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotik çözeltisi içeren *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Biochrom) çözeltisi kullanılmıştır. L929 fare fibroblast

hücrelerinin kültür çalışmaları için hazırlanması amacıyla, -180°C 'deki sıvı nitrojen tankında bulunan hücreler, tanktan çıkarılmış ve laminar hava akımlı kültür kabini (BHG 2000 S/D, D: Group Company), içinde kültür ortamı bulunan 75 cm^2 'lik flasklara alınarak %5 CO_2 içeren 37°C 'deki inkübatörde (Sanyo MCO-18AIC) çoğaltılmıştır.

Simvastatin yüklü doku iskelesi formülasyonlarına ait sitotoksitenin değerlendirilebilmesi için, öncelikle etkin maddenin sitotoksiste çalışmaları yapılarak simvastatin dozundan kaynaklanan sitotoksiste belirlenmiştir. Bu nedenle doku iskelesi formülasyonlarının sitotoksiste çalışmaları iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiş olup öncelikle farklı konsantrasyonlardaki simvastatin çözeltileri üzerinde *in vitro* sitotoksiste çalışmaları yapılmış ve sitotoksik etki gözlenmeyen konsantrasyonun belirlenmesinin ardından bu konsantrasyonu aşmayacak şekilde doku iskeleleri kesilip tartılarak sitotoksiste çalışmaları yapılmıştır.

- **Simvastatinin Sitotoksiste Çalışmaları**

Simvastatin sitotoksitenin incelenmesi amacıyla öncelikle simvastatinin %2 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) içeren kültür ortamı içinde $200\ \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stoktan kültür ortamı ile gerekli seyreltmeler yapılarak 100 , 50 , 25 ve $12,5\ \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin sterilizasyonu $0,22\ \mu\text{m}$ por çapına sahip tek kullanımlık steril filtrelerden süzülerek gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığının incelenmesi için, L929 hücreleri tripan mavisi ile boyandıktan sonra hemasitometrede sayılarak 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına ekilmiştir. Ardından plak %5 CO_2 içeren 37°C 'de inkübatöre alınarak 24 saat boyunca bekletilmiştir. 24 saat inkübasyonun ardından hazırlanan $200\ \mu\text{g/mL}$, $100\ \mu\text{g/mL}$, $50\ \mu\text{g/mL}$, $25\ \mu\text{g/mL}$ ve $12,5\ \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarındaki simvastatin çözeltileri ve kontrol olarak etkin madde içermeyen çözücü ortamları hücreler üzerine uygulanmıştır. Plaklar %5 CO_2 içeren 37°C 'deki inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa $5\ \text{mg/mL}$ konsantrasyonda MTT çözeltisi (Sigma-Aldrich) eklenmiş ve plaklar 4 saat boyunca

inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, çözünür bir tetrazolyum tuzu olan MTT bileşiği canlı olan hücreler tarafından, çözünür olmayan mor renkli formazan kristallerine çevrilmiştir. Oluşan formazan kristalleri, 200 µL DMSO çözeltisi eklenerek çözüldürülmüş ve mikropalak okuyucuyla (VERSAmax, Molecular Devices) 570 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. Hücre canlılığı, kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

- **Doku İskelelerinin Sitotoksosite Çalışmaları**

Doku iskelesi formülasyonlarının sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacıyla *in vivo* çalışmalarda kullanılmak için seçilen UF(+) ζ (+)2:1-SV formülasyonu ile birlikte UF(-) ζ (+)2:1-SV formülasyonu ve bu formülasyonların etkin madde içermeyen karşılıkları olan UF(+) ζ (+)2:1-B ve UF(-) ζ (+)2:1-B formülasyonları kullanılmıştır.

Simvastatinin sitotoksosite çalışmaları sonucunda sitotoksik etki gözlenmeyen simvastatin konsantrasyonu belirlenmiş ve bu konsantrasyon sağlanacak şekilde doku iskeleleri kesilip tartılmıştır. Elde edilen doku iskelesi kesitleri 12 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa bir doku iskelesi gelecek şekilde yerleştirilmiş ve sitotoksosite çalışmalarına başlamadan önce UV ışık ile 30 dk. boyunca sterilize edilmiştir. Kontrol grubu olarak doku iskelesi bulunmayan kuyucuklara hücreler ekilerek tek başına hücreler takip edilmiştir. Daha sonra tripan mavisi ile boyanarak hemisitometrede sayılan L929 hücreleri 55×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde içerisinde doku iskeleleri bulunan 12 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Hazırlanan plaklar %5 CO₂ içeren 37°C'deki inkübatöre alınarak 12 ve 24 saat boyunca bekletilmiştir. 12 ve 24 saat inkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 5 mg/mL konsantrasyonda MTT çözeltisi eklenmiş ve plaklar 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonunda kuyucuklarda bulunan ortam uzaklaştırılarak oluşan formazan kristallerini çözmek için 2 mL DMSO eklenmiştir. Ardından her kuyucuktan 250 µL alınarak 96 kuyucuklu plaklara yerleştirilip mikropalak okuyucuyla 570 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. Hücre canlılığı, kontrol grubu ile karşılaştırılarak yüzde olarak ifade edilmiştir.

3.2.13. İn Vivo Çalışmalar İçin Simvastatin Dozunun ve Doku İskelesi Formülasyonunun Belirlenmesi, Deney Hayvanlarının Seçimi ve Hayvanların Gruplandırılması

Simvastatin Dozunun Belirlenmesi

Wistar albino sıçanlarla gerçekleştirilmiş olan in vivo yara iyileşmesi çalışmalarına geçilmeden önce doku iskelesi formülasyonu içerisinde topikal olarak uygulanacak simvastatin dozunun belirlenmesi amacıyla detaylı bir literatür taraması yapılmıştır. Literatürde yer alan simvastatin içeren doku iskelesi formülasyon çalışmaları ve doku iyileşmesi amacıyla topikal uygulanan simvastatin dozları incelendiğinde 0,2 mg–10 mg arasında simvastatinin uygulandığı gözlenmiştir (21, 123, 219-223). Yasasvini ve ark. (21) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada simvastatin yüklü kitosan mikropartiküllerini içeren topikal hidrojellerin yara iyileştirici etkisi 2,5 mg, 5 mg ve 10 mg olmak üzere üç farklı simvastatin dozunda Wistar albino sıçanlar üzerinde incelenmiştir. Çalışma sonunda 2,5 mg düşük doz simvastatin içeren hidrojelin, orta ve yüksek simvastatin dozuna ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek yara kapanması gösterdiği ve histopatolojik incelemeler sonucunda da granülasyon dokusunda tam epitelizasyonun sadece bu grupta olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, düşük, orta ve yüksek dozda simvastatinin kemik dokusu üzerindeki etkisini sıçanlar üzerinde incelemek amacıyla gerçekleştirilen başka bir çalışmada 7 mg üzerindeki simvastatin dozlarında doz artışına bağlı olarak enflamasyon bulguları tespit edilmiştir (221). Bu nedenle doku iskelesi formülasyonlarında kullanılacak simvastatin dozunun yüksek dozlarda olmamasına dikkat edilerek 7 mg'ı aşmayacak ve 0,2 mg–7 mg doz aralığını sağlayacak şekilde seçilmesine karar verilmiştir. Sonuç olarak 2 ve 4 mg dozlarında simvastatin içeren doku iskeleleri ile çalışmalar yapılmıştır. Konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile hazırlanan doku iskelelerindeki simvastatin dozu 2 mg iken konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile hazırlanan doku iskelelerinde doz 4 mg olacak şekilde belirlenmiştir.

Doku İskelesi Formülasyonunun Belirlenmesi

İn vivo çalışmalarda, hazırlanan doku iskelelerinin yaralı bölgede 14 ve 28 gün boyunca kontrollü bir şekilde simvastatin salımını gerçekleştirirken, doku kaybı yerine geçecek uygun mekanik güç ve parçalanma özelliklerine sahip olması beklenmektedir. Bu nedenle doku iskelesi formülasyonları üzerinde karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek uygun özellikteki doku iskelesi formülasyonu belirlenmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda çapraz bağlı ve konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile hazırlanan doku iskeleleri, yüksek mekanik dayanıklılık, 28 gün devam eden düşük parçalanma özelliği ve kontrollü simvastatin salımı gösterdiklerinden in vivo çalışmalar açısından daha uygun özelliklere sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Ayrıca in vitro salım çalışmaları sonucunda, 2:1 kitosan:kollajen polimer oranı ile hazırlanan formülasyonların 1:1 polimer oranı ile hazırlananlara oranla salım hızının ve başlangıçtaki salınan miktarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile 2:1 kitosan:kollajen polimer oranında hazırlanan çapraz bağlı UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-SV formülasyonu in vivo çalışmalar için en uygun doku iskelesi olarak seçilmiştir. Etkin madde içermeyen boş lipit nanopartikülle hazırlanan doku iskelesi formülasyonu olarak ise bu formülasyonun etkin madde içermeyen karşılığı olan UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-B formülasyonu seçilmiştir.

Deney Hayvanlarının Seçimi ve Hayvanların Gruplandırılması

İn vivo etkinlik çalışmaları, Dışkapı Yıldırım Bayezit Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Gerekli etik kurul izni, 02.12.2013 tarihinde, 2013/68 protokol numarası ile Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır. Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının in vivo etkinliğinin değerlendirilmesi için, 3 aylık, 280 g-350 g ağırlığında değişen Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritminde tutularak çeşme suyu ve standart pellet sıçan yemi ile beslenmiştir.

Kök hücre izolasyonunun sağlanması için rastgele seçilmiş 16 sıçandan oluşan hayvan grubu ile birlikte toplam yedi grup oluşturulmuş ve tüm gruptaki

sıçanlar rastgele seçilmiştir. Grupların oluşturulmasında yara iyileşmesine katkı sağladığı düşünülen her bir etkenin ayrı ayrı ve birlikte uygulanmaları düşünülerek, kök hücre izolasyon grubu haricinde toplam 6 grupta diyabetik yara iyileşmesi değerlendirilmiştir (20, 181, 182, 219, 224, 225).

- Grup 1 (Kontrol Grubu): Hiçbir uygulama yapılmayan diyabetik yara oluşturulmuş hayvan grubu (n=13)
- Grup 2: Boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi uygulanan diyabetik yara oluşturulmuş hayvan grubu (n=16)
- Grup 3: Serbest simvastatin içeren doku iskelesi uygulanan diyabetik yara oluşturulmuş hayvan grubu (n=16)
- Grup 4: Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi uygulanan diyabetik yara oluşturulmuş hayvan grubu (n=15)
- Grup 5: Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi uygulanan diyabetik yara oluşturulmuş hayvan grubu (n=15)
- Grup 6: Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi uygulanan diyabetik yara oluşturulmuş hayvan grubu (n=14)
- Grup 7: Kök hücre elde edilecek hayvan grubu (n=16)

3.2.14. Epidermal Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesi

Ksilazin (Alfazyn, Ege Vet) ve ketamin (Ketalar, Pfizer) ile derin anestezi altındaki Wistar Albino sıçanların femur bölgesi traşlanıp temizlenmiş ve femur bölgesinden dermis ve epidermis ekleri çıkarılmıştır. Çıkarılan materyal transport besiyeri içine alınarak kök hücre laboratuvarına getirilmiş ve iki kez penisilin, streptomisin, amfoterisin B (Biological Industries) içeren DMEM solüsyonu (Lonza), ile 5 dk. muamele edilmiştir. Ardından materyaller cam petri içine alınarak dermis ve epidermis arasındaki bölge diseksiyonla küçük parçalara ayrılmıştır. Elde edilen örneklerin, explant yöntemi ile T25 flasklarda %20 FBS (Lonza), %2 L-Glutamine (Lonza), %1 penisilin, streptomisin, amfoterisin B ve %77 DMEM içinde ekimi yapılmış daha sonra flasklar 15-20 dk. %5 CO₂, 37°C'deki inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında mezenkimal kök hücre besiyeri eklenmiş ve %5 CO₂, 37°C'deki inkübatöre yerleştirilmiştir. Üç günde bir besiyeri değişimi yapılarak

hücrelerin gelişimi invert mikroskop (Leica) ile gözlemlenmiştir. Hücreler doluluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapılmıştır. 2. pasaja gelen hücreler dondurma solüsyonu içinde kriyotüplere konularak in vivo çalışmanın planlandığı zamana kadar -80°C’de bekletilmiştir.

3.2.15. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İn vivo çalışmalarda kullanılacak epidermal kökenli mezenkimal kök hücreler elde edilmelerinin ardından flow-sitometri ile tanımlama ve adiposit, kondrosit, osteosit farklılaşma çalışmaları ile karakterize edilerek kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir.

Flow-Sitometri ile Mezenkimal Kök Hücre Tanımlanması

İkinci pasajın sonunda hücreler süspansiyon haline getirilerek 3 ayrı tüp içinde her bir tüpte 150,000 hücre olacak şekilde flow sitometri cihazının (FACS-ARIAIII, BD) tüplerine konulmuştur. Elde edilen hücre süspansiyonu PBS içine alınarak santrifüj cihazında (Hettich) 1200 rpm’de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Hücreler üzerine CD45R, CD11b/c, CD90 ve CD44 antikorları (BD-Pharmingen) ilave edilerek 45 dk. karanlıkta inkübe edilmiş ve ardından flow sitometri cihazında okuma işlemi yapılmıştır.

Mezenkimal Kök Hücre Farklılaşması

- **Adiposit Farklılaşması:**

Adiposit farklılaşması için *adipocyte differentiation basal medium* ve *suplement medium* (Gibco, Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. İkinci pasaja gelen hücreler adiposit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılarak üçüncü hafta sonunda Oil Red boyası (Diagnostic BioSystem) ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- **Kondrosit Farklılaşması:**

Kondrosit farklılaşması için *Chondrocytes differentiation basal medium* ve *suplement medium* (Gibco, Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. İkinci pasaja

gelen hücrelerde kondrosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılmış ve ikinci hafta sonunda Alcian Blue boyası (Diagnostic BioSystem) ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- **Osteosit Farklılaşması:**

Osteosit farklılaşması için *Osteocyte differentiation basal medium* ve *suplement medium* (Gibco, Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. İkinci pasaja gelen hücrelerde osteosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılmıştır. Üçüncü hafta sonunda Von Kossa boyası (Diagnostic BioSystem) ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.16. Mezenkimal Kök Hücrelerin İn Vivo Deneyler İçin Hazırlanması

İn vivo çalışmalara kadar -80°C 'de dondurularak saklanan mezenkimal kök hücreler in vivo deneyler öncesinde hızlı çözme tekniği ile çözündürülmüştür. Bu teknikte -80°C dondurucudan çıkarılan hücreler 37°C 'deki su banyosunun içine alınmıştır. Hücre süspansiyonu erimeye başladığında üzerlerine FBS solüsyonu eklenerek 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant atılarak pelet kırılmış ve üzerine DMEM solüsyonu eklenerek tekrar 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Çöken hücreler süspand edilerek çözünmüş hale getirilmiştir.

Çözündürme işleminin ardından hücrelerin canlılığının kontrol edilmesi amacıyla 10 μL hücre süspansiyonu alınarak üzerine 10 μL Tripa Blue (Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Countess slaytına 10 mikrolitre eklenerek hücrelerin Countess® Automated Cell Counter (İnvitrogen) cihazında hem sayısına hem de canlılığına bakılmıştır. Hücre sayısı belirlendikten sonra $2 \cdot 10^6$ hücre/mL geçmeyecek şekilde her bir mL için 10 μL BrDU boyası (Diagnostic BioSystem) eklenerek boyama işlemi gerçekleştirilmiş ardından hücreler 2 saat boyunca %5 CO_2 , 37°C 'deki inkübatörde bekletilmiştir.

3.2.17. Doku İskelesi Formülasyonlarının İn Vivo Deneyle İçin Hazırlanması

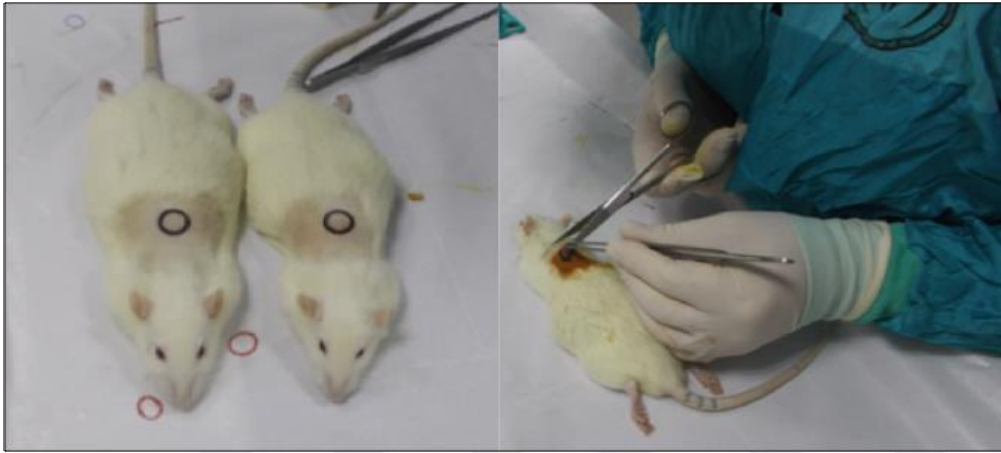
İn vivo çalışmalarda kullanılacak olan boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi formülasyonu için UF(+) ζ (+)2:1-B, lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi formülasyonu için ise UF(+) ζ (+)2:1-SV doku iskeleleri Bölüm 3.2.9.'da anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Elde edilen doku iskeleleri in vivo çalışmaları ve kök hücre ekimine geçilmeden UV ışık altında her iki yüzü 30 dk. boyunca sterilize edilerek steril plaklar içinde saklanmıştır. Kök hücre etkinliğinin değerlendirildiği 'boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi' ve 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' grupları için ise sırasıyla UF(+) ζ (+)2:1-B ve UF(+) ζ (+)2:1-SV formülasyonları 300 μ L mezenkimal kök hücre besiyeri ile ıslatılarak doku iskelesinin besiyerini tam olarak emmesi için 5 dk. beklenilmiştir. Islanan doku iskeleleri üzerine BrDU ile boyanmış olan kök hücreler, her bir doku iskelesine 2.10^6 hücre gelecek şekilde ekilmiş ve 45 dk. bekletilmiştir. Ekimin hemen ardından hazırlanan doku iskeleleri in vivo deneylerde kullanılmıştır.

'Serbest simvastatin içeren doku iskelesi' grubu için kullanılacak doku iskelesi formülasyonu, UF(+) ζ (+)2:1-SV formülasyonunun hazırlanması aşamasında Fm-50-20-UF(2KAT) nanopartikül dispersiyonu yerine, eşdeğer konsantrasyonda simvastatin içeren NLT formülasyonunun sulu fazındaki simvastatin süspansiyonu kullanılarak Bölüm 3.2.9.'da anlatıldığı gibi hazırlanmış ve UV sterilizasyon sonrası in vivo deneylerde kullanılmıştır.

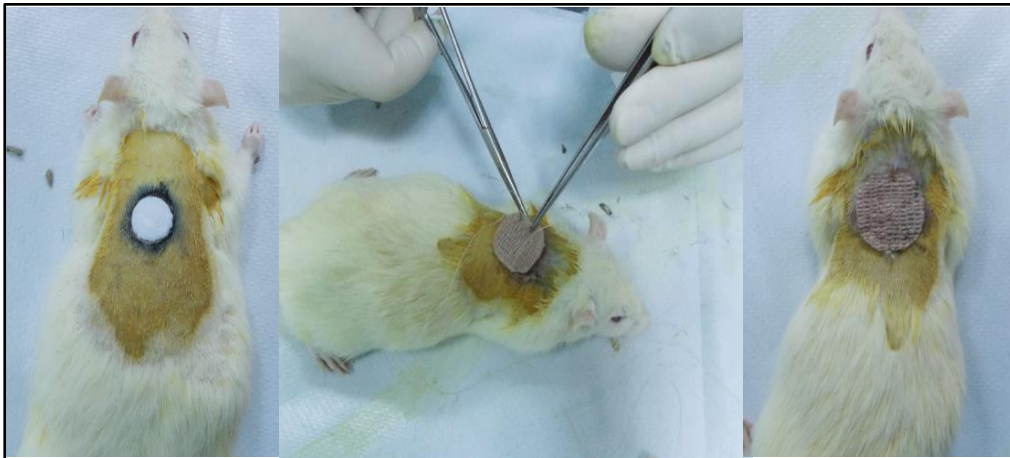
3.2.18. İn Vivo Çalışmalar: Sıçanlarda Yara Oluşumu ve Takip Süreci

Wistar albino erkek sıçanlarda diyabet modeli 45mg/kg dozda streptozotosin (Sigma-Aldrich) verilerek oluşturulmuştur. Streptozotosin uygulamasından bir hafta sonra sıçanların kan şekerleri ölçümleri yapılmış ve kan şekerleri 280-350 arasında olan sıçanlar diyabetik kabul edilerek in vivo çalışmalara katılmıştır. Diyabet gelişmeyen sıçanlar için ikinci bir streptozotosin dozu verilerek bir hafta sonraki kan şekeri ölçümlerinde diyabetik kabul edilenler çalışmalara eklenmiştir.

Diyabetik Wistar albino erkek sıçanlar intraperitoneal ketamin enjeksiyonu ile anestezi altına alınmıştır. Anestezi altındaki sıçanların dorsal kısımlarında deri ve ekleri çıkarılarak yaklaşık olarak 1,2 cm çaplık bir eksizyon oluşturulmuştur (Şekil 3.3.). Kontrol grubu hariç olmak üzere, diğer gruplara boş veya simvastatin ve/veya kök hücre içeren doku iskeleleri yara oluşturulan bölgeye uygulanmıştır. Doku iskelelerinin yara bölgesinden kaymasını engellemek amacıyla uygun boyutlarda kesilmiş koban bandajı yara çevresine dikilerek iskeleler sabitlenmiştir (Şekil 3.4.).



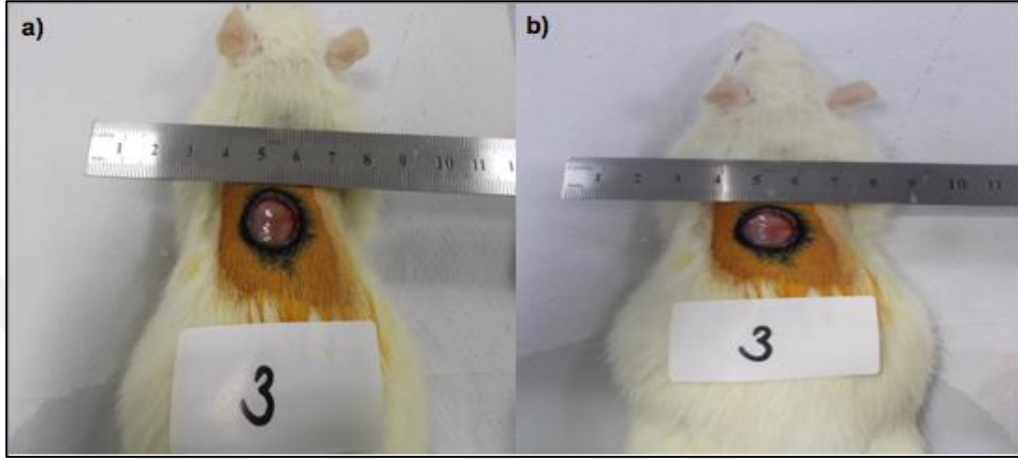
Şekil 3.3. Sıçanların dorsal bölgelerinde yara oluşturulması.



Şekil 3.4. Yara bölgesine doku iskelelerinin koban bandajı ile sabitlenmesi.

Yara iyileşmesi, doku iskelesinin uygulanmasından sonra haftada 1 gün olmak üzere dijital fotoğraf makinesi ile yaralı bölge fotoğraflanarak takip edilmiştir. Bu günler 14. günde sonlandırılacak sıçanlar için 0, 7, 14. gün olarak belirlenirken, 28. günde sonlandırılacak sıçanlar için ise 0, 7, 14, 21, 28. gün olarak belirlenmiştir. Yara bölgesi belirlenen fotoğraflama günlerinde yakın ve uzak mesafe olmak üzere

yara yakınına cetvel konularak ve cetvel konulmadan dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmıştır. Yakın ve uzak mesafeler her zaman aynı noktadan ve belirli bir uzaklıktan çekilmiştir. Uzak mesafe çekimlerinde yaklaşık 20 cm uzaktan çekim yapılırken yakın çekimlerde ise yaklaşık 10 cm uzaktan çekim yapılmıştır (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Yara bölgesinin a) yakın ve b) uzak sabit bir mesafeden fotoğraflanması.

14 veya 28. gün sonunda ise her gruptan belirli bir sayıda sıçan sonlandırılmıştır. Sonlandırma işlemi sonrasında yara oluşturulan bölge ve çevresi çıkarılarak formole alınmış ve patolojik inceleme için patoloji kliniğine gönderilmiştir.

3.2.19. İn Vivo Çalışmalar: Yara İyileşmesinin İzlenmesi ve Değerlendirilmesi

Geliştirilen diyabetik yara modeli üzerinde yara iyileşmesi yara alanlarının hesaplanması ve patolojik incelemelerle değerlendirilmiştir.

Yara Alanlarının Hesaplanması

Farklı doku iskelesi formülasyonu uygulanan gruplarda ve kontrol grubunda haftada 1 gün yaralı bölgenin yakın ve sabit bir mesafeden fotoğraf çekimleri yapılmış ve bu fotoğraflar üzerinde 'Image J' programı kullanılarak yara alanları belirlenmiştir.

Elde edilen yara alanlarından hareketle aşağıda verilen formül kullanılarak % yara alanı hesaplanmıştır (Formül 3.9.) (181). Grupların yara iyileşmesi % yara alanı sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

$$\% \text{ Yara Alanı} = (A_t / A_0) \times 100 \quad (3.9.)$$

A_0 : 0. günde ölçülen yara alanı (cm²)

A_t : t. günde ölçülen yara alanı (cm²)

Hematoksilen-eozin (H&E) boyama ve Patolojik Değerlendirme

14. veya 28. gün sonunda sonlandırma yapılan sıçanların yara oluşturulan bölge ve çevresi çıkarılarak patolojik incelenme için formole alınmıştır. Daha sonra elde edilen doku materyallerine H&E boyama gerçekleştirilmiş ve inflamasyon, epitelizasyon, anjiyogenez ve fibroblastik proliferasyon varlığı açısından patalog tarafından kör olarak incelenmiştir. İnflamasyon, epitelizasyon, vaskülarizasyon ve fibroblastik proliferasyon derecesi her bir doku örneği için kantitatif skorlama yapılarak değerlendirilmiştir. Puan skorlaması, 0: yok, 1: hafif, 2:orta, 3: yoğun olarak gerçekleştirilmiştir.

İmmünohistokimyasal Boyama ve Patolojik Değerlendirme

Dokuların tümü, %10'luk tamponlanmış nötral formalin çözeltisinde 24 saat fikse edildikten sonra parafinle bloklanmıştır. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alınarak CD31 (Lab Vision, Thermo Fisher Scientific), bcl-2 (Merck Milipore) Ki67 (Merck Milipore) primer antikoları yardımıyla streptavidin biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal çalışma yapılmıştır. Deparafinize edilen kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dk. inkübe edilerek giderilmiştir. Ardından kesitler pH 6,0 sitrat tamponu içerisinde 30 dk. kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dk. soğumaya bırakılmıştır. Kesitlere 5 dk. blok antikor, sonrasında bir saat süresince primer antikorlar uygulanmıştır. Biotinli anti-immünglobulin ve streptavidin-peroksidaz konjugatı (Nichirei) ile 10 dk. inkübe edilmiştir. Renklendirici ajan olarak DAB (3,3'-diaminobenzidin) kit (Dako Laboratories) kullanılmıştır. Son olarak kesitler mayer hematoksilen ile 60 saniye boyunca boyanarak DAB uygulamasına kadar tüm aşamalarda pH 7,6 fosfat

tamponu ile, DAB uygulamasından sonra ise distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen örnekler ışık mikroskobu (Leica) altında değerlendirilmiştir.

Aynı patoloji örneklerinde immüno-histokimyasal boyama yapılarak vaskülarizasyon için CD31 belirteçleri, apoptozis için bcl-2 belirteçleri ve proliferasyon için Ki-67 belirteçleri değerlendirilmiştir. CD31 için sayısal bir skorlama yapılırken, bcl-2 ve Ki-67 belirteçlerinde puan skorlaması yapılarak, 0: yok, 1: hafif, 2:orta, 3: yoğun olarak kabul edilmiştir.

Kök Hücrelerin İyileşen Doku İçindeki Varlığının İncelenmesi ve İmmünohistokimyasal Boyamalar

Sıçanlardan 28. günde alınan doku örnekleri BrDU saptama kiti (BD-Pharmingen, ABD) kullanılarak daha önce BrDU ile işaretlenen mezenkimal kök hücrelerinin yara yeri iyileşme alanındaki yeri ve sayısı araştırılmıştır.

3.2.20. İstatistiksel Analiz

Deneysel sonuçlar ortalama (\bar{X}) ve standart hata (SH) ile birlikte verilmiştir. Tüm istatistiksel analizler ise 'IBM SPSS Statistics Version 22.0' programı kullanılarak yapılmıştır. Bağımsız grupların ikili eşleştirmelerinde Mann Whitney U testi, ikiden fazla grubun karşılaştırıldığı çalışmalarda ise Kruskal Wallis tek yönlü testi kullanılmıştır. Simvastatinin HPLC analizi sırasındaki stabilitesi, salım ortamındaki stabilitesi ve NLT formülasyonlarının stabilite çalışmalarında iki bağımlı grubun karşılaştırıldığı nonparametrik bir test olan Wilcoxon testi ve ikiden fazla bağımlı grubun karşılaştırıldığı durumlarda ise Friedman testinden yararlanılmıştır. Tüm testlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

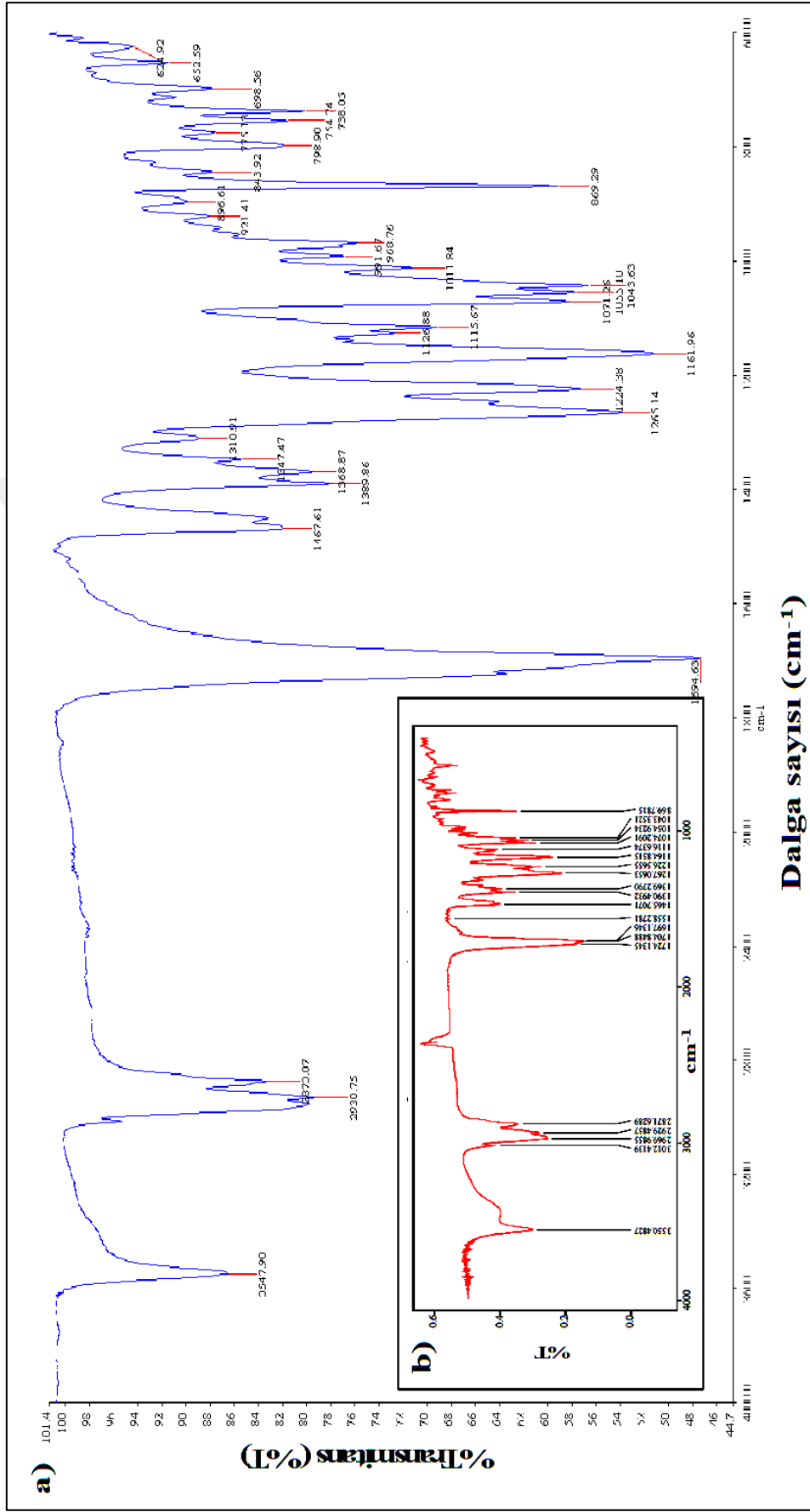
4. BULGULAR

4.1. Simvastatinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Simvastatinin, fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi amacıyla FT-IR, UV spektrumu ve erime derecesi tayini analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. FT-IR Spektrumu

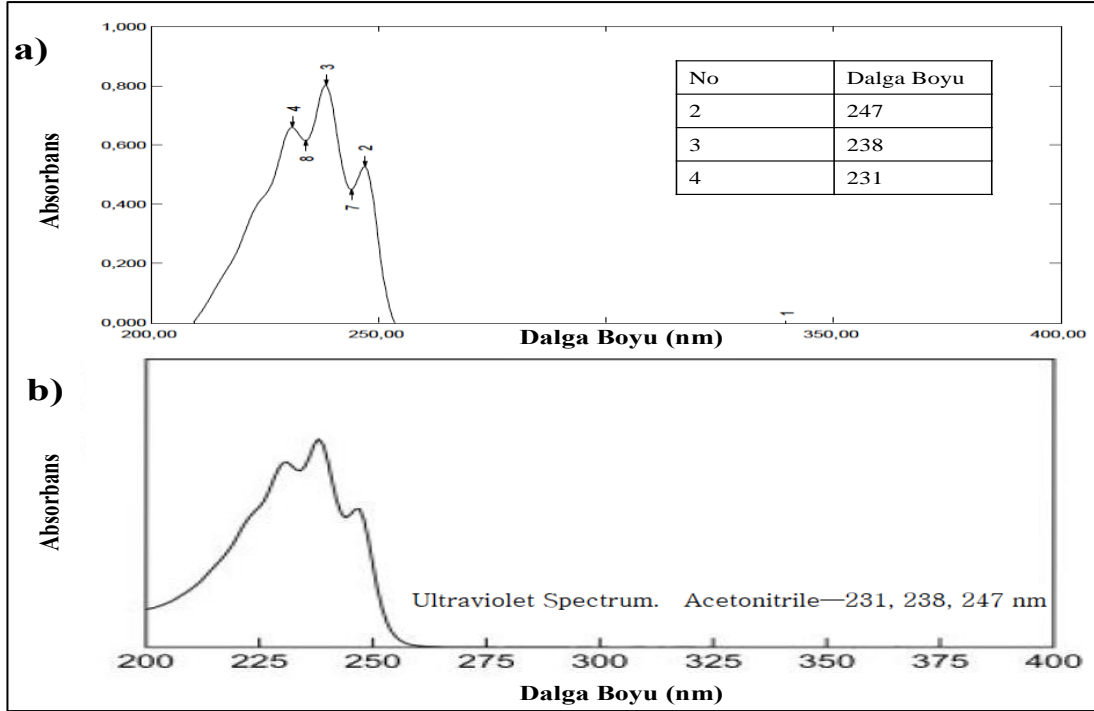
Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi simvastatinin FT-IR spektrumu, Perkin Elmer FT-IR cihazında Attenuated Total Reflectance (ATR) aparatı kullanılarak alınmış ve dalga sayısı (cm^{-1}) cinsinden değerlendirilmiştir. Simvastatin FT-IR spektrumunda, maddenin yapısına özgü, etilenik C-H gerilim ($2930,75 \text{ cm}^{-1}$), alifatik C-H gerilim ($2873,07 \text{ cm}^{-1}$), O-H gerilim ($3547,9 \text{ cm}^{-1}$), siklik ester karbonil C=O gerilim ($1694,63 \text{ cm}^{-1}$), C-O deformasyon pikleri ($1161,96 \text{ cm}^{-1}$), C=C deformasyon pikleri ($1265,14-1224,38 \text{ cm}^{-1}$) gözlenmiştir (Şekil 4.1.). Elde edilen FT-IR spektrumu (Şekil 4.1a) referans FT-IR spektrumu (Şekil 4.1b) ile benzer bulunmuştur (226).



Şekil 4.1. Simvastatine ait **a)** örnek **b)** referans FT-IR spektrumu (226).

4.1.2. UV Spektrumu

Simvastatinin 10 µg/mL konsantrasyonunda asetonitrildeki çözeltisinin UV spektrumu 200 nm–400 nm dalga boyları arasında çekilmiştir. Elde edilen UV spektrumu (Şekil 4.2a), literatürde yer alan simvastatinin asetonitrildeki çözeltisinin 200 nm-400 nm aralığında çekilen UV spektrumu (Şekil 4.2b) ile uyumlu bulunmuştur (193). Referans kaynaktada yer alan simvastatinin maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyları ($\lambda_1 = 231$ nm, $\lambda_2 = 238$ nm ve $\lambda_3 = 247$ nm) elde ettiğimiz simvastatin UV spektrumunda 2, 3 ve 4 numara ile gösterilen dalga boylarında görülmektedir.



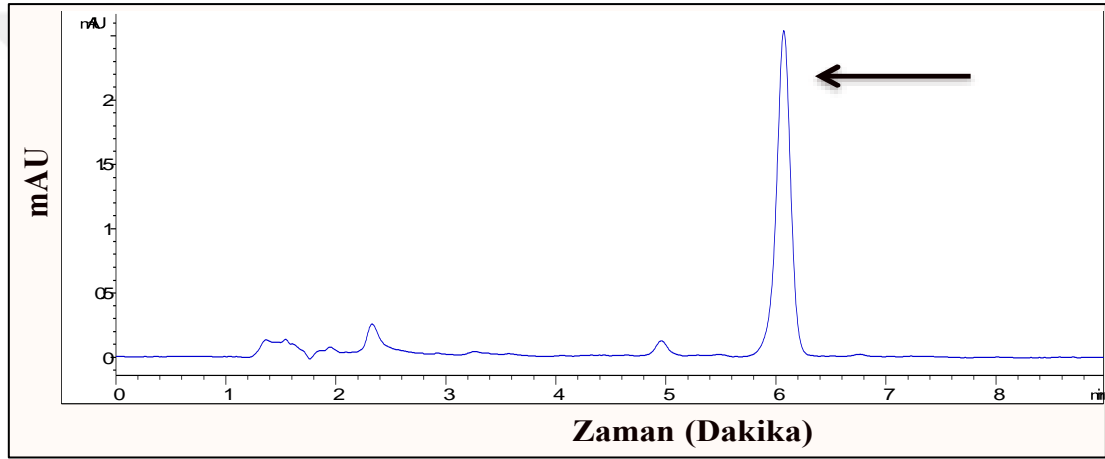
Şekil 4.2. Simvastatinin asetonitrildeki çözeltisine ait a) örnek b) referans UV spektrumu (193).

4.1.3. Erime Derecesi Tayini

Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi simvastatinin erime derecesi Thomas Hoover kılcal erime derecesi tayin cihazı kullanılarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlarda simvastatin erime derecesi aralığı 132°C-136°C olarak belirlenmiştir. Bu aralık, literatürde yer alan simvastatin için verilen erime derecesi aralığına (135°C-138°C) oldukça yakın olduğundan etkin maddemizde herhangi bir kirlilik bulunmamakta ve yüksek derecede saflık göstermektedir (193).

4.2. Simvastatinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Miktar Tayini

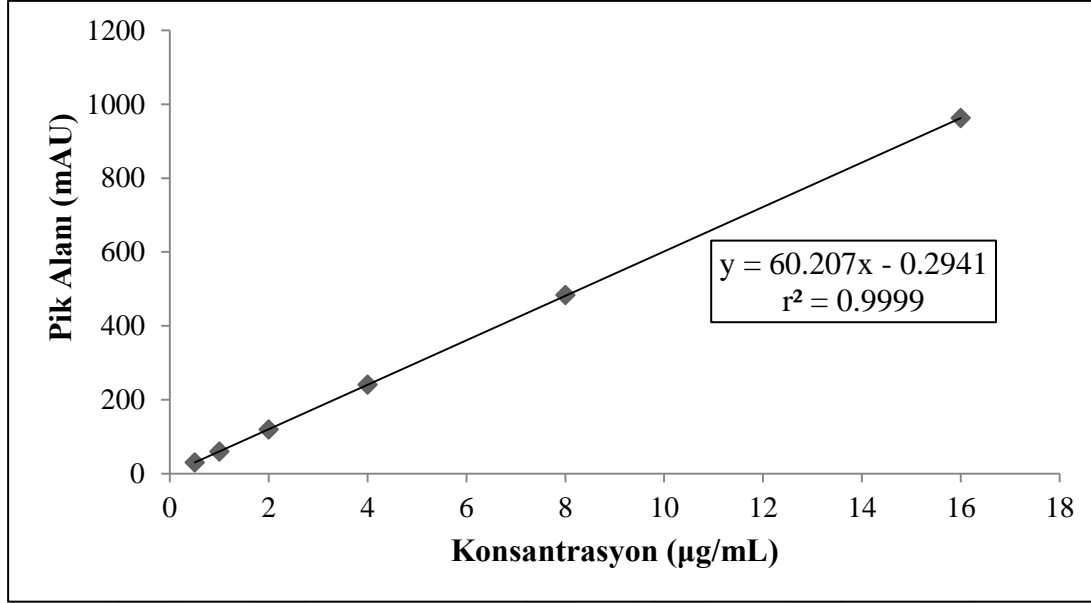
Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımında hazırlanan 0,5 µg/mL standart çözeltisi için elde edilen kromatogram Şekil 4.3.'de verilmiştir. Kromatogramda görüldüğü gibi simvastatinin alıkonma zamanı 6 dakikadır. Simvastatinin diğer standart çözeltileri 1, 2, 4, 8 ve 16 µg/mL için elde edilen kromatogramlarda da aynı alıkonma zamanında simvastatin pikleri elde edilmiştir. Simvastatin konsantrasyonunun 0,5 µg/mL'ye kadar indirilmesi yöntemin düşük konsantrasyonlara hassas olduğu göstermektedir.



Şekil 4.3. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki 0,5 µg/mL çözeltisinin enjeksiyonuyla elde edilen HPLC kromatogramı (Alıkonma zamanı: 6 dk.).

4.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

Simvastatinin kalibrasyon doğrusu Bölüm 3.2.2.'de belirtildiği gibi Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımında hazırlanan 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL konsantrasyonlarındaki simvastatin çözeltileri kullanılarak çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.4.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6).

4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Doğrusallık (Linearity)

Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki farklı konsantrasyondaki çözeltilerinden hareketle hazırlanan kalibrasyon doğrusuna ait regresyon katsayısı (r^2) 0,9999 olarak saptanmıştır (Şekil 4.4.). Regresyon katsayısı değerinin 1'e çok yakın bir değer çıkması ve intersept değerinin sifira yakınlığı simvastatin kalibrasyon doğrusunu oluşturan noktaların doğrusal olduğunu göstermektedir.

Doğruluk (Accuracy)

Yöntemin doğruluğunun değerlendirilmesi amacıyla simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımında hazırlanan düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı konsantrasyonda (0,5, 2 ve 16 µg/mL) çözeltileri kullanılarak gün içi ve günler arası olarak çalışılmıştır. Simvastatinin doğruluk analizi sonucunda hesaplanan Ortalama (\bar{X}), Standart Hata (SH), Varyasyon Katsayısı VK (%), % Bağıl Hata ve % Geri Kazanım verileri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki gün içi ve günler arası doğruluk sonuçları (n=6).

Doğruluk	İlave Edilen Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Tayin Edilen Konsantrasyon (µg/mL)	SH	VK (%)	% Bağıl Hata	% Geri Kazanım
Gün İçi	0,5	0,504	0,001	0,594	0,799	100,799
	2	2,013	0,005	0,544	0,662	100,662
	16	16,036	0,021	0,291	0,225	100,225
Günler Arası	0,5	0,504	0,0002	0,068	0,892	100,892
	2	2,000	0,006	0,453	0,020	100,020
	16	16,042	0,013	0,116	0,261	100,261

Gün içi ve günler arası doğruluk sonuçlarında, % Bağıl Hata ve % Geri Kazanım değerleri olması gereken sınırlar içinde bulunduğundan kullanılan analitik yöntemin gün içi ve günler arası doğruluğu gösterilmiştir.

Kesinlik (Precision)

Kesinlik çalışmaları simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımında hazırlanan üç farklı konsantrasyonu (düşük, orta, yüksek: 0,5, 2, 16 µg/mL) üzerinden gerçekleştirilmiş olup, tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tekrar edilebilirlik sonuçları VK (%) ile belirtilmiş olup, bu değerler gün içi analiz için 0,058 ile 0,228 arasında, günler arası için ise 0,041 ile 0,472 arasında değişmektedir (Tablo 4.2.).

Gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik sonuçlarında VK (%) ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler 0,175 ile 0,563 arasında, günler arası için 0,046 ile 0,470 arasında değişmektedir (Tablo 4.3.). Hesaplanan % VK değerlerinin %2'nin oldukça altında olması ile analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirliği gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).

Tekrar Edilebilirlik	İlave Edilen Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Tayin Edilen Konsantrasyon (µg/mL)	SH	VK (%)
Gün İçi	0,5	0,502	0,001	0,228
	2	1,998	0,001	0,131
	16	16,030	0,004	0,058
Günler Arası	0,5	0,505	0,002	0,472
	2	1,997	0,001	0,041
	16	16,037	0,008	0,074

Tablo 4,3, Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6).

Tekrar Elde Edilebilirlik	İlave Edilen Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Tayin Edilen Konsantrasyon (µg/mL)	SH	VK (%)
Gün İçi	0,5	0,504	0,001	0,563
	2	1,989	0,002	0,197
	16	16,037	0,013	0,175
Günler Arası	0,5	0,507	0,002	0,470
	2	1,991	0,002	0,146
	16	16,040	0,005	0,046

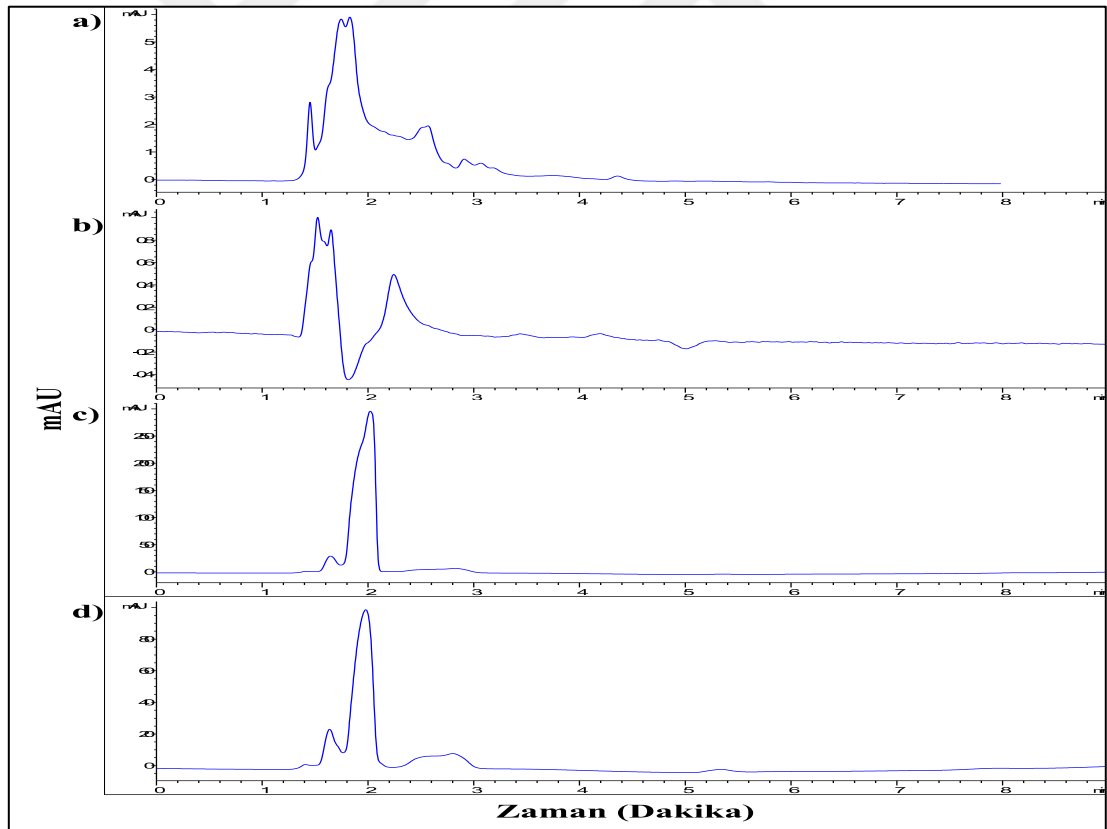
Duyarlılık (*Sensitivity*)

Analitik yöntemin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki simvastatin duyarlılığını belirlemek amacıyla saptanabilirlik sınırı (*Limit of Detection*, LOD) ve tayin edilebilirlik sınırı (*Limit of Quantification*, LOQ) hesaplanmıştır. Saptanabilirlik sınırı, analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Tayin edilebilirlik sınırı ise analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyondur.

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen tayin edilebilirlik sınırı 9,9 ng/mL olup, saptanabilirlik sınırı 3 ng/mL'dir. Bu veriler geliştirilen analitik yöntemin çalışmamızın amacına uygun duyarlılığa sahip olduğunu ve ng düzeyinde analiz yapılabilecek bir hassasiyete sahip olduğunu göstermiştir.

Özgünlük (*Specificity*)

Tez çalışması kapsamında yapılan HPLC analizlerinde etkin madde dışındaki diğer formülasyon bileşenleri ve analizde kullanılan ortamları içeren; etkin madde yüklenmemiş NLT formülasyonu, Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımı, %0,5 SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu in vitro salım ortamı ve etkin madde yüklenmemiş doku iskelesi formülasyonu ile gerçekleştirilen salım çalışmasına ait kromatogramlar Şekil 4.5.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.5. a) Etkin madde yüklenmemiş NLT formülasyonu b) Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımı c) %0,5 SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu in vitro salım ortamı d) Etkin madde yüklenmemiş doku iskelesi formülasyonu ile gerçekleştirilen salım çalışmasına ait kromatogramlar.

Kromatogramlardan anlaşıldığı gibi 6. dk.'da görülen simvastatine ait olan pikin bulunduğu bölgelerde herhangi bir girişime neden olacak bir madde piki bulunmamaktadır. Sonuç olarak geliştirilen analitik yöntem simvastatine özgündür.

Stabilite (Stability)

Simvastatinin 0,5, 2 ve 16 µg/mL konsantrasyonlarında Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımında hazırlanan çözeltileri etkin maddenin stabilitesini göstermek amacıyla değerlendirilmiştir. Çözeltiler hazırlamadan hemen sonra ve ardından 37°C'de 72 saat boyunca bekletilerek her 24 saatte bir HPLC ile analiz edilmiş ve sonuçlar arasındaki fark; SH ve VK incelenerek değerlendirilmiştir. Simvastatinin HPLC analizi boyunca incelenen stabilite çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4.4.'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. Simvastatinin Asetonitril:Metanol:50mM NaH₂PO₄ (pH 4,5) (6:1:3) mobil faz karışımındaki stabilite sonuçları (n=3).

Konsantrasyon	0,5 µg/mL		2 µg/mL		16 µg/mL	
	Ort. Pik Alanı	Ort. Ölçülen Konsantrasyon	Ort. Pik Alanı	Ort. Ölçülen Konsantrasyon	Ort. Pik Alanı	Ort. Ölçülen Konsantrasyon
0. saat	29,900	0,502	119,900	1,996	964,333	16,022
24. saat/1.gün	29,867	0,501	119,900	1,996	965,400	16,040
48. saat/2.gün	29,800	0,500	120,167	2,001	964,633	16,027
72. saat/3.gün	29,767	0,499	120,133	2,000	964,967	16,032
Ortalama	29,833	0,500	120,025	1,998	964,833	16,030
Standart Hata	0,030	0,001	0,072	0,001	0,229	0,004
Varyasyon Katsayısı	0,177	0,175	0,105	0,104	0,041	0,041

Stabilite bulguları incelendiğinde, simvastatinin hazırlanır hazırlanmaz ve 37 °C'de 72 saat bekletildikten sonra HPLC ile analizi sonucunda elde edilen konsantrasyonlar arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Zamanla konsantrasyon

değerlerinin değişimi % VK değerleri %2'nin altında ve standart hata değerleri 0,001-0,229 arasında olmak üzere oldukça düşük bulunarak simvastatinin HPLC analizi sırasında dayanıklı olacağı gösterilmiştir (Tablo 4.4.).

4.3. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında katı ve sıvı lipit taramaları yapılarak NLT formülasyon çalışmaları için uygun lipitler belirlenmiştir.

4.3.1 Katı Lipit Taraması

Simvastatinin katı lipit taraması amacıyla seçilen Precirol ATO 5, Compritol 888 ATO, Apifil, Gelot 64 ve Geleol katı lipitleri içerisinde %5, %10 ve %20'lik (a/a) konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmış ve simvastatin çözünürlüğü 80°C'de gözlemsel olarak ve 60°C'de polarize ışık mikroskopunda incelenmiştir. Katı lipit taraması çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4.5. ve 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Simvastatinin farklı katı lipitlerdeki gözlemsel çözünürlük sonuçları (80°C).

Katı Lipitler	%5 Simvastatin		%10 Simvastatin		%20 Simvastatin	
	Çözünme	Çözünme Süresi	Çözünme	Çözünme Süresi	Çözünme	Çözünme Süresi
Precirol ATO 5	+	5 dk.	+	8 dk.	+	15 dk.
Compritol 888 ATO	+	5 dk.	-	-	-	-
Apifil	+	5 dk.	-	-	-	-
Gelot 64	+	3 dk.	+	8 dk.	-	-
Geleol	+	5 dk.	+	6 dk.	-	-

(+): Simvastatin tamamen çözülmüştür. (-): Simvastatin çözünmemiştir.

Tablo 4.6. Simvastatinin farklı katı lipidlerdeki mikroskopik çözünürlük sonuçları (60°C).

Katı Lipitler	%5 Simvastatin		%10 Simvastatin		%20 Simvastatin	
	Çözünme	Simvastatin Kristal varlığı	Çözünme	Simvastatin Kristal varlığı	Çözünme	Simvastatin Kristal varlığı
Precirol ATO 5	+	-	+	-	+	-
Apifil	+	-	-	+	-	+
Gelot 64	+	-	+	-	-	+
Geleol	+	-	+	±	-	+

(+): Simvastatine ait kristaller bulunmaktadır. (-): Simvastatine ait kristaller yoktur.

(±): Çözünme olmasına rağmen simvastatine ait kristaller bulunmaktadır. (Compritol 888 ATO, ED: 69-74°C olduğundan maksimum 60°C'de çalışılan mikroskopta incelenememiştir).

Gözlemsel ve mikroskopik incelemeler sonucunda %5 simvastatin konsantrasyonunda, tüm katı lipidlerde tamamen çözünme gözlenmiştir (Tablo 4.5. ve 4.6.). Ancak konsantrasyon %10'a çıktığında Apifil ve Compritol 888 ATO'da, simvastatin çözünmemiştir. %20 simvastatin konsantrasyonunda ise yalnız Precirol ATO 5'te tam olarak çözünme gözlenirken Gelot 64 ve Geleol'de çözünme gerçekleşmemiştir. Polarize ışık mikroskobu ile çözeltilerin yapısında simvastatine ait kristaller aranmış ve %5 simvastatin çözeltilerinin hiç birinde bu kristallere rastlanmamıştır (Tablo 4.6.). Bu durum %5 konsantrasyonda simvastatinin Precirol ATO 5, Apifil, Gelot 64 ve Geleol lipidlerinde uygun bir şekilde tamamen çözüldüğünü göstermektedir. %10 simvastatin konsantrasyonunda ise, Apifil içerisinde simvastatin çözünmediğinden çok sayıda simvastatin kristaline rastlanmıştır. %10 simvastatin içeren Geleol çözeltilisinde, gözlemsel olarak çözünme olmasına rağmen yapıda simvastatine ait kristaller bulunmuştur. Konsantrasyon %20'ye çıkarıldığında Precirol ATO 5 dışındaki diğer lipidlerde simvastatin çözünmediğinden simvastatin kristalleri gözlemlenmiştir. Gözlemsel olarak çözünmenin gerçekleştiği Precirol ATO 5'te ise mikroskopik incelemeler sonucunda simvastatin kristalleri de gözlenmediğinden %20 konsantrasyonda simvastatin bu lipitte tamamen çözülmüştür.

Sonuç olarak, katı lipit taraması deneylerinde incelenen bu beş katı lipit arasında, en yüksek simvastatin çözünürlüğü Precirol ATO 5 için elde edilmiştir. Simvastatinin lipit matriks içinde yüksek oranlarda hapsedilebilmesi için formülasyona giren lipitlerdeki çözünürlüğünün yüksek olması gerekmektedir. Bu nedenle simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonlarının tasarlanması için Precirol ATO 5 uygun katı lipit olarak seçilmiştir. Katı lipit seçiminin doğrulanması amacıyla ayrıca Precirol ATO 5 kullanılarak NLT ön formülasyon çalışmaları da gerçekleştirilmiş ve uygun partikül boyutu ve dağılımı sonuçları elde edilmiştir.

4.3.2. Sıvı Lipit Taraması

Sıvı lipit taraması için seçilen oleik asit, Labrafac Lipophile, Labrafil M 1944 CS, Maisine ve Peceol sıvı lipitlerinde simvastatinin %2, %5, %10 ve %20 (a/a) konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanarak 25°C’de ve 80°C’deki çözünürlükleri gözlemsel olarak incelenmiştir. Sıvı lipitler üzerinde yapılan simvastatin lipit taraması sonuçları Tablo 4.7.’de özetlenmektedir.

Tablo 4.7. Simvastatinin farklı sıvı lipitlerdeki gözlemsel çözünürlük sonuçları.

Sıvı Lipit	%2 Simvastatin		%5 Simvastatin		%10 Simvastatin		%20 Simvastatin	
	25°C	80°C	25°C	80°C	25°C	80°C	25°C	80°C
Labrafac Lipophile	-	+	-	±	-	-	-	-
Oleik asit	+	+	-	+	-	-	-	-
Labrafil M 1944 CS	+	+	-	+	-	±	-	-
Maisine	+	+	+	+	-	+	-	+
Peceol	+	+	+	+	-	+	-	+

(+): Simvastatin tamamen çözülmüştür. (-) : Simvastatin çözünmemiştir. (±):Simvastatin hemen hemen çözülmüştür.

Simvastatin, %2 konsantrasyonda tüm sıvı lipitlerde çözünmüştür. %5 konsantrasyonda 25°C'de ise tamamen çözünme sadece Maisine ve Peceol sıvı lipitlerinde gözlemlenirken, konsantrasyon %10 ve %20'ye yükseltildiğinde 25°C'de simvastatin hiç bir lipitte çözünmemiştir. 80°C'de ise %10 ve %20 konsantrasyonlar için sadece Maisine ve Peceol lipitlerinde tamamen çözünme gözlenmiştir. Literatürde yer alan simvastatin lipit taraması çalışmalarında da benzer şekilde Maisine ve Peceol lipitlerinde yüksek simvastatin çözünürlüğü gözlenirken Labrafil M 1944 CS, Labrafac Lipophile ve oleik asitte düşük çözünürlük elde edilmiştir (227, 228).

NLT formülasyonlarında hapsedilme etkinliği etkin maddenin lipit matriksteki çözünürlüğüne bağlı olduğundan yüksek çözünürlük gözlenen lipitlerin seçilmesi formülasyon optimizasyonu açısından önemlidir. Bu nedenle elde edilen tüm sonuçlar Maisine veya Peceol sıvı lipitlerinin simvastatin NLT formülasyonu için uygun bir sıvı lipit olduğunu göstermektedir. Ancak Maisine ve Peceol kullanılarak gerçekleştirilen NLT ön formülasyon çalışmaları sonucunda Maisine içeren formülasyonlarla daha uygun partikül büyüklüğü ve dağılımları elde edildiğinden, simvastatinin yüksek çözünürlük gösterdiği sıvı lipit çeşidi olarak Maisine kullanılmasına karar verilmiştir. Bununla birlikte simvastatinin düşük çözünürlük gösterdiği bir sıvı lipitin formülasyonlar üzerindeki etkisini incelemek amacıyla düşük simvastatin çözünürlüğü elde edilen ve literatürdeki NLT formülasyonlarında da yaygın olarak kullanılan oleik asit de formülasyon çalışmaları için sıvı lipit çeşidi olarak seçilmiştir.

4.4. Nanoyapılı Lipit Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

NLT formülasyonlarının karakterizasyonu Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı şekilde partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri, etkin madde yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği çalışmaları, DSC ve FT-IR analizleri, morfolojik incelemeler, viskozite tayini, in vitro salım çalışmaları ve stabilite çalışmaları açısından değerlendirilmiştir.

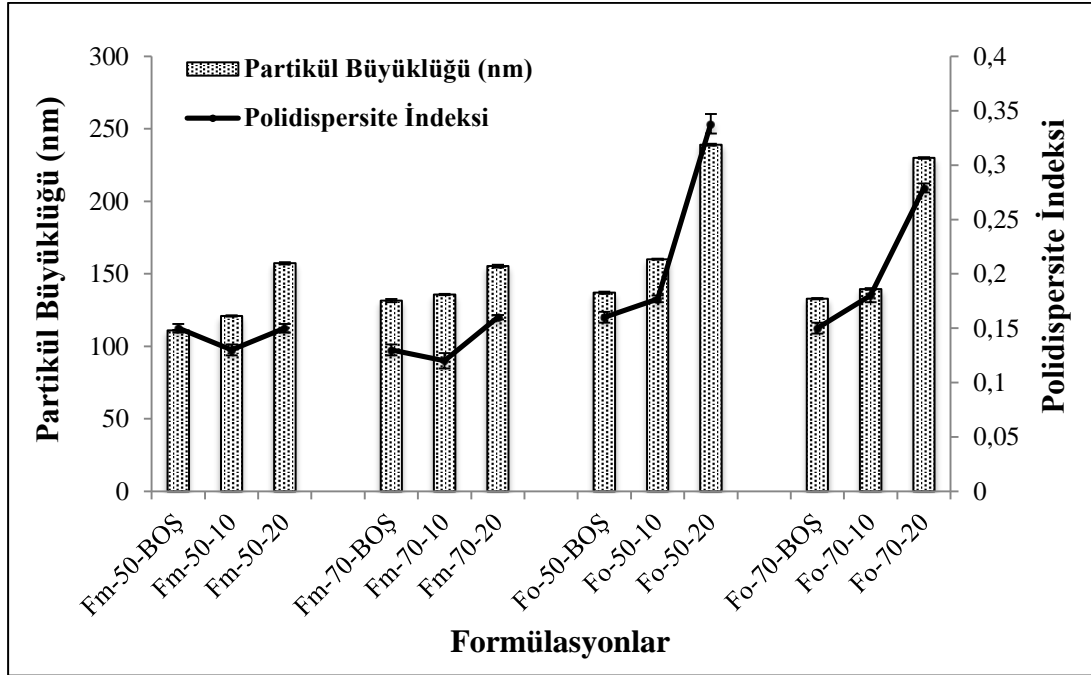
4.4.1. Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi Ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Bölüm 3.2.4.'de bahsedilen ultrafiltrasyon uygulanmamış NLT formülasyonları ve Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri foton korelasyon spektroskopisi ve lazer doppler anemometri esasına göre çalışan partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazında (Zetasizer Nanoseries-ZS) gerçekleştirilmiştir. NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi sonuçları ortalama ve standart hata ($\bar{X} \pm SH$) değerleri ile birlikte Tablo 4.8. ve Şekil 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.8. NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü (PB), zeta potansiyel (ZP) ve PDI sonuçları (n=6).

NLT Formülasyon Kodu	Ortalama PB (nm) $\bar{X} \pm SH$	PDI $\bar{X} \pm SH$	1. PB Piki (nm) $\bar{X} \pm SH$	1. PB Piki % $\bar{X} \pm SH$	ZP (mV) $\bar{X} \pm SH$
Fm-50-BOŞ	110,95±0,26	0,15±0,00	131,00±1,32	100,00±0,00	-17,23±0,18
Fm-70-BOŞ	131,58±1,17	0,13±0,01	153,48±1,55	100,00±0,00	-17,03±0,89
Fo-50-BOŞ	136,97±0,75	0,16±0,01	162,75±1,38	100,00±0,00	-23,78±1,04
Fo-70-BOŞ	132,80±0,46	0,15±0,01	158,03±1,19	99,83±0,17	-29,42±0,33
Fm-50-10	120,92±0,45	0,13±0,01	141,13±1,10	100,00±0,00	-20,77±0,99
Fm-70-10	135,75±0,39	0,12±0,01	154,68±1,71	100,00±0,00	-23,9±0,96
Fm-50-20	157,27±0,83	0,15±0,00	188,67±2,18	100,00±0,00	-29,65±0,21
Fm-70-20	155,28±1,09	0,16±0,00	196,27±9,29	99,55±0,29	-25,30±0,22
Fo-50-10	160,13±0,39	0,18±0,00	196,90±1,61	99,92±0,08	-28,60±0,32
Fo-70-10	139,60±0,46	0,18±0,01	170,40±2,23	99,82±0,18	-27,82±0,64
Fo-50-20	239,02±0,71	0,34±0,01	375,85±24,84	98,37±0,60	-33,37±0,31
Fo-70-20	229,93±0,57	0,28±0,00	322,60±10,22	99,13±0,52	-35,57±0,21

*m: Maisine, o: Oleik asit.



Şekil 4.6. NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi grafiği (n=6).

Sonuçlar incelendiğinde, Maisine içeren NLT formülasyonlarının 0,16 ve altında bir PDI değeri ile 110,95 nm-157,27 nm arasında değişen partikül büyüklüklerine sahip oldukları görülmektedir. Kullanılan sıvı lipit oleik asit ile değiştirildiğinde ise en yüksek PDI değerinin 0,34'e kadar yükseldiği ve partikül büyüklüklerinin de 132,80 nm'den 239,02 nm'ye kadar daha geniş bir aralıkta değiştiği gözlemlenmiştir.

PDI değerleri 0,25'den küçük olan formülasyonlar monodispers ve dar bir partikül büyüklüğü dağılımı göstermektedir (60). Hazırlanan NLT formülasyonlarında % 20 etkin madde içeren oleik asitli formülasyonlar dışında tüm formülasyonlar 0,18 ve altında bir PDI değerine sahip olduğundan istenilen partikül büyüklüğü dağılımı elde edilmiştir. Bununla birlikte tüm formülasyonlar %100 ve %100'e yakın bir partikül büyüklüğü pik yüzdesine sahip olduğundan tek tepeli bir dağılım gösterdikleri kabul edilerek partikül büyüklüklerinin karşılaştırılmasında ortalama partikül büyüklüğü (Z-Average) değerleri kullanılmıştır. Literatürde yer alan simvastatin ile yüklenmiş, yüksek stabilite ve uygun bir kontrollü salım sonuçları elde edilen lipit nanopartikül formülasyonları üzerinde yapılan çalışmalarda partikül büyüklüğünün yaklaşık olarak 100 nm-300 nm aralığında

değiştirdiği gözlemlenmiştir (56, 99, 205, 229). Elde edilen sonuçlarda tüm formülasyonların partikül büyüklükleri 110,95 nm-239,02 nm aralığında değiştiğinden bu sonuçlar daha önce yapılmış olan literatür çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur.

Hazırlanan formülasyonlar negatif bir zeta potansiyel değerine sahiptir. Etkin madde içeren tüm formülasyonların zeta potansiyel değerleri -20,77 mV ile -35,57 mV arasında değişmektedir, bu sonuçlar ideal bir stabilizasyon için olması gereken 20 mV-30 mV aralığını karşıladığından elde edilen tüm formülasyonların elektrostatik olarak stabil olduklarından bahsedilebilir (60, 66, 230).

Maisine ile hazırlanan formülasyonlarda sıvı lipit miktarının artması ile % 20 etkin madde içeren Fm-50-20 ve Fm-70-20 formülasyonları arasında partikül büyüklüğünün değişmediği ($p>0,05$) zeta potansiyel değerlerinin ise azaldığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Etkin madde içermeyen ve %10 simvastatin yüklü diğer Maisine formülasyonlarında ise sıvı lipit miktarı arttıkça partikül büyüklüğü artmakta ($p<0,05$) zeta potansiyel değerleri ise değişmemektedir ($p>0,05$). Oleik asit içeren formülasyonlarda ise sıvı lipit miktarı arttıkça partikül büyüklüğü azalmaktadır ($p<0,05$). Literatürde yer alan çalışmalar, oleik asit içeren formülasyonlar için elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak sıvı lipit miktarının artması ile partikül büyüklüğünün azaldığını göstermektedir (231, 232). Bu formülasyonların zeta potansiyel değerleri karşılaştırıldığında %10 simvastatin yüklü Fo-50-10 ve Fo-70-10 arasında fark bulunmazken ($p>0,05$) diğer oleik asitli formülasyonlarda sıvı lipit miktarının artması ile zeta potansiyel değerlerinin de arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Maisine içeren formülasyonların tümünde etkin madde miktarının artması partikül büyüklüğünün artmasına neden olmuştur ($p<0,05$). Zeta potansiyel sonuçlarında ise benzer şekilde Fm-70-10 ve Fm-70-20 ikili karşılaştırması ($p>0,05$) haricinde zeta potansiyel değerleri etkin madde miktarının artırılması ile artmaktadır ($p<0,05$). Oleik asitli formülasyonlarda ise, Maisine içeren formülasyonlara benzer şekilde etkin madde miktarının artırılması partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli

artırmakta ve özellikle bu etki %20 simvastatin içeren formülasyonlarda daha belirgin bir artışa neden olmaktadır ($p<0,05$).

Genel olarak Maisine'den oleik asite geçildiğinde tüm formülasyonlarda partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ile birlikte zeta potansiyel artmaktadır ($p<0,05$), yalnız Fm-70-BOŞ ve Fo-70-BOŞ formülasyonları arasında partikül büyüklüğü ve PDI, Fm-50-BOŞ ve Fo-50-BOŞ formülasyonları arasında ise PDI değerlerinde fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Bu durum, Maisine içeren formülasyonların, oleik asitlere göre daha küçük partiküllerden oluşan, daha dar bir partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak zeta potansiyel değerlerinin daha düşük olması oleik asitli formülasyonların elektrostatik ve sterik stabilizasyonun daha kuvvetli olduğunu göstermektedir.

Hazırlanan NLT formülasyonları doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanması aşamasında ultrafiltrasyonla konsantre edilecektir. Bu nedenle ultrafiltrasyon işleminin formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel sonuçları üzerindeki etkisini göstermek amacıyla in vivo çalışmalar için seçilmiş olan Fm-50-BOŞ ve Fm-50-20 formülasyonları 2 ve 5 kat ultrafiltre edilmiş ve partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri ölçülerek karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar $\bar{X} \pm SH$ değerleri ile birlikte Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Ultrafiltrasyon uygulanmış NLT formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI Sonuçları (n=6).

NLT Formülasyon Kodu	Ortalama PB (nm) $\bar{X} \pm SH$	PDI $\bar{X} \pm SH$	1. PB Piki (nm) $\bar{X} \pm SH$	1. PB Piki % $\bar{X} \pm SH$	ZP (mV) $\bar{X} \pm SH$
Fm-50-BOŞ	110,95±0,26	0,15±0,00	131,00±1,32	100,00±0,00	-17,23±0,18
Fm-50-BOŞ-UF(2KAT)	111,30±0,72	0,14±0,01	131,42±1,57	100,00±0,00	-17,03±0,36
Fm-50-BOŞ-UF(5KAT)	111,37±0,16	0,15±0,01	131,65±1,23	100,00±0,00	-23,90±0,56
Fm-50-20	157,27±0,83	0,15±0,00	188,67±2,18	100,00±0,00	-29,65±0,21
Fm-50-20-UF(2KAT)	158,15±1,23	0,16±0,00	189,95±2,37	100,00±0,00	-33,83±0,29
Fm-50-20-UF(5KAT)	158,12±1,07	0,17±0,01	190,20±2,41	100,00±0,00	-32,42±0,59

*m: Maisine, UF: ultrafiltrasyon, UF(2KAT): 2 kat ultrafiltrasyon, UF(5KAT): 5 kat ultrafiltrasyon.

Fm-50-BOŞ ve Fm-50-20 formülasyonlarının 2 ve 5 kat ultrafiltre edilmesi sonucunda elde edilen tüm formülasyonların ultrafiltrasyon öncesi ve sonrası partikül büyüklükleri ve PDI değerleri arasında fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Zeta potansiyel sonuçları değerlendirildiğinde ise, Fm-50-BOŞ formülasyonunun 2 kat ve 2 kat konsantre edilmiş Fm-50-20 formülasyonunun ise 5 kat konsantre edilmesi zeta potansiyel değerlerinde farklılığa yol açmazken ($p>0,05$) diğer formülasyonlarda her konsantrasyon işlemi sonrası zeta potansiyel değerleri artmıştır ($p<0,05$). Elde edilen bu sonuçlar ultrafiltrasyon işleminin formülasyonların partikül büyüklüğü ve dağılımı özelliklerini değiştirmedeğini ancak zeta potansiyel değerlerinde artışa neden olabileceklerini göstermektedir.

4.4.2. Etkin Madde Yükleme Kapasitesi ve Hapsedilme Etkinliği Çalışmaları

Bölüm 3.2.4.'de bahsedilen etkin madde ile yüklenmiş Fm-50-10, Fm-50-20, Fm-70-10, Fm-70-20, Fo-50-10, Fo-50-20, Fo-70-10 ve Fo-70-20 NLT formülasyonları için % etkin madde yükleme kapasitesi ve % hapsedilme etkinliği değerleri Bölüm 3.2.6.'da analtıldığı gibi NLT formülasyonlarının ultrafiltrasyonu

sonucunda elde edilen filtrattan serbest simvastatinin tayin edilmesi sonucunda belirlenen total simvastatin miktarı, total lipit miktarı ve serbest simvastatin miktarı kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.3. ve 3.4.). Elde edilen sonuçlar Tablo 4.10.'da verilmektedir.

Tablo 4.10. Etkin madde ile yüklenmiş NLT formülasyonlarına ait serbest simvastatin konsantrasyonu, % etkin madde yükleme kapasitesi ve % hapsedilme etkinliği değerleri (n=6).

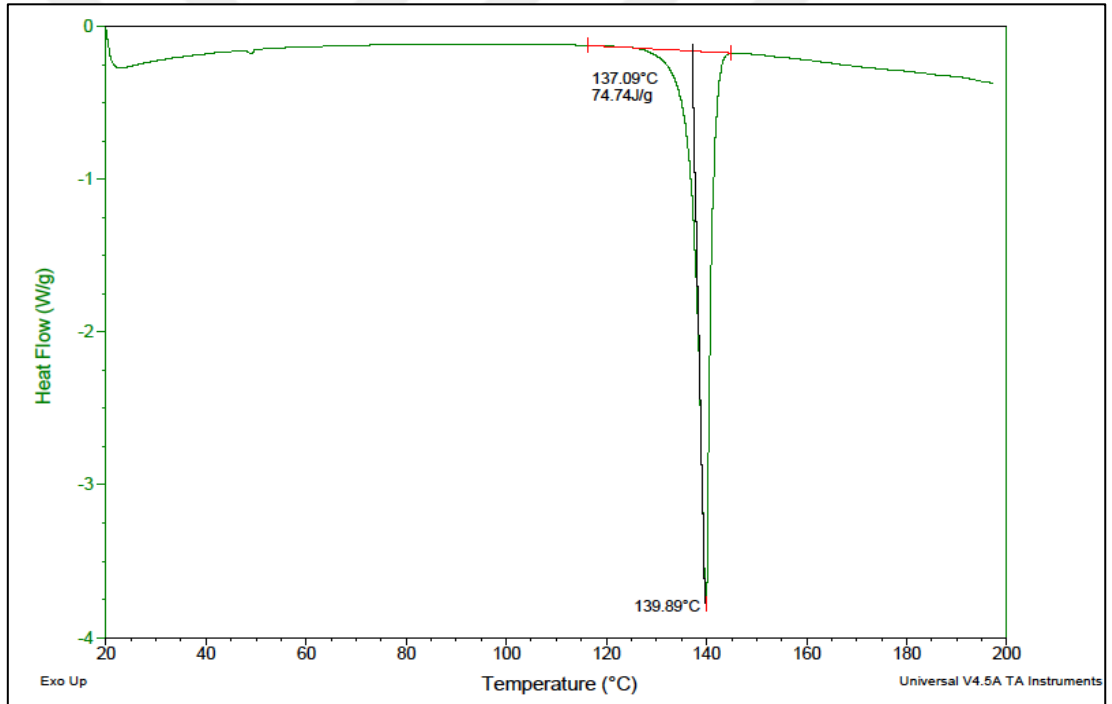
NLT Formülasyon Kodu	Serbest Simvastatin Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm \text{SH}$	% Etkin Madde Yükleme Kapasitesi $\bar{X} \pm \text{SH}$	% Hapsedilme Etkinliği $\bar{X} \pm \text{SH}$
Fm-50-10	0,015 \pm 0,001	99,999 \pm 0,000	10,020 \pm 0,000
Fm-50-20	0,163 \pm 0,002	99,997 \pm 0,000	20,080 \pm 0,000
Fm-70-10	0,014 \pm 0,001	99,999 \pm 0,000	10,021 \pm 0,000
Fm-70-20	0,755 \pm 0,006	99,987 \pm 0,000	20,077 \pm 0,000
Fo-50-10	0,014 \pm 0,001	99,999 \pm 0,000	10,020 \pm 0,000
Fo-50-20	0,042 \pm 0,002	99,999 \pm 0,000	20,080 \pm 0,000
Fo-70-10	0,010 \pm 0,001	100,000 \pm 0,000	10,020 \pm 0,000
Fo-70-20	0,298 \pm 0,011	99,994 \pm 0,000	20,079 \pm 0,000

Etkin madde yükleme kapasitesi geliştirilen tüm formülasyonlar için yaklaşık olarak %100 bulunmuştur ($p > 0,05$). Yüksek yükleme kapasitesi hapsedilme etkinliğinin de beklenen en üst düzeyde çıkmasına yol açmıştır. Simvastatin formülasyonlara total lipit miktarının %10 (a/a)'u ve %20 (a/a)'si kadar yüklendiğinden hapsedilme etkinliği sonuçları da %10 ($p > 0,05$) ve %20 olarak ($p > 0,05$) değişmektedir. Elde edilen yüksek yükleme kapasitesi ve hapsedilme etkinliği değerleri partiküllerin yüzeyine adsorbe olmuş ve nanopartikül çekirdeğine yüklenmiş olan simvastatin yüzdesini göstermektedir. Hazırlanan NLT formülasyonlarında doku iskelelerinin hazırlanması aşamasında dispersiyon halinde direkt kullanılacaktır. Bu nedenle sadece nanopartikül çekirdeğine yüklenmiş olan simvastatin değil aynı zaman da partikül yüzeyine adsorbe olmuş simvastatin kristalleri de bu çalışma için önemli olup yüklenen simvastatin miktarını oluşturmaktadır. Bununla birlikte yüzeye adsorbe olmuş olan simvastatinin hızlı

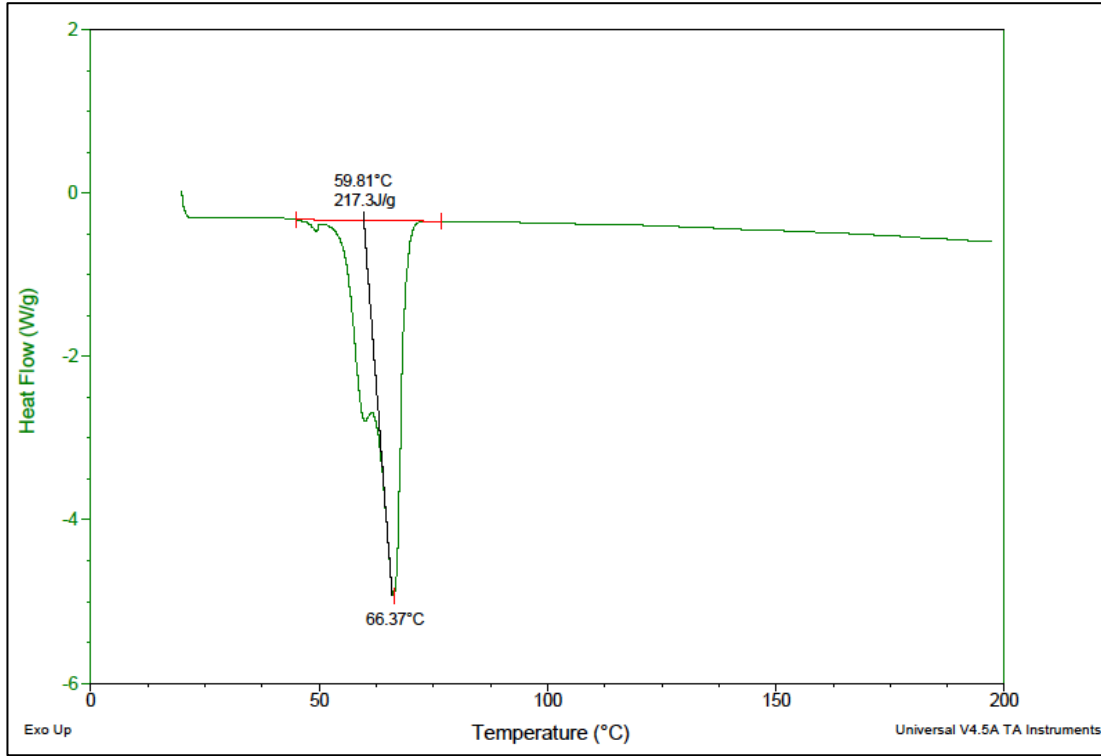
salımı ile başlangıç dozu sağlanırken çekirdeğe hapsedilmiş olan simvastatin ile uzatılmış bir salım elde edilmesi amaçlanmaktadır.

4.4.3. DSC Analizi

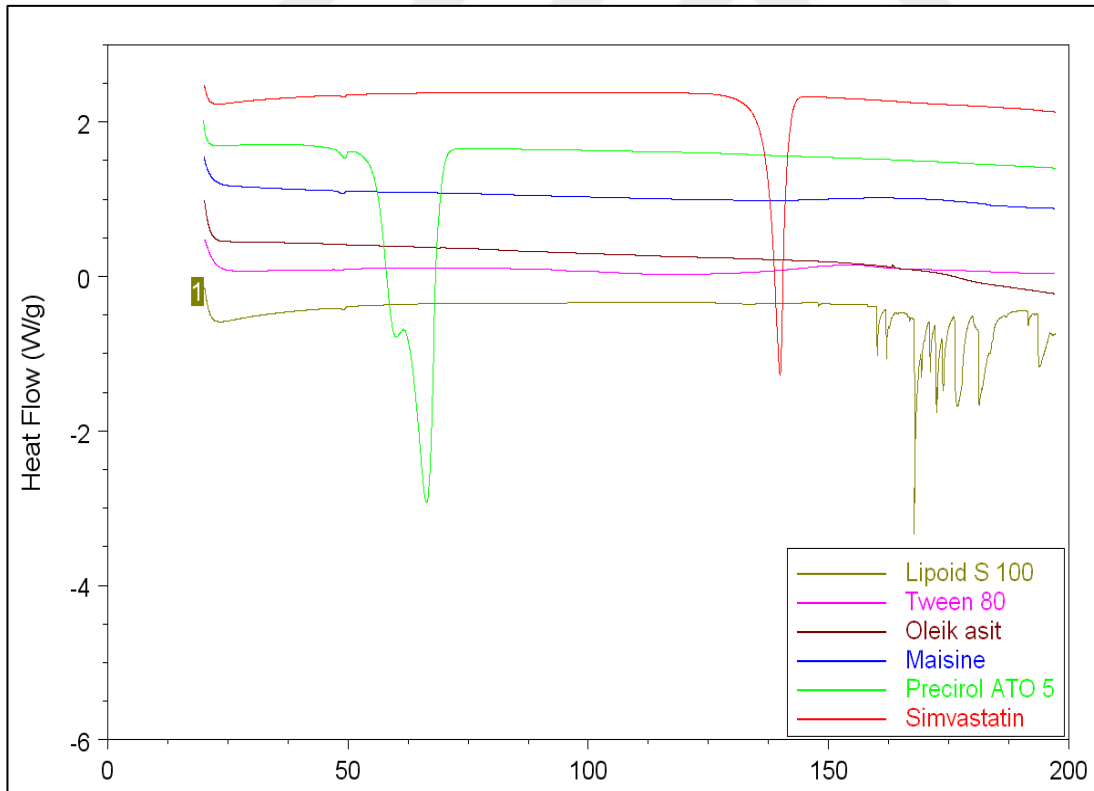
Bölüm 3.2.4.'de bahsedilen Fm-50-BOŞ, Fm-50-10, Fm-50-20, Fm-70-BOŞ, Fm-70-10, Fm-70-20, Fo-50-BOŞ, Fo-50-10, Fo-50-20, Fo-70-BOŞ, Fo-70-10 ve Fo-70-20 NLT formülasyonları, Simvastatin, Precirol ATO 5, Maisine, oleik asit, Tween 80, Lipoid S100 ve Fm-50-20 formülasyonuna ait lipit matrisin fiziksel ve eriyik haldeki karışımları Bölüm 3.2.6.'da belirtildiği şekilde 10°C/dk ısıtma hızında, 20–200°C aralığında diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC Q100) cihazı ile analiz edilmiş ve Şekil 4.7.-4.12.'de verilen DSC termogramları elde edilmiştir.



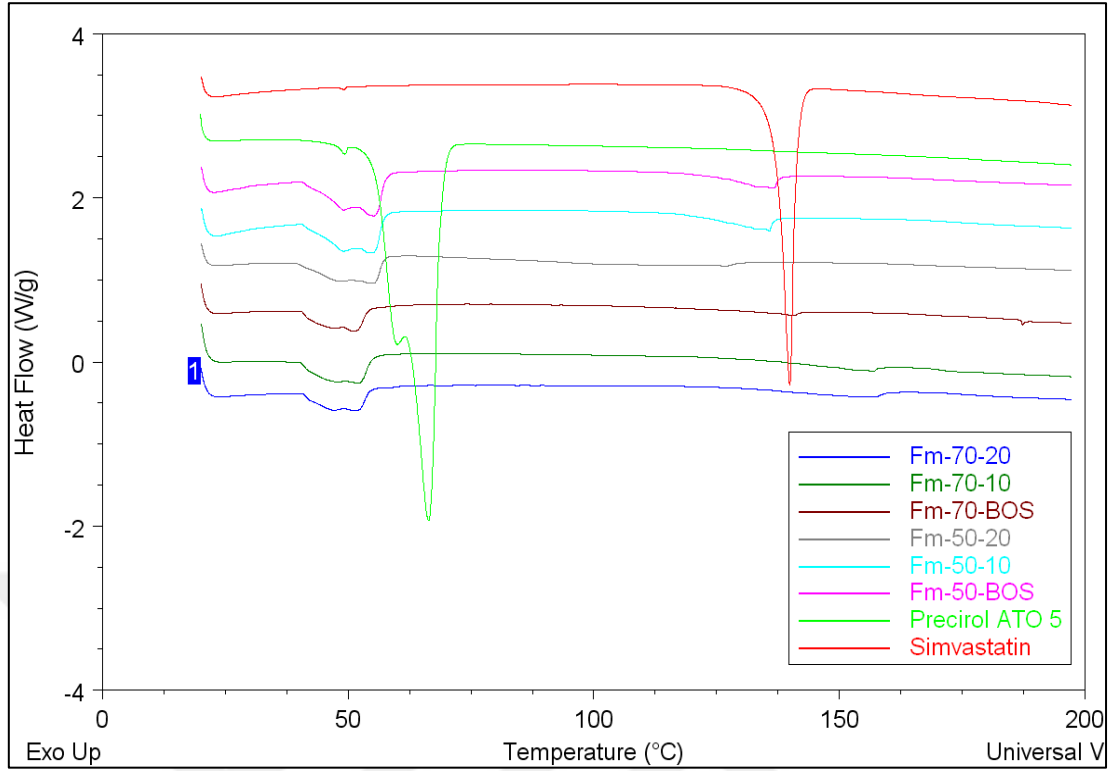
Şekil 4.7. Simvastatinin DSC termogramı.



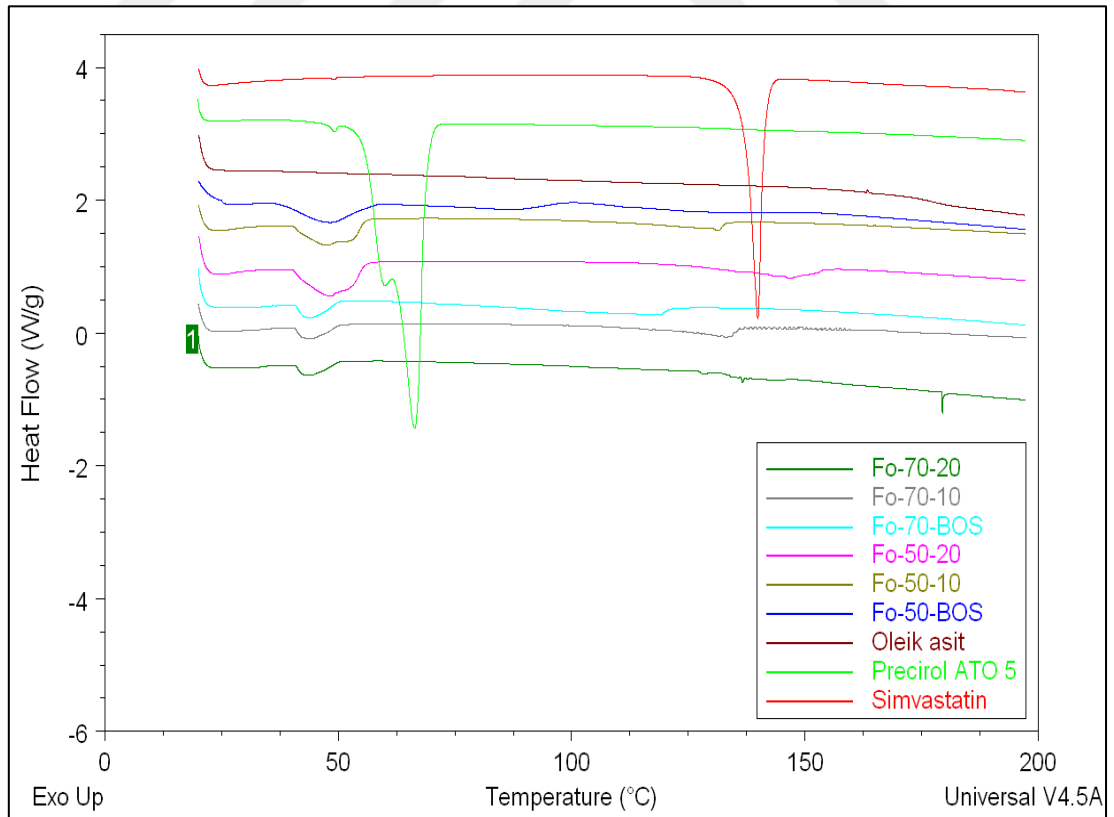
Şekil 4.8. Precirol ATO 5'in DSC termogramı.



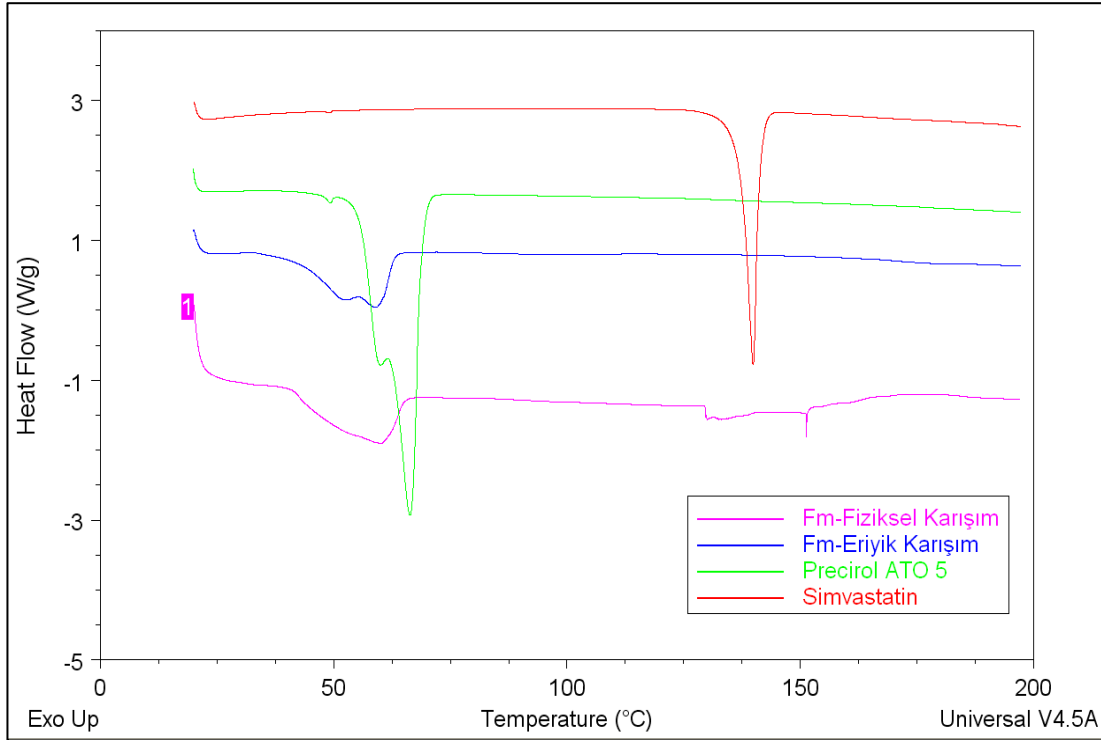
Şekil 4.9. NLT formülasyon bileşenlerinin DSC termogramları.



Şekil 4.10. Simvastatin, Precirol ATO 5 ve Maisine kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarının DSC termograflarının karşılaştırılması.



Şekil 4.11. Simvastatin, Precirol ATO 5 ve oleik asit kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarının DSC termograflarının karşılaştırılması.



Şekil 4.12. Simvastatin, Precirol ATO 5 ve Fm-50-20 formülasyonuna ait lipit matriksin fiziksel ve eriyik karışımlarının DSC termogramlarının karşılaştırılması.

Saf simvastatine ait termogramda (Şekil 4.7.) yaklaşık olarak $139,8^{\circ}\text{C}$ 'de, $74,74 \text{ J/g}$ entalpi ile tek bir keskin endotermik erime piki gözlenmektedir. Erimenin başladığı sıcaklık ise tahmini olarak 137°C 'dir. Elde edilen bu erime dereceleri, Bölüm 4.1.3'de gerçekleştirilen simvastatin erime derecesi tayini analizi sonucunda gözlenen $132\text{-}136^{\circ}\text{C}$ erime derecesi aralığı ile benzer değerlerdir. Bununla birlikte literatürde yer alan simvastatin DSC analizi sonuçlarında da araştırmacılar benzer sonuçlar elde etmişlerdir (78, 207). Saf halde Precirol ATO 5 katı lipitin DSC analizi sonucunda $66,4^{\circ}\text{C}$ sıcaklık değerinde gözlenen spesifik bir endotermik erime piki görülmektedir (Şekil 4.8.). Erime başlangıç noktası yaklaşık olarak $59,8^{\circ}\text{C}$ olup, katı lipitin α polimorfik formunun erimesi sonucu oluşan belirgin bir omuz yapısı gözlenmektedir. Elde edilen Precirol ATO 5 termogramı literatürde yer alan termogramla oldukça benzerlik göstermektedir (77). NLT formülasyonlarının yapısına katılan Maisine, oleik asit, Tween 80 ve Lipoid S100 ait termogramlarda maddenin yapısına ait polimorfik ve termal özellikleri gösteren herhangi pik görülmemiştir.

Liyofilize NLT formülasyonlarına ait DSC analizlerinin tümünde benzer termogram sonuçları elde edilmiştir (Şekil 4.10-4.11). Katı lipitin yapısına sıvı lipit eklenmesi ve nano boyutlarda lipit partiküllerin hazırlanması, saf lipit materyalin termal davranışında belirgin farklılıklara neden olmaktadır. Sıvı lipitin yapıya girmesi Precirol ATO 5'in erime noktası ve entalpisinde düşmeye neden olmuştur. Tüm Liyofilize NLT formülasyonlarında, Precirol ATO 5'in daha düşük sıcaklıklarda gözlenen, daha geniş ve baskılanmış bir endotermik erime piki gözlenmektedir. Bununla birlikte yaklaşık 139,8°C'de gözlenen saf simvastatine ait erime geçiş piki NLT formülasyonlarının hiçbirinde gözlenmemiştir.

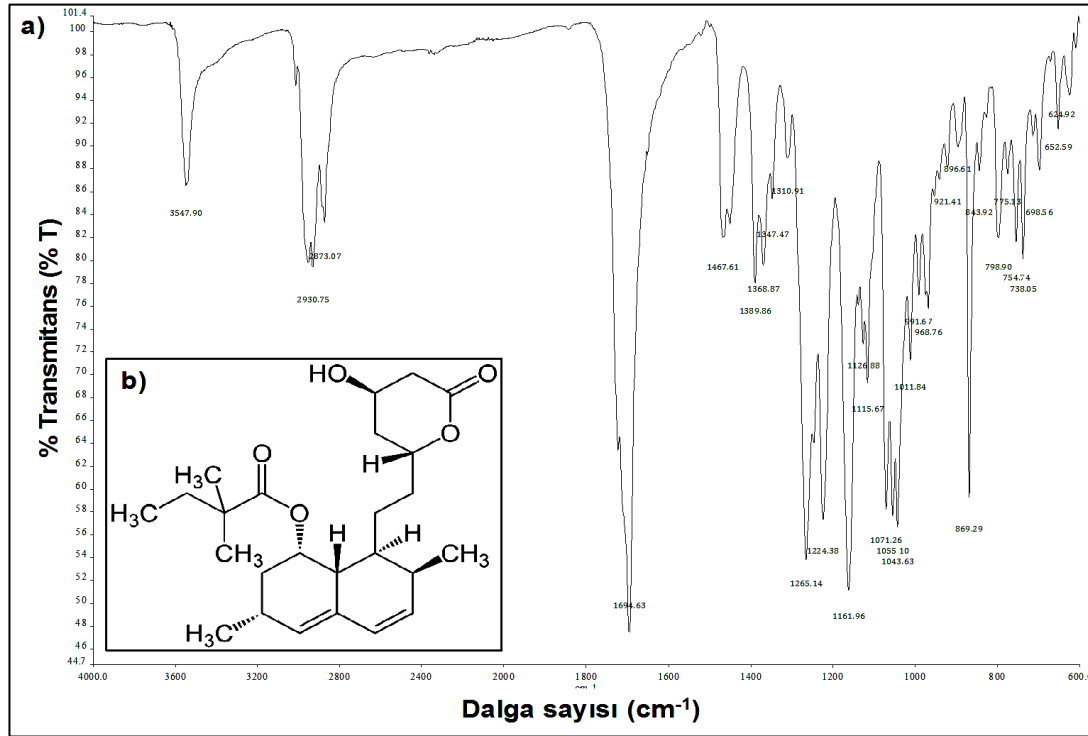
Fiziksel karışım ve eriyik halde bulunan matriks karışımlarının DSC çalışmaları sonucunda da simvastatinin lipit matriksle etkileşimi daha açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Eriyik lipit matriks karışımında simvastatine ait erime piki gözlenmezken fiziksel karışımında simvastatinin erime derecesinin gözlendiği sıcaklıklarda baskılanmış ve genişlemiş bir endotermik erime piki gözlenmektedir (Şekil 4.12).

Formülasyonların tümünde ve eriyik lipit matriks karışımında simvastatinin erime geçişine ait pik bulunmaması, etkin maddenin lipit matriks içerisinde tamamen çözüldüğünü göstererek, simvastatinin %100'e yakın olan yükleme kapasitesi sonuçlarını da doğrulamaktadır.

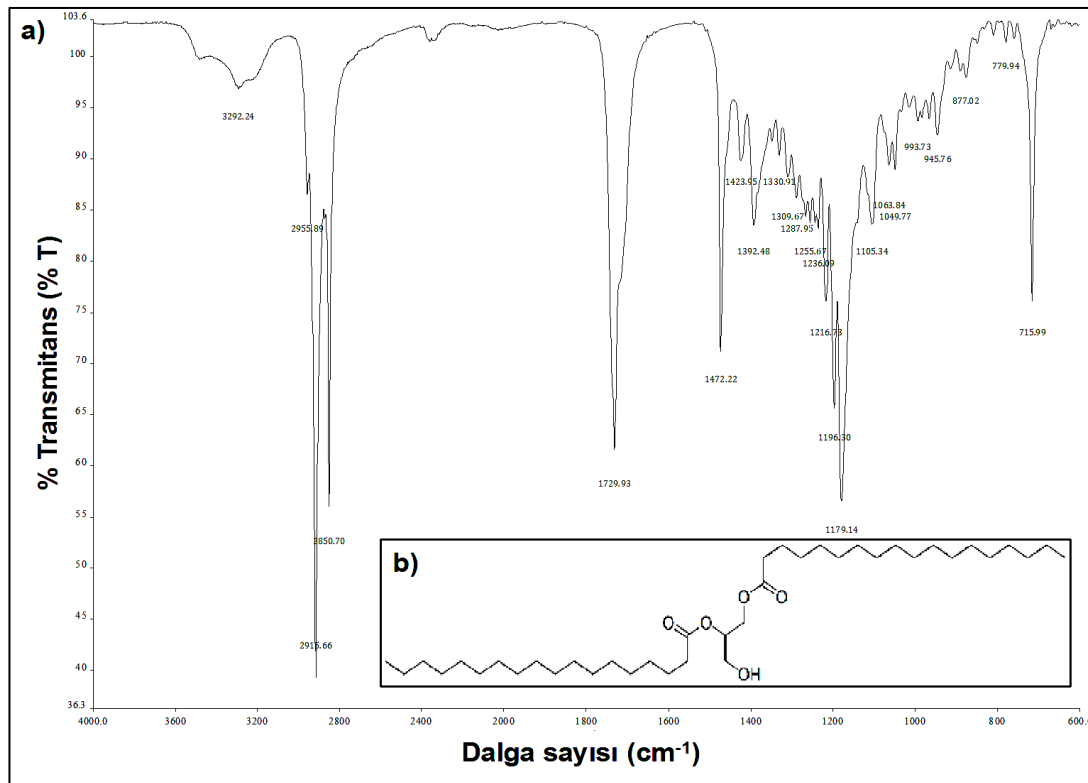
4.4.4. FT-IR Analizi

NLT formülasyon ekspiyanları ve simvastatin arasındaki etkileşimleri incelemek amacıyla FT-IR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. NLT formülasyonlarının yapısına katılan; simvastatin, Precirol ATO 5, Lipoid S100 ve sıvı özellikteki Maisine, oleik asit, Tween 80 formülasyon bileşenlerinin ve Bölüm 3.2.4.'de bahsedilen Fm-50-BOŞ, Fm-50-10, Fm-50-20, Fm-70-BOŞ, Fm-70-10, Fm-70-20, Fo-50-BOŞ, Fo-50-10, Fo-50-20, Fo-70-BOŞ, Fo-70-10 ve Fo-70-20 NLT formülasyonlarının FT-IR spektrumu, Perkin Elmer FT-IR cihazında Attenuated Total Reflectance (ATR) aparatı kullanılarak alınmış ve dalga sayısı (cm^{-1}) cinsinden

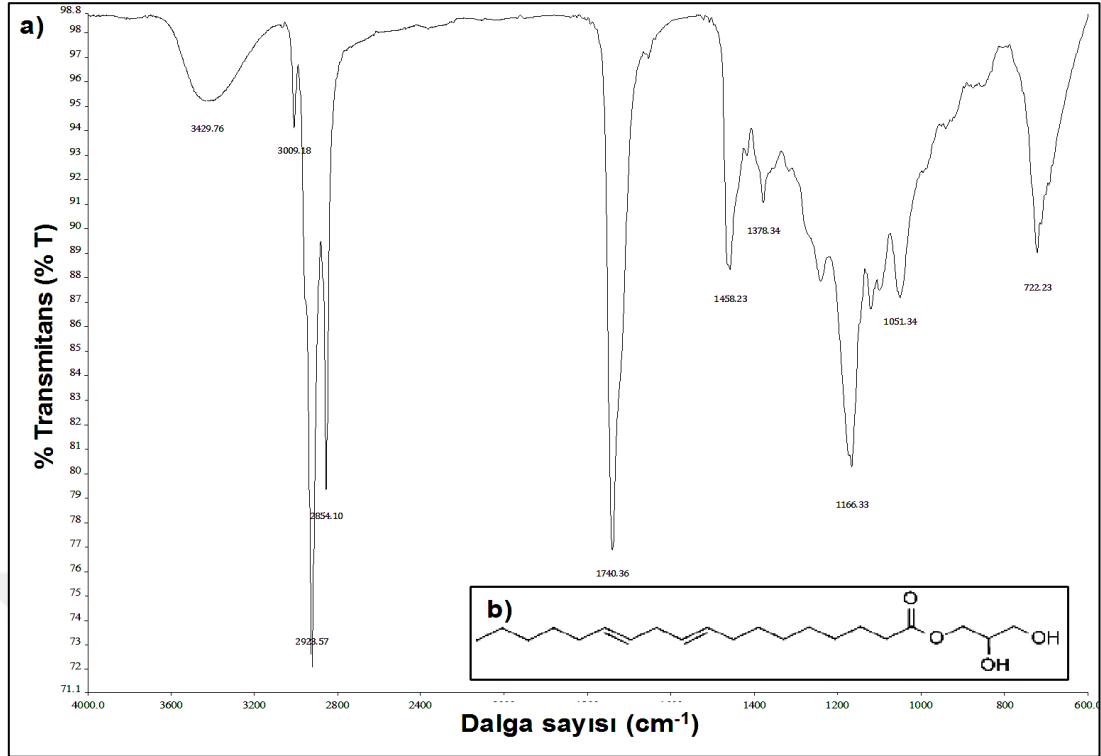
değerlendirilmiştir. Elde edilen spektrumlar maddelerin kimyasal yapıları ile birlikte Şekil 4.13.-4.22.'de gösterilmektedir.



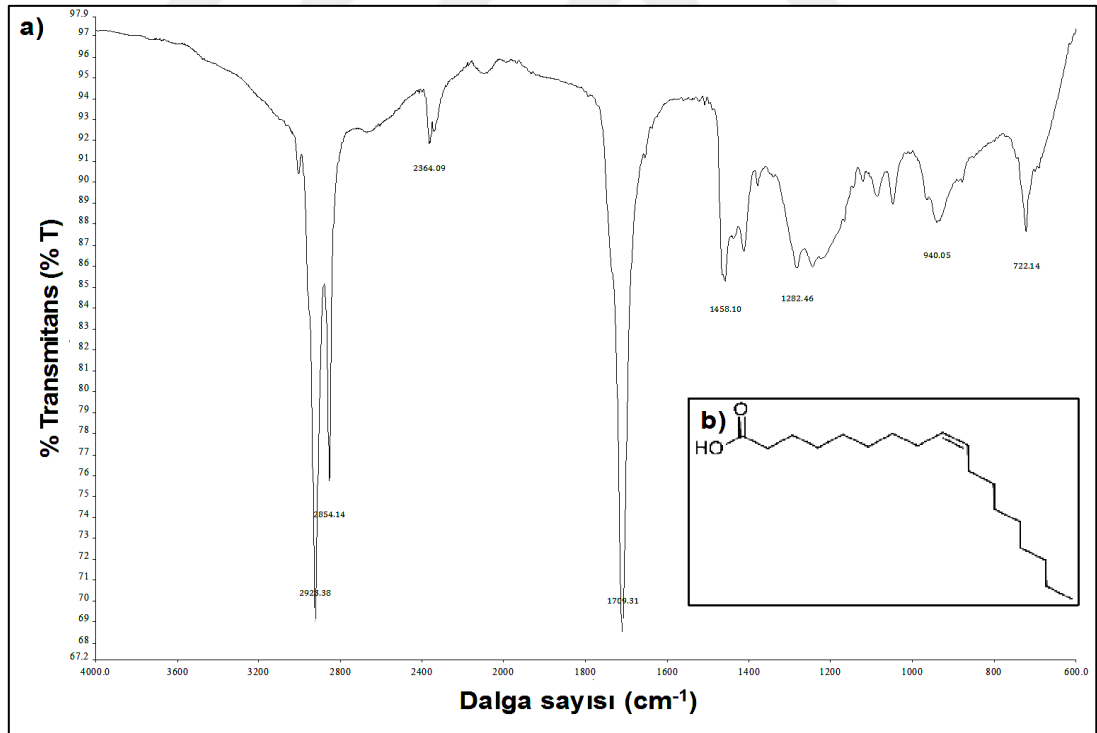
Şekil 4.13. Simvastatinin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı (193).



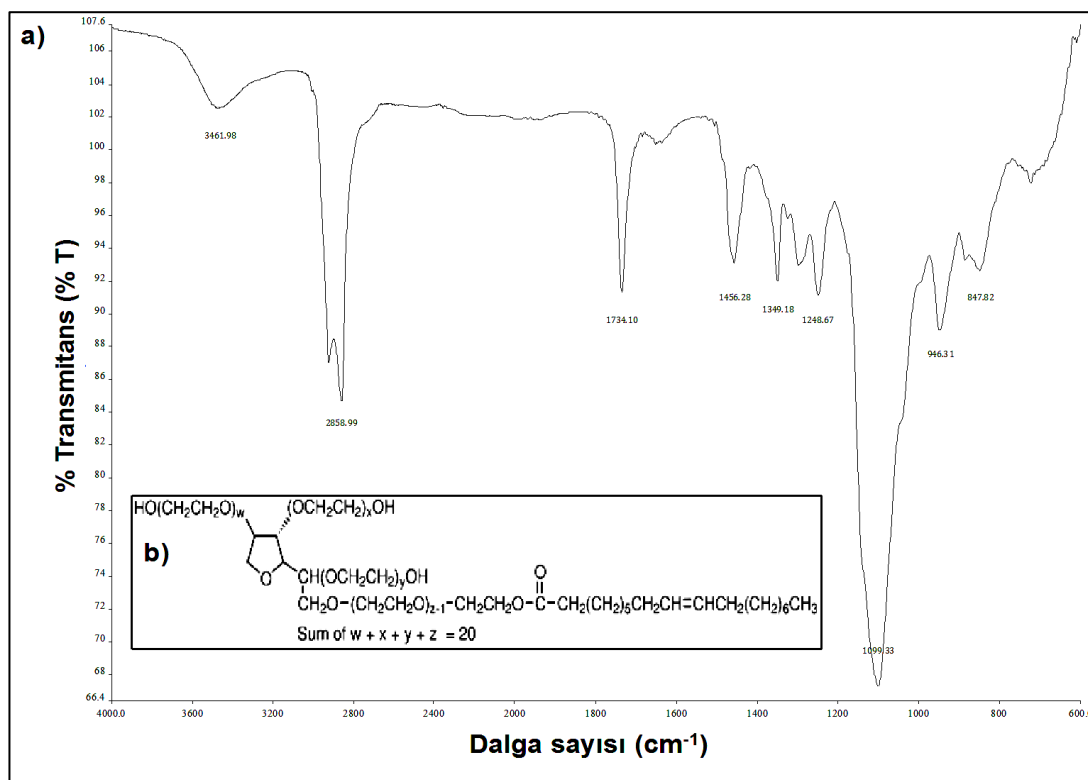
Şekil 4.14. Precirol ATO 5'in a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı (233).



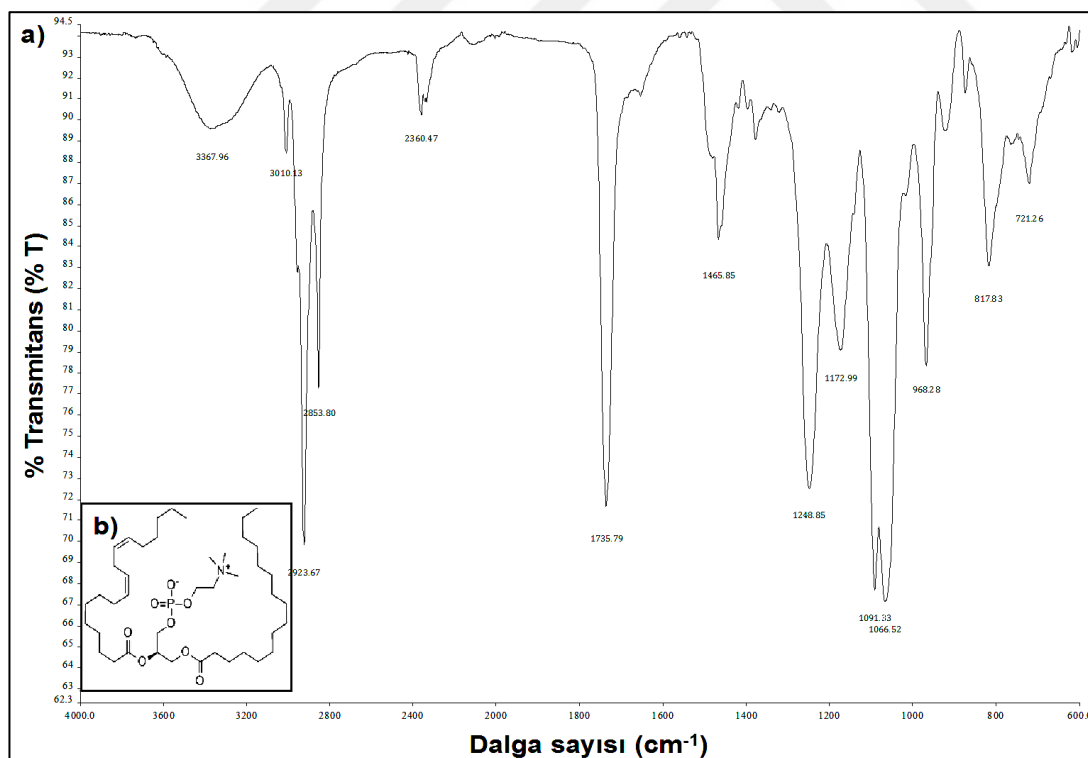
Şekil 4.15. Maisine'nin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı (234).



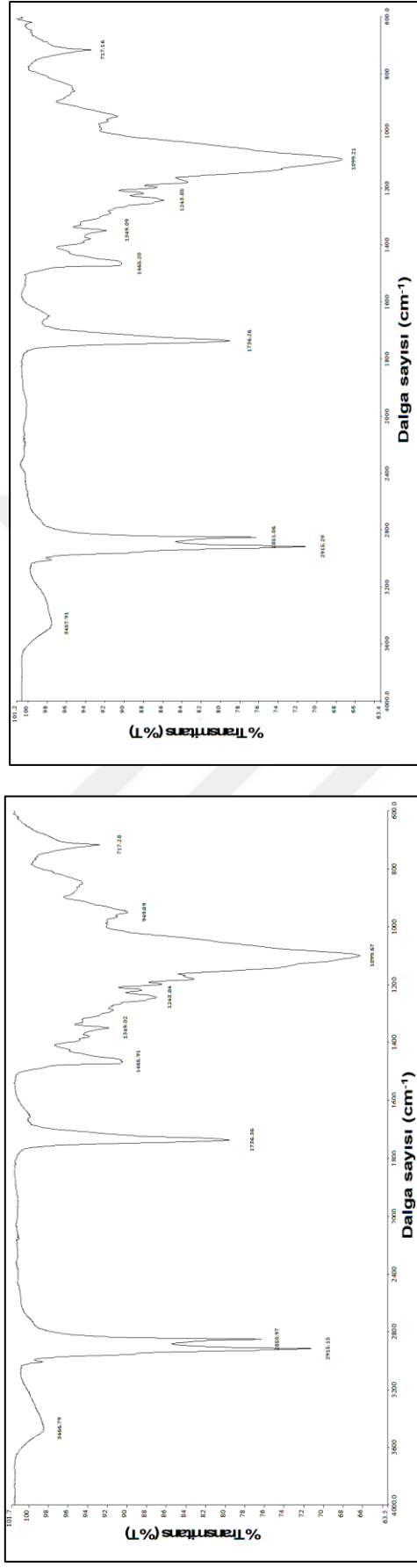
Şekil 4.16. Oleik asitin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı (235).



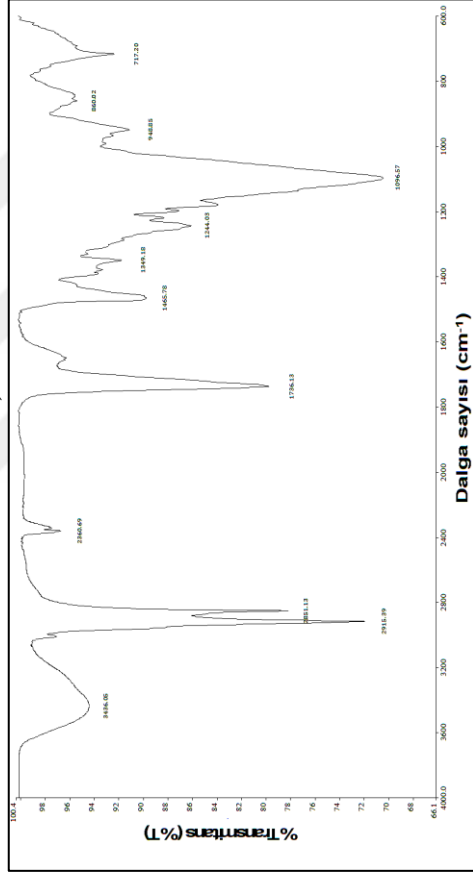
Şekil 4.17. Tween 80'nin a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı (236).



Şekil 4.18. Lipoid S100'ün a) FT-IR spektrumu b) kimyasal yapısı (237).



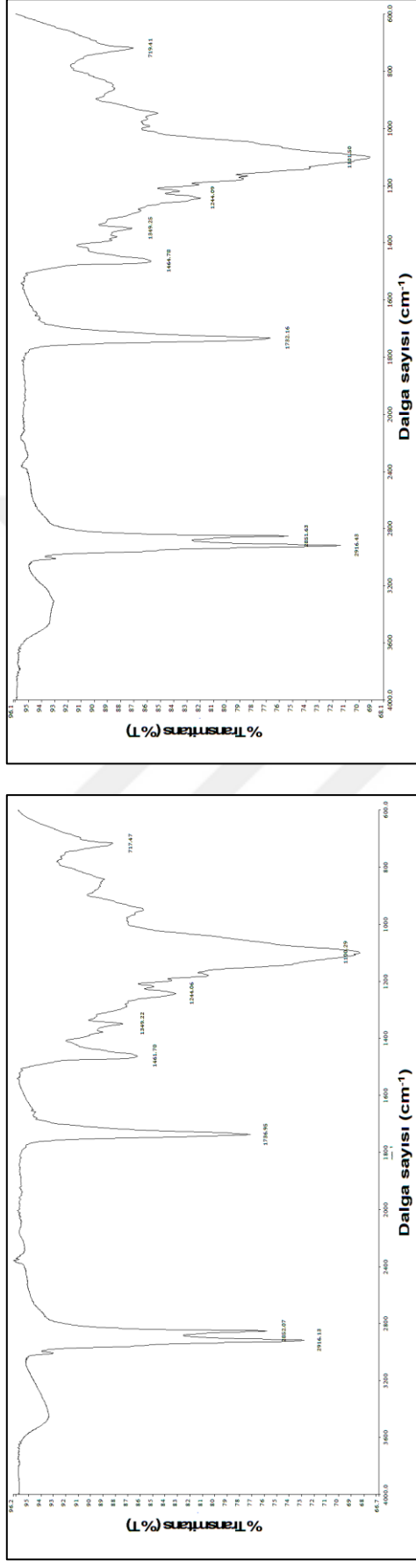
a) Fm-50-BOŞ



c) Fm-50-20

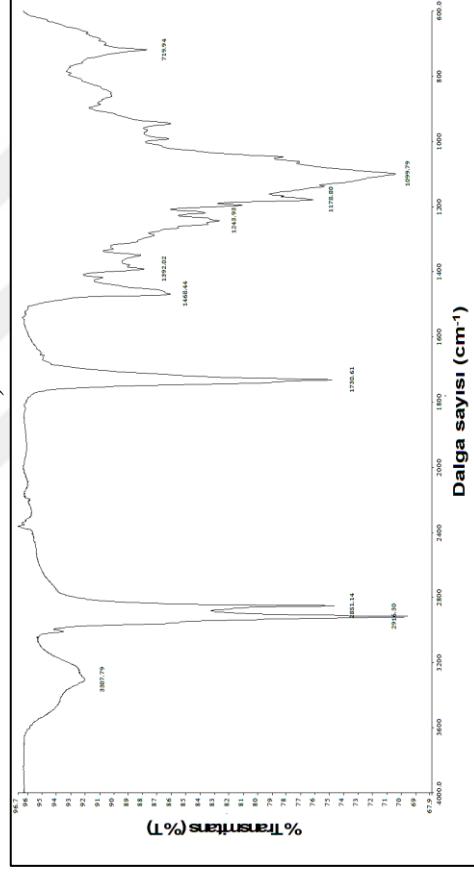
b) Fm-50-10

Şekil 4.19. Maisine kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fm-50-BOŞ b) Fm-50-10 c) Fm-50-20.



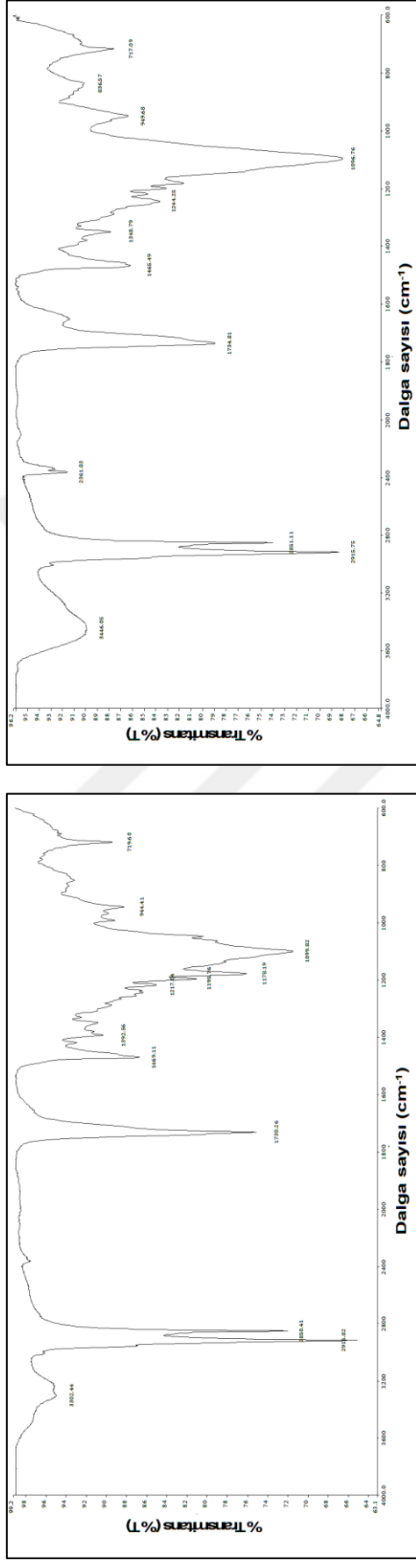
a) Fm-70-BOŞ

b) Fm-70-10

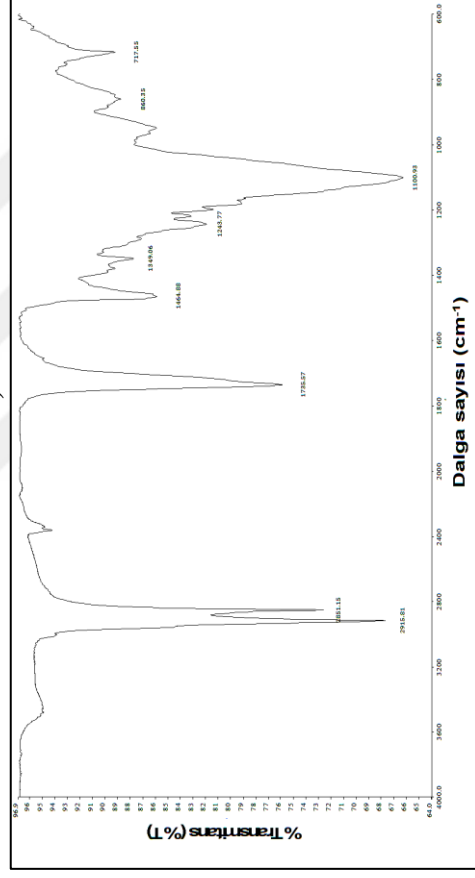


c) Fm-70-20

Şekil 4.20. Maisine kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fm-70-BOŞ b) Fm-70-10 c) Fm-70-20.



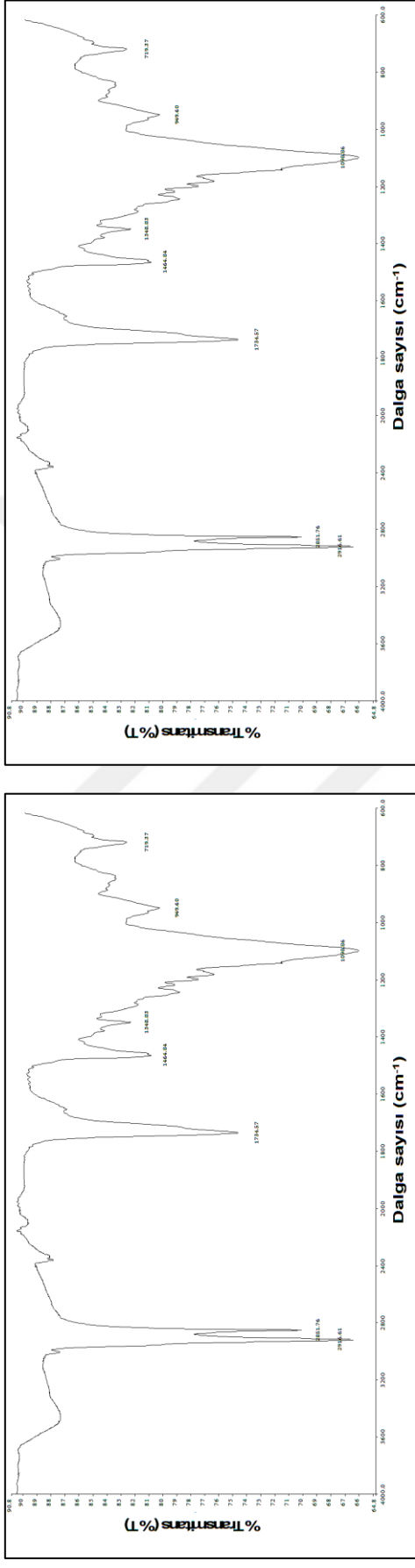
a) Fo-50-BOŞ



c) Fo-50-20

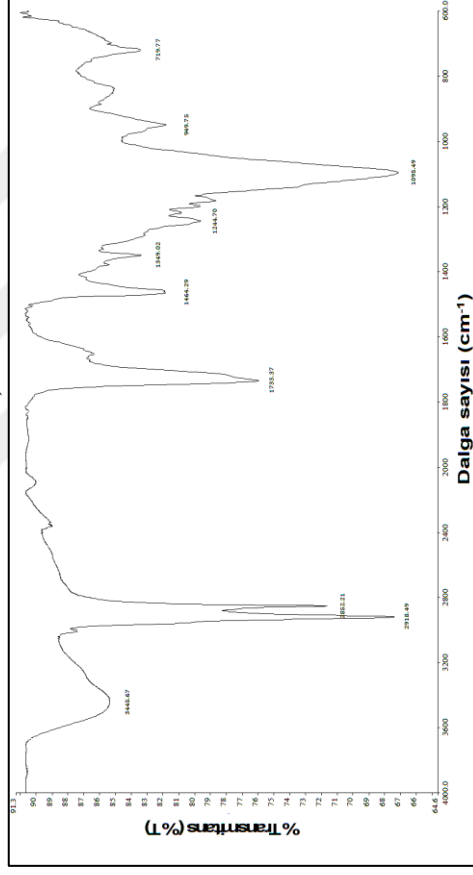
b) Fo-50-10

Şekil 4.21. Oleik asit kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fo-50-BOŞ b) Fo-50-10 c) Fo-50-20.



a) Fo-70-BOŞ

b) Fo-70-10



c) Fo-70-20

Şekil 4.22. Oleik asit kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları a) Fo-70-BOŞ b) Fo-70-10 c) Fo-70-20.

Simvastatine ait FT-IR spektrumunda, maddenin yapısına özgü olan, şiddetli etilenik C-H gerilim ($2930,75 \text{ cm}^{-1}$), orta şiddetli etilenik C-H gerilim ($2930,75 \text{ cm}^{-1}$), şiddetli keskin bir O-H gerilim ($3547,9 \text{ cm}^{-1}$), şiddetli siklik ester karbonil C=O gerilim ($1694,63 \text{ cm}^{-1}$), C-O deformasyon pikleri ($1161,96 \text{ cm}^{-1}$), C=C deformasyon pikleri ($1265,14 \text{ cm}^{-1}$ - $1224,38 \text{ cm}^{-1}$) gözlenmiştir (Şekil 4.13.).

Formülasyonda kullanılan katı lipite ait spektrumda (Şekil 4.14.) Precirol ATO 5'in kimyasal yapısında çok sayıda bulunan CH, CH₂, CH₃ grupları nedeniyle simvastatin ile karşılaştırıldığında daha fazla sayıda ve şiddetli C-H gerilim ($2915,66 \text{ cm}^{-1}$, $2850,70 \text{ cm}^{-1}$, $2955,89 \text{ cm}^{-1}$) pikleri, orta şiddetli gözlenen alifatik ester karbonil C=O gerilim ($1729,93 \text{ cm}^{-1}$) piki ve simvastatine göre daha zayıf şiddette ve genişlemiş O-H gerilim ($3292,24 \text{ cm}^{-1}$) piki yapıya özgü olarak gözlenmektedir.

Maisine'e ait spektrumda (Şekil 4.15.) Maisine kimyasal yapısı Precirol ATO 5'le benzer fonksiyonel gruplar içerdiğinden, Precirol ATO 5'in spektrumunda gözlenen pikler yakın şiddet ve dalga boylarında Maisine'nin spektrumunda da gözlenmiştir bu pikler; şiddetli C-H gerilim ($2923,57 \text{ cm}^{-1}$, $2854,10 \text{ cm}^{-1}$, $3009,18 \text{ cm}^{-1}$), şiddetli ester karbonil C=O gerilim ($1740,36 \text{ cm}^{-1}$) ve zayıf şiddette ve genişlemiş O-H gerilim ($3429,76 \text{ cm}^{-1}$) pikleridir.

Formülasyonlarda kullanılan diğer sıvı lipid olan, oleik asitin spektrumunda (Şekil 4.16.), yapıdaki uzun alifatik zincir nedeniyle gözlenen ve Precirol ATO 5, Maisine spektrumunda da benzer şekilde gözlenen şiddetli C-H gerilim ($2928,38 \text{ cm}^{-1}$, $2854,14 \text{ cm}^{-1}$) pikleri, şiddetli karboksilik asit karbonil C=O gerilim ($1709,31 \text{ cm}^{-1}$) piki ve C-H bükülme ($1458,10 \text{ cm}^{-1}$, $1282,46 \text{ cm}^{-1}$) pikleri yapıya karakteristik olarak gözlenmektedir.

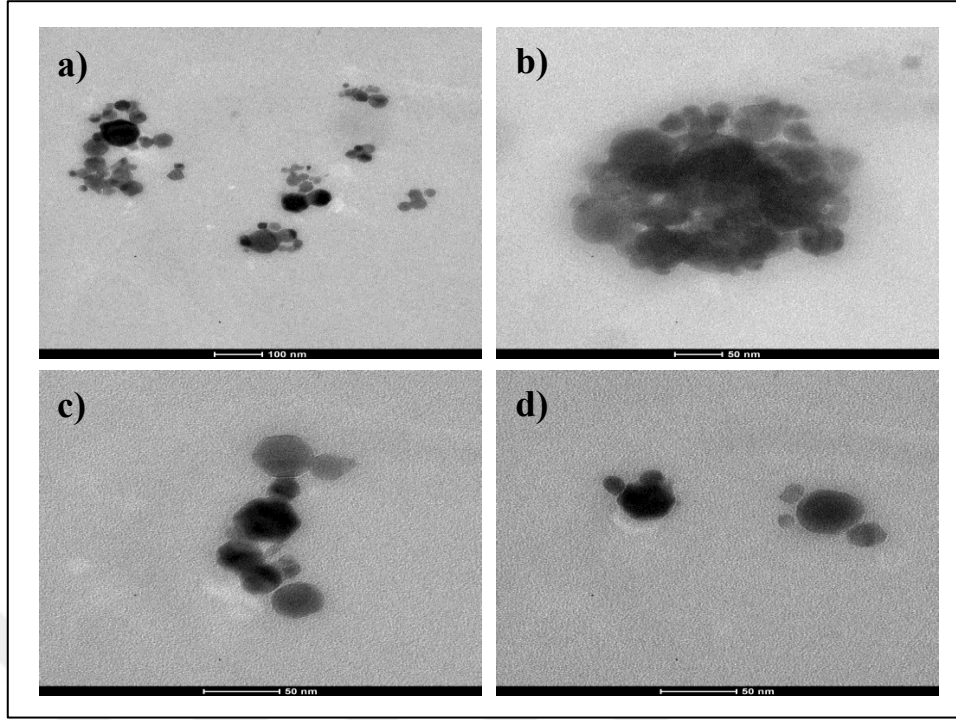
Tween 80, hidrofilik yüzey etkin maddesine ait spektrum incelendiğinde (Şekil 4.17.), zayıf şiddette ve genişlemiş O-H gerilim ($3461,98 \text{ cm}^{-1}$), orta şiddette C-H gerilim ($2858,99 \text{ cm}^{-1}$), zayıf ester karbonil C=O gerilim ($1734,10 \text{ cm}^{-1}$) pikleri görülmektedir. Hidrofobik yapıdaki Lipoid S100 yüzey etkin maddesine ait spektrumda ise (Şekil 4.18.), yapıya spesifik olan N-H gerilim ($3367,96 \text{ cm}^{-1}$),

şiddetli C-H gerilim ($2923,67 \text{ cm}^{-1}$, $2853,80 \text{ cm}^{-1}$) ve şiddetli ester karbonil C=O gerilim ($1735,79 \text{ cm}^{-1}$) pikleri gözlenmiştir.

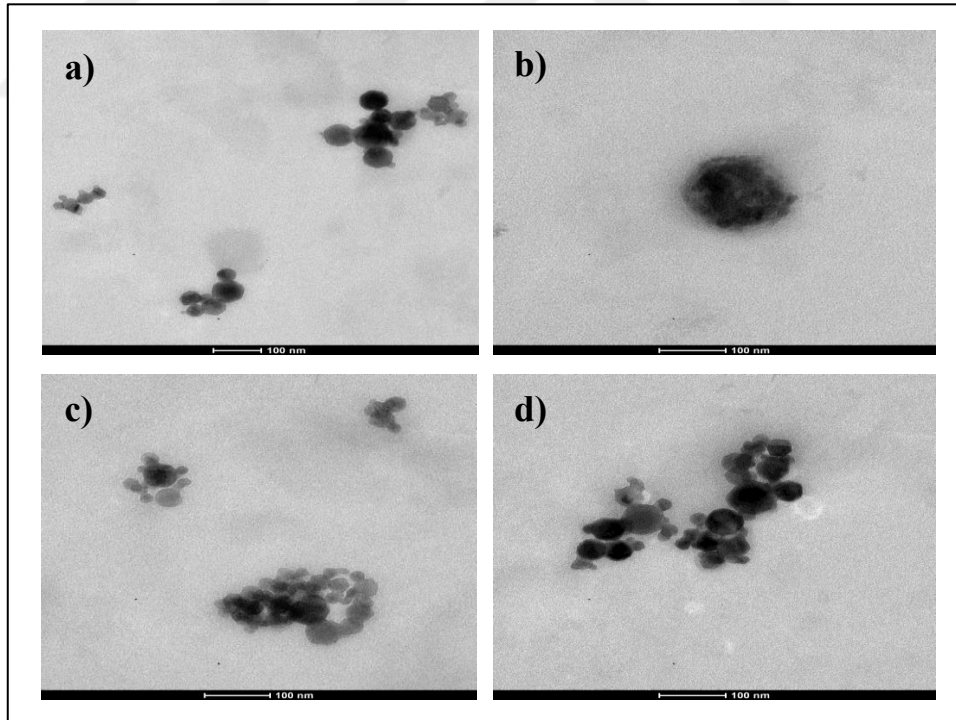
Etkin madde yüklenmemiş ve yüklenmiş olan tüm NLT formülasyonlarının spektrumları oldukça benzerlik göstermektedir (Şekil 4.19.-4.22.). NLT formülasyonu yapısında gözlenen çeşitli fonksiyonel gruplara spesifik olan pikler birbirine çok yakın dalga boylarında formülasyon spektrumlarının hepsinde gözlenmiştir. Etkin madde yüklenmemiş Fm-50-BOŞ, Fm-70-BOŞ, Fo-50-BOŞ ve Fo-70-BOŞ formülasyonlarının, %10 ve %20 simvastatin ile yüklenmiş formülasyonları ile neredeyse aynı spekturuma sahip olması ve simvastatinin karakteristik piklerinin Precirol ATO 5 katı lipitine ait piklerle yer değiştirmesi simvastatinin lipit matriks içerisinde çözünerek enkapsüle olduğunu ve bu nedenle saf yapısına ait özelliklerin gözlenemediğini kanıtlamaktadır. Formülasyonlara ait spektrumlar detaylı olarak incelendiğinde simvastatinin spektrumunda gözlenen orta şiddetli etilenik C-H gerilim ($2930,75 \text{ cm}^{-1}$) pikleri yerine Precirol ATO 5'in şiddetli C-H gerilim ($2915,66 \text{ cm}^{-1}$, $2850,70 \text{ cm}^{-1}$, $2955,89 \text{ cm}^{-1}$) pikleri, gözlenmektedir. Bununla birlikte simvastatinin şiddetli siklik ester karbonil C=O gerilim ($1694,63 \text{ cm}^{-1}$) piklerinin yerinde Precirol ATO 5'in $1729,93 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda gözlenen orta şiddetli alifatik ester karbonil C=O gerilim pikleri gözlenmekte ve $3947,90 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda simvastatine özgü olan şiddetli, keskin bir pik görünümdeki O-H gerilim pikleri, Precirol ATO 5'e ait spektrumda gözlendiği gibi daha zayıf şiddette ve genişlemiş ($3292,24 \text{ cm}^{-1}$) olarak görülmektedir.

4.4.5. Morfolojik İncelemeler

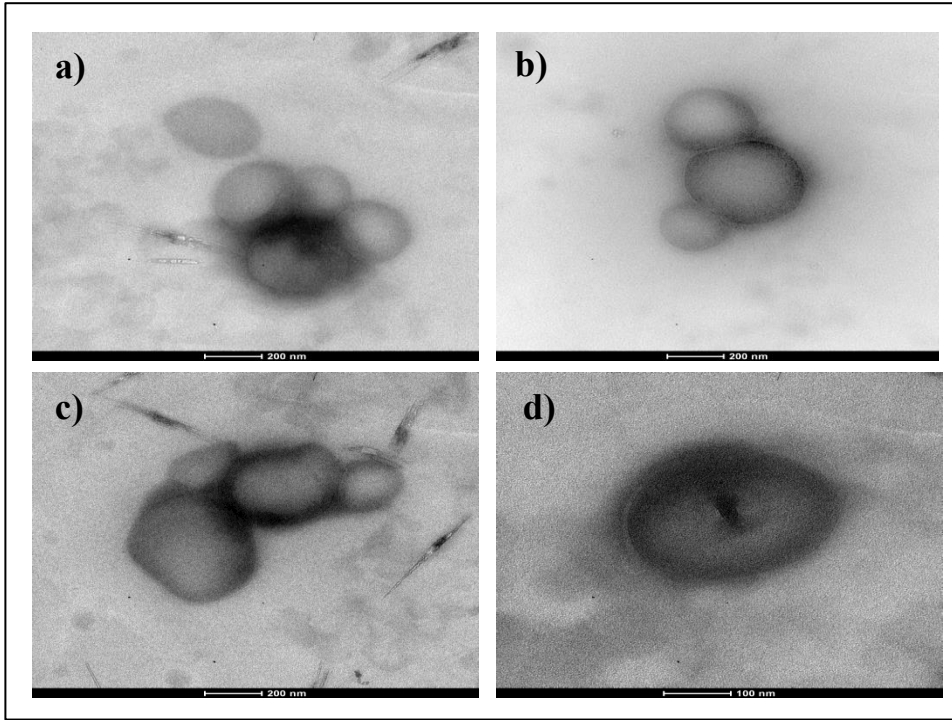
Bölüm 3.2.4.'de anlatılan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10, Fm-50-20, Fm-70-BOŞ, Fm-70-10, Fm-70-20, Fo-50-BOŞ, Fo-50-10, Fo-50-20, Fo-70-BOŞ, Fo-70-10 ve Fo-70-20 NLT formülasyonları, Bölüm 3.2.5.'de bahsedildiği gibi 400 mesh karbon film kaplı bakır ızgara üzerinde hazırlanarak geçirimli elektron mikroskopunda (FEI Tecnai G2 Series), 80 kV'de görüntülenmişlerdir. Elde edilen TEM görüntüleri Şekil 4.23.-4.34.'de sunulmaktadır.



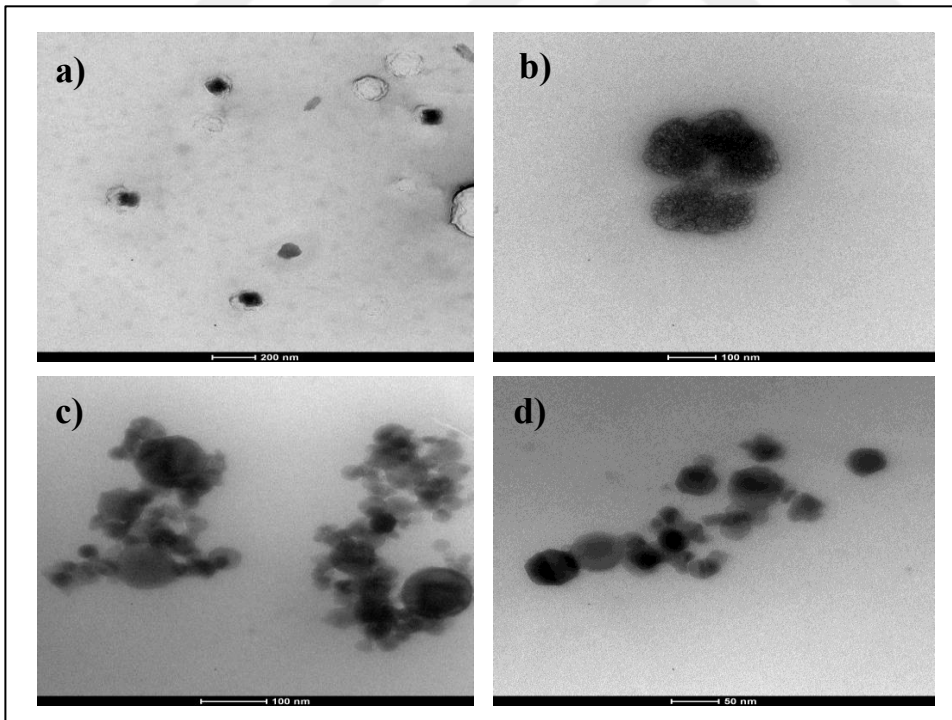
Şekil 4.23. Fm-50-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x49.000 büyütme, **b)** x98.000 büyütme, **c)** x150.000 büyütme, **d)** x150.000 büyütme.



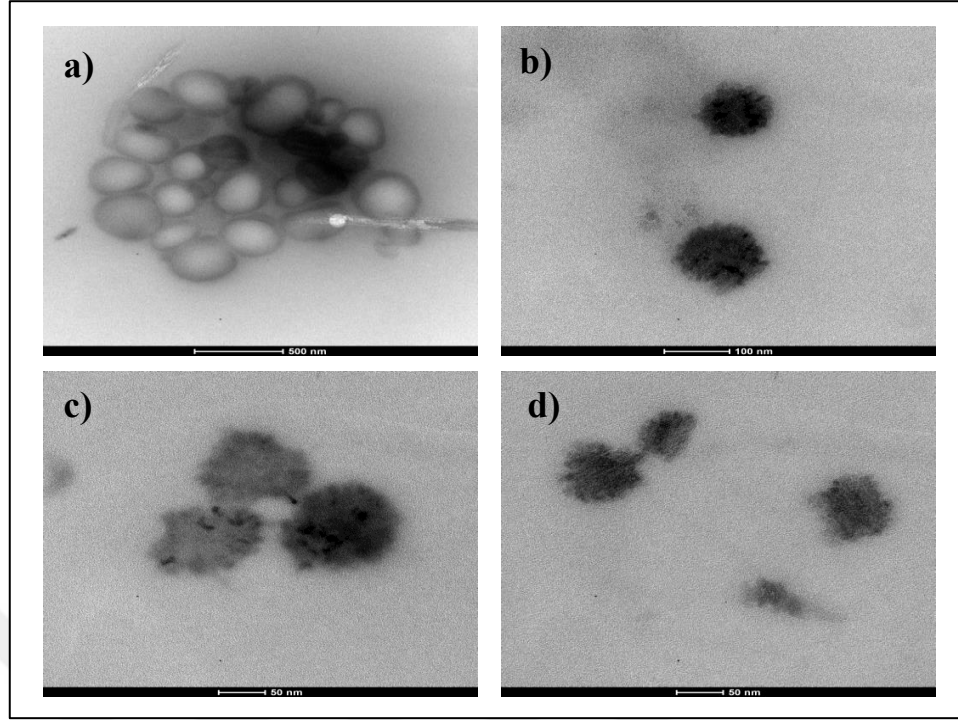
Şekil 4.24. Fm-50-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x49.000 büyütme, **b)** x68.000 büyütme, **c)** x68.000 büyütme, **d)** x68.000 büyütme.



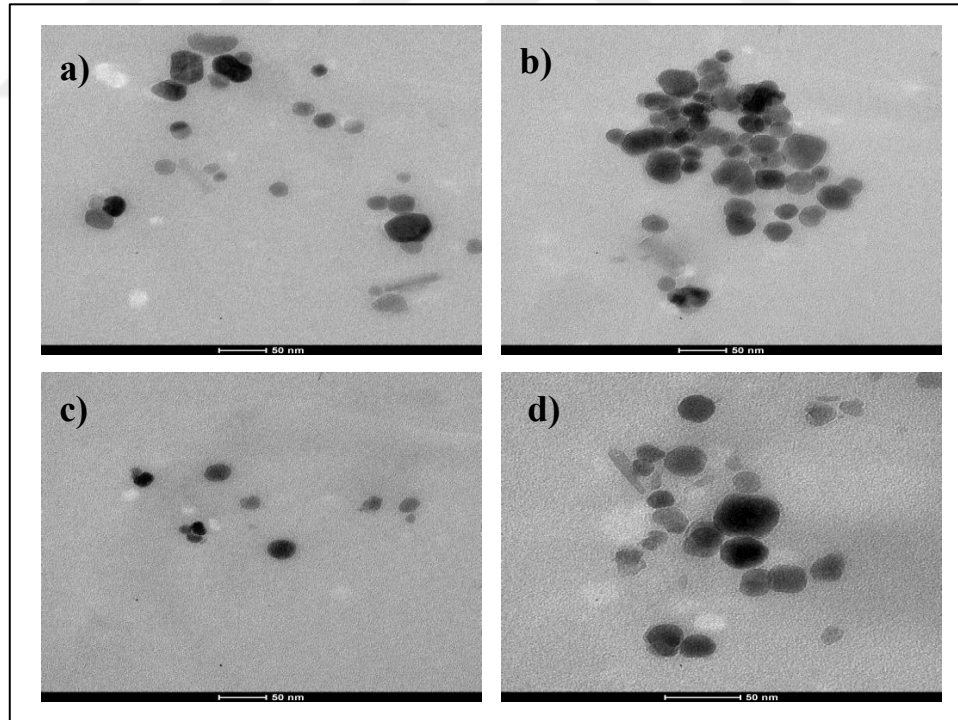
Şekil 4.25. Fm-50-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x30.000 büyütme, **b)** x30.000 büyütme, **c)** x30.000 büyütme, **d)** x68.000 büyütme.



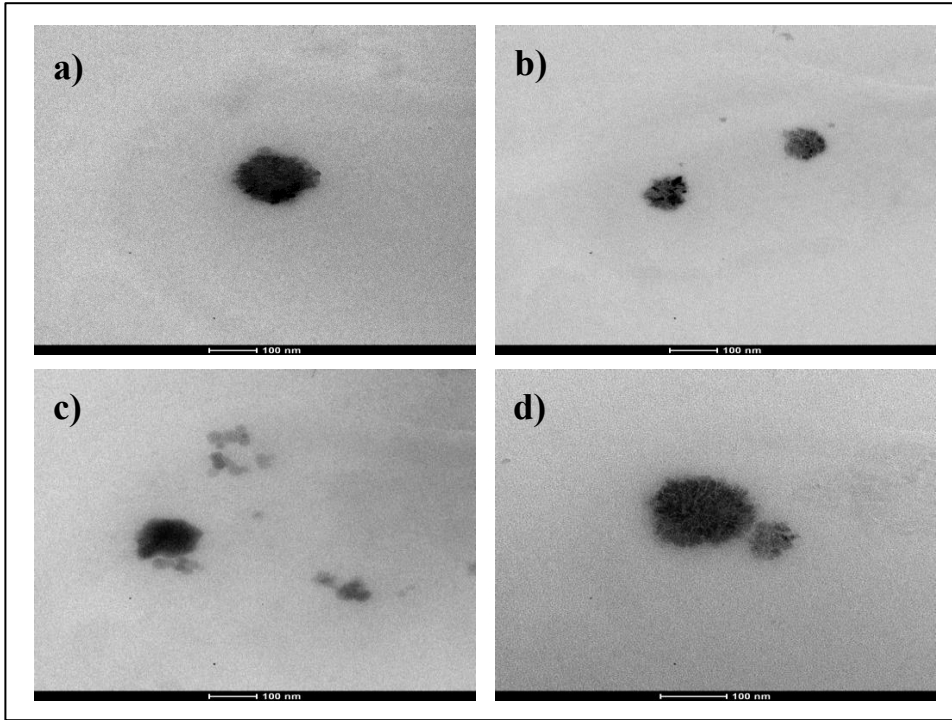
Şekil 4.26. Fm-70-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x23.000 büyütme, **b)** x49.000 büyütme, **c)** x68.000 büyütme, **d)** x98.000 büyütme



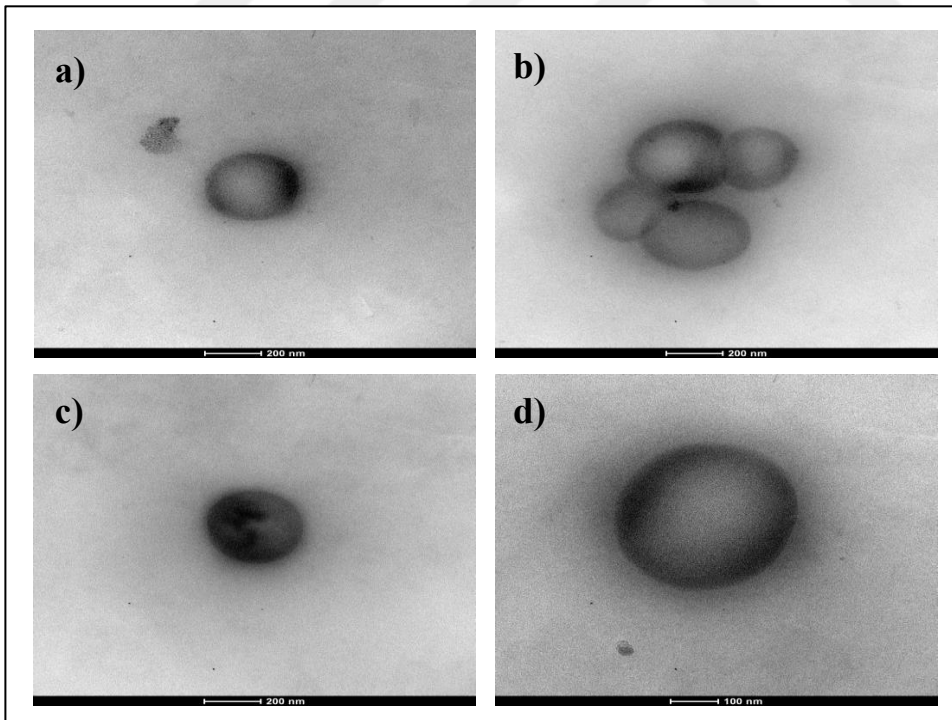
Şekil 4.27. Fm-70-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x18.500 büyütme, **b)** x68.000 büyütme, **c)** x98.000 büyütme, **d)** x98.000 büyütme.



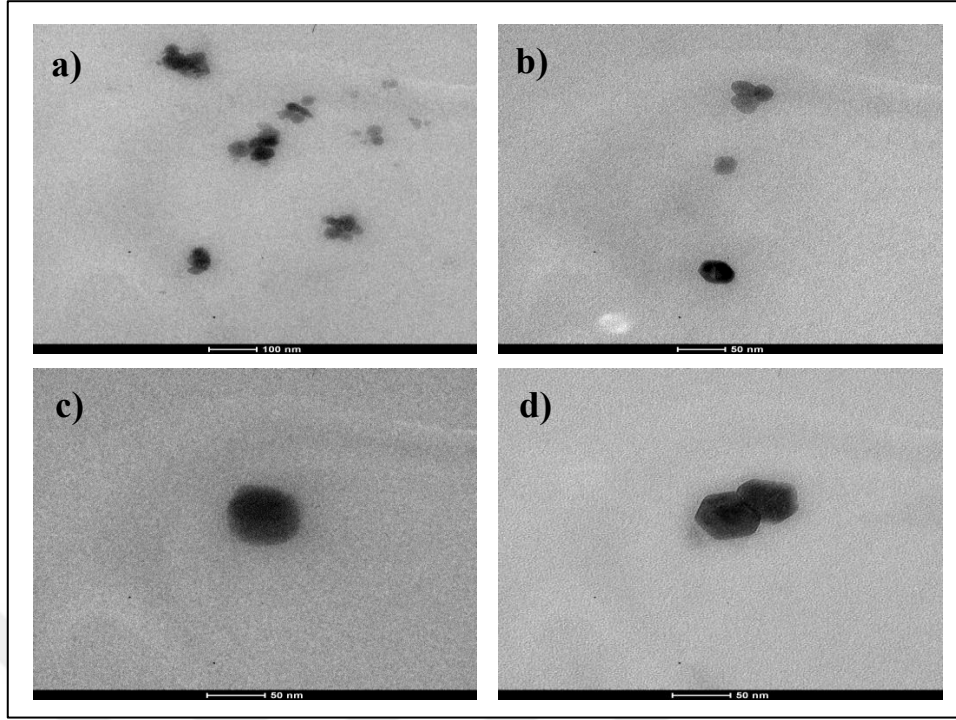
Şekil 4.28. Fm-70-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x98.000 büyütme, **b)** x98.000 büyütme, **c)** x98.000 büyütme, **d)** x150.000 büyütme.



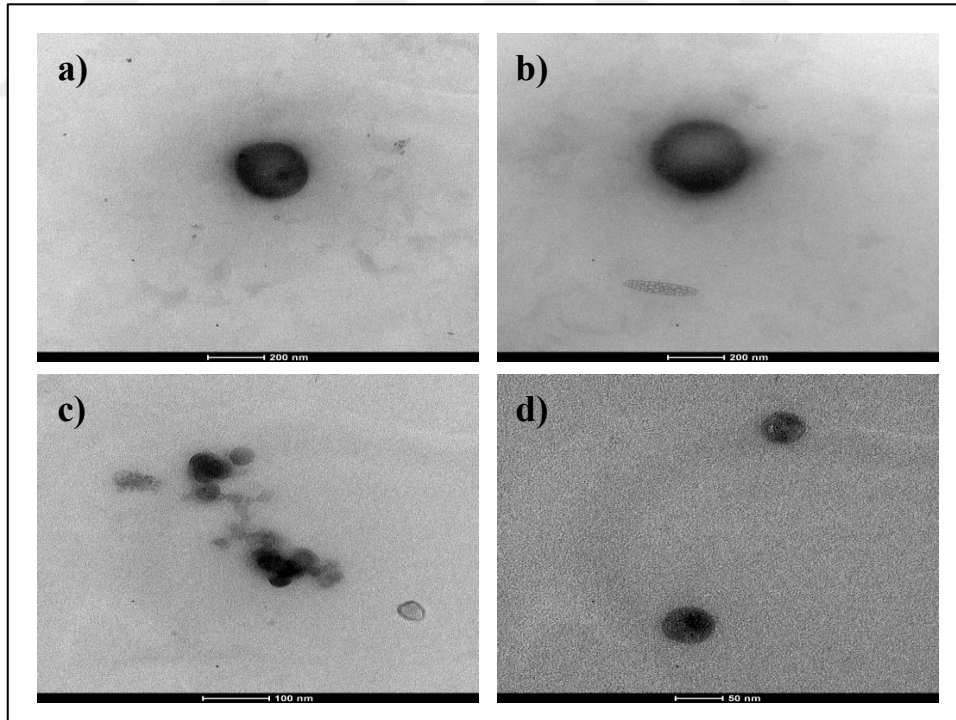
Şekil 4.29. Fo-50-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x49.000 büyütme, **b)** x49.000 büyütme, **c)** x49.000 büyütme, **d)** x68.000 büyütme.



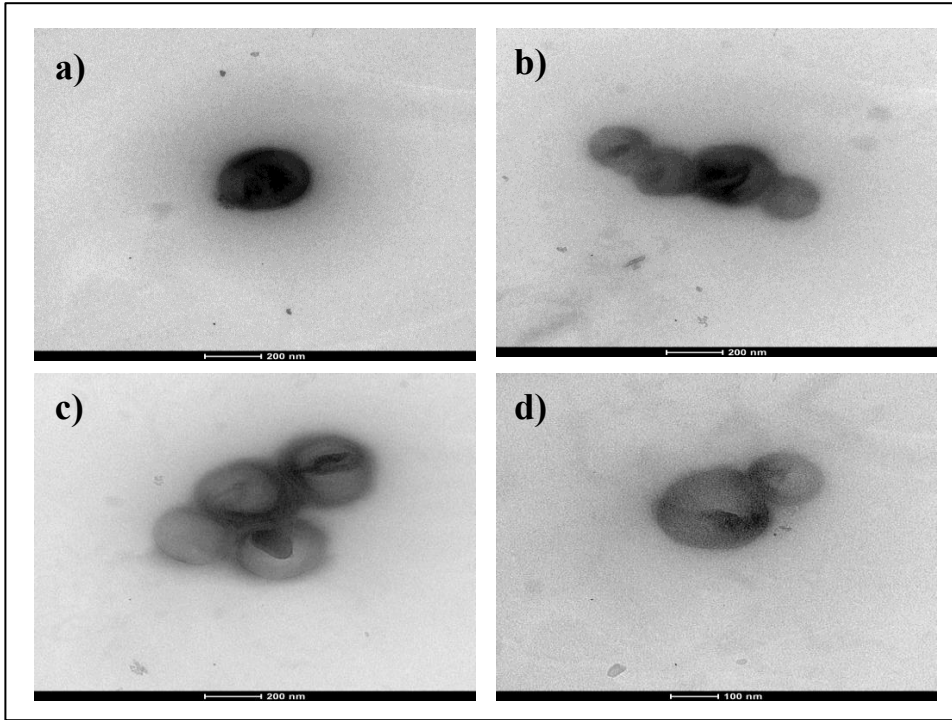
Şekil 4.30. Fo-50-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x30.000 büyütme, **b)** x30.000 büyütme, **c)** x30.000 büyütme, **d)** x49.000 büyütme.



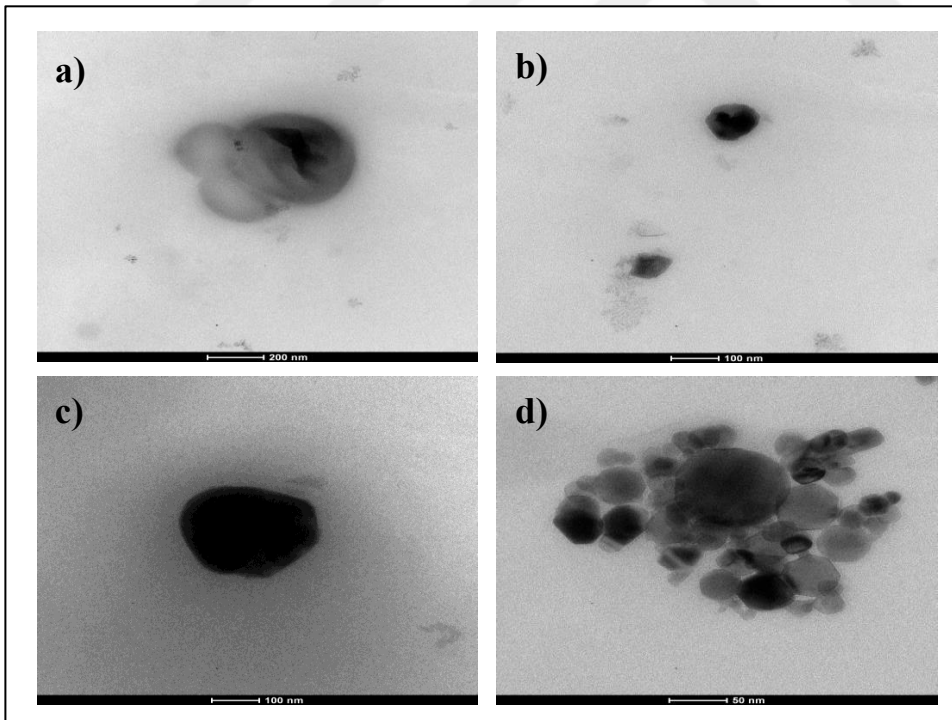
Şekil 4.31. Fo-50-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x49.000 büyütme, **b)** x98.000 büyütme, **c)** x120.000 büyütme, **d)** x120.000 büyütme.



Şekil 4.32. Fo-70-BOŞ formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x30.000 büyütme, **b)** x30.000 büyütme, **c)** x68.000 büyütme, **d)** x98.000 büyütme.



Şekil 4.33. Fo-70-10 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x30.000 büyütme, **b)** x30.000 büyütme, **c)** x30.000 büyütme, **d)** x49.000 büyütme.

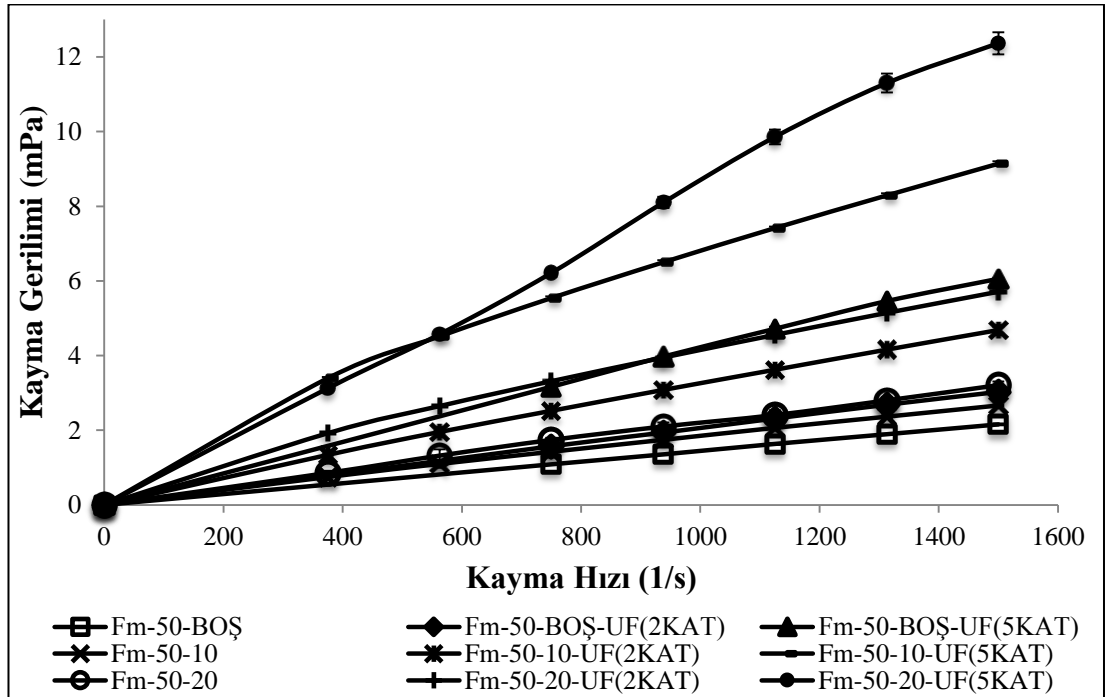


Şekil 4.34. Fo-70-20 formülasyonuna ait TEM görüntüleri **a)** x30.000 büyütme, **b)** x49.000 büyütme, **c)** x49.000 büyütme, **d)** x120.000 büyütme.

TEM analizi görüntülerinde, lipid nanopartiküller iki boyutlu olarak gözlemlenebilmektedir. Bu sebeple bu analizin en önemli sakıncası, daha küçük partikül büyüklüklerinde partikül görüntülerinin elde edilmesidir. NLT formülasyonlarından bazılarında, Zetasizer Nanoseries-ZS cihazı ile yapılan partikül büyüklüğü sonuçları (100-200 nm) ile uyumlu partikül büyüklüğü görüntüleri elde edilirken genel olarak çoğu formülasyonda beklenen boyutundan daha küçük partiküller görüntülenmiştir. TEM analizi ile partikül büyüklüğü dağılımı hakkında kesin bir sonuca ulaşılamasa da partiküllerin şekilleri net olarak görülebilmektedir. Görüntülenen tüm formülasyonlarda partiküllerin sınırları belirgin, küresel şekle sahip oldukları görülmüştür.

4.4.6. Viskozite Tayini

Boş ve etkin madde yüklenmiş olan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 NLT formülasyonlarının ve bu formülasyonların 2 ve 5 kat ultrafiltre edilmiş dispersiyonlarının viskozite ölçümleri 25°C’de koni plak tipi Brookfield DV2T RV viskometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerin tümü 3 ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.35. ve Tablo 4.11.’de gösterilmektedir.



Şekil 4.35. NLT formülasyonlarının 25°C’deki akış reogramları (n=3).

Tablo 4.11. NLT formülasyonlarına ait n (Eğim) değerleri ve 25°C’de 1500 sn⁻¹ kayma hızında ölçülen viskozite sonuçları (n=3).

NLT Formülasyon Kodu	Viskozite (cP) $\bar{X} \pm SH$	n (Eğim)
Fm-50-BOŞ	1,44 ± 0,02	0,99
Fm-50-BOŞ-UF(2KAT)	2,02 ± 0,02	0,95
Fm-50-BOŞ-UF(5KAT)	4,04 ± 0,02	0,94
Fm-50-10	1,78 ± 0,02	0,92
Fm-50-10-UF(2KAT)	3,12 ± 0,06	0,90
Fm-50-10-UF(5KAT)	6,09 ± 0,05	0,72
Fm-50-20	2,17 ± 0,03	0,93
Fm-50-20-UF(2KAT)	3,82 ± 0,04	0,79
Fm-50-20-UF(5KAT)	8,24 ± 0,18	1,02

Formülasyonların akış özelliklerini belirlemek amacıyla, kayma hızı ve kayma gerilimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi gerekmektedir. Akış özellikleri tayini “Power Law” modeliyle tanımlanmış ve her bir formülasyon için $\log(\text{Kayma Hızı}, 1/\text{sn})$ değerlerine karşılık $\log(\text{Kayma Gerilimi}, \text{mPa})$ değerleri grafiklendirilerek, oluşan eğrinin eğiminden “n” değerleri hesaplanmıştır. Eğimin 1’e eşit çıkması sistemin newtonian, 1’den küçük çıkması pseudoplastik, büyük çıkması ise dilatant akış tipine sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen n değerleri incelendiğinde Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-20 ve Fm-50-20-UF(+5KAT) formülasyonlarının newtonian akış özelliği gösterdikleri kabul edilirken Fm-50-10, Fm-50-10-UF(2KAT), Fm-50-10-UF(5KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) formülasyonlarında n değerlerinin birden küçük çıkması nedeniyle pseudoplastik bir akış gözlenmiştir. Şekil 4.35.’de görüldüğü gibi Fm-50-10, Fm-50-10-UF(2KAT), Fm-50-10-UF(5KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) formülasyonlarının pseudoplastik akış özelliği nedeniyle kayma hızının artması ile viskozite değerlerinde azalma gözlenmiştir. Newtonian akış gösteren Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-20 ve Fm-50-20-UF(+5KAT) formülasyonlarında ise kayma hızının artması viskoziteyi değiştirmemiştir.

1500 sn⁻¹ kayma hızında gözlenen viskozite değerleri karşılaştırıldığında, tüm formülasyonların viskozite değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı derecede fark bulunmuştur (p<0,05) (Tablo 4.11.). Sonuç olarak formülasyona etkin madde yüklenmesinin, viskoziteyi artırdığı ve yüklenen etkin madde miktarının artırılması ile viskozitenin arttığı görülmüştür (p<0,05). Bunun yanı sıra ultrafiltrasyon işleminin uygulanması da viskoziteyi artırmıştır (p<0,05). Ultrafiltrasyon işlemi sonucu nanopartikül konsantrasyonu arttıkça formülasyonların viskozitesi artmaktadır (p<0,05).

4.4.7. İn Vitro Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları amacıyla öncelikle simvastatinin sink koşulları sağlayan salım ortamı çözünürlük tayini ile belirlenmiş ardından salım ortamındaki stabilitesi tayin edilmiştir.

- **Simvastatinin İn Vitro Salım Ortamlarındaki Çözünürlüğünün Tayini**

İn vitro salım çalışmaları öncesinde, sink koşulun sağlandığı salım ortamının belirlenmesi amacıyla simvastatinin literatürde sıklıkla kullanılan pH 7,4 PBS tamponu ve %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu salım ortamlarındaki çözünürlüğü değerlendirilmiştir (56, 78, 205). Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi 37±0,5°C'de ve 120 spm hızdaki yatay çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları sonucunda elde edilen çözünürlük değerleri Tablo 4.12'de verilmektedir.

Tablo 4.12. Simvastatinin pH 7,4 PBS tamponu ve %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponundaki çözünürlük tayini sonuçları (n=3).

Zaman (Saat)	PBS pH 7,4		%0,5 SDS PBS pH 7,4	
	Çözünürlük (mg/mL) $\bar{X} \pm SH$	Varyasyon Katsayısı (%)	Çözünürlük (mg/mL) $\bar{X} \pm SH$	Varyasyon Katsayısı (%)
1	2,447±0,183	1,562	1372±0,035	1,637
3	3,323±0,166	1,762	1424±0,095	1,510
5	3,575±0,152	1,499	1629±0,025	1,556
8	3,579±0,113	1,115	1644±0,034	1,585

Simvastatinin pH 7,4 PBS tamponunda, 8 saat sonundaki çözünürlüğü oldukça düşük bir değer olan $3.579 \cdot 10^{-3}$ mg/mL olarak bulunmuştur. Bu nedenle pH 7,4 PBS tamponu ile sink koşul sağlanamamaktadır. Sink koşulun sağlanabilmesi için etkin maddenin doyumluk konsantrasyonu, salım ortamındaki konsantrasyonun en az 3 katı olmalıdır (238).

Çözünürlüğün artırılması amacıyla pH 7,4 PBS tamponuna %0,5 (a/h) SDS'nin ilave edilmesi, simvastatinin 8 saat sonundaki çözünürlüğünü 1.645 mg/mL'ye çıkartarak, çözünürlüğü yüksek miktarda artırmıştır. Simvastatinin bu ortamda, 5. ve 8. saatler sonundaki çözünürlük değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu nedenle %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponundaki doyumluk konsantrasyonu 8 saat sonundaki çözünürlük değeri olan 1.645 mg/mL olarak belirlenmiştir. 1.645 mg/mL, simvastatinin difüzyon ortamında sink koşulunun sağlanması için yeterli derecede yüksek bir doyumluk konsantrasyonudur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında in vitro salım ortamı için, %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponunun kullanılmasına karar verilmiştir.

- **İn Vitro Salım Süresince Simvastatinin Stabilesinin İncelenmesi**

Simvastatinin salım ortamındaki stabilesi Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi 16 µg/mL konsantrasyonda, %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponunda hazırlanan simvastatin çözeltileri ile in vitro salım koşullarında 72 saat boyunca

değerlendirilmiştir. Çözeltilerin hazırlandıkları an ve belirlenen analiz saatlerindeki HPLC ile miktar tayini sonuçları Tablo 4.13.'de sunulmaktadır.

Tablo 4.13. İn vitro salım koşullarında simvastatinin stabilitesi (n=6).

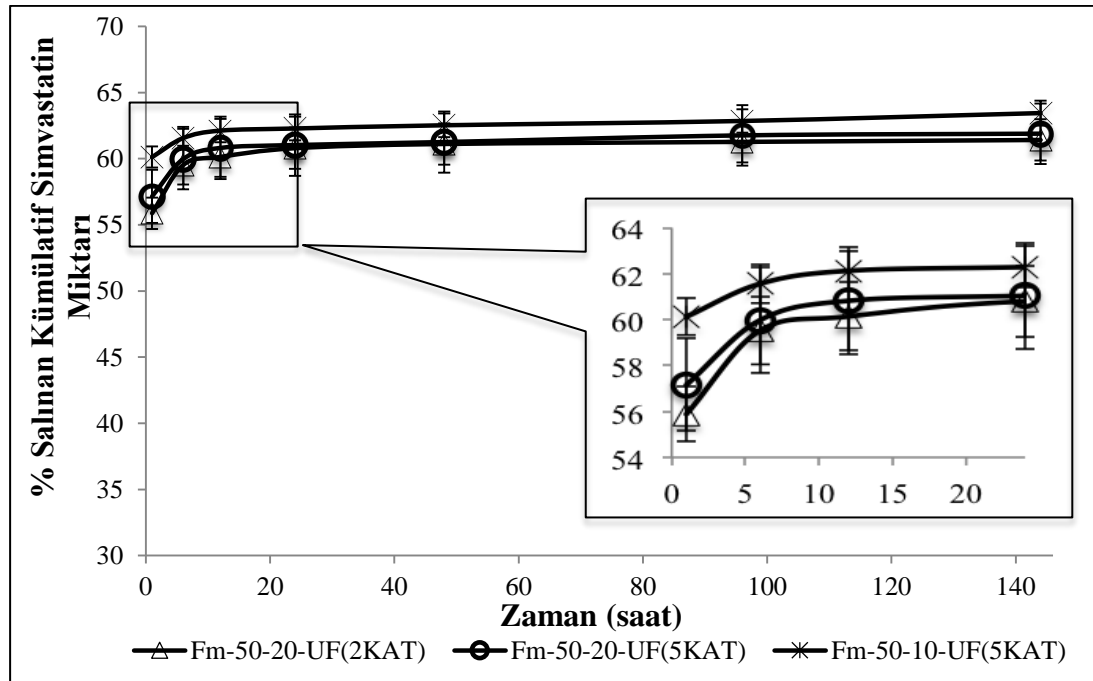
Zaman (saat)	Simvastatin Pik Alanı	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm \text{SH}$	Varyasyon Katsayısı (%)
0	977,9	15,979	15,984 \pm 0,058	0,361
	978,8	15,994		
	982,9	16,061		
	981,0	16,030		
	973,2	15,902		
	975,6	15,941		
24	967,5	15,809	15,773 \pm 0,045	0,284
	965,5	15,776		
	961,8	15,715		
	969,3	15,838		
	963,4	15,742		
	964,5	15,760		
48	914,8	14,946	14,912 \pm 0,069	0,461
	910,4	14,874		
	915,0	14,949		
	908,1	14,836		
	919,0	15,014		
	909,2	14,854		
72	890,2	14,543	14,447 \pm 0,215	1,490
	892,4	14,579		
	898,7	14,682		
	880,1	14,378		
	883,5	14,433		
	861,1	14,066		

Sonuçlar incelendiğinde simvastatinin zaman geçtikçe bozunmaya uğradığı ve salım ortamındaki konsantrasyonunun azaldığı gözlenmektedir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, çözeltilerin hazırlandıkları andaki (0. saat) konsantrasyonları, diğer tüm zaman noktaları ile istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklılık göstermektedir ($p < 0,05$). Yapılan literatür araştırmaları sonucunda simvastatinin bazik pH'lardaki sulu çözeltilerinde inaktif lakton yapısından, aktif hidroksi asit formuna hidrolize olduğu bilgisine ulaşılmıştır (239). İn vitro salım ortamı

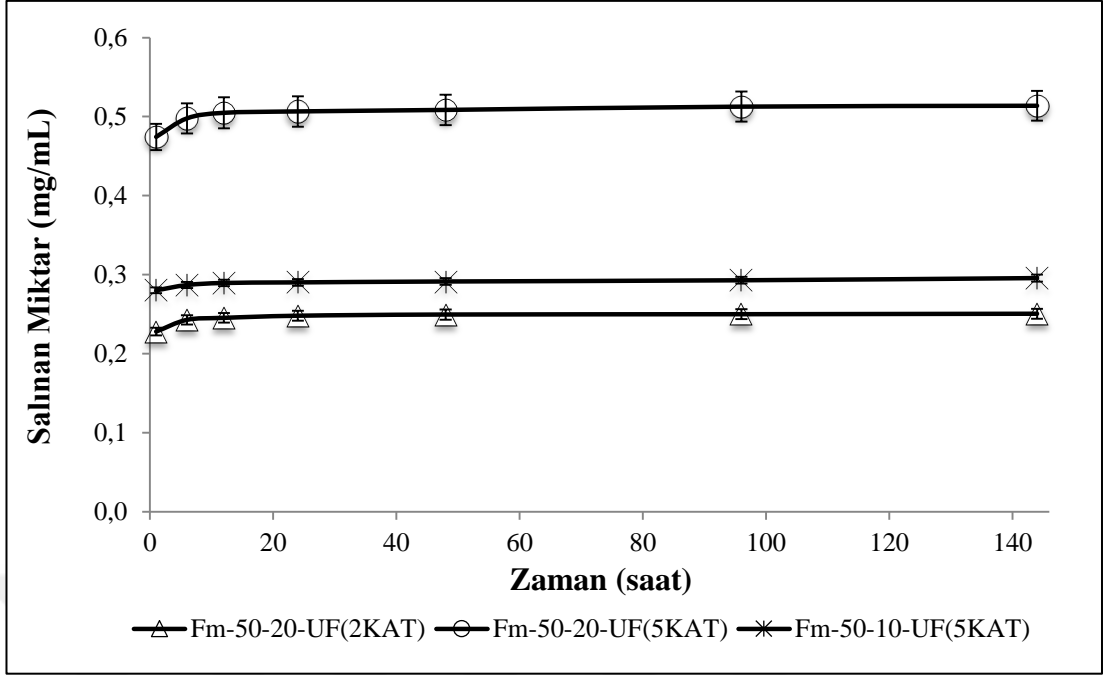
koşullarında 48 saate kadar simvastatinin %93,3'ü korunmaktadır. Bu nedenle salım deneylerinde, maksimum 48 saatte bir salım ortamı taze ortam ile değiştirilerek, ortamdaki simvastatinin stabilitesi sağlanmaya çalışılmıştır.

- **Salım Çalışmaları**

Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonlarının in vitro salım deneyleri Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de ve 120 spm hızdaki yatay çalkalayıcı su banyosunda 144 saat boyunca gerçekleştirilerek salım profilleri oluşturulmuştur (Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.).



Şekil 4.36. NLT formülasyonlarından zamana karşı salınan kümülatif simvastatin miktarı (n=6).



Şekil 4.37. NLT formülasyonlarından simvastatinin salım profili (n=6).

Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları etkin madde konsantrasyonu ve ultrafiltrasyon işleminin salım profiline olan etkisini incelemek amacıyla seçilmiştir. Salım çalışması 6 gün boyunca sürdürülmüş ve 6 günün sonunda Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonlarından salınan kümülatif simvastatin yüzdeleri sırasıyla %63,45, %61,42 ve %61,89, salınan simvastatin miktarları ise 0,296, 0,251 ve 0,514 mg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.). Formülasyonların tümü benzer bir salım profiline sahip olup ilk bir saatte yüksek oranda başlangıç patlama salımı (burst release) göstermiş ve bu salımı takiben yavaş bir salım hızı ile simvastatin salımı devam ederek yaklaşık 12-24 saatte salım platoya ulaşmıştır.

Tüm formülasyonlar arasında kümülatif salınan simvastatin yüzdeleri açısından fark bulunmamasına karşın ($p > 0,05$), salınan simvastatin miktarları arasında fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Formülasyondaki etkin madde konsantrasyonunun %10'dan %20'ye çıkarılması salınan simvastatin miktarını yaklaşık olarak iki kat oranda artırmıştır. Bununla birlikte ultrafiltrasyonla nanopartikül konsantrasyonunun artırılması formülasyondaki etkin madde konsantrasyonunu artırdığından salınan simvastatin miktarı artmıştır ($p < 0,05$). Bu sonuçlar formülasyonun konsantre edilmesi ve yüklenen etkin madde

konsantrasyonunun artırılması ile salınan etkin madde miktarının da orantılı olarak artış gösterdiğini kanıtlamaktadır.

NLT formülasyonlarından etkin madde salımının sıfıncı derece ve Higuchi kinetiğine uyumu incelenerek bu kinetiklere göre 12. saate kadar hesaplanan salım hızları, tanımlayıcılık katsayıları (R^2) ve 6 gün sonunda % salınan simvastatin miktarları Tablo 4.14.'de verilmiştir.

Tablo 4.14. NLT formülasyonlarından 6 gün sonunda salınan kümülatif simvastatin miktarı ve salım hızları ($t=12$ saat)

Formülasyon Kodu		Salım Miktarı (%)	Salım Hızı (%.saat ⁻¹) (%.saat ^{-1/2})*	R ²
Fm-50-10-UF(5KAT)	0. derece Kinetiği	63,451±0,946	0,179±0,023	0,9103
	Higuchi Kinetiği		0,799±0,100	0,9825
Fm-50-20-UF(2KAT)	0. derece Kinetiği	61,416±1,561	0,404±0,076	0,8111
	Higuchi Kinetiği		1,915±0,369	0,9089
Fm-50-20-UF(5KAT)	0. derece Kinetiği	61,890±2,287	0,327±0,039	0,8838
	Higuchi Kinetiği		1,518 ±0,183	0,9620

*Higuchi kinetiğine göre hesaplanan salım hızı

Tablo 4.14.'de gözlendiği gibi tanımlayıcılık katsayıları karşılaştırıldığında NLT formülasyonlarından salımın Higuchi kinetiğine daha uygun olduğu görülmüştür. Formülasyonların Higuchi kinetiği ile hesaplanan salım hızları ele alındığında Fm-50-20 formülasyonunun iki ve beş kat konsantre edilmiş formülasyonları arasında fark bulunmazken ($p>0,05$), Fm-50-20-UF(5KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT)'ın salım hızınının Fm-50-10-UF(5KAT) formülasyonuna göre önemli derecede daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Elde edilen bu sonuç

formülasyona yüklenen etkin madde miktarının NLT formülasyonlarının salım hızını etkileyen bir parametre olduğunu göstermektedir.

Tez çalışmasının ilerleyen basamaklarında simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonlarından hareketle üç boyutlu doku iskelesi formülasyonları hazırlanmış ve in vitro salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Doku iskelesi salım çalışmalarında, doku iskelesinin yapısı ve parçalanma hızı simvastatinin salınma hızını yavaşlatarak, kontrollü bir salımın elde edilmesi sağlanacağından, lipit nanopartikül formülasyonlarından simvastatinin yüksek bir patlama salımı ile salınması ve devamında plato değerine ulaşması çalışmanın ilerleyen basamakları düşünüldüğünde NLT formülasyonları için istenilen bir salım özelliğidir. Fm-50-20-UF(5KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) formülasyonları Fm-50-10-UF(5KAT) formülasyonuna göre yüksek bir salım hızıyla daha fazla simvastatin miktarı salabilmesi nedeniyle daha uygun bir salım profili oluşturmaktadır. Bu sebeple doku iskelesi formülasyon çalışmalarında Fm-50-20 ve ultrafiltre edilmiş formülasyonlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4.8. Stabilite Çalışmaları

NLT formülasyonlarının stabilite çalışmaları 4°C ve 25°C sıcaklıklarda etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ ve Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonları ile 90 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi makroskobik özellikler, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, PDI, pH, viskozite ve formülasyondaki etkin madde stabilitesi değerlendirilmiştir.

- **Makroskobik İnceleme**

Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının 4°C ve 25°C'de 90 gün boyunca fiziksel görüntüsü takip edilmiştir. Tüm formülasyonlar süt rengi görünümünü koruyarak her iki saklama sıcaklığında da 90 günlük saklama süresi boyunca herhangi bir renk değişimi, sedimentasyon veya agregasyon göstermemiş, makroskobik özelliklerini korumuşlardır.

- **Partikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Ölçümleri**

Etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının stabilite çalışmalarındaki partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri NLT formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarında bahsedildiği gibi partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazında 25°C ve 173° ışık saçılım açısında gerçekleştirilmiştir. 4°C ve 25°C'de 90 gün boyunca sürdürülen stabilite çalışmaları sonucunda partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.15.'de verilmiştir.

Etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ formülasyonunun farklı saklama sıcaklıkları ve bekletilme zamanlarına bağlı olarak partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinde meydana gelen değişim incelendiğinde 25°C'de 3 gün süresince partikül büyüklüğü değişmemiş ($p>0,05$). 7. günden sonra partikül büyüklüğü zamanla artmıştır ($p<0,05$). 4°C'de saklanan Fm-50-BOŞ formülasyonunun partikül büyüklüğü 7 gün süresince düşüş göstermiş ($p<0,05$) ancak daha sonra 90 güne kadar partikül büyüklüğü artmıştır ($p<0,05$). Fm-50-BOŞ formülasyonunun polidispersite indeksi sonuçları karşılaştırıldığında 25°C'de hazırlandığı günden itibaren saklama süresi boyunca artmış göstermiştir ($p<0,05$). 4°C'de ise PDI değerleri 15 gün boyunca değişim göstermemiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak Fm-50-BOŞ formülasyonuna ait PDI sonuçları incelendiğinde değerlerin 0,32'nin altında olduğu ve her iki sıcaklık koşulunda saklanmaları sonucu zamanla PDI değerlerinin arttığı görülmektedir.

Total lipit miktarının %10'u kadar etkin madde yüklenmiş olan Fm-50-10 formülasyonunun stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen partikül büyüklüğü sonuçları değerlendirildiğinde 25°C ve 4°C'de partikül büyüklüğü formülasyonun hazırlandığı günden sonra stabilite çalışmaları süresince değişme göstermiştir ($p<0,05$). 4°C'de zamanla azalma gerçekleşirken ($p<0,05$). 25°C'de zamanla partikül büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). 90 günün boyunca farklı saklama sıcaklıklarında bekletilen Fm-50-10 formülasyonlarına ait PDI değerleri 25°C

saklama koşulunda 30 güne kadar değişim göstermezken ($p>0,05$). 4°C’de 7 gün boyunca değişmemiştir ($p>0,05$).

Total lipit miktarının %20’si kadar etkin madde yüklenmiş olan Fm-50-20 formülasyonunun 90 günlük süre sonunda, partikül büyüklüğündeki değişimler incelendiğinde 25°C’de saklanan formülasyonun partikül büyüklüğünün 90 gün sonunda anlamlı şekilde arttığı ($p<0,05$). 4°C’de saklanan formülasyonlarda ise 15. güne kadar değişim gözlenmezken ($p>0,05$). 15. günden 90. güne kadar geçen süre boyunca partikül büyüklüğü değişimleri anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Fm-50-20 formülasyonunun PDI değerleri ise 4°C saklama koşulunda 30 güne kadar önemli bir değişiklik göstermezken ($p>0,05$). 25°C saklama koşulunda saklama süresi arttıkça PDI değerleri de anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0,05$).

Fm-50-BOŞ ve Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının tümünde zamanla ve saklama koşulluyla değişen zeta potansiyelleri incelendiğinde her iki saklama sıcaklığı için de (25°C ve 4°C) zeta potansiyel değerleri formülasyonların hazırlandıkları günden itibaren değişim gösterdiği gözlenmiştir ($p<0,05$). Formülasyonların 25°C ve 4°C saklama süresince elde edilen zeta potansiyel değerleri karşılaştırıldığında ilişkili bir değişiklik gözlenmemiştir. Zeta potansiyel değerleri saklama süresi ve sıcaklığından bağımsız olarak azalma ve artmalar göstermiştir.

Sonuç olarak; etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ ve Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının saklama süresi ve saklama sıcaklıkları ile partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinde meydana gelen değişim incelendiğinde 4°C’de formülasyonların tümünün 0,3’ten daha düşük PDI değerleri ile literatürde yer alan NLT çalışmalarında elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak 300 nm’nin altında partikül büyüklüğünü korudukları ancak formülasyonlar 25°C’de saklandıklarında Fm-50-10 formülasyonu bu sınırları 90 güne kadar korumayı sürdürürken Fm-50-BOŞ formülasyonu 60 gün, Fm-50-20 formülasyonu ise 30 güne kadar bu değerleri sağlamıştır (56, 99, 205, 229).

Tablo 4.15. 25°C ve 4°C sıcaklıkta saklanan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının partikül büyüklüğü. polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri (n=6).

Formülasyon Kodu		Fm-50-BOŞ				Fm-50-10				Fm-50-20			
Zaman (Gün)	PB (nm) ($\bar{X} \pm SH$)	PDI ($\bar{X} \pm SH$)	ZP(mV) ($\bar{X} \pm SH$)	Zaman (Gün)	PB (nm) ($\bar{X} \pm SH$)	PDI ($\bar{X} \pm SH$)	ZP(mV) ($\bar{X} \pm SH$)	Zaman (Gün)	PB (nm) ($\bar{X} \pm SH$)	PDI ($\bar{X} \pm SH$)	ZP(mV) ($\bar{X} \pm SH$)	Zaman (Gün)	PB (nm) ($\bar{X} \pm SH$)
25°C	0	112,28±0,97	0,18±0,00	-14,27±0,21	176,23±0,20	0,20±0,01	-24,70±0,26	0,22±0,01	184,17±0,68	0,22±0,01	184,17±0,68	0,22±0,01	-25,07±0,19
	3	110,37±0,84	0,21±0,02	-11,88±0,36	180,47±1,51	0,19±0,01	-31,75±0,23	0,23±0,01	225,43±2,23	0,23±0,01	225,43±2,23	0,23±0,01	-29,42±0,25
	7	111,10±0,41	0,20±0,01	-15,35±0,20	175,92±1,94	0,19±0,01	-24,50±0,24	0,30±0,01	228,17±1,82	0,30±0,01	228,17±1,82	0,30±0,01	-29,23±0,29
	15	114,90±0,90	0,22±0,01	-10,77±0,31	175,45±1,89	0,19±0,01	-25,55±0,24	0,26±0,01	259,78±17,09	0,26±0,01	259,78±17,09	0,26±0,01	-30,72±0,20
	30	123,27±1,49	0,26±0,01	-11,28±0,16	172,78±3,14	0,20±0,02	-26,60±0,22	0,27±0,01	248,02±2,59	0,27±0,01	248,02±2,59	0,27±0,01	-34,43±0,47
	60	206,73±1,66	0,28±0,01	-19,97±0,43	181,52±1,54	0,18±0,01	-29,78±0,24	0,47±0,03	344,28±11,14	0,47±0,03	344,28±11,14	0,47±0,03	-36,07±0,39
4°C	0	338,33±2,78	0,32±0,01	-22,90±0,29	219,33±1,53	0,24±0,01	-31,70±0,18	0,64±0,05	515,12±43,51	0,64±0,05	515,12±43,51	0,64±0,05	-35,85±0,23
	3	112,28±0,97	0,18±0,00	-14,27±0,21	176,23±0,20	0,20±0,01	-24,70±0,26	0,22±0,01	184,17±0,68	0,22±0,01	184,17±0,68	0,22±0,01	-25,07±0,19
	7	104,87±0,69	0,20±0,02	-11,68±0,17	166,92±1,71	0,20±0,01	-26,33±0,26	0,21±0,01	184,32±2,12	0,21±0,01	184,32±2,12	0,21±0,01	-29,92±0,26
	15	104,33±0,47	0,19±0,01	-15,67±0,24	167,80±3,55	0,21±0,01	-24,95±0,33	0,22±0,03	190,23±5,75	0,22±0,03	190,23±5,75	0,22±0,03	-20,67±0,15
	30	104,70±1,23	0,20±0,03	-12,27±0,23	165,80±2,59	0,22±0,01	-20,98±0,14	0,24±0,02	182,68±1,58	0,24±0,02	182,68±1,58	0,24±0,02	-27,38±0,18
	60	104,93±1,70	0,23±0,03	-18,70±0,54	169,83±4,87	0,27±0,04	-27,10±0,21	0,24±0,04	182,08±5,53	0,24±0,04	182,08±5,53	0,24±0,04	-30,33±0,20
90	109,67±0,40	0,29±0,01	-17,15±0,87	163,92±1,53	0,22±0,01	-27,38±0,34	0,25±0,00	184,20±1,09	0,25±0,00	184,20±1,09	0,25±0,00	-26,65±0,24	
90	109,42±0,98	0,27±0,02	-25,90±1,19	158,90±0,52	0,23±0,00	-30,65±0,31	0,27±0,02	184,48±3,77	0,27±0,02	184,48±3,77	0,27±0,02	-27,55±0,24	

- **Viskozite Ölçümü**

Stabilite çalışmaları süresince 25°C ve 4°C'deki saklama sıcaklıklarında bekletilen Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının viskozite ölçümleri Bölüm 3.2.6.'da anlatıldığı gibi 25°C'de koni plak tipi Brookfield DV2T RV viskometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Viskozite sonuçları için Tork (%) değerinin en uygun aralıkta bulunduğu kayma hızı 1500 sn⁻¹ (200 rpm) olduğundan formülasyonların bu kayma hızında elde edilen viskozite sonuçları karşılaştırılmıştır. 90 gün boyunca elde edilen viskozite sonuçları Tablo 4.16.'da verilmiştir.

Tablo 4.16. 25°C ve 4°C sıcaklıklarda saklanan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının 25°C'de 1500 sn⁻¹ kayma hızında ölçülen viskozite sonuçları (n=3).

Sıcaklık	Zaman (Gün)	Formülasyon Kodu		
		Fm-50-BOŞ	Fm-50-10	Fm-50-20
		Viskozite (cP)* ($\bar{X} \pm SH$)	Viskozite (cP)* ($\bar{X} \pm SH$)	Viskozite (cP)* ($\bar{X} \pm SH$)
25°C	0	1,63±0,04	1,98±0,03	2,04±0,01
	3	1,42±0,02	1,97±0,04	2,46±0,07
	7	1,44±0,02	2,26±0,02	2,55±0,03
	15	1,44±0,03	1,87±0,04	2,04±0,04
	30	1,43±0,07	2,16±0,02	1,97±0,05
	60	1,81±0,08	1,49±0,03	1,75±0,14
	90	1,89±0,01	1,45±0,05	1,39±0,08
4°C	0	1,63±0,04	1,98±0,03	2,04±0,01
	3	1,41±0,01	1,93±0,05	2,26±0,05
	7	1,41±0,00	2,21±0,01	2,35±0,04
	15	1,40±0,03	1,73±0,04	1,96±0,02
	30	1,37±0,05	1,95±0,04	1,91±0,01
	60	1,42±0,01	1,88±0,02	1,90±0,00
	90	1,45±0,11	1,64±0,01	1,87±0,02

* 25°C/1500 sn⁻¹

Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının viskozite değerlerinin stabilite çalışmaları sonucunda; 90 gün süresince her iki saklama sıcaklığında da saklanan tüm formülasyonların hazırlandıkları günkü viskoziteleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05). Bu sonuç tüm

formülasyonların 25°C ve 4°C'deki saklama sıcaklıklarında viskozite açısından 90 gün boyunca stabil olduklarını göstermiştir.

- **pH Tayini**

Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının 90 gün süresince 25°C ve 4°C'de saklanmasıyla pH değerlerinde meydana gelen değişim Tablo 4.17.'de verilmiştir.

Tablo 4.17. 25°C ve 4°C sıcaklıklarda saklanan Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının pH değerleri (n=3).

Sıcaklık	Zaman (Gün)	Formülasyon Kodu		
		Fm-50-BOŞ	Fm-50-10	Fm-50-20
		pH ($\bar{X} \pm SH$)	pH ($\bar{X} \pm SH$)	pH ($\bar{X} \pm SH$)
25°C	0	4,13±0,01	4,10±0,04	4,15±0,01
	3	4,13±0,01	4,12±0,04	4,12±0,05
	7	4,14±0,01	4,09±0,01	4,12±0,02
	15	4,09±0,01	4,04±0,03	4,04±0,01
	30	4,09±0,01	4,03±0,01	4,04±0,00
	60	4,09±0,01	4,04±0,02	4,02±0,01
	90	4,07±0,03	4,11±0,03	4,03±0,02
4°C	0	4,13±0,01	4,10±0,04	4,15±0,01
	3	4,13±0,01	4,14±0,04	4,11±0,04
	7	4,13±0,02	4,12±0,01	4,13±0,02
	15	4,10±0,01	4,02±0,00	4,03±0,00
	30	4,10±0,03	4,10±0,01	4,08±0,00
	60	4,09±0,02	4,07±0,04	4,04±0,01
	90	4,11±0,04	4,12±0,02	4,07±0,03

Formülasyonların stabilite çalışmaları boyunca gerçekleştirilen her iki saklama sıcaklığındaki pH sonuçları birbirine yakın olup 4,02-4,15 arasında gözlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirme sonucunda, 90 gün boyunca tüm stabilite koşullarındaki formülasyonlarda pH değerleri açısından istatistiksel olarak önemli derecede fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının hepsi 25°C ve 4°C'deki saklama koşullarında pH değerleri açısından 90 gün boyunca stabil bulunmuştur.

- **Etkin Madde Stabilitesi**

Etkin madde içeren Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonları etkin madde stabilitesinin tayini amacıyla hazırlanmalarının ardından içerdikleri simvastatin miktarı hesaplanmış ve formülasyonlar 90 gün boyunca 25°C ve 4°C’de saklanırken belirlenen zaman noktalarında formülasyonların içinde kalan simvastatin yüzdesi formülasyonların metanol içerisinde çözündürülmesi ile tayin edilmiştir. Stabilité çalışmaları boyunca simvastatin miktarında meydana gelen değişimler Tablo 4.18.’de sunulmuştur.

Tablo 4.18. 25°C ve 4°C sıcaklıkta saklanan Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının 90 gün boyunca içerdikleri etkin madde yüzdesi (n=6).

Zaman (Gün)	% Simvastatin (a/a) ($\bar{X} \pm SH$)			
	Fm-50-10		Fm-50-20	
	25°C	4°C	25°C	4°C
0	100,00±1,39	100,00±1,39	100,00±1,33	100,00±1,33
3	99,84±1,00	100,22±0,48	98,34±0,69	100,49±1,22
7	85,98±0,69	100,13±0,99	82,75±2,12	93,15±0,47
15	69,40±0,83	93,84±0,25	61,66±0,67	91,35±0,32
30	62,99±1,31	83,10±0,37	59,49±0,78	86,68±0,49
60	56,78±0,67	74,65±2,88	55,48±0,51	78,50±1,91
90	54,17±2,50	67,10±0,74	50,41±1,36	69,31±2,43

4°C saklama koşulunda Fm-50-10 formülasyonunda tayin edilen simvastatin miktarında 7 güne kadar anlamlı bir değişim olmazken ($p>0,05$). Fm-50-20 formülasyonunda ise 3 güne kadar elde edilen simvastatin miktarları arasındaki değişim anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$). Bu tarihlerden sonra her iki formülasyondaki simvastatin miktarları saklama süresi arttıkça azalmıştır ($p<0,05$). 25°C’de saklanan formülasyonlara ait sonuçlar incelendiğinde ise formülasyonların her ikisinde 3. güne kadar simvastatin miktarı değişmezken ($p>0,05$). 3. günden sonra simvastatin miktarı anlamlı derecede azalma göstermiştir ($p<0,05$).

Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarındaki simvastatin stabilitesinin değerlendirilmesi sonucunda, her iki formülasyonunda 4°C’deki saklama koşulunda 15 gün, 25°C’deki saklama koşulunda ise 3 gün süresince simvastatin miktarının

%90'ından fazlası koruduğu gözlenmiştir. 4°C'de saklanan Fm-50-10 formülasyonu 15 gün sonunda formülasyonun hazırlandığı günkü simvastatin miktarının %93,84'ünü, Fm-50-20 formülasyonu ise %91,35'ini korumaktadır. 25°C'de saklama koşullarında ise Fm-50-10 formülasyonu 3 gün sonunda formülasyonun hazırlandığı günkü simvastatin miktarının %99,84'ünü, Fm-50-20 formülasyonu da %98,34'ünü stabil olarak bulundurmaktadır. Sonuç olarak NLT formülasyonlarının 4°C'de saklanmaları, etkin maddenin stabilitesini koruması açısından daha uygun bulunmuştur. 4°C'de saklanan formülasyonlarda simvastatin miktarı 25°C'de saklanan formülasyonlara kıyasla tüm zaman noktaları için anlamlı derecede daha yüksek oranda tayin edilmiştir ($p<0,05$).

Literatürde NLT formülasyonlarının dondurarak kurutma ve püskürterek kurutma yöntemleri ile içerdiği su uzaklaştırılarak stabilitenin artırıldığına dair çalışmalar bulunmaktadır (240, 241). Bu tez kapsamında da taze hazırlanan NLT dispersiyonları doku iskelesi formülasyon bileşenleri ile birleştirilerek dondurarak kurutma yöntemi ile doku iskeleleri elde edildiğinden NLT formülasyonlarında gözlenen stabilite problemleri ortadan kaldırılmıştır.

4.5. Doku İskelesi Formülasyonlarının İn Vitro Karakterizasyonu

Hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının; çap-kalınlık, morfolojik, porozite ve por büyüklüğü dağılımı, su absorplama, in vitro parçalanma, mekanik, in vitro salım ve sitotoksosite özellikleri karakterize edilmiştir.

4.5.1. Çap- Kalınlık Tayini

Bölüm 3.2.8.'de belirtilen 2:1 veya 1:1 kitosan:kollajen polimer oranlarında, çapraz bağlı veya bağısız olarak, Fm-50-BOŞ veya Fm-50-20 formülasyonlarından hareketle veya bu formülasyonların ultrafiltrasyona uğratarak iki kat konsantre edilmiş Fm-50-BOŞ-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) dispersiyonları kullanılarak hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonlarının çap ve kalınlık değerleri 12 tekrarlı olarak mekanik bir kumpas yardımıyla ölçülmüştür. Sonuçlar tekrarlı 12 ölçümün ortalaması alınarak ifade edilmiştir (Tablo 4.19.).

Tablo 4.19. Doku iskelesi formülasyonlarının çap ve kalınlıkları (n=12).

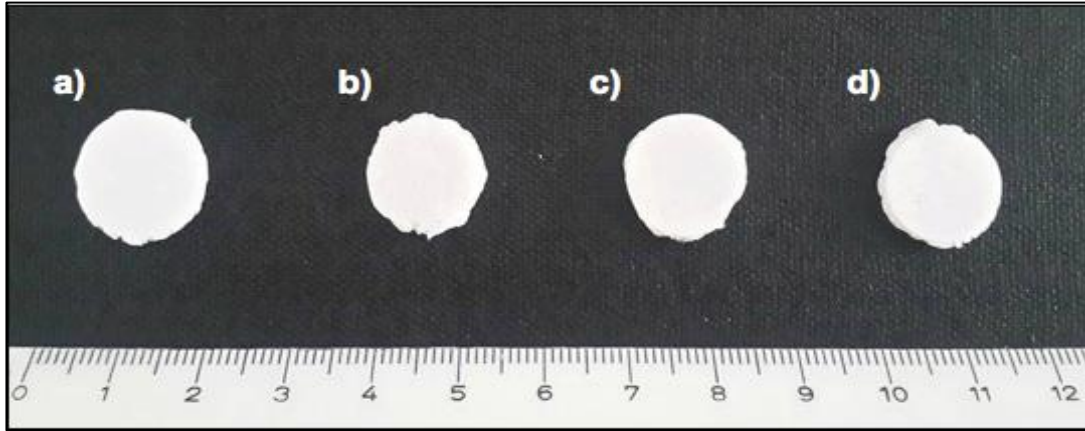
Formülasyon Kodu	Çap (cm) ($\bar{X} \pm SH$)	Kalınlık (cm) ($\bar{X} \pm SH$)
UF(-)Ç(-)1:1-B	1,53±0,01	0,26±0,01
UF(-)Ç(+1)1:1-B	1,52±0,01	0,27±0,01
UF(-)Ç(-)2:1-B	1,51±0,01	0,26±0,00
UF(-)Ç(+2)1:1-B	1,51±0,02	0,26±0,01
UF(+1)Ç(-)1:1-B	1,52±0,02	0,26±0,01
UF(+1)Ç(+1)1:1-B	1,52±0,01	0,26±0,01
UF(+1)Ç(-)2:1-B	1,50±0,02	0,26±0,01
UF(+1)Ç(+2)1:1-B	1,51±0,01	0,26±0,01
UF(-)Ç(-)1:1-SV	1,51±0,02	0,27±0,01
UF(-)Ç(+1)1:1-SV	1,51±0,01	0,26±0,01
UF(-)Ç(-)2:1-SV	1,52±0,01	0,26±0,01
UF(-)Ç(+2)1:1-SV	1,51±0,02	0,26±0,01
UF(+1)Ç(-)1:1-SV	1,52±0,01	0,27±0,00
UF(+1)Ç(+1)1:1-SV	1,52±0,01	0,26±0,01
UF(+1)Ç(-)2:1-SV	1,52±0,01	0,26±0,01
UF(+1)Ç(+2)1:1-SV	1,52±0,01	0,26±0,01

Farklı doku iskelesi formülasyonlarına ait çap ve kalınlık değerleri karşılaştırıldığında sonuçların birbirine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Hazırlanan tüm formülasyonlar için çap değeri yaklaşık olarak 1,52 cm ve kalınlık değeri ise 0,26 cm olarak bulunmuştur. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde formülasyonların çap ve kalınlık değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

4.5.2. Morfolojik Analizler

Doku iskelelerinin genel şekillerine ait görüntülerinin değerlendirilmesi amacıyla dijital fotoğraf makinesi ile çekilen fotoğraflarından yararlanılmıştır. Etkin

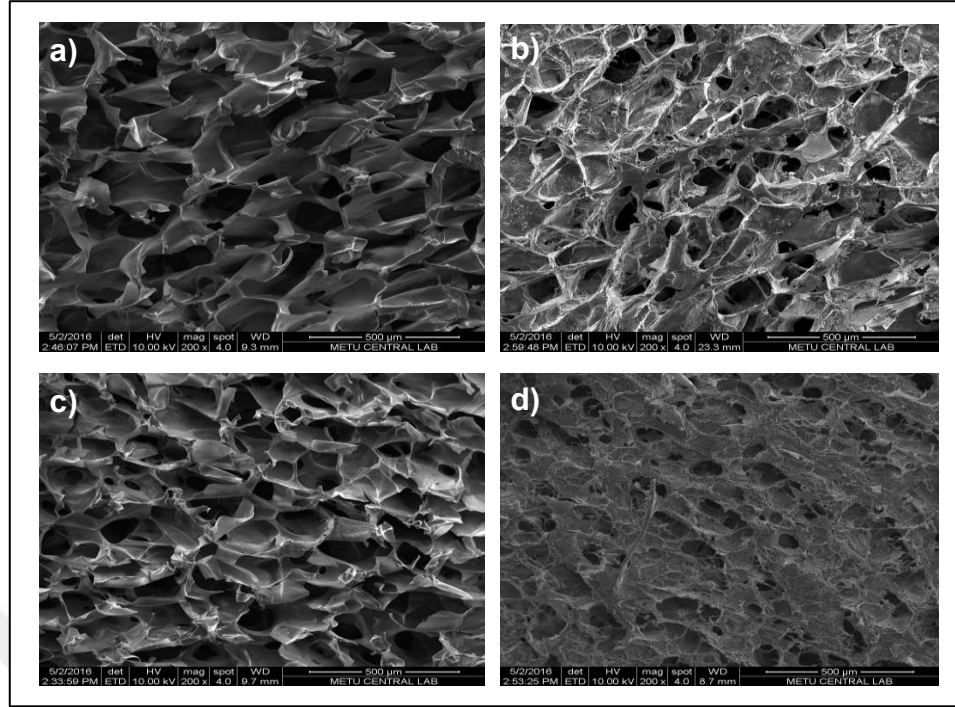
madde içermeyen ve simvastatin yüklenmiş doku iskelelerinden çapraz bağlı ve bağısız örneklerine ait fotoğraflar Şekil 4.38.'de verilmiştir.



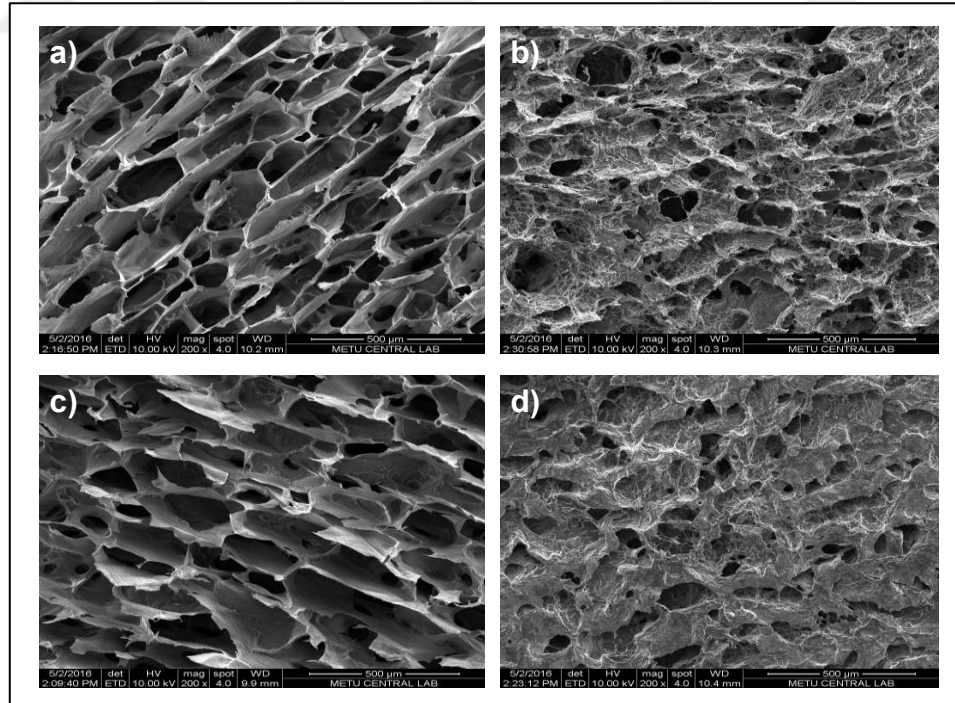
Şekil 4.38. Farklı doku iskelesi formülasyonlarına ait görüntüler a) UF(+) \checkmark (-)2:1-B, b) UF(+) \checkmark (+)2:1-B, c) UF(+) \checkmark (-)2:1-SV, d) UF(+) \checkmark (+)2:1-SV.

Şekil 4.38.'de verilen fotoğraflarda görüldüğü gibi tüm doku iskeleleri düzgün kenarlı, ince silindirik bir yapı göstermektedir. Aynı nanopartikül ve polimer içeriği ile hazırlanan doku iskelelerinin etkin madde yüklenme veya çapraz bağlanma durumları sonucunda genel şekillerinde herhangi bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir.

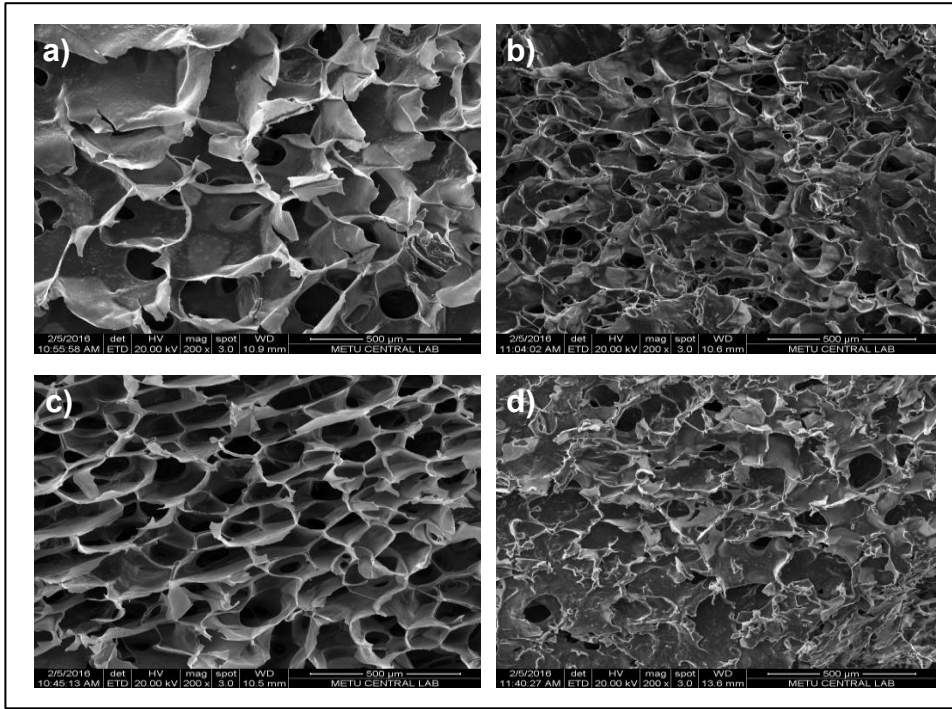
Bölüm 3.2.8.'de belirtilen doku iskeleleri, yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla altın-palladyum ile kaplanarak taramalı elektron mikroskopunda (Quanta 400F Field Emission) görüntülenmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.39.-4.42.'de sunulmaktadır.



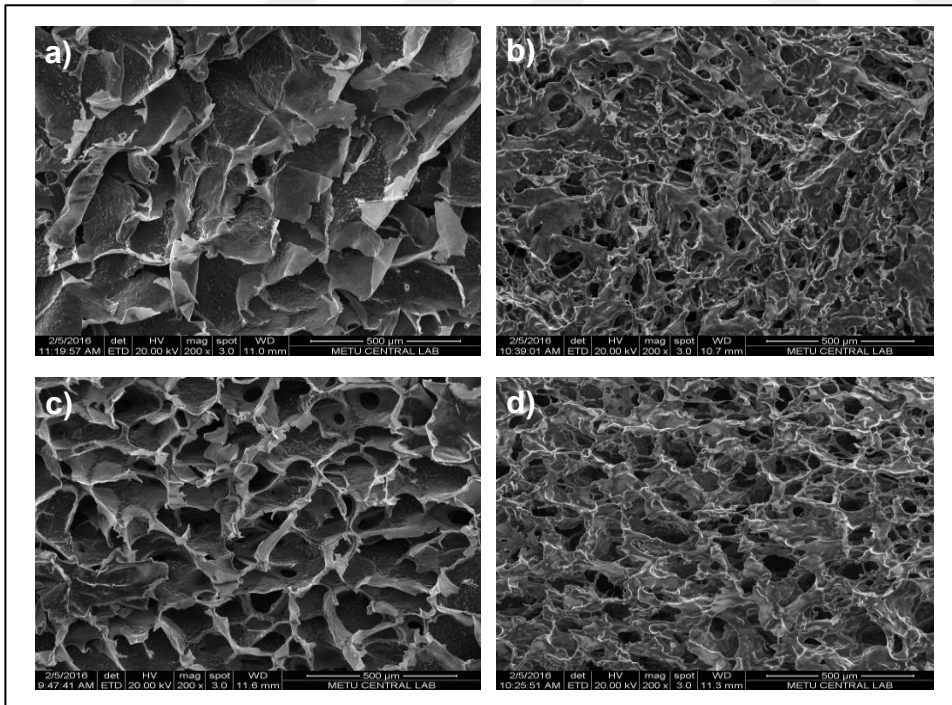
Şekil 4.39. Ultrafiltrasyon uygulanmamış, etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(-)Ç(-)1:1-B, b) UF(-)Ç(+):1:1-B, c) UF(-)Ç(-)2:1-B, d) UF(-)Ç(+):2:1-B.



Şekil 4.40. Ultrafiltrasyon uygulanmamış, etkin madde içeren Fm-50-20 NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(-)Ç(-)1:1-SV, b) UF(-)Ç(+):1:1-SV, c) UF(-)Ç(-)2:1-SV, d) UF(-)Ç(+):2:1-SV.



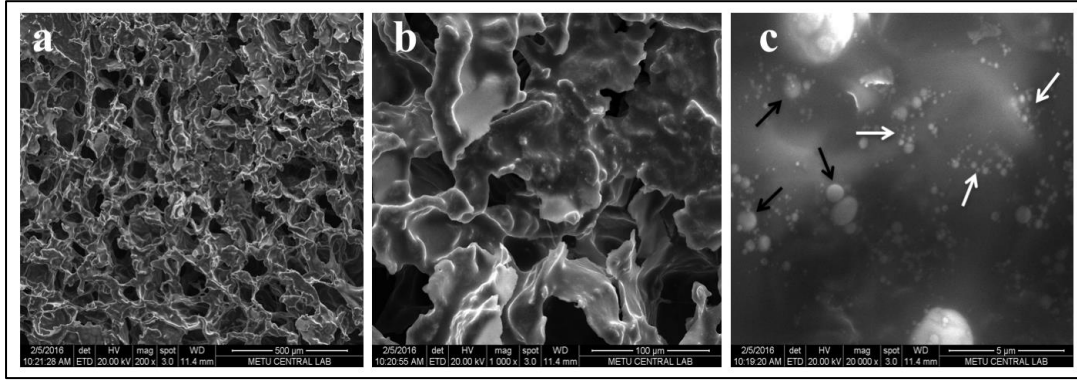
Şekil 4.41. Ultrafiltrasyon uygulanmış, etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(+)$\zeta(-)$1:1-B, b) UF(+)$\zeta(+)$1:1-B, c) UF(+)$\zeta(-)$2:1-B, d) UF(+)$\zeta(+)$2:1-B



Şekil 4.42. Ultrafiltrasyon uygulanmış, etkin madde içeren Fm-50-20 NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarına ait SEM görüntüleri x200 büyütme, a) UF(+)$\zeta(-)$1:1-SV, b) UF(+)$\zeta(+)$1:1-SV, c) UF(+)$\zeta(-)$2:1-SV, d) UF(+)$\zeta(+)$2:1-SV.

SEM görüntüleri incelendiğinde hazırlanan tüm doku iskelelerinin yüksek oranda poröz bir yapıya sahip olduğu ve porların birbirleri arasında bağlantılarının bulunduğu görülmektedir. Ultrafiltrasyonla konsantre edilmiş veya ultrafiltrasyon uygulanmamış NLT formülasyonları ile hazırlanan doku iskelelerinin yüzey görüntüleri karşılaştırıldığında nanopartikül ve/veya simvastatin konsantrasyonunun artırılmasının doku iskelelerinin yüzey görüntüleri ve por yapılarında belirgin bir farklılığa yol açmadığı görülmüştür (Şekil 4.39.-4.42.). Benzer sonuçlar 1:1 veya 2:1 kitosan:kollajen oranları ile hazırlanan doku iskelelerinin SEM görüntülerinde de gözlenmekte olup polimer oranlarının değiştirilmesinin doku iskelelerinin yüzey özelliklerini değiştirmediği gözlenmiştir (Şekil 4.39.-4.42.). Ancak tüm doku iskelesi formülasyonlarının çapraz bağımsız ve bağlı formülasyonları karşılaştırıldığında çapraz bağlama işleminin doku iskelelerinin yüzey yapılarında belirgin farklılıklara neden olduğu görülmektedir. Çapraz bağımsız doku iskelelerinin gözenekleri yaprak benzeri yapılarla daha uniform bir por dağılımı göstermektedir (Şekil 4.39.-4.42.). Bu formülasyonlar çapraz bağlandığında porlar arasındaki bağlantıların artarak yüzeydeki poröz görünümün azaldığı daha yoğun bir yapının olduğu görülmektedir. Çapraz bağlama işleminin porlar arasında gelişigüzel bağlantılar oluşturması farklı boyutlarda düzensiz bir şekilde dağılmış por dağılımlarının oluşmasına neden olmuştur. Doku iskelelerinin por büyüklükleri incelendiğinde, çapraz bağımsız formülasyonların 20-100 µm aralığında değişen dar bir por dağılımı gösterdiği gözlenmiştir. Bunun yanısıra çapraz bağlı formülasyonlar daha büyük por boyutları sahip olup, 20-200 µm arasında değişen geniş bir por büyüklüğü dağılımı göstermektedir. Bu sonuçlar doku iskelelerinin morfolojik farklılıklarının ve por büyüklüğü dağılımlarının esas olarak çapraz bağlama işleminden kaynaklandığını göstermektedir.

Doku iskelesi formülasyonlarının yüzey özelliklerinin SEM analizi ile incelenmesi sırasında iskelelerin por duvarlarına yerleşmiş olan lipit nanopartiküllere ait görüntüler de elde edilmiştir (Şekil 4.43.).



Şekil 4.43. UF(+)/Ç(+):2:1-SV doku iskelesi formülasyonunun aynı bölgeden elde edilmiş farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri a) x200 b) x1000 c) x20000 (beyaz oklar: nanoboyutlardaki lipit nanopartikülleri, siyah oklar: mikro boyutlardaki lipit nanopartikülleri göstermektedir).

Şekil 4.43.'de görüldüğü gibi NLT formülasyonlarına ait partiküller doku iskelelerinin poröz yapısına zarar vermeden por duvarlarına homojen bir şekilde dağılmıştır. Doku iskelesi formülasyonu içerisine yerleşen bu partiküller TEM görüntülerinde gözlemlendiği gibi sınırları belirgin küresel şekillerini korumakta olup partikül büyüklükleri de Zetasizer Nanoseries-ZS cihazı ile elde edilen sonuçlarla çoğunlukla uyum göstermiştir. Ancak elde edilen SEM görüntülerinde az miktarda da olsa mikron boyutlarında agregatlara rastlanmıştır. Agregasyona uğramış nanopartiküllere ait görüntüler benzer şekilde Nandagiri ve ark. (210) tarafından hazırlanan PLGA nanopartiküllerini içeren kitosan-jelatin doku iskelelerinde de gözlemlenmiştir.

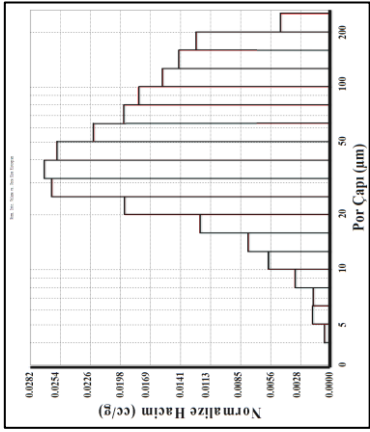
4.5.3. Porozite ve Por Büyüklüğü Dağılımı Tayini

Bölüm 3.2.9.'da belirtildiği gibi 2:1 veya 1:1 kitosan:kollajen polimer oranlarında, çapraz bağlı veya bağımsız olarak, Fm-50-BOŞ veya Fm-50-20 formülasyonlarından hareketle veya bu formülasyonların ultrafiltrasyona uğratılarak iki kat konsantre edilmiş Fm-50-BOŞ-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) dispersiyonları kullanılarak hazırlanan tüm doku iskelelerinin porozite ve por büyüklüğü dağılımı 140° temas açısı ile düşük basınçta (0-50 psi) civa uygulanarak civalı porozimetre cihazında (Poremaster 60, Quantachrome Corporation) ölçülmüştür. Formülasyonların porozite ve por büyüklüğü dağılımı sonuçları Tablo 4.20.'de, por büyüklüğü dağılımlarına ilişkin histogram grafikleri ise Şekil 4.44. ve 4.45.'de sunulmuştur.

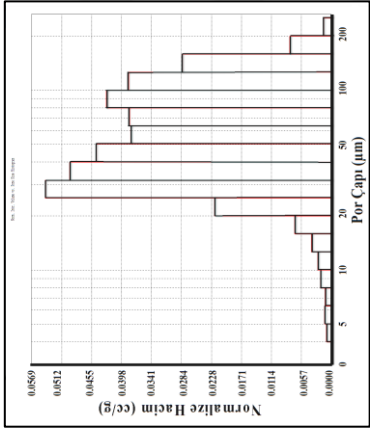
Tablo 4.20. Doku iskelesi formülasyonlarına ait porozite ve por büyüklüğü dağılım sonuçları

Formülasyon Kodu	% Porozite	Por Büyüklüğü Dağılım Aralığı (μm)
UF(-)Ç(-)1:1-B	91,07	20-100
UF(-)Ç(+1:1-B	85,63	30-170
UF(-)Ç(-)2:1-B	73,48	20-130
UF(-)Ç(+2:1-B	64,81	20-170
UF(+1)Ç(-)1:1-B	73,98	20-100
UF(+1)Ç(+1:1-B	74,26	20-170
UF(+1)Ç(-)2:1-B	82,20	30-130
UF(+1)Ç(+2:1-B	81,16	30-200
UF(-)Ç(-)1:1-SV	65,94	30-100
UF(-)Ç(+1:1-SV	68,37	30-200
UF(-)Ç(-)2:1-SV	75,32	20-100
UF(-)Ç(+2:1-SV	78,97	30-170
UF(+1)Ç(-)1:1-SV	92,57	30-130
UF(+1)Ç(+1:1-SV	70,35	30-200
UF(+1)Ç(-)2:1-SV	86,58	20-100
UF(+1)Ç(+2:1-SV	74,38	20-200

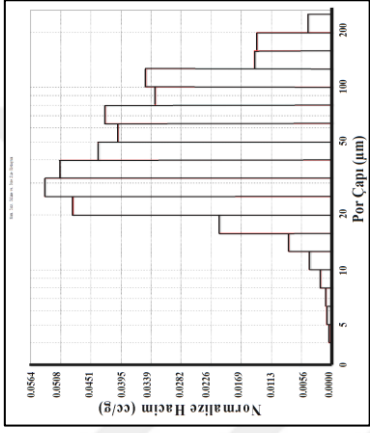
Tablo 4.20.'de verildiği gibi doku iskelesi formülasyonları minimum 20 μm , maksimum 200 μm por boyutu göstermektedir. Formülasyonların çapraz bağlanması por büyüklüğü dağılımını etkilemiştir. Çapraz bağımsız formülasyonlar 20 μm -100 μm , 20 μm -130 μm veya 30 μm -130 μm aralığında değişen daha dar bir dağılım gösterirken çapraz bağlama işlemi sonucunda bu aralık genişleyerek 20 μm -200 μm , 30 μm -200 μm , 20 μm -170 μm ve 30 μm -170 μm gibi küçük ve büyük por boyutlarının bir arada görüldüğü geniş dağılımlar göstermiştir.



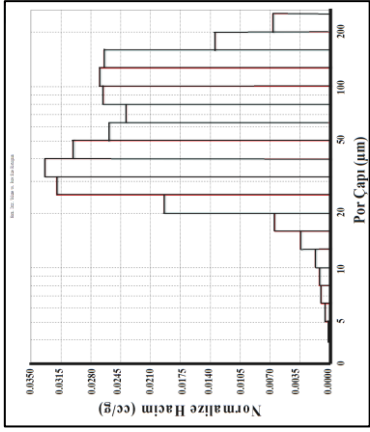
a) UF(-)Ç(-)1:1-B



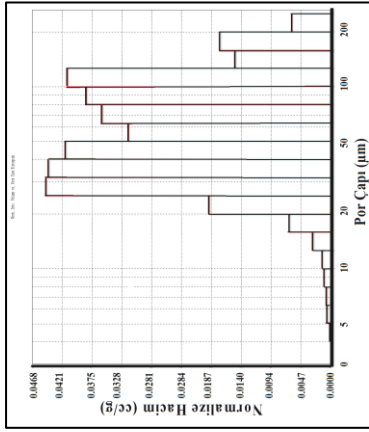
b) UF(-)Ç(+)-1:1-B



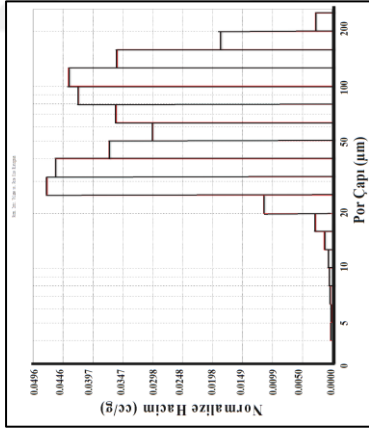
c) UF(-)Ç(-)2:1-B



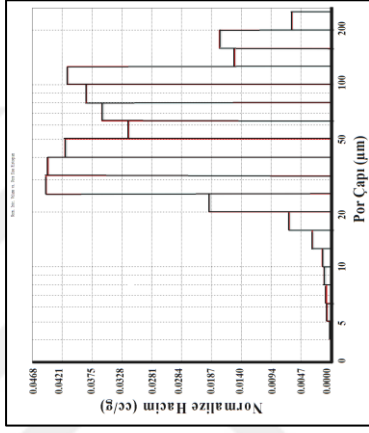
d) UF(-)Ç(+)-2:1-B



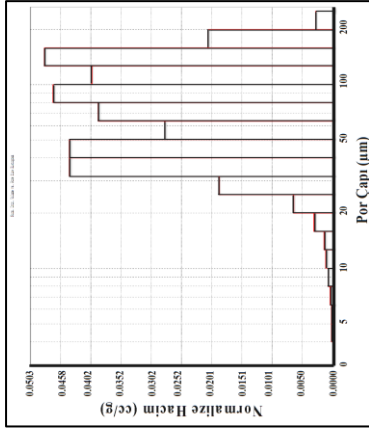
e) UF(+)-Ç(-)1:1-B



f) UF(+)-Ç(+)-1:1-B

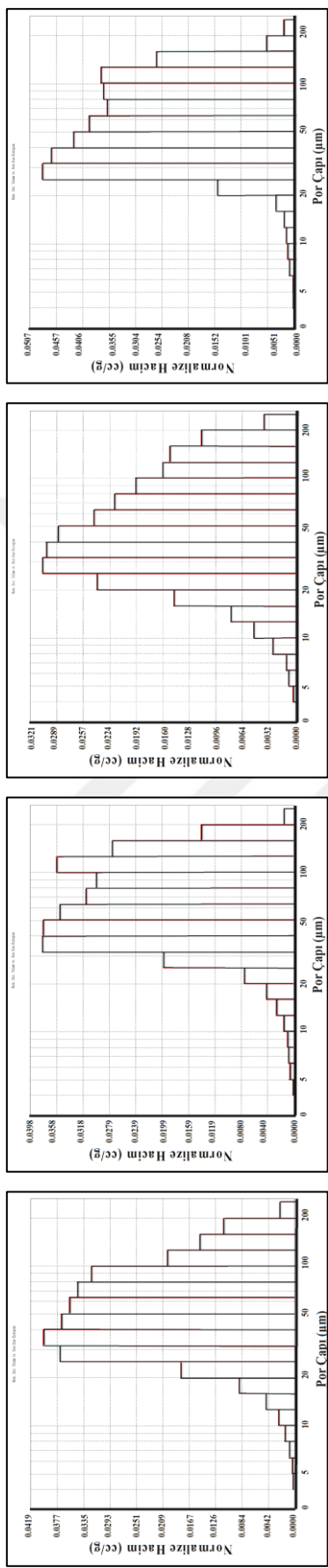


g) UF(+)-Ç(-)2:1-B



h) UF(+)-Ç(+)-2:1-B

Şekil 4.44. Etkin madde içermeyen farklı doku iskelesi formülasyonlarına ait por büyüklüğü dağılımları **a)** UF(-)Ç(-)1:1-B **b)** UF(-)Ç(+)-1:1-B **c)** UF(-)Ç(-)2:1-B **d)** UF(-)Ç(+)-2:1-B **e)** UF(+)-Ç(-)1:1-B **f)** UF(+)-Ç(+)-1:1-B **g)** UF(+)-Ç(-)2:1-B **h)** UF(+)-Ç(+)-2:1-B.

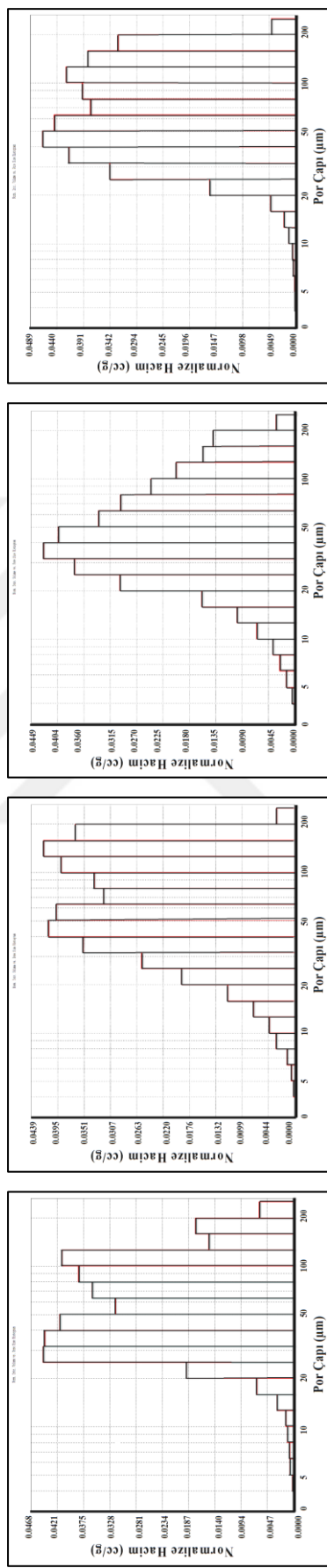


a) UF(-)Ç(-)1:1-SV

b) UF(-)Ç(+)-1:1-SV

c) UF(-)Ç(-)2:1-SV

d) UF(-)Ç(+)-2:1-SV



e) UF(+)-Ç(-)1:1-SV

f) UF(+)-Ç(+)-1:1-SV

g) UF(+)-Ç(-)2:1-SV

h) UF(+)-Ç(+)-2:1-SV

Şekil 4.45. Etkin madde içeren farklı doku iskelesi formülasyonlarına ait por büyüklüğü dağılımları **a) UF(-)Ç(-)1:1-SV**
b) UF(-)Ç(+)-1:1-SV **c) UF(-)Ç(-)2:1-SV** **d) UF(-)Ç(+)-2:1-SV** **e) UF(+)-Ç(-)1:1-SV** **f) UF(+)-Ç(+)-1:1-SV** **g) UF(+)-Ç(-)2:1-SV**
h) UF(+)-Ç(+)-2:1-SV.

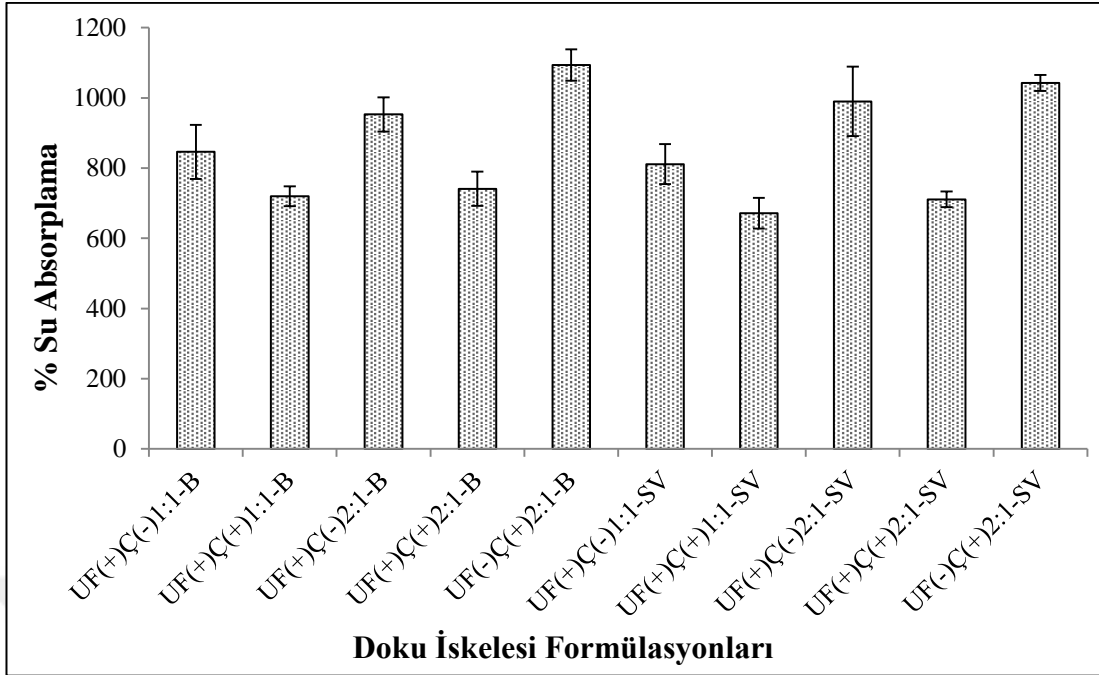
Farklı polimer oranı veya ultrafiltrasyon uygulanması durumlarında formülasyonların por büyüklüğü dağılımlarının birbirine benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.44. ve 4.45.). Elde edilen por büyüklükleri sonuçlarının, SEM görüntüleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Formülasyonların por büyüklükleri dağılımları, yara iyileşmesinde rol oynayan hücrelerin doku iskelesi içine penetrasyonunu ve bu hücrelerin canlılıklarını sürdürdürebilmeleri için gerekli olan besin maddeleri, hücre artıkları ve çeşitli hücresel sinyallerin aktarımını sağlayabilecek düzeydedir (242, 243). Özellikle çapraz bağlı formülasyonların geniş por büyüklüğü dağılımı göstermesi, bu doku iskelelerinin pek çok hücre tipinin penetrasyonu ve proliferasyonu için uygun özelliklere sahip olmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak hazırlanan çapraz bağlı doku iskeleleri doku mühendisliği uygulamaları açısından çok yönlü uygulamaları olan formülasyonlar olarak değerlendirilebilmektedir (244).

Tüm formülasyonlar doku mühendisliği çalışmaları için istenen özellikte yüksek porozite göstermekte olup % Porozite değerleri %64,81 ile %92,57 arasında değişmektedir (Tablo 4.20.). Formülasyonlar arasındaki polimer oranı, ultrafiltrasyon ve çapraz bağlanma farklılıkları % porozite sonuçlarında ilişkili bir farklılığa yol açmamıştır (245).

4.5.4. Su Absorplama Özelliklerinin İncelenmesi

Su absorplama özelliklerinin tayini Bölüm 3.2.8.'de belirtilen konsantre edilmiş NLT formülasyonları kullanılarak hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonları ile birlikte konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV formülasyonları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerinin $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de pH: 7,4 PBS tamponu içerisindeki 24 saat inkübasyonu sonucunda hesaplanan % su absorplama sonuçları Şekil 4.46.'da verilmiştir.



Şekil 4.46. Doku iskelesi formülasyonlarının $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de pH: 7,4 PBS tamponu içerisinde 24 saat sonunda elde edilen su absorpsiyon değerleri (n=6).

Şekil 4.46.'da görüldüğü gibi tüm doku iskeleleleri ağırlıklarının yaklaşık olarak %671,31-%1093,61 katı arasında sıvı ile yüklenerek yüksek bir su absorplama özelliği göstermiştir. Doku iskeleleleri arasında en yüksek su absorpsiyonu UF(-)Ç(+2):1-B (%1093,61) ve UF(-)Ç(+2):1-SV (%1042,90) formülasyonlarında; en düşük su absorpsiyonu ise UF(+)/Ç(+1):1-SV (%671,31) ve UF(+)/Ç(+2):1-SV (%710,88) formülasyonlarında gözlenmiştir. Doku iskelelelerinin su absorplama değerlerinin yüksek bulunması hazırlanan formülasyonların üç boyutlu poröz yapıda olduklarını desteklemektedir (123).

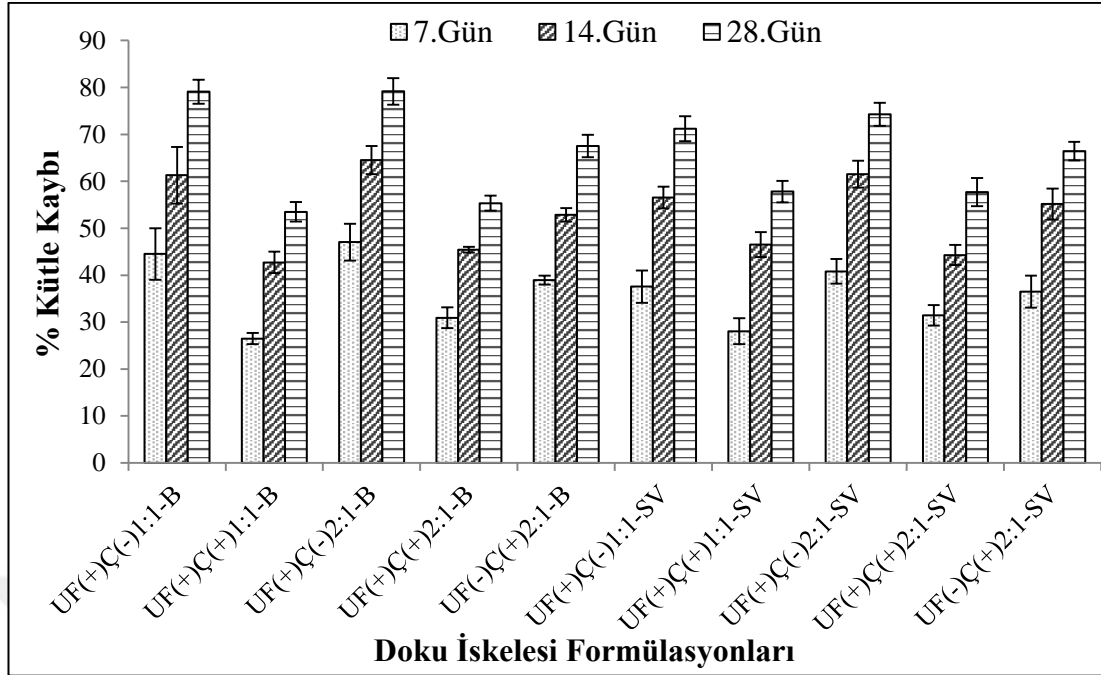
Formülasyonlar diğer değişkenler sabit tutularak kitosan:kollajen polimer oranı (1:1 ve 2:1), çapraz bağlanma [Ç(-) ve Ç(+)], etkin madde yüklenme (B ve SV) ve ultrafiltrasyon uygulanması [UF(-) ve UF(+)] durumlarına göre uygun ikili karşılaştırmalarla % su absorpsiyonu değerleri açısından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda 2:1 kitosan:kollajen polimer oranında hazırlanan doku iskelelelerinin çapraz bağlandıklarında su absorplama kapasitelerinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). 1:1 kitosan:kollajen polimer oranı kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda ise benzer şekilde çapraz bağlama işlemi öncesi formülasyonlar daha yüksek su absorplama göstermiş ancak

bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Ultrafiltrasyon uygulanmamış NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV formülasyonları ultrafiltre edilmiş formülasyonlarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek suyu absorplamışlardır ($p<0,05$). Diğer formülasyonların su absorpsiyon değerleri arasında ise fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Su absorplama kapasitesi doku iskelesinin hidrofiliğine ve üç boyutlu poroz yapısına dayanmaktadır. Ultrafiltrasyonla nanopartikül konsantrasyonunun artırıldığı doku iskelesi formülasyonlarında lipit nanopartiküllerin hidrofobik özelliği nedeniyle doku iskelesinin hidrofiliği azalmaktadır. Bu nedenle ultrafiltrasyon uygulanmamış formülasyonlar daha hidrofilik bir yapıya sahip olduklarından su absorplama kapasiteleri literatürle uyumlu olarak daha yüksek bulunmuştur (123).

4.5.5. İn Vitro Parçalanma

Konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonlarının ve konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV doku iskelelerinin in vitro parçalanma özelliklerinin incelenmesi için tüm doku iskelesi formülasyonları $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'deki pH: 7,4 PBS tamponu içerisinde 28 gün süresince inkübe edilmişlerdir. Bölüm 3.2.10.'da anlatıldığı gibi belirli zaman aralıklarında doku iskeleleri inkübasyon çözeltisinden çıkarılarak % kütle kaybı değerleri hesaplanmıştır. Şekil 4.47.'de doku iskelelerinin in vitro parçalanma analizi sonuçları verilmektedir.



Şekil 4.47. Doku iskelesi formülasyonlarının $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de pH: 7,4 PBS tamponu içerisinde 28 gün süresince elde edilen in vitro parçalanma sonuçları (n=6).

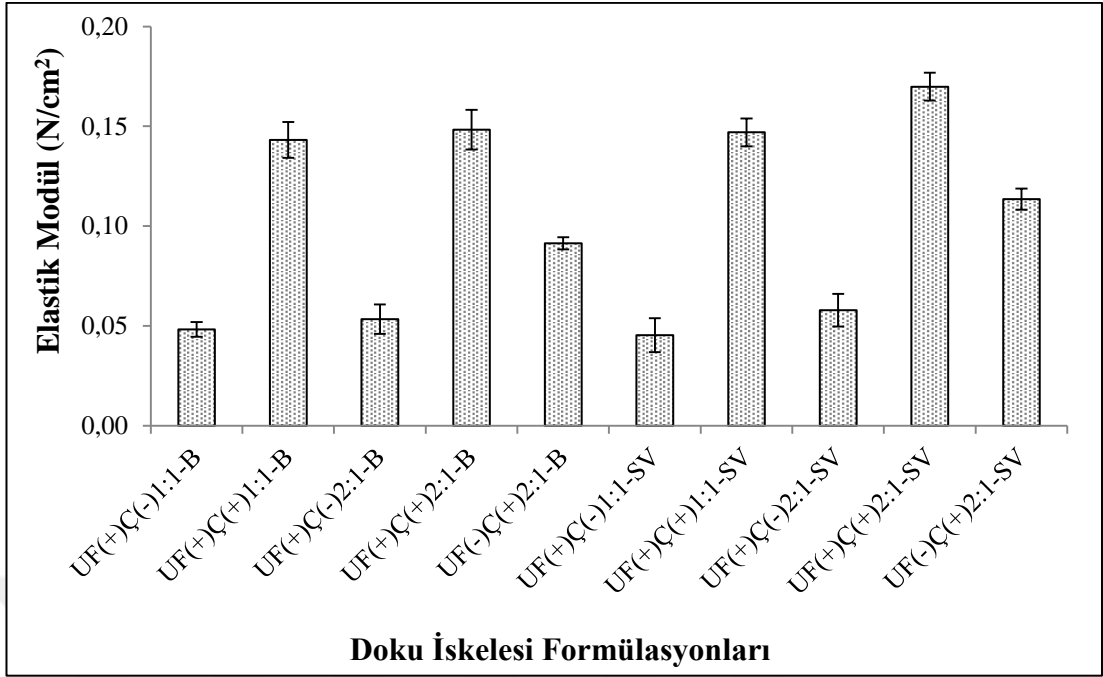
28. gün sonunda doku iskelesi formülasyonlarının % kütle kaybı sonuçları; ultrafiltrasyon uygulanmış çapraz bağımsız formülasyonlar için %71,17-%79,17 çapraz bağlı formülasyonlarda ise %53,49-%57,83 arasında değişmektedir. Ultrafiltrasyon uygulanmamış UF(-)Ç(+)-2:1-B ve UF(-)Ç(+)-2:1-SV formülasyonları için ise sırasıyla % 67,54 ve %66,44 kütle kaybı gözlenmiştir (Şekil 4.47.).

Formülasyonların 28 gün sonundaki % kütle kaybı sonuçları diğer değişkenler sabit tutularak kitosan:kollajen polimer oranı (1:1 ve 2:1), çapraz bağlanma [Ç(-) ve Ç(+)], etkin madde yüklenme (B ve SV) ve ultrafiltrasyon uygulaması [UF(-) ve UF(+)] farklılıklarına göre ikili karşılaştırmalarla istatistiksel olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda, polimer oranı ve etkin madde yüklenme durumlarının % kütle kaybı sonuçları arasında anlamlı derecede farklılığa neden olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Ancak çapraz bağlı doku iskelesi formülasyonlarının tümü, çapraz bağımsız formülasyonlara göre tüm zaman noktalarında daha az parçalanma göstermiştir ($p<0,05$). Bu sonuç çapraz bağlama işlemi ile istenilen artmış yapısal stabilitenin sağlandığını göstermektedir. Şekil 4.47.'de görüldüğü gibi bağlı ve bağımsız formülasyonlar arasındaki bu fark inkübasyon süresi arttıkça daha da artış göstererek 28. güne gelindiğinde oldukça belirginleşmiştir ($p<0,05$). Bununla

birlikte ultrafiltrasyon uygulanmadan hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV formülasyonlarının parçalanma oranları ultrafiltrasyon uygulanan formülasyonlara göre daha yüksektir ($p < 0,05$). Elde edilen bu sonuç Tan ve ark. (246) tarafından hazırlanan PLGA mikrokürelerini içeren jelatin/kitosan/ hyaluronan doku iskelesi formülasyonuna ait sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Lipit nanopartikül konsantrasyonu doku iskelesi formülasyonlarının parçalanma özelliklerini etkileyen önemli bir parametre olup kütle kaybında gözlenen bu farklılık, lipit nanopartiküllerin kitosan ve kollajen polimerlerine kıyasla daha hidrofobik bir yapıya sahip olması ve hidrolize karşı duyarlılığının daha az olmasından kaynaklanmıştır.

4.5.6. Mekanik Özelliklerin İncelenmesi

Doku iskelesi formülasyonlarının kitosan:kollajen polimer oranı (1:1 ve 2:1), çapraz bağlanma [Ç(-) ve Ç(+)], etkin madde yüklenme (B ve SV) ve ultrafiltrasyon uygulaması [UF(-) ve UF(+)] değişkenlerine bağlı olarak gösterdikleri mekanik dayanıklılık özelliklerini incelemek amacıyla Bölüm 3.2.8.'de yer alan konsantre edilmiş NLT formülasyonları ile hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonları ve konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV doku iskelesi formülasyonlarının mekanik analizleri Bölüm 3.2.10.'da anlatıldığı gibi Texture Analyser (TA-XTPlus, Stable Microsystems) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri üzerine 5 mm/dk sabit hızda, 5 N ağırlığında kuvvet uygulanması sonucunda hesaplanan elastik modül değerleri Şekil 4.48.'de verilmiştir.



Şekil 4.48. Doku iskelesi formülasyonlarına ait elastik modül değerleri (n=6).

Şekil 4.48.'de gözlemlendiği gibi çapraz bağlı formülasyonların elastik modül değerleri çapraz bağımsız formülasyonlara göre önemli derecede daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). Çapraz bağımsız formülasyonların elastik modül değerleri 0,045'ten 0,058'e (N/cm^2) kadar değişmekte iken, çapraz bağlı formülasyonlar için bu değer 0,091'den 0,170'e (N/cm^2) kadar değişmekte olup bu formülasyonlar kendi aralarında anlamlı bir fark göstermemektedir ($p > 0,05$). Çapraz bağımsız formülasyonların çapraz bağlı formülasyonlara göre daha düşük bir elastik modüle sahip olması bu formülasyonların yumuşak ve kırılğan bir yapıya sahip olduklarını ve çapraz bağlama işlemi ile hazırlanan doku iskelelerinin mekanik dayanıklılıklarının artırılabilceğini göstermiştir. Shimojo ve ark. (214) tarafından yapılan bir çalışmada ise elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak, hazırlanan kitosan doku iskeleleri arasında en yüksek mekanik güç TPF ile çapraz bağlanmış formülasyonda gözlenmiştir.

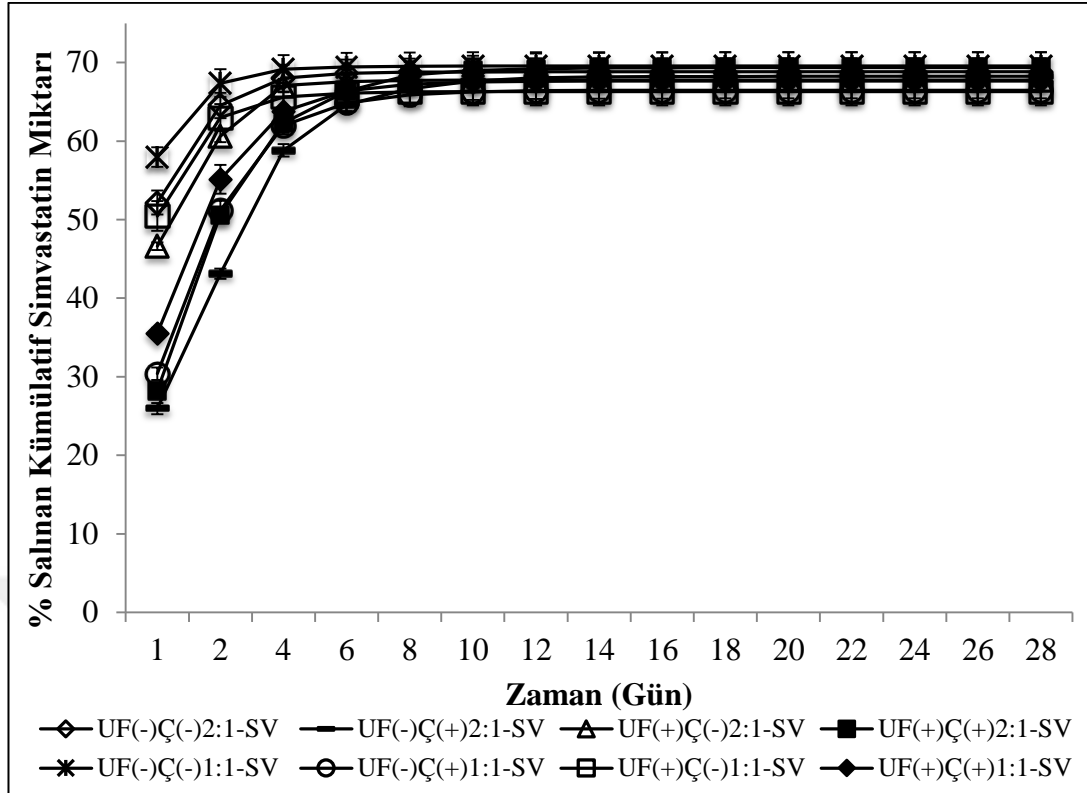
Ultrafiltrasyon uygulanarak doku iskelesindeki nanopartikül konsantrasyonunun artırıldığı formülasyonlardan UF(+)-Ç(+)-2:1-B ve UF(+)-Ç(+)-2:1-SV formülasyonlarının mekanik dayanıklılıkları, ultrafiltrasyon uygulanmamış karşılıkları olan UF(-)-Ç(+)-2:1-B ve UF(-)-Ç(+)-2:1-SV formülasyonlarına göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.48.). Ultrafiltrasyon işlemi, dolayısıyla

nanopartikül konsantrasyonu mekanik gücü önemli derecede artırmıştır ($p < 0,05$). Bu sonuç Gentile ve ark. (123) ile uyumlu bulunarak mekanik güçteki artışın nanopartiküllerin kuvvetlendirici etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

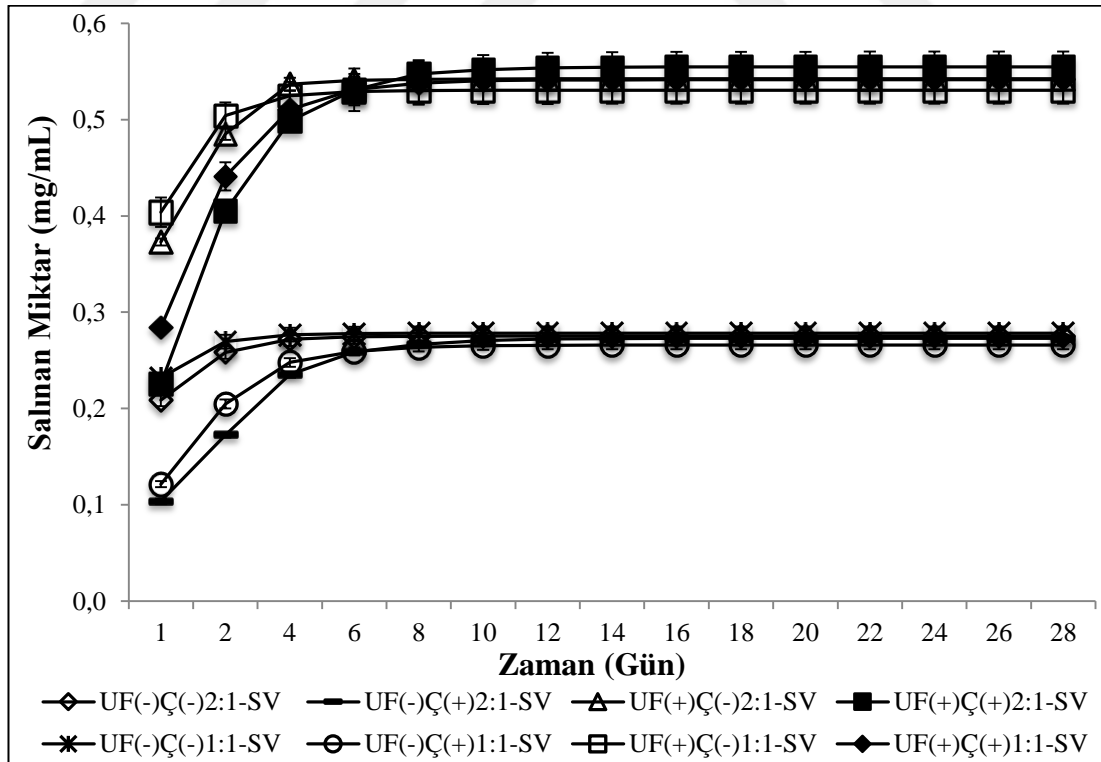
Kitosan:kollajen polimer oranı (1:1 ve 2:1) ve etkin madde yüklenme (B ve SV) değişkenlerinin doku iskelesi formülasyonlarının mekanik özellikleri üzerindeki etkisi diğer değişkenler sabit tutularak incelendiğinde formülasyonların elastik modül değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$). Sonuç olarak, çapraz bağlama ve ultrafiltrasyon işlemi doku iskelesi formülasyonlarının mekanik dayanıklılıklarını artırırken, kitosan:kollajen polimer oranı (1:1 ve 2:1) ve etkin madde yüklenme (B ve SV) farklılıkları formülasyonların mekanik özelliklerini değiştirmemiştir.

4.5.7. İn Vitro Salım Çalışmaları

Bölüm 3.2.9.'da belirtilen 2:1 veya 1:1 kitosan:kollajen polimer oranlarında, çapraz bağlı veya bağısız olarak, Fm-50-20 formülasyonlarından hareketle veya bu formülasyonun ultrafiltrasyona uğratarak iki kat konsantre edilmiş Fm-50-20-UF(2KAT) dispersiyonu ile hazırlanan tüm doku iskelesi formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları, %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponu içerisinde $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ve 120 spm hızdaki yatay çalkalayıcı su banyosu kullanılarak 28 gün süresince gerçekleştirilmiştir. Elde edilen salım profilleri Şekil 4.49. ve Şekil 4.50.'de sunulmuştur.



Şekil 4.49. Doku iskelesi formülasyonlarından zamana karşı salınan kümülatif simvastatin miktarı (n=6).



Şekil 4.50. Doku iskelesi formülasyonlarından simvastatinin salım profili (n=6).

Doku iskelesi formülasyonları çapraz bağlama, polimer oranı ve yüklenen simvastatin miktarlarına bağlı olarak farklı salım özellikleri göstermişlerdir. Şekil 4.49.'da gözlemlendiği gibi çapraz bağımsız formülasyonlar, çapraz bağlı formülasyonlara göre yaklaşık olarak iki kat daha fazla bir başlangıç patlama salımı (%46,61-57,98) göstermiş daha sonra yavaş bir salım hızıyla 4-6 günde platoya ulaşmıştır. Çapraz bağlı formülasyonlar ise bağımsız formülasyonlara göre daha dayanıklı bir yapı ve daha yavaş parçalanma özellikleri gösterdiklerinden simvastatini doku iskelesi yapısı içerisinde daha uzun süre hapsedebilmektedir. Bu nedenle çapraz bağlı formülasyonlar daha düşük bir başlangıç patlama salımının (%25,94-35,52) ardından daha hızlı bir salım hızı ile kontrollü simvastatin salımı sağlayarak 8-10 günde platoya ulaşmıştır. Salım çalışması 28 gün boyunca sürdürülmüş olup 28 günün sonunda tüm doku iskelesi formülasyonlarının içerdikleri simvastatinin %66,29-%69,34'ünü saldığı tespit edilmiş ve salınan simvastatin yüzdeleri arasında fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Doku iskelesi formülasyonlarının Şekil 4.50.'de verilen zamana karşı salım profilleri incelendiğinde ultrafiltrasyon uygulanarak yüklenen simvastatin miktarının iki kat artırıldığı UF(+) ζ (-)1:1-SV, UF(+) ζ (+)1:1-SV, UF(+) ζ (-)2:1-SV ve UF(+) ζ (+)2:1-SV formülasyonlarından 28 gün sonunda salınan simvastatin miktarlarının 0,530 mg/mL-0,555 mg/mL arasında, ultrafiltrasyon uygulanmamış UF(-) ζ (-)1:1-SV, UF(-) ζ (+)1:1-SV, UF(-) ζ (-)2:1-SV ve UF(-) ζ (+)2:1-SV formülasyonlarında ise 0,266 mg/mL-0,278 mg/mL arasında olduğu gözlenmiştir. Ultrafiltrasyon uygulanmış ve uygulanmamış formülasyonlardan salınan simvastatin miktarları kendi aralarında farklılık göstermezken ($p>0,05$), ultrafiltrasyon uygulanması sonucunda formülasyonlardan salınan simvastatin miktarlarının anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak formülasyonların 28 gün sonundaki kümülatif salınan simvastatin yüzdeleri arasında fark bulunmamaktayken ($p>0,05$), bu süre sonunda, ultrafiltrasyon uygulanmış ve uygulanmamış formülasyonlar arasında salınan simvastatin miktarları (mg/mL) açısından fark olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Elde edilen bu sonuç formülasyondaki simvastatin konsantrasyonunun artırılması ile salınan simvastatin miktarının da arttığını göstermektedir.

Doku iskelesi formülasyonlarından etkin madde salımının kinetiğini belirlemek amacıyla zamana karşı salınan kümülatif simvastatin yüzderinin sıfırıncı derece ve Higuchi kinetiğine uygunluğu incelenmiştir (t=96 saat). Bu kinetiklere göre hesaplanan salım hızları, tanımlayıcılık katsayıları (R^2) ve 28 gün sonunda kümülatif salınan simvastatin yüzdeleri Tablo 4.21.'de verilmiştir.

Tablo 4.21. Doku iskelesi formülasyonlarından 28 gün sonunda salınan kümülatif simvastatin miktarı ve salım hızları (t=96 saat).

Formülasyon Kodu		Salım Miktarı (%)	Salım Hızı (%.saat ⁻¹) (%.saat ^{-1/2})*	R ²
UF(-)Ç(-)1:1-SV	0. derece Kinetiği	69,558 ± 1,758	0,138 ± 0,008	0,7141
	Higuchi Kinetiği		2,174 ± 0,111	0,7926
UF(-)Ç(+)1:1-SV	0. derece Kinetiği	66,465 ± 1,036	0,408 ± 0,015	0,8682
	Higuchi Kinetiği		6,271 ± 0,180	0,9236
UF(+)Ç(-)1:1-SV	0. derece Kinetiği	66,292 ± 1,755	0,188 ± 0,012	0,7245
	Higuchi Kinetiği		2,947 ± 0,146	0,8019
UF(+)Ç(+)1:1-SV	0. derece Kinetiği	67,657 ± 2,836	0,362 ± 0,015	0,8409
	Higuchi Kinetiği		5,589 ± 0,185	0,9017
UF(-)Ç(-)2:1-SV	0. derece Kinetiği	68,810 ± 1,735	0,199 ± 0,011	0,7666
	Higuchi Kinetiği		3,095 ± 0,136	0,839
UF(-)Ç(+)2:1-SV	0. derece Kinetiği	68,244 ± 0,841	0,438 ± 0,009	0,9541
	Higuchi Kinetiği		6,630 ± 0,082	0,9846
UF(+)Ç(-)2:1-SV	0. derece Kinetiği	67,783 ± 0,857	0,263 ± 0,011	0,8477
	Higuchi Kinetiği		4,048 ± 0,129	0,9072
UF(+)Ç(+)2:1-SV	0. derece Kinetiği	69,342 ± 1,966	0,440 ± 0,017	0,8697
	Higuchi Kinetiği		6,768 ± 0,193	0,9247

*Higuchi kinetiğine göre hesaplanan salım hızı

Tablo 4.21.'de görüldüğü gibi doku iskelesi formülasyonlarının tamamı, Higuchi kinetiğine daha uygun bir salım göstermektedir. Higuchi kinetiğine göre hesaplanan salım hızları incelendiğinde formülasyonların farklı salım hızlarına sahip oldukları gözlenmiştir. Salım hızlarına göre formülasyonlar sıralanacak olursa; UF(+)Ç(+)2:1-SV> UF(-)Ç(+)2:1-SV> UF(-)Ç(+)1:1-SV> UF(+)Ç(+)1:1-SV> UF(+)Ç(-)2:1-SV> UF(-)Ç(-)2:1-SV> UF(+)Ç(-)1:1-SV ve UF(-)Ç(-)1:1-SV şeklinde bir sıralama yapılabilmektedir. Tablo 4.21.'de gözlemlendiği gibi doku iskelesi formülasyonlarının salım hızlarındaki değişimler doku iskelelerinin çapraz bağlanma

ve polimer oranı farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Çapraz bağlı formülasyonlar çapraz bağırsız formülasyonlara göre önemli derecede daha yüksek bir salım hızı göstermiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte 2:1 kitosan:kollajen polimer oranı ile daha fazla kitosan içeren formülasyonlardan simvastatin salım hızı, 1:1 polimer oranı karşılığı olan formülasyonlarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha büyüktür ($p<0,05$). Bu sonuç doku iskelelerinden salım hızının formülasyonların çapraz bağlanması ve polimer oranının değiştirilmesi ile kontrol edilebileceğini göstermiştir.

İn vitro salım çalışmaları sonucunda elde edilen tüm veriler incelendiğinde, UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-SV formülasyonunun diğer formülasyonlara göre daha yüksek bir salım hızı ve salım miktarı ile kontrollü bir salım profili gösterdiği gözlenmiştir. İn vivo ortamda hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının içerdiği simvastatin miktarını kontrollü bir şekilde salarak uzun etki göstermesi amaçlandığından UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-SV formülasyonunun in vivo çalışmalar için gerekli özellikleri taşıdığı düşünülmüştür.

4.5.8. Sitotoksosite Çalışmaları

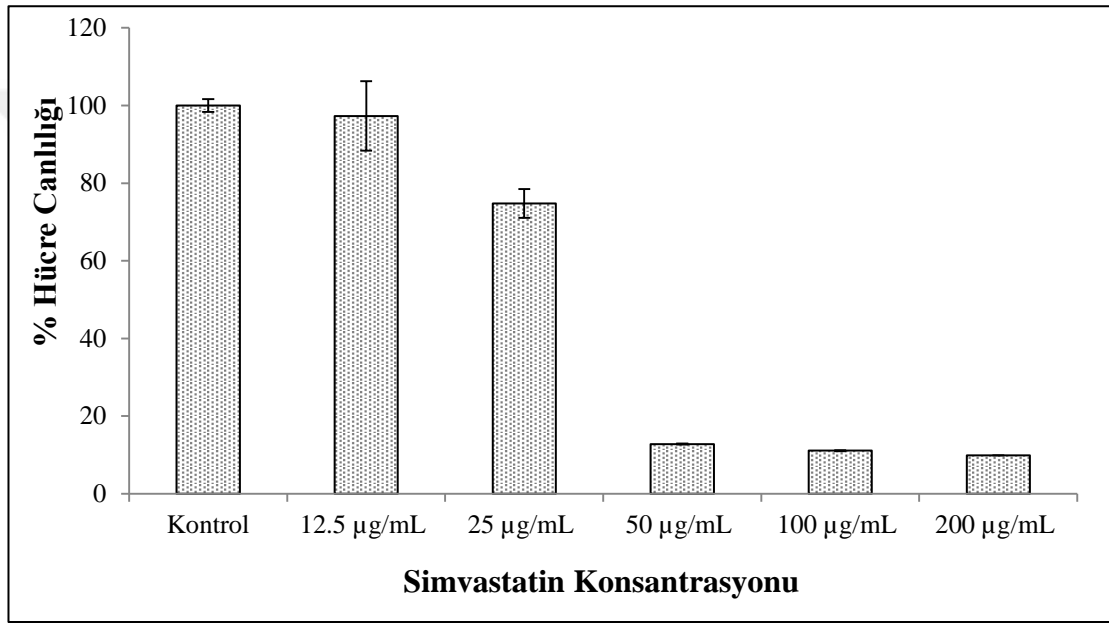
Doku iskelelerinin hücreler üzerindeki toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla in vitro sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Hücre toksisitesi ve hücre canlılığının değerlendirilmesi öncelikle etkin madde üzerinde gerçekleştirilmiş ve simvastatinin belirlenen toksik dozları dikkate alınarak etkin madde yüklenmiş ve yüklenmemiş doku iskelesi formülasyonları üzerinde sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

- **Simvastatinin Sitotoksosite Çalışmaları**

Simvastatinin 200, 100, 50, 25 ve 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarında kültür ortamında hazırlanan çözeltileri L929 fare fibroblast hücrelerine uygulanmış ve 24 saat sonunda hücre canlılık değerleri bulunmuştur (Tablo 4.22. ve Şekil 4.51.).

Tablo 4.22. Simvastatin çözeltilerinin L929 hücrelerinde 24. saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen % hücre canlılığı değerleri (n=6).

Simvastatin Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Dilüsyon Oranı	Hücre Canlılığı (%) ($\bar{X} \pm \text{SH}$)
12,5	1/16	97,32 \pm 8,94
25	1/8	74,74 \pm 3,72
50	1/4	12,78 \pm 0,11
100	1/2	11,08 \pm 0,16
200	-	9,88 \pm 0,04



Şekil 4.51. Simvastatin çözeltilerinin L929 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları (n=6).

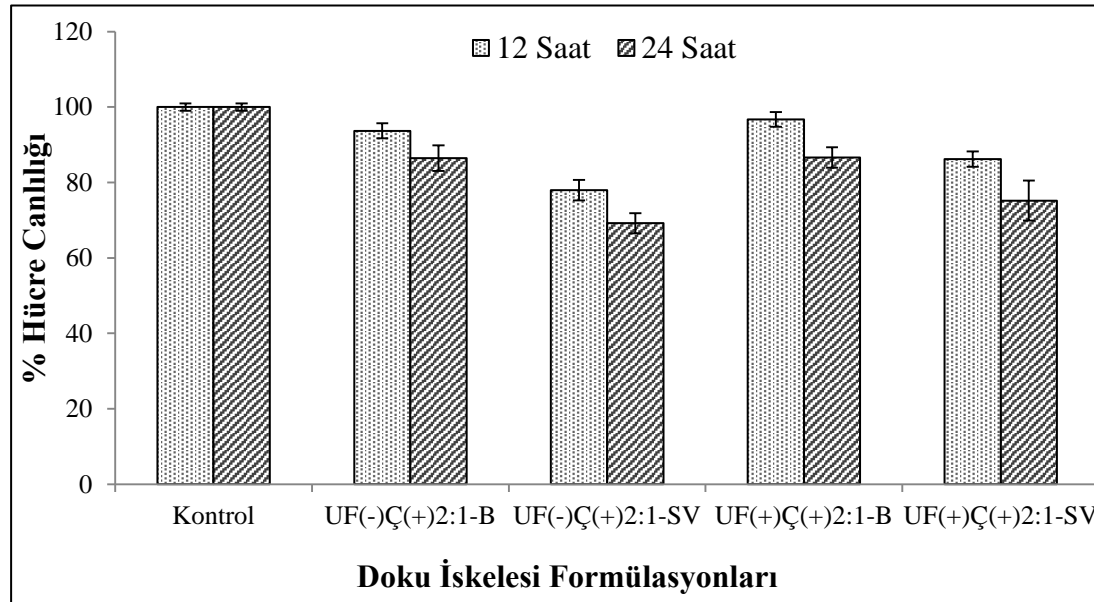
Şekil 4.51.'de görüldüğü gibi simvastatin konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığı azalmaktadır. Tablo 4.22.'de verildiği gibi 24 saat sonundaki simvastatin konsantrasyonlarına göre hücre canlılığı sonuçları 12,5 $\mu\text{g/mL}$ 'de %97,32, 25 $\mu\text{g/mL}$ 'de %74,74, 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de %12,78, 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de %11,08 ve 200 $\mu\text{g/mL}$ 'de %9,88 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 12,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda % hücre canlılığı değerleri açısından fark bulunmazken ($p > 0,05$) 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ ve 200 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0,05$). 25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon üzerinde % hücre canlılığı %50'nin altında olduğundan sitotoksik etki gözlenmeyen konsantrasyon olarak 25 $\mu\text{g/mL}$ seçilmiştir.

• **Doku İskelelerinin Sitotoksosite Çalışmaları**

Bölüm 3.2.11.'de anlatıldığı gibi UF(-)Ç(+):2:1-B, UF(-)Ç(+):2:1-SV, UF(+):Ç(+):2:1-B ve UF(+):Ç(+):2:1-SV formülasyonları Bölüm 4.5.8.'de belirlenen sitotoksik etki gözlenmeyen simvastatin (25µg/mL) konsantrasyonunu sağlayacak şekilde tartılarak hazırlanmıştır. Elde edilen doku iskelesi kesitlerine L929 fare fibroblast hücreleri ekilmiş ve hücre canlılığı 12 ve 24 saat sonunda belirlenmiştir (Tablo 4.23. ve Şekil 4.52.).

Tablo 4.23. Simvastatin içeren ve içermeyen doku iskelelerinin L929 hücrelerinde 12. ve 24. saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen % hücre canlılığı değerleri (n=6).

Doku İskelesi Formülasyon Kodu	Hücre Canlılığı (%) ($\bar{X} \pm SH$)	
	12 Saat	24 Saat
UF(-)Ç(+):2:1-B	93,70±2,02	86,49±3,39
UF(-)Ç(+):2:1-SV	77,95±2,72	69,19±2,67
UF(+):Ç(+):2:1-B	96,72±1,93	86,60±2,71
UF(+):Ç(+):2:1-SV	86,17±2,04	75,21±5,29



Şekil 4.52. Simvastatin içeren ve içermeyen doku iskelelerinin L929 hücreleri üzerinde 12 ve 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları (n=6).

Doku iskelelerinin sitotoksosite çalışmaları sonucunda UF(-)Ç(+):2:1-B, UF(-)Ç(+):2:1-SV, UF(+):Ç(+):2:1-B ve UF(+):Ç(+):2:1-SV formülasyonlarına ait % hücre canlılığı sonuçları sırasıyla 12 saat için %93,70, 77,95, 96,72 ve 86,17; 24 saat sonunda 86,49, 69,19, 86,60 ve 75,21 olarak bulunmuştur (Tablo 4.23.). Tüm doku iskelesi formülasyonlarında 24 saat sonunda 12 saate oranla hücre canlılığı anlamlı derecede daha düşük çıkmıştır ($p<0,05$). Kontrol grubuna göre elde edilen hücre canlılığı sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında 12 saat sonunda etkin madde içermeyen UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(+):Ç(+):2:1-B formülasyonları için fark bulunmazken ($p>0,05$), etkin madde yüklenmiş UF(-)Ç(+):2:1-SV ve UF(+):Ç(+):2:1-SV formülasyonlarında fark bulunmuştur ($p<0,05$). 24 saat sonunda ise tüm doku iskelesi formülasyonları ile kontrol grubu arasında hücre canlılığı sonuçları açısından fark gözlenmektedir ($p<0,05$). Doku iskelesi formülasyonları her iki inkübasyon süresi için kendi aralarında karşılaştırıldığında, formülasyona etkin madde yüklenmesinin hücre canlılığını azalttığı gözlemlenirken ($p<0,05$), ultrafiltrasyon uygulanmasının farklılığa yol açmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Sonuç olarak doku iskelesi formülasyonları 12 saat sonunda %86,17, 24 saat sonunda ise %69,19'un üzerinde bir hücre canlılığı göstermişlerdir. Elde edilen bu sonuçlar %50 canlılığın üzerinde olduğundan doku iskelesi formülasyonlarının L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır.

4.6. İn Vivo Çalışmalar: Sıçanlarda Yara iyileşmesinin Takibi ve Değerlendirilmesi

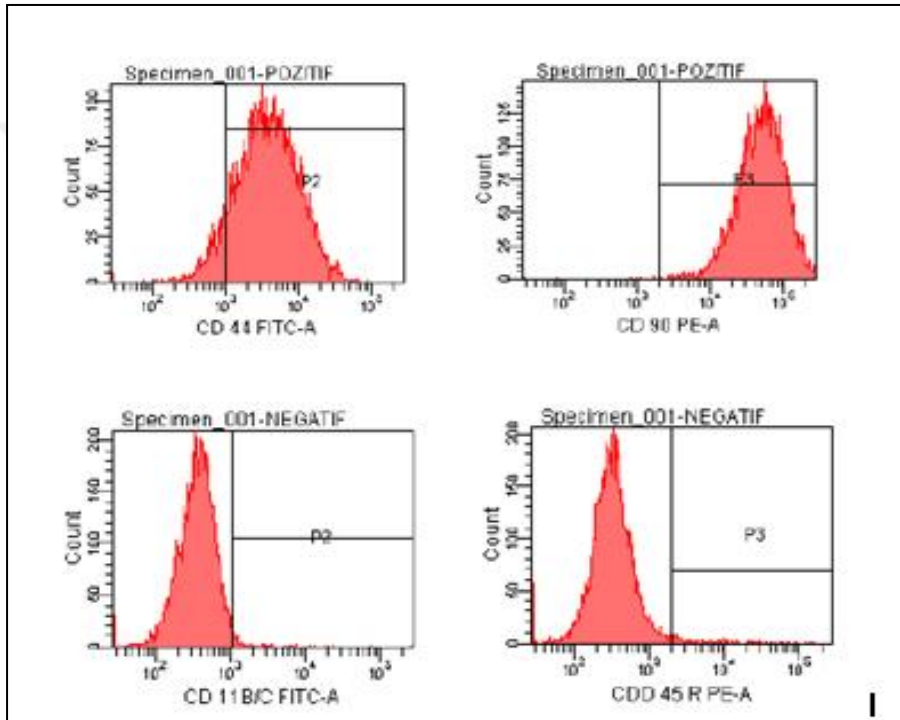
Optimum doku iskelesi formülasyonunun seçimi ve mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesinin ardından diyabetik sıçanlar üzerinde geliştirilmiş yara modellerinde in vivo etkinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Bölüm 3.2.14.'de anlatıldığı şekilde epidermal dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin varlığı, flow-sitometri ile tanımlama ve farklılaşma çalışmalarıyla gösterilmiştir.

- **Flow-Sitometri ile Mezenkimal Kök Hücre Tanımlanması**

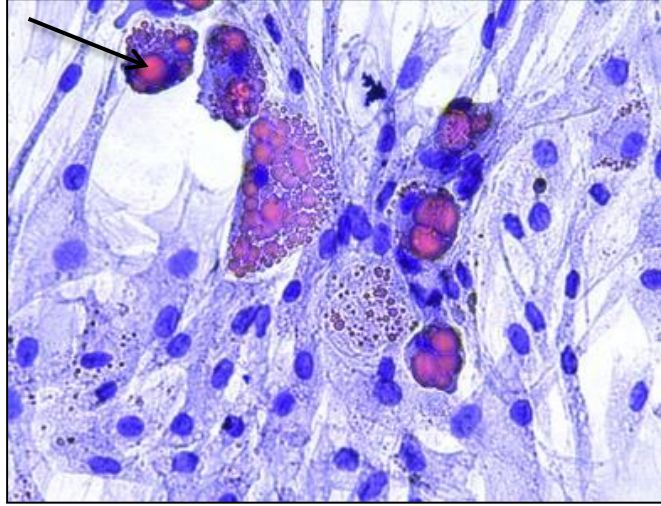
Mezenkimal kök hücreler CD45R, CD11b/c, CD90 ve CD44 yüzey belirteçleri açısından flow sitometri cihazında okunarak tanımlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Okuma işlemi sonunda pozitif çıkması gereken CD90 ve CD44 antikoru CD90 [%99,9(+)] ve CD44 [%91,1(+)] olarak, negatif çıkması gereken CD45R ve CD11b/c, antikoru ise CD45R [%2,4(-)] ve CD11b/c [%1,7(-)] olarak bulunmuş ve mezenkimal kök hücrelerin varlığı kanıtlanmıştır (Şekil 4.53.).



Şekil 4.53. Mezenkimal kök hücrelerin flow-sitometri ile tanımlanması (CD45R, CD11b/c, CD90 ve CD44).

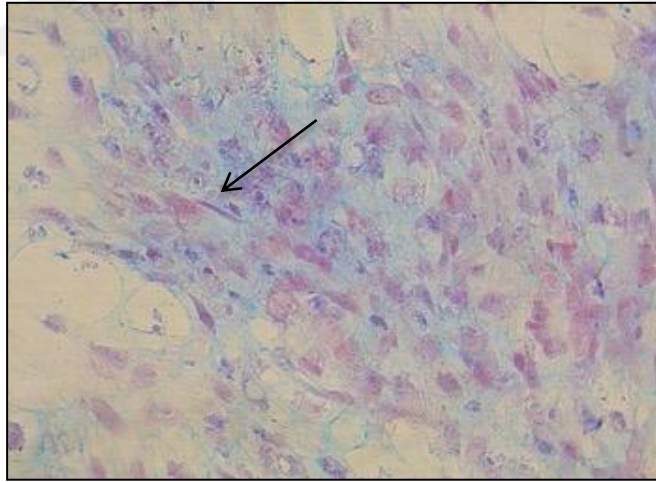
- **Mezenkimal Kök Hücre Farklılaşması**

Mezenkimal kök hücrelerin adiposit, kondrosit ve osteosit hücrelere farklılaşma özellikleri Bölüm 3.2.14.'de bahsedildiği gibi uygun kültür ortamı ve boyalar kullanılarak incelenmiştir. Farklılaşma karakterizasyonları sonucunda adiposit, kondrosit ve osteosit hücreler invert mikroskop ile görüntülenerek belirlenmiştir (Şekil 4.54.-4.56.).



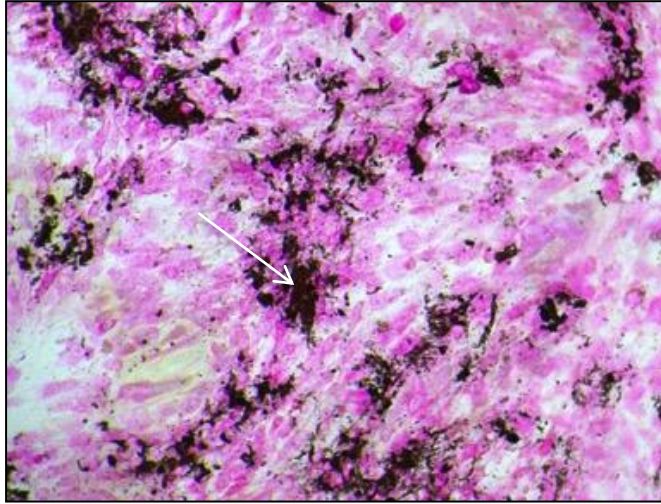
Şekil 4.54. Deri kökenli MKH adiposit farklılaşması (10X10) (Kırmızı=Sitoplazmik yağ damlacıkları birikimi).

Adiposit farklılaşma ortamında inkübe edilen mezenkimal kök hücreler adiposit hücelere farklılaşmış ve oil red ile boyanmaları sonucunda elde edilen mikroskop görüntülerinde hücrelerin sitoplazmalarında bulunan yağ damlacıkları kırmızı ile boyanmıştır (Şekil 4.54.).



Şekil 4.55. Deri kökenli MKH kondrosit farklılaşması (10X10) (Mavi=Proteoglikan birikimi).

Şekil 4.55.'deki MKH'lerin kondrosit farklılaşma için gerekli ortamda bekletilmeleri sonucunda yapılan Alcian Blue boyamaları ile elde edilen görüntülerde ise sitoplazma ve çekirdekleri mavi ile boyanmış hücreler kondrosit hücrelerin varlığını göstermiştir.



Şekil 4.56. Deri kökenli MKH osteosit farklılaşması (10X10) (Siyah:Kalsiyum Birikimi).

Osteosit farklılaşmanın gösterilmesi amacıyla belirlenen kültür ortamında hücreler inkübe edilmiş ve Von Kossa boyası sonucu osteosit hücrelerde gözlenen kalsiyum birimleri siyah ile boyanarak MKH'lerin osteosit hücrelere farklılaşabilirliği gösterilmiştir (Şekil 4.56.).

4.6.2. Yara İyileşmesinin İzlenmesi ve Değerlendirilmesi

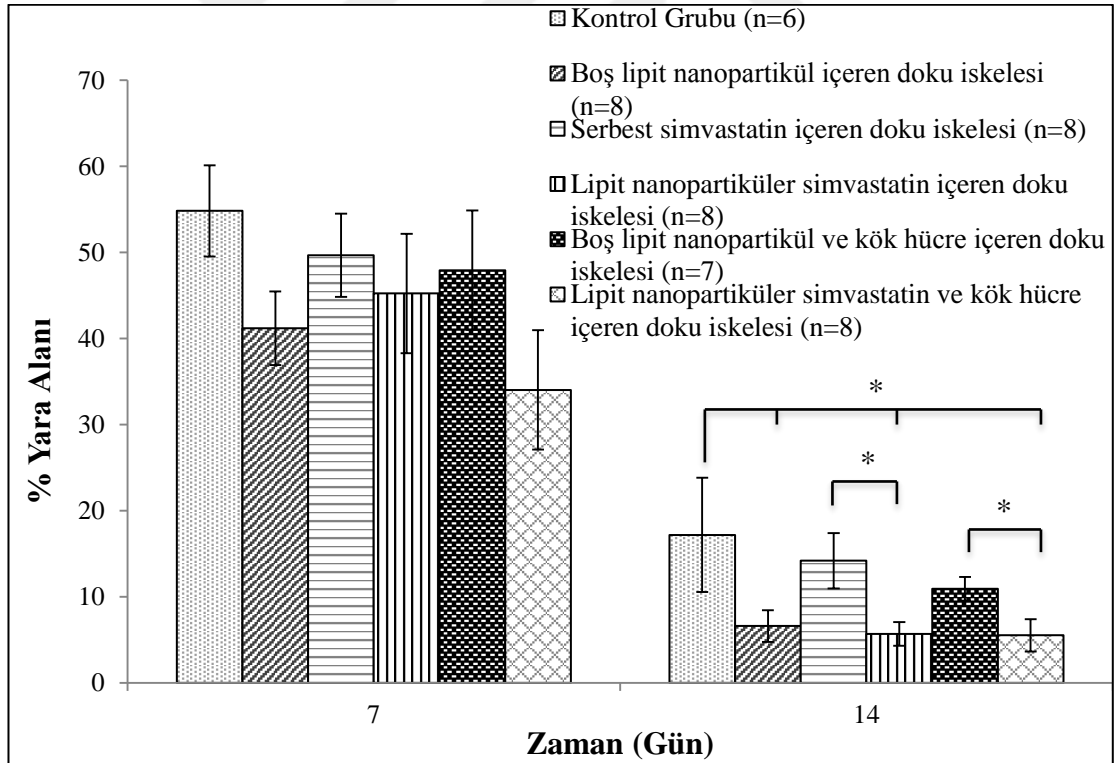
Doku iskelesi formülasyonlarının yara iyileştirici etkileri yara alanlarının hesaplanması ve patolojik incelemelerle değerlendirilmiştir.

- **Yara Alanlarının Hesaplanması**

14 ve 28 gün süreyle gerçekleştirilen kontrol ve farklı doku iskelesi formülasyonlarının uygulandığı hayvan gruplarında yer alan herbir sıçanın yara alanı haftada 1 gün dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmıştır. Elde edilen fotoğraflar image J programı ile incelenerek yara alanları belirlenmiş ve yara oluşturulan güne göre % yara alanları hesaplanmıştır. Yara iyileşmesi zamanla % yara alanında meydana gelen azalma ile değerlendirilmiştir. Her bir deney grubu için elde edilen % yara alanı sonuçları 14 gün sürdürülen deney grupları için Tablo 4.24. ve Şekil 4.57.'de verilmiştir.

Tablo 4.24. 14 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait % yara alanı değerleri.

Deney Grubu	% Yara Alanı ($\bar{X} \pm SH$)	
	7. Gün	14. Gün
Kontrol Grubu (n=6)	54,82±5,30	17,19±6,63
Boş lipid nanopartikül içeren doku iskelesi (n=8)	41,19±4,26	6,60±1,84
Serbest simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	49,67±4,85	14,19±3,20
Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	45,23±5,90	5,67±1,24
Boş lipid nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=7)	47,94±6,92	10,94±1,38
Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=8)	34,03±6,93	5,53±1,88

**Şekil 4.57.** 14 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarında farklı doku iskelelerinin yara alanı üzerindeki etkileri (* p<0,05).

14 gün boyunca devam ettirilen in vivo deney sonuçları grupların 14. gün % yara alanları karşılaştırılarak incelenmiştir. Kontrol grubu ile doku iskelesi

uygulanan gruplar karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına göre ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu hariç diğer doku iskelesi uygulanan grupların yara alanlarının önemli derecede azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Tablo 4.24. ve Şekil 4.57.). Kontrol grubuna karşı gözlenen bu fark bu doku iskelesi formülasyonlarının 14. günde yara iyileştirici etkinliği sağlayabildiklerini göstermektedir.

Tablo 4.24. ve Şekil 4.57.’de verilen kök hücre içeren doku iskelesi grupları ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ kök hücre içermeyen karşılıkları olan ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ doku iskelesi gruplarıyla kök hücrelerin yara iyileştirici etkisini incelemek amacıyla karşılaştırıldıklarında % yara alanları arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuç 14 günlük tedavi sonucunda kök hücrelerin tek başlarına tedavi edici etkinliğinin bulunmadığını göstermektedir.

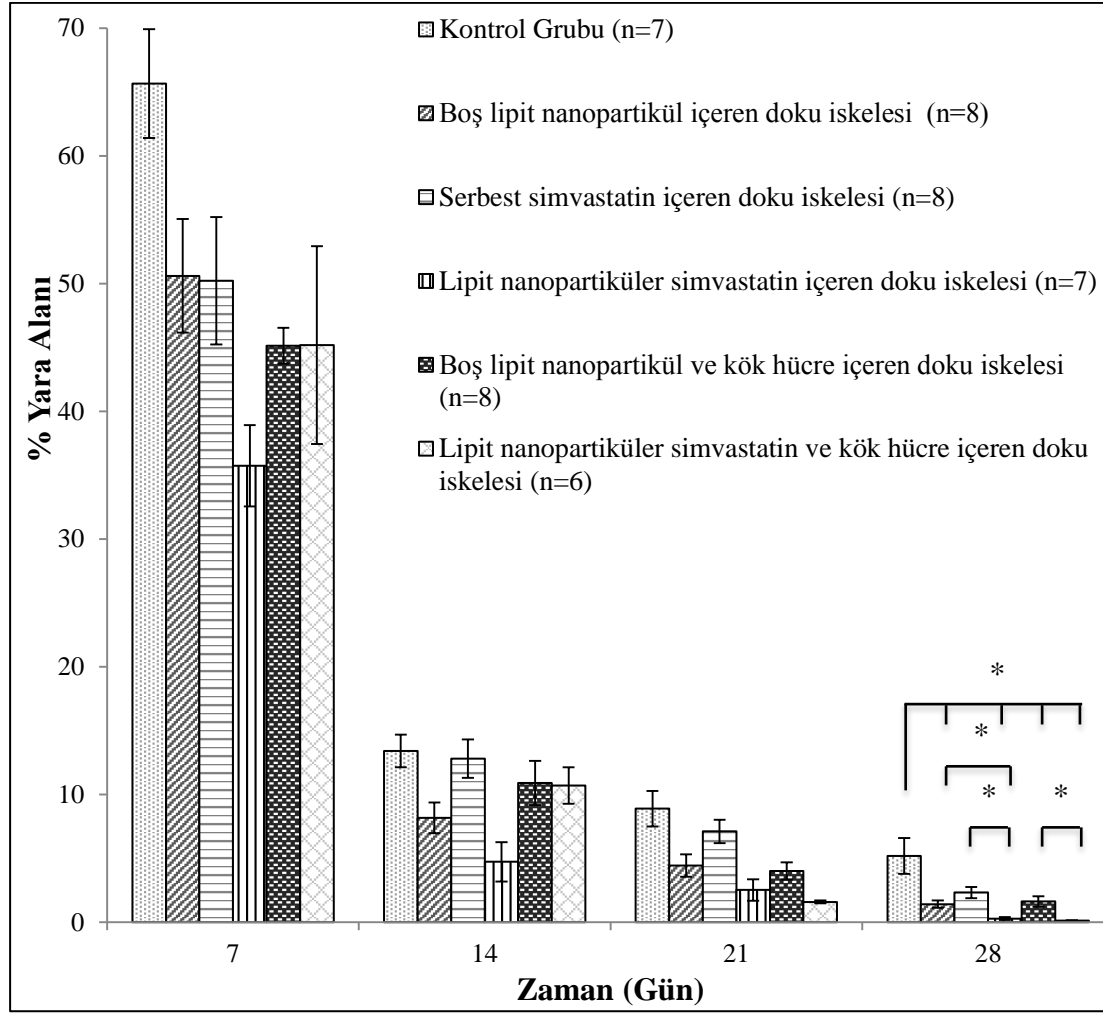
Simvastatinin yara iyileşmesi üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ gruplarına ait yara alanları karşılaştırıldığında ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunda yara iyileşmesi daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grupları karşılaştırıldığında yara alanları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.24. ve Şekil 4.57.).

Simvastatinin NLT formülasyonları halinde doku iskelesi formülasyonlarında yer almasının tedavi etkinliği üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Tablo 4.24. ve Şekil 4.57.’de sunulan ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grupları için elde edilen % yara alanı sonuçları karşılaştırılmış ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubunun yara alanının 14. günde önemli derecede daha fazla azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu sonuç simvastatinin nanopartiküller içerisine hapsedilmesinin simvastatinin yara iyileştirici etkisini önemli derecede geliştirdiğini göstermektedir.

28 gün sürdürülen deney grupları için elde edilen % yara alanı sonuçları ise Tablo 4.25. ve Şekil 4.58.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.25. 28 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait % yara alanı değerleri.

Deney Grubu	% Yara Alanı ($\bar{X} \pm SH$)			
	7. Gün	14. Gün	21. Gün	28. Gün
Kontrol Grubu (n=7)	65,65 \pm 4,25	13,41 \pm 1,28	8,88 \pm 1,39	5,20 \pm 1,40
Boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi (n=8)	50,60 \pm 4,45	8,16 \pm 1,21	4,43 \pm 0,87	1,41 \pm 0,29
Serbest simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	50,22 \pm 4,98	12,80 \pm 1,50	7,11 \pm 0,91	2,32 \pm 0,43
Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi (n=7)	35,74 \pm 3,19	4,73 \pm 1,53	2,52 \pm 0,85	0,28 \pm 0,11
Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=8)	45,13 \pm 1,41	10,90 \pm 1,73	4,00 \pm 0,88	1,62 \pm 0,41
Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=6)	45,19 \pm 7,74	10,70 \pm 1,42	1,59 \pm 0,11	0,13 \pm 0,03



Şekil 4.58. 28 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarında farklı doku iskelelerinin yara alanı üzerindeki etkileri (* $p < 0,05$).

28 gün sürdürülen in vivo deneyler sonucunda ise doku iskelesi uygulanan tüm deney grupları, kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve 14. gün sonuçlarından farklı olarak sadece ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu hariç diğer tüm grupların yara alanları kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ($p < 0,05$) (Tablo 4.25. ve Şekil 4.58.). Bu sonuç serbest simvastatinin tek başına yara iyileşmesi üzerinde etkinliğinin olmadığını işaret etmektedir. Bununla birlikte diğer doku iskelesi formülasyonlarının tedavi edici etkinliğinin olduğunun gösterilmesi yara iyileşmesinde doku iskelesi yapısındaki polimerlerin ve NLT formülasyonunun etkinliğinin varlığına işaret etmektedir.

Tablo 4.25. ve Şekil 4.58.’de gösterilen ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu ile ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grubunun 28

gün sonundaki yara alanları karşılaştırıldığında ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubunun anlamlı derecede daha yüksek bir iyileşme gösterdiği sonucu elde edilmiştir ($p<0,05$).

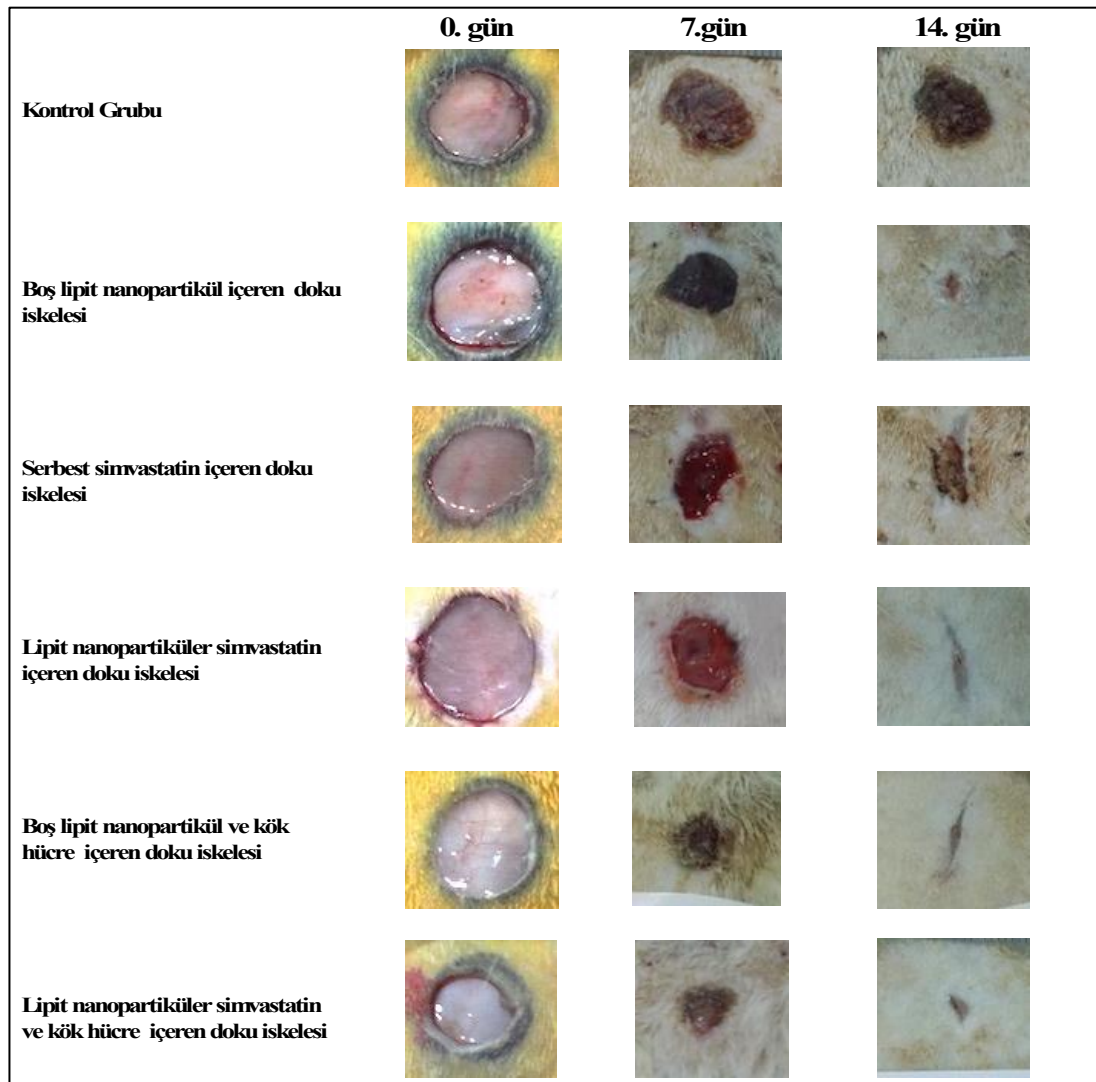
14 ve 28 günlük deney sonuçlarının her ikisinde de ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grubuna göre daha yüksek yara kapanma hızına sahiptir ($p<0,05$) (Tablo 4.24., Tablo 4.25., Şekil 4.57. ve Şekil 4.58.). Bu sonuçlar simvastatinin nanopartikül içerisine hapsedilmeden süspansiyon halinde direkt yaralı bölgeye uygulanmasının yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediğini ancak kontrollü simvastatin salımı sağlayan ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ ile önemli derecede iyileşme hızının artmasının sağladığını düşündürmektedir.

28 günlük tedavi sonucunda ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu, kontrol ve ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ gruplarına göre anlamlı derecede yara iyileşmesi göstermiştir ($p<0,05$) (Tablo 4.25. ve Şekil 4.58.). Bu durum simvastatinin ile nanopartikül formülasyonunun doku iskelesi ile birlikte bir araya geldiğinde yara iyileştirici etkisini desteklemektedir. Bununla birlikte, ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu, ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek yara kapanma hızı göstererek ($p<0,05$), daha iyi bir yara iyileşmesi göstermiştir. Bu sonuç da yine simvastatinin yara iyileştirici etkinliği için bir gösterge olarak değerlendirilmiştir. 14 ve 28 gün sürdürülen her iki deney sonucunda da ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ grubunun kontrol grubuna göre anlamlı yara iyileşmesi sağlaması ($p<0,05$) simvastatinin yanı sıra doku iskelesi formülasyonunun da tek başına belli bir oranda yara iyileştirici etkinliği olduğunu göstermektedir (Tablo 4.24., Tablo 4.25., Şekil 4.57. ve Şekil 4.58.).

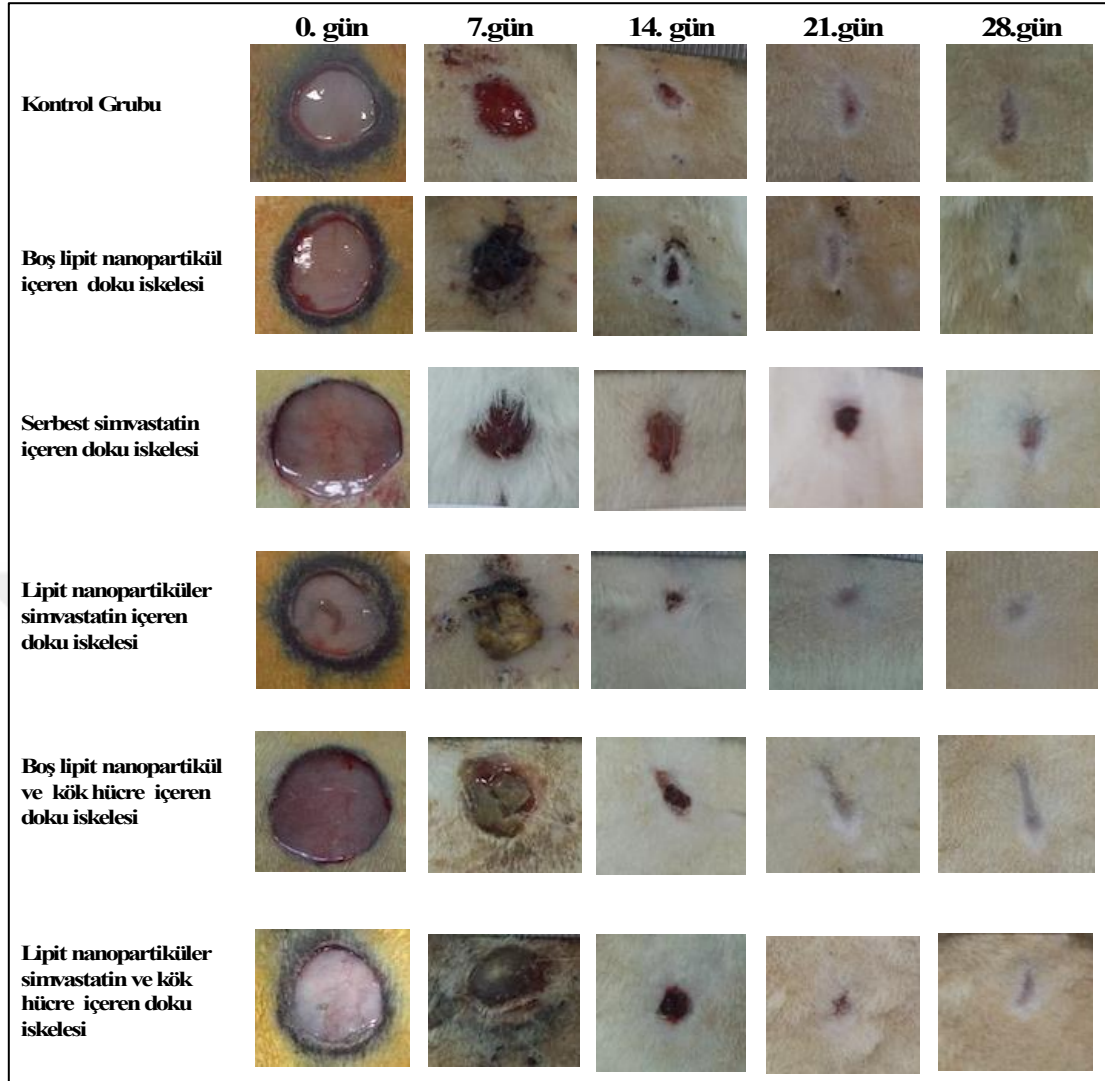
Tablo 4.25. ve Şekil 4.58.’de verilen 28 gün sonundaki % yara alanları değerlendirildiğinde kök hücre içeren formülasyon gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yara iyileşmesi gözlenmiştir ($p<0,05$). Ancak 14 günlük deney sonuçlarında gözleendiği gibi bu gruplar kök hücre içermeyen karşılıkları olan boş lipit nanopartikül ve lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grupları ile

karşılaştırıldığında yara alanlarında önemli derecede fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Her iki tedavi süresi sonunda da kök hücrelerin doku iskelesi formülasyonlarına eklenmesinin yara kapanması açısından farklılığa yol açmaması kök hücrelerin yara epitelinin kapanmasında anlamlı bir iyileştirici etkisinin bulunmadığını kanıtlamaktadır.

14 ve 28 gün sürdürülen her bir in vivo deney grubuna ait örnek yara alanı görüntüleri Şekil 4.59. ve Şekil 4.60.'da sunulmuştur.



Şekil 4.59. 14 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarına ait yara alanı görüntüleri.



Şekil 4.60. 28 günde sonlandırılan in vivo deney gruplarına ait yara alanı görüntüleri.

14 ve 28 gün sonunda elde edilen yara alanlarının değerlendirildiği bu sonuçlar sadece yara epitelizasyonunu, yani epidermisin epitel kısmının onarımını göstermesi nedeniyle tartışmalıdır. Bilindiği gibi yara iyileşmesi farklı aşamalardan oluşup epitelizasyon sadece epidermisin üst tabakası hakkında bilgi vermektedir (2). Bu nedenle yara iyileşmesinin diğer aşamaları hematoksilin-eozin (H&E) ve immünohistokimyasal boyamalar ile patolojik olarak değerlendirilmiştir.

- **Hematoksilen-eozin (H&E) boyama ve Patolojik Değerlendirme**

İn vivo çalışmalar 14. ve 28. günlerde sonlandırılmalarının ardından sıçanlardan alınan yara doku örnekleri üzerinde H&E boyama yapılarak inflamasyon, epitelizasyon, vaskülarizasyon ve fibroblastik proliferasyon varlığı patolojik olarak

değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar 0: yok, 1: hafif, 2: orta ve 3: yoğun puan skorlamasına göre karşılaştırılmış ve ortalama değerler olarak verilmiştir. Kronik bir inflamatuvar fazda kalan diyabetik yaralarda artmış inflamatuvar yanıt nedeniyle yeni doku oluşumu gerçekleşemediğinden bu yaralarda inflamasyon düzeyinin azalması yara iyileşmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte yüksek bir fibroblastik proliferasyon seviyesi de aşırı ECM oluşumu ve azalmış yeniden düzenlenme ile sonuçlanan fibrozis gelişimini gösterdiğinden yara iyileşmesinde fibroblastik proliferasyonun düşük çıkması istenilmektedir. Ancak yara bölgesindeki epitel dokunun maturasyonunu belirten epitelizasyon ve yeni damar oluşumunu gösteren vaskülarizasyon seviyeleri ise yeni doku oluşumu için önemli olduğundan yara iyileşmesinde yüksek çıkması beklenilmektedir. 14 gün sürdürülen her bir hayvan grubu için elde edilen patolojik değerlendirme sonuçları Tablo 4.26.'da verilmiştir.

Tablo 4.26. 14 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait H&E boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.

Deney Grubu	Skor ($\bar{X} \pm SH$)			
	İnflamasyon	Epitelizasyon	Vaskülarizasyon	Fibroblastik Proliferasyon
Kontrol Grubu (n=6)	1,67±0,21	0,67±0,21	1,17±0,17	2,17±0,17
Boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi (n=8)	1,13±0,12	1,38±0,18	1,13±0,12	1,75±0,16
Serbest simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	1,13±0,12	0,75±0,31	1,13±0,12	1,25±0,16
Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	1,63±0,18	1,38±0,18	1,63±0,18	2,13±0,12
Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=7)	0,86±0,14	1,71±0,42	1,43±0,20	1,43±0,20
Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=6)	0,50±0,18	1,50±0,27	1,38±0,18	1,38±0,18

14 gün süresince devam ettirilen in vivo deneylerde grupların yara iyileşmesinin patolojik olarak değerlendirilmesi sonucunda kontrol ve 'lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi' gruplarında orta düzeyde inflamasyon gözlenirken diğer deney gruplarında hafif düzeyde gözlenmiştir. Kontrol ve 'lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi' gruplarında gözlenen inflamasyon düzeyleri arasında fark bulunmazken, kontrol ve 'lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi' gruplarının 'boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi', 'serbest simvastatin içeren doku iskelesi', 'boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi' ve 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' deney gruplarına göre inflamasyon düzeyleri daha fazladır ($p<0,05$). Genel olarak doku iskelesi uygulanan deney gruplarında inflamasyon düzeyinin yüksek çıkmaması diyabetik yaralarda azalması istenilen inflamasyon düzeyine ulaşıldığını göstermektedir. Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grubunda ise beklenilen aksine kontrol grubu ile aynı seviyede inflamasyon gözlenmesi Özeç ve ark. (221) tarafından yapılan çalışmada ifade edilen simvastatinin inflamasyon yanıtı artırıcı etkisinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Aynı deney gruplarında epitelizasyon sonuçları karşılaştırıldığında 'boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi' ve 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' gruplarında epitelizasyon orta düzeydeyken diğer gruplarda hafif düzeyde bulunmuştur. Ancak kök hücre içeren 'boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi' ve 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' deney gruplarının epitelizasyon seviyesi yalnızca kontrol grubuna göre yüksek olup ($p<0,05$), diğer hayvan grupları ile arasında epitelizasyon seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Hafif düzeyde epitelizasyon gösteren gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında 'lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi' ve 'boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi' gruplarının epitelizasyon seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek ($p<0,05$) olduğu gözlenirken diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,05$). Sonuç olarak 'serbest simvastatin içeren doku iskelesi' grubu dışında tüm doku iskelesi uygulanan grupların epitelizasyon seviyesi kontrol grubuna

göre daha yüksek elde edilerek istenilen epitel doku maturasyonuna ulaşılmıştır. Özellikle kök hücre içeren gruplarda epitelizasyonun daha yüksek bulunması kök hücrelerin yara iyileşmesinde epitel doku oluşumunu artırdığını göstermektedir.

Vaskülarizasyon sonuçları değerlendirildiğinde ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu hariç tüm deney gruplarında hafif seviyede vaskülarizasyon gözlenirken ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubunda orta düzeyde gözlenmiştir. Hafif düzeyde vaskülarizasyon gösteren gruplar karşılaştırıldığında vaskülarizasyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Orta düzeyde vaskülarizasyon gösteren ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu ise kontrol ve ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ gruplarına göre daha yüksek vaskülarizasyon göstermiştir ($p<0,05$). Elde edilen bu sonuçlar lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi ve boş doku iskelesi formülasyonlarının yara tedavisinde istenilen yeniden damar oluşumunu desteklediğini göstermektedir. Bununla birlikte literatürde yer alan simvastatinin vaskülarizasyonu artırarak yara iyileşmesini desteklediğini gösteren çalışmalarla uyumlu olarak kontrollü salım gösteren simvastatinin vaskülarizasyonu artırdığı gösterilmiştir (20, 21).

Fibroblastik proliferasyon varlığı açısından yapılan incelemeler sonucunda ise, kontrol, ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ gruplarında yoğun düzeyde, ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’, ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ gruplarında ise orta düzeyde fibroblastik proliferasyona rastlanmıştır. Orta ve yoğun düzey gösteren grupların kendi aralarında fibroblastik proliferasyon seviyesi açısından fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Yoğun seviyede fibroblastik proliferasyon gösteren gruplar orta fibroblastik proliferasyon gösteren gruplarla karşılaştırıldığında ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu tüm orta düzeyde fibroblastik proliferasyon gösteren hayvan gruplarından daha yüksek bir fibroblastik proliferasyon seviyesi göstermiştir ($p<0,05$). Diğer yoğun seviyede fibroblastik proliferasyon gösteren gruplar olan; kontrol ve ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ grupları ise ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu

ile fibroblastik proliferasyon düzeyi açısından anlamlı bir fark göstermezken ($p>0,05$) diğer orta düzey fibroblastik proliferasyona sahip gruplara göre anlamlı bir fark göstermiştir ($p<0,05$). Sonuç olarak serbest simvastatin ve kök hücre içeren gruplarda daha düşük fibroblastik proliferasyona rastlanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar literatürle uyumlu olarak simvastatinin ve kök hücrelerin fibrozisi azaltarak yara iyileşmesini artırdığını kanıtlamaktadır (247, 248).

28. gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait patolojik değerlendirme sonuçları ise Tablo 4.27.'de sunulmuştur.

Tablo 4.27. 28 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait H&E boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.

Deney Grubu	Skor ($\bar{X}\pm SH$)			
	İnflamasyon	Epitelizasyon	Vaskülarizasyon	Fibroblastik Proliferasyon
Kontrol Grubu (n=7)	0,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00	2,86±0,14
Boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi (n=8)	0,00±0,00	1,38±0,18	1,00±0,00	2,75±0,16
Serbest simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	0,00±0,00	1,25±0,16	1,38 ± 0,18	1,50±0,18
Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi (n=7)	0,00±0,00	1,29±0,18	1,00±0,00	2,57±0,30
Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=8)	0,00±0,00	1,13±0,12	1,13±0,12	2,00±0,00
Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=6)	0,00±0,00	1,67±0,21	1,00±0,00	3,00±0,00

28 gün devam ettirilen in vivo deney grupları yara iyileşmesi açısından patolojik olarak incelendiğinde, tüm deney grupları herhangi bir inflamasyon

göstermemiştir ($p>0,05$). Grupların hiç birinde inflamasyon gözlenmemesi diyatik yaralarda artmış inflamatuvar yanıtın tüm gruplar için azaldığını göstermektedir. Bununla birlikte vaskülarizasyon seviyesi açısından 28 gün sonunda gruplar arasında fark bulunmamakta ($p>0,05$) olup tüm gruplarda hafif seviyede gözlenmiştir. 28 gün sonunda gruplar arasındaki inflamasyon ve vaskülarizasyon farklılıklarının kalkmasının yara iyileşmesinin grupların çoğunda tamamlanması ve azalan simvastatin salımı ile kök hücre canlılığından oluşabileceği düşünülmektedir.

28 gün sonunda yaralı alandaki epitelizasyon değerlendirildiğinde, ‘lipit nanopartiküller simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunun orta, diğer deney grupları ise hafif seviye epitelizasyon göstermiştir. Ancak ‘lipit nanopartiküller simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu diğer hayvan gruplarından yalnızca kontrol ve ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek epitelizasyona sahiptir ($p<0,05$). Elde edilen bu sonuçlar 14. gün sonuçları ile benzerlik göstererek kök hücrelerin gelişmiş bir epitel doku oluşumu üzerindeki olumlu etkisini desteklemektedir. 28 gün sonunda bu etkinin sadece kök hücrelerin simvastatinle birlikte uygulandığı ‘lipit nanopartiküller simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunda gözlenmesinin ise simvastatinin kök hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (249).

Aynı deney grupları fibroblastik proliferasyon varlığı açısından incelendiğinde, ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grupları orta seviyede fibroblastik proliferasyon gözlenirken diğer deney gruplarında yoğun seviyede rastlanmış olup bu gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). Orta seviye gözlenen ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grupları ve yoğun seviye gözlenen deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında fibroblastik proliferasyon düzeyi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak 14. gün sonunda elde edilen sonuçlarla benzer şekilde serbest simvastatin ve kök hücre içeren gruplarda daha düşük fibroblastik proliferasyon gözlenmiş ve literatürle uyumlu olarak 28 gün sonunda da yüksek doz

simvastatinin ve kök hücrelerin yara tedavisinde istenmeyen artmış fibroblastik proliferasyonu azalttıkları gösterilmiştir (247, 248).

- **İmmünohistokimyasal Boyama ve Patolojik Değerlendirme**

İn vivo çalışmalar sonucunda alınan kesitlerden CD31, bcl-2 ve Ki-67 primer antikolarıyla, streptavidin biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal çalışmalar yapılmış ve vaskülarizasyon için CD31 belirteçleri, apoptozis için bcl-2 belirteçleri ve proliferasyon için Ki-67 belirteçleri patolojik olarak değerlendirilmiştir. CD31 ve Ki-67 ile belirtilen vaskülarizasyon ve proliferasyon düzeyleri yara iyileşmesinde yeni doku oluşumu için gerekli olan damar endoteli maturasyonunu ve hücre çoğalmasını yansıttığından yara tedavisinde yüksek çıkması beklenirken, programlanmış hücre ölümünü gösteren bcl-2 ile belirtilen apoptozise rastlanılmaması gerekmektedir. CD31 için sayısal skorlama yapılırken, bcl-2 ve Ki67 için 0: yok, 1: hafif, 2:orta, 3: yoğun puan skorlaması yapılarak sonuçlar Tablo 4.28. ve Tablo 4.29.'da verilmiştir.

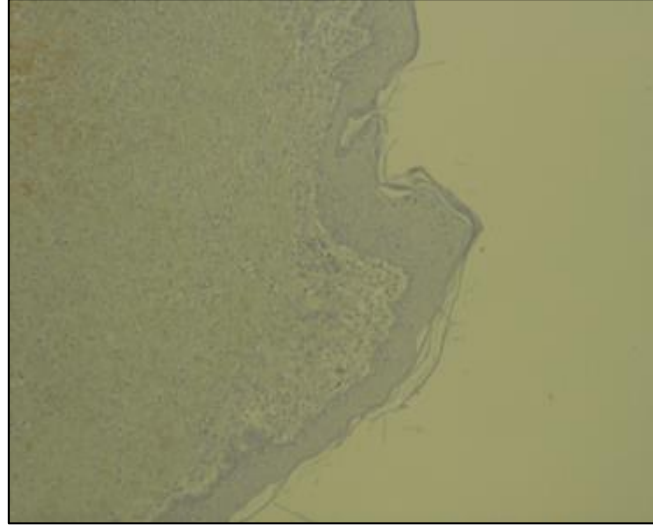
Tablo 4.28. 14 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait immünohistokimyasal boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.

Deney Grubu	Skor ($\bar{X} \pm SH$)		
	CD31	Ki-67	bcl-2
Kontrol Grubu (n=6)	17,83±4,60	0,50±0,22	0,00±0,00
Boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi (n=8)	26,63±068	1,38±0,18	0,00±0,00
Serbest simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	20,00±4,31	1,00±0,00	0,00±0,00
Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	29,75±173	1,38±0,18	0,00±0,00
Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=7)	31,43±2,57	2,14±0,34	0,00±0,00
Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=6)	34,63±3,76	2,75±0,16	0,00±0,00

Tablo 4.29. 28 gün sürdürülen in vivo deney gruplarına ait immünohistokimyasal boyama ve patolojik değerlendirme sonuçları.

Deney Grubu	Skor ($\bar{X}\pm SH$)		
	CD31	Ki-67	bcl-2
Kontrol Grubu (n=7)	21,00±0,44	1,00±0,00	0,00±0,00
Boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi (n=8)	19,71±0,36	1,43±0,20	0,00±0,00
Serbest simvastatin içeren doku iskelesi (n=8)	17,25±0,77	1,25±0,16	0,00±0,00
Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi (n=7)	18,71±0,36	1,43±0,20	0,00±0,00
Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=8)	21,50±0,95	1,25±0,16	0,00±0,00
Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi (n=6)	17,17±0,60	2,33±0,33	0,00±0,00

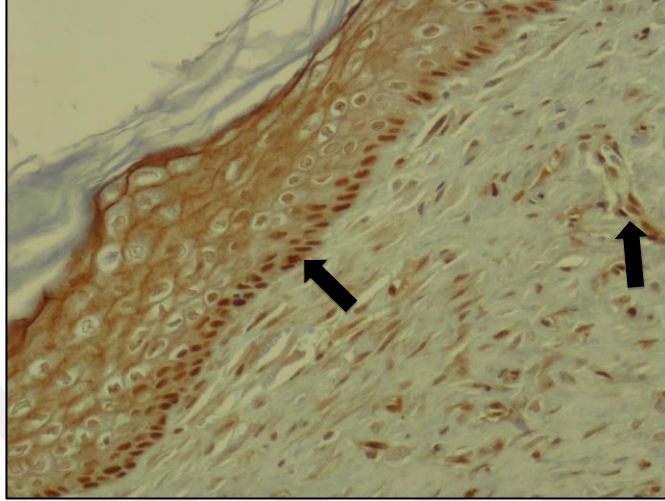
Tablo 4.28. ve Tablo 4.29.'da görüldüğü gibi 14 ve 28. günlerde sonlandırılan in vivo deney gruplarının tümünde bcl-2 belirtecine karşı sıfır yanıt oluşmuştur ($p>0,05$). Şekil 4.61.'de görüldüğü gibi bcl-2 ile boyanmış herhangi bir kahverengi alan gözlenmediğinden bcl-2 immünohistokimyasal boyanma negatiftir. Bu nedenle tüm gruplarda apoptozis gözlenmediği sonucuna varılmıştır. Hücre ölümüne grupların hiçbirinde rastlanmaması hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının biyouyumlu olduklarını ve yara iyileşme sürecinde herhangi bir olumsuz bir etkiye yol açmadıklarını göstermektedir.



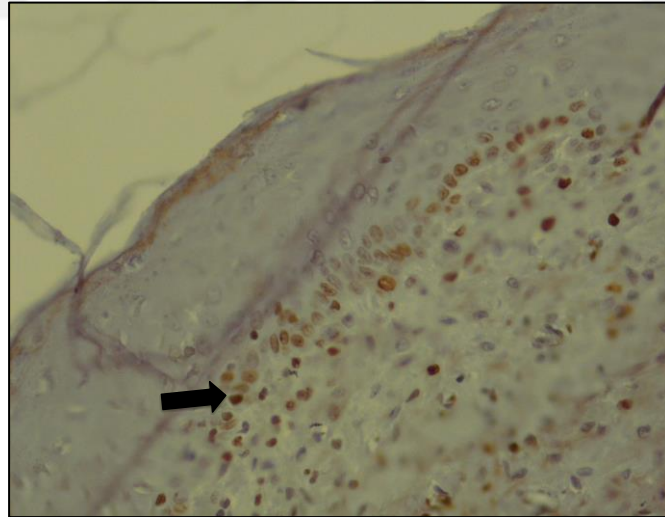
Şekil 4.61. Doku kesitine ait bcl-2 ile boyama görüntüsü, 10x10 büyütme (bcl-2 ile kahverengiye boyanan alan bulunmamaktadır).

Yaralı bölgedeki proliferasyon derecesini gösteren Ki-67 belirteci açısından 14 gün sürdürülen in vivo gruplar değerlendirildiğinde, kontrol, ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’, ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ gruplarında hafif derecede proliferasyon gözlenirken kök hücre içeren ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ gruplarında orta derecede gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ile diğer deney gruplarının tümü arasında Ki-67 seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark gözlenerek kontrol grubunun proliferasyon seviyesi daha düşük bulunmuştur ($p < 0,05$). Bununla birlikte ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grupları arasında da Ki-67 seviyesi açısından istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunarak, ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu daha yüksek proliferasyon göstermiştir. 14 gün sürdürülen diğer gruplar arasında gerçekleştirilen ikili karşılaştırmalar sonucunda ise proliferasyon açısından fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Tüm doku iskelesi uygulanan grupların kontrol grubuna göre daha yüksek proliferasyon göstermesi hazırlanan doku iskelesi formülasyonları ile yaralı dokuda hücre büyümesi ve çoğalmasının desteklendiğini göstermektedir. Özellikle kök hücre içeren formülasyonlarda daha yüksek proliferasyon gözlenmesi ise literatürle uyumlu

olarak mezenkimal kök hücrelerin hücre proliferasyonu artırdığını göstermiştir (250, 251). ‘Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ gruplarına ait Ki-67 boyama sonuçları Şekil 4.62. ve Şekil 4.63.’de verilmiştir.



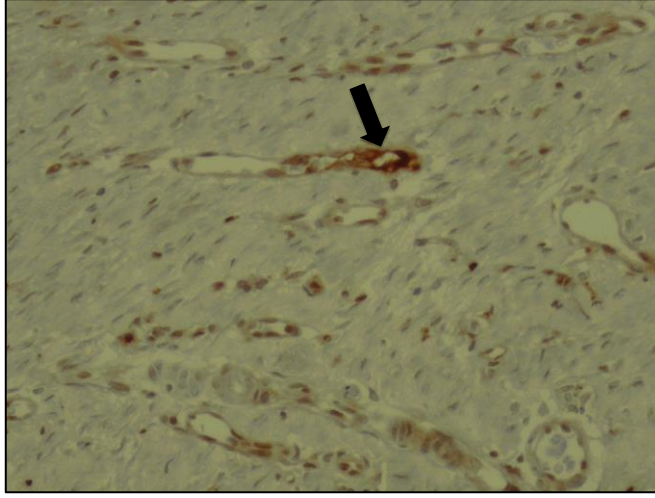
Şekil 4.62. Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait Ki-67 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: Ki-67 ile kahverengiye boyanan çoğalan hücreler).



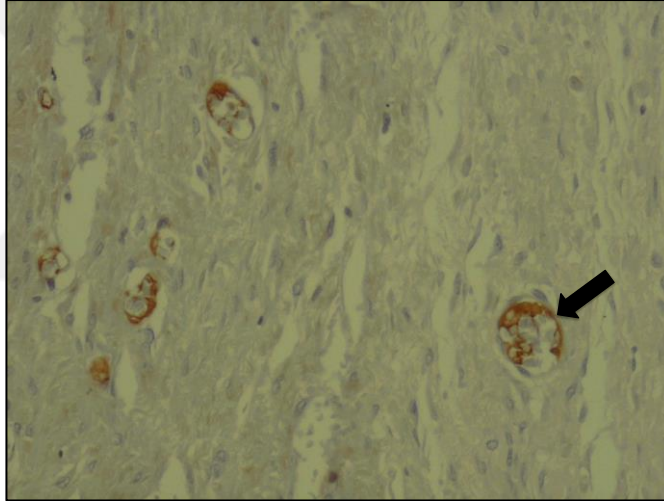
Şekil 4.63. Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grubuna ait Ki-67 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: Ki-67 ile kahverengiye boyanan çoğalan hücreler).

Şekil 4.62.'de görüldüğü gibi kök hücre içeren doku iskelesi grubunda Ki-67 ile kahverengiye boyanmış çoğalan hücreler hem epidermis hemde epidermis altında yoğun bir şekilde gözlenmiştir. Şekil 4.63.'de gösterilen kök hücre içermeyen doku iskelesi grubunda ise kök hücre içeren gruba göre daha az proliferasyon gözlenmiştir.

CD31 belirteci ise mikrovasküler damarlardaki endotel hücrelerini boyayarak gruplar arasındaki vaskülarizasyon seviyesi hakkında bilgi vermekte olup boyanan hücre sayısına göre sayısal olarak skorlanmıştır. 14 gün sürdürülen deney gruplarında CD31 belirteci karşı elde edilen değerler karşılaştırıldığında en yüksek CD31 seviyesi, kök hücre içeren gruplar olan 'boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi' ve 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' deney gruplarında 31.43 ve 34.63 olarak elde edilmiştir. En düşük CD31 seviyesi ise 17.83 değeri ile kontrol grubunda gözlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak kök hücre içeren 'boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi' ve 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' deney grupları karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre daha yüksek vaskülarizasyon göstermiştir ($p < 0,05$). Bunun yanısıra 'lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi' grubu 'serbest simvastatin içeren doku iskelesi' grubuna göre daha yüksek bir vaskülarizasyon seviyesine sahiptir ($p < 0,05$). Diğer gruplar arasında ise CD31 seviyesi ve dolayısıyla vaskülarizasyon açısından fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Bu sonuçlar H&E boyama ile elde edilen vaskülarizasyon sonuçları ile benzerlik göstermekte olup kontrollü simvastatin salımının ve kök hücrelerin literatürle uyumlu olarak yara iyileşmesinde vaskülarizasyonu artırdığı bir kez daha gösterilmiştir (20, 25, 187). 'Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' ve 'lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi' gruplarında CD31 varlığı Şekil 4.64. ve Şekil 4.65.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.64. Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait CD31 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: CD31 ile kahverengiye boyanmış damar endotel hücreleri).



Şekil 4.65. Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grubuna ait CD31 boyama görüntüleri, 40x10 büyütme (siyah ok: CD31 ile kahverengiye boyanmış damar endotel hücreleri).

Kahverengi ile boyanmış damar endotelleri kök hücre içeren doku iskelesi grubunda daha yüksek oranda gözlenmiştir (Şekil 4.64.). Lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grubunda ise daha seyrek oranda boyanmış damar endotellerine rastlanarak kök hücrelerin vaskülarizasyon üzerindeki olumlu etkisinin yarattığı fark açıkça gözlenmiştir (Şekil 4.64. ve Şekil 4.65.).

28. günde sonlandırılan in vivo deney gruplarının immünohistokimyasal boyamaları sonucunda elde edilen Ki-67 belirteci sonuçları değerlendirildiğinde, ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunda orta, diğer deney gruplarında ise hafif derecede proliferasyon gözlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu kontrol grubu, ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek proliferasyon göstermiştir ($p<0,05$). Diğer in vivo gruplar arasında ise proliferasyon derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Bu sonuçlar 14 günün sonunda elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermekte olup kök hücrelerin yara iyileşmesinde hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi bir kez daha gösterilmiştir (250, 251). Bununla birlikte yüksek proliferasyonun sadece ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunda gözlenmesi literatürde yer alan simvastatinin kök hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu artırıcı etkisini desteklemektedir (249). Bu nedenle ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunda kök hücrelerin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin 28 güne kadar devam ettiği düşünülmektedir.

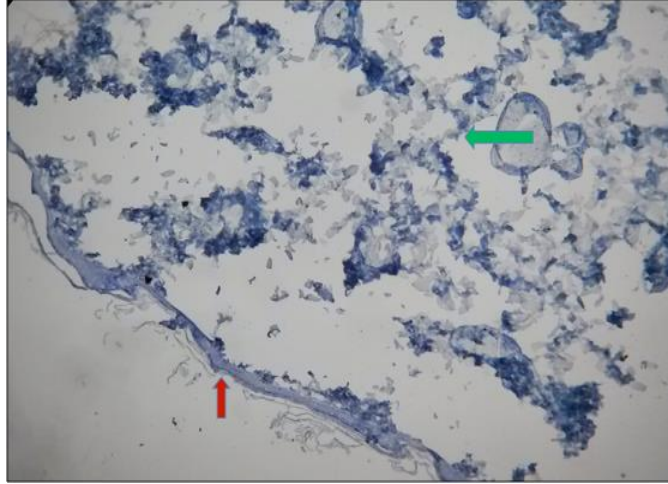
28 gün devam ettirilen in vivo deney grupları CD31 seviyeleri açısından patolojik olarak incelendiğinde, CD31 düzeyi en yüksek ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ deney grubunda, en düşük ise ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunda gözlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol grubu ile ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’, ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’, ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark gözlenerek kontrol grubu daha yüksek vaskülarizasyon göstermiştir. En düşük CD31 gözlenen ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu ise ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grupları ile karşılaştırıldığında önemli derecede daha düşük vaskülarizasyon göstermiştir ($p<0,05$). Vaskülarizasyon açısından diğer

grupların ikili karşılaştırma sonuçları arasında ise fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak 28 gün sonunda beklenmeyen bir şekilde simvastatin içeren gruplarda CD31 düzeyi azalmış ve 14. günün sonunda elde edilen CD31 ve H&E boyama ile elde edilen vaskülerizasyon sonuçları ile farklılık göstermiştir. H&E boyama ile doku kesitindeki damar yapıları sayılarak vaskülerizasyon düzeyi belirlenirken, CD31 boyaması ile endotel hücrelerin varlığı ve maturasyonu gösterilmektedir. Bu nedenle 28. günde elde edilen bu sonuçların, simvastatinin 28 gün sonunda vaskülerizasyonu artırmasına rağmen endotel maturasyonu üzerinde istenmeyen etkilere yol açmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

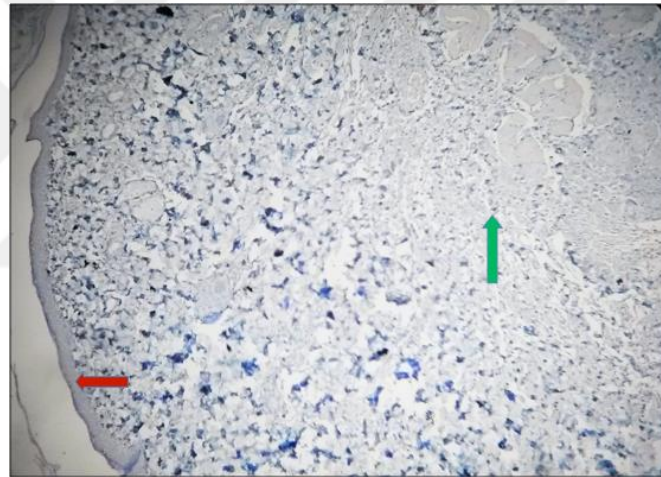
- **Kök Hücrelerin İyileşen Doku İçindeki Varlığının İncelenmesi ve İmmünohistokimyasal Boyamalar**

28. günlerde sonlandırılan sıçanlardan alınan doku örneklerinde BrdU saptama kiti kullanılarak yara alanındaki epitel ve dermal alanlardaki iyileşmeler ve işaretlenen mezenkimal kök hücrelerin iyileşme alanında yeri ve sayısı incelenmiştir.

28. günde sonlandırılan sıçanlardan alınan doku örnekleri üzerinde BrdU boyama sonucunda epitel ve dermal alanlarda gözlenen iyileşmenin kalitesi değerlendirildiğinde, ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunun ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubuna göre daha iyi bir epitelizasyonla yara alanında kapanma sağladığı ve epitel tabakanın altında da iyi gelişmiş bir epidermal ve dermal alan oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.66. ve Şekil 4.67.).

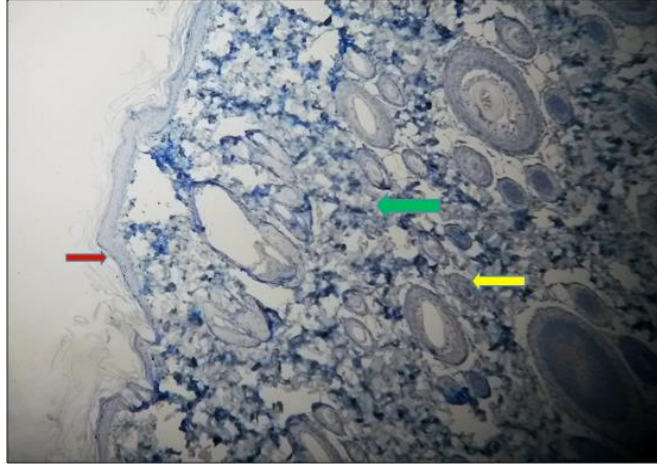


Şekil 4.66. Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU boyama görüntüleri, 10x10 büyütme (kırmızı ok: epitelizasyon oluşumu, yeşil ok: epitelizasyon var var ancak tam olarak gelişmemiş epidermal ve dermal alan oluşumu).



Şekil 4.67. Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU boyama görüntüleri, 10x10 büyütme (kırmızı ok: iyi epitelizasyon oluşumu, yeşil ok: Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna göre daha iyi gelişmiş epidermal ve dermal alan oluşumu).

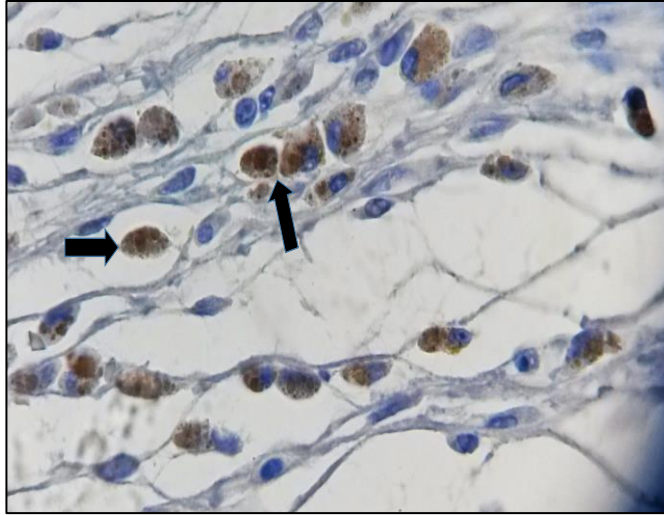
Aynı zamanda Şekil 4.68.'de görüldüğü gibi 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' grubunda iyi bir epidermal ve dermal doku gelişiminin yanı sıra yara iyileşmesi için oldukça önemli olan vaskülarizasyon oluşumlarına da rastlanmıştır.



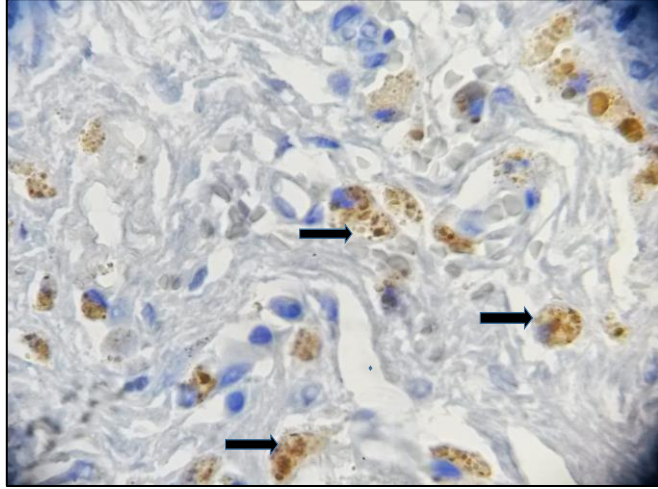
Şekil 4.68. Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU boyama görüntüleri, 10x10 büyütme (kırmızı ok: epitelizasyon oluşumu, yeşil ok: iyi gelişmiş epidermal ve subepidermal alanlar, sarı ok: hemen epitelin altındaki alanda başlamış vaskülarizasyon).

Bu sonuçlar simvastatinin, kök hücre ile birlikte sağlam ve iyi gelişmiş bir epitel ve dermal doku oluşumu ve artmış vaskülarizasyon ile etkili yara iyileşmesi sağladığını desteklemektedir.

BrdU saptama kiti ile işaretlenen yara alanındaki mezenkimal kök hücrelere ait görüntüler Şekil 4.69. ve Şekil 4.70.'de verilmiştir.

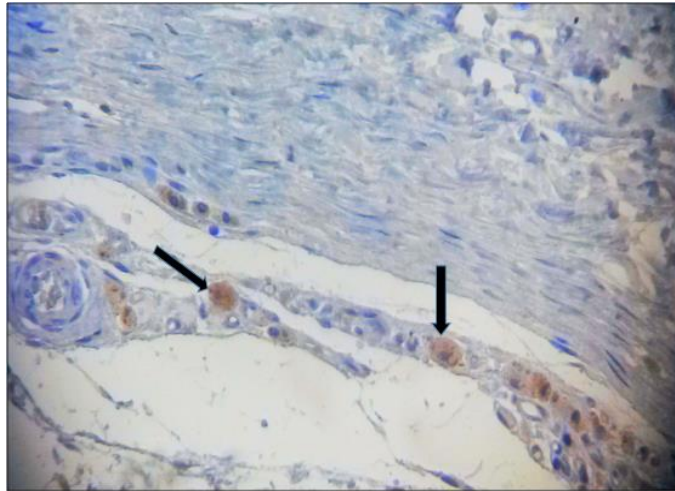


Şekil 4.69. Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 40x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+)].

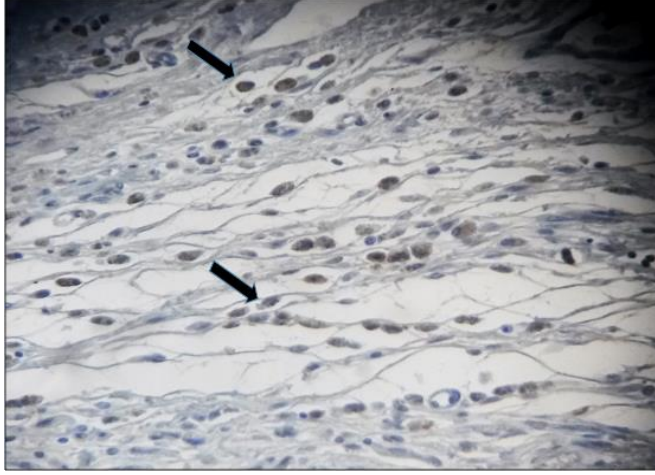


Şekil 4.70. Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 40x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+)].

Elde edilen BrdU işaretlenmeleri sonucunda kök hücrelerin çekirdekleri kahverengi ile boyanırken normal hücrelerin çekirdekleri mavi ile boyanmaktadır (Şekil 4.69. ve Şekil 4.70.). Mikroskopik incelemeler sonucunda her preparatta 20x10'luk alanda 3'er kez 100 hücre sayılarak çekirdekleri mavi veya kahverengi ile boyanmış hücrelerin ortalaması alınmıştır (Şekil 4.71. ve Şekil 4.72.).



Şekil 4.71. Boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 20x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+), %4 BrdU (+) hücre tespit edilmiştir].



Şekil 4.72. Lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grubuna ait BrdU saptama kiti ile işaretlenen kök hücre görüntüleri, 20x10 büyütme [siyah ok: BrdU ile kahverengiye boyanan kök hücre çekirdekleri BrdU (+), %10 BrdU (+) hücre tespit edilmiştir].

Şekil 4.71. ve Şekil 4.72.'de görüldüğü gibi yapılan incelemeler sonucunda 'lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi' grubunda %10 kök hücre gözlenirken 'boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi' grubunda %4 oranında kök hücreye rastlanmıştır. Bu sonuç simvastatinin literatürle uyumlu olarak kök hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu artırdığını göstermektedir (249).

5. TARTIŞMA

Diyabetik yaralar, hızlı gelişen önemli bir diyabet komplikasyonudur. Diyabetin neden olduğu periferik nöropati, periferik vasküler hastalıklar, arteriyel yetmezlik ve bozulmuş enfeksiyon direnci ile ayak deformiteleri, travma gibi risk faktörlerinin karmaşık bir karışımının sonucunda oluşmaktadır. Diyabet hastalarının yarısından fazlasında tek bir yara ile başlayan ülserleşme, kronik enflamatuvar fazda kalarak iyileşme gösterememektedir. Proteazlar ve reaktif oksijen türlerinde dengesizliğe yol açan kronik enflamasyon nedeniyle büyüme faktörleri parçalanarak dokunun anjiyogenez kabiliyeti bozulmakta ve yara bölgesine hücre göçü engellenmektedir. Bozulmuş yara iyileşmesi bu hastalarda amputasyonun da önde gelen nedenidir. Diyabetik yaralı hastaların tekrarlayan hastaneye yatma riski yüksek olup hastalık yaşam kalitesi, morbidite, mortalite ve sosyal ekonomi üzerinde uzun vadeli olumsuz etkilere neden olmaktadır. Diyabetik yara tedavisi kompleks olup uzun süre ve multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Son on yılda yara iyileşmesinde ilerlemeler yaşanmasına rağmen diyabetik yara tedavisi sağlık sistemi, hastalar ve dolayısıyla toplum için önemli bir maddi yük oluşturmakta ve yara tedavisinde olumlu gelişmeler gözlenememektedir (4, 252-254).

Tüm yara tedavisi yaklaşımlarının amacı, enfeksiyonu en aza indirecek, doğru nem dengesini teşvik eden ve yaranın tekrar epitelyalizasyonunu kolaylaştıracak bir ortam yaratmaktır. Sağlıklı ve yaralı dokularda memeli dokusunda bulunan mikro çevre koşullarının kapsamlı bir şekilde anlaşılması halen eksik olsa da rejeneratif tıp alanında bulunan yeni bulgular, yara iyileşmesi için gerekli mikro ortamın sağlanmasında ve hücre davranışlarının düzenlenerek doku onarımını teşvik etmede ECM'nin önemini vurgulamaktadır. ECM'nin önemini farkedilmesi, kronik yara tedavisinde doğal ECM'in mekanik ve yapısal özelliklerini ve biyoaktivitesini taklit edebilen doku mühendisliği ürünü olan biyoparçalanabilir ve üç boyutlu doku iskelelerinin kullanılmasını başlatmıştır. Geleneksel yara tedavisi yaklaşımları, enfeksiyon ve iskemi gibi altta yatan nedenleri kontrol altına almaya çalışırken doku iskeleleri, iyi iyileşmeyen bir yara ortamını, vücudun yarayı doğal olarak iyileştirmesine izin veren akut bir yaraya benzeyen bir mikro çevreye

dönüştürmektedir. Son yıllarda doku mühendisliği alanında çok sayıda bilimsel araştırmalar yapılmış olup diyabetik yara tedavisinde de yaygın olarak yara iyileşmesini ve doku rejenerasyonunu hızlandırmak amacıyla hücre proliferasyonuna ve göçüne imkan veren ECM yapısının sağlandığı doku iskelelerinden yararlanılmaktadır (255, 256). Doku iskeleleri yalnızca ECM yerine geçerek yara iyileşmesini hızlandırmakla kalmamakta aynı zamanda içeriğine aktif bileşenlerin de dahil edilmesi ile ilaç taşıyıcı sistem haline gelebilmektedir. Son yıllarda doku iskeleleri ile ilaç taşıyıcı sistemlerin bir arada kullanılması konusunda yoğun bir şekilde araştırmalar yapılmaktadır. Doku iskeleleri yara tedavisi amacıyla günümüze kadar büyüme faktörleri, antibiyotikler, antiinflamatuvar ilaçlar ve diğer pek çok yara iyileştirici ajanla birleştirilerek araştırılmıştır (125, 177, 178, 181, 184). Üç boyutlu doku iskeleleri, bu ilaçların kısa, orta veya uzun süreli lokalize salımını sağlayarak sistemik yan etkilerini ortadan kaldırmakta ve daha düşük dozlarda uygulama sunarak tedavi maliyetini azaltmaktadır (183). Bu tez çalışmasında ise simvastatin nanolipit partikülleri içeren biyoparçalanabilir doku iskelelerinin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Simvastatin kolesterol sentezinde yer alan HMG-KoA'nın mevalonata dönüştürülmesini katalize eden HMG-KoA redüktaz enziminin kompetitif inhibitörü olarak etki gösteren bir lipit düşürücü ilaçtır. Lipit düşürücü etkisinden bağımsız olarak simvastatin, diyabetik yara tedavisinde immünmodülatör, antiinflamatuvar ve anjiyogenik etkiler gibi çeşitli olumlu etkileri nedeniyle son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir (20, 219, 220). Diyabetik hayvan modeli üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada simvastatinin yara bölgesinde VEGF'nin sentezini ve salımını artırarak anjiyogenezisi uyardığı, oksidatif stresi azalttığı, mikro vasküler ve endotel fonksiyonları iyileştirdiği raporlanmıştır (20). Aynı zamanda başka bir çalışmada hem akut hem de kronik yaralarda IL-1, IL-6 ve IL-8 ve TNF α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin düzenlenmesiyle antiinflamatuvar aktivite sergilediği kanıtlanmıştır (220). Yara iyileşmesinde yeniden düzenlenme fazı sırasında anjiyogenezis meydana gelmektedir. Bu faz diyabet durumunda en çok etkilenen faz olup, diyabet bu fazda VEGF'nin üretimini ve salımını azaltmakta, bu olumsuz etkinin de yara bölgesinde yeniden damarlanmayı engelleyen en önemli neden olduğu düşünülmektedir. Bu

nedenle simvastatinin VEGF üzerinden anjiogenezisi artırması ve antiinflamatuvar etki göstermesi diyabetik yaralarda oluşan kronik enflamasyonu azaltması ve diyabetik yaraların etkin bir şekilde tedavi edilmesi açısından önem taşımaktadır. Diyabetik yaralarda simvastatinin en uygun uygulama yolu, yan etkileri azaltıp doğrudan hedef dokuya uygulama sunması nedeniyle topikal yoldur. Ancak literatürde simvastatinin kronik yara iyileşmesi amacıyla topikal kullanıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (20, 219, 257). Bu çalışmalarda da genellikle çözelti veya merhem tipi klasik dozaj şekilleri kullanılmıştır. Topikal tedavi uygulamalarında merhem, krem gibi klasik dozaj şekilleri ile cilt yüzeyinde uzun süreli temas sağlanamadığından etkin maddenin kontrollü salımı ve yara bölgesinde uzatılmış etki göstermesi sağlanamamaktadır. Bu nedenle yeni ilaç taşıyıcı sistemlerden özellikle NLT sistemleri etkin maddenin stabilitesinin, biyoyararlanımının, dermal penetrasyonunun artırılması ve kontrollü ilaç salımının sağlanması gibi avantajlar sağladıklarından, günümüzde deriye ilaç uygulanması araştırmalarında tercih edilen dozaj şekilleri olmuşlardır (86).

Son 20 yıldır NLT sistemler ile başta parenteral, peroral, oküler ve pulmoner sistemler olmak üzere birçok alanda çalışmalar yapılmaktadır (46, 77, 105, 258). Nanoyapılı lipit taşıyıcı sistemler özellikle deri hastalıklarının topikal tedavisi için uygun taşıyıcı sistemlerdir. Çünkü bu sistemler, tedavi edilen deri alanına yüksek konsantrasyonda ilacın ulaşmasına olanak vermektedir. Diğer taraftan, küçük partikül büyüklüğü ve lipidik bir bileşime sahip olması, nanopartiküller ve deri arasındaki teması artırmakta ve enkapsüle edilmiş ilacın kontrollü bir şekilde salımı sağlanarak ilacın deride kalış süresi uzatılmaktadır. Bu partiküller ayrıca, örtücü özellik göstererek derinin nemlenmesini sağlamakta ve bu sebeple ilacın penetrasyonunu da artırmaktadır. Bu özelliklerin tümü NLT'lerin, diyabetik yaralar gibi kronik yaraların tedavisi için uygun bir ilaç taşıyıcı sistem olduğunu göstermektedir (259). Bununla birlikte NLT formülasyonları simvastatin gibi lipofilik yapıdaki stabilite problemi bulunan ilaçların uzun dönem fiziksel ve kimyasal stabilitesini sağlayarak yüksek ilaç yüklenme kapasitesi ile daha uygun bir kontrollü salım sistemi sağlamaktadır (56, 203).

Yara iyileştirici etkilerinin yanı sıra statinlerin proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi pek çok hücre fonksiyonunda önemli rol oynaması, araştırmacıları statinlerin kök hücreler üzerindeki etkilerinin incelenmesine de yöneltmiştir. Assmus ve ark. (260) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada statinlerin, kemik iliğinden yaralı dokuya doğru yönelen ve doğrudan damar duvarları içerisine dahil olup veya çeşitli anjiyogenik büyüme faktörleri salgılayarak yeniden damarlanmayı destekleyen, endotelial progenitör hücrelerin çoğalmalarını artırdığı gösterilmiştir. Statinlerin bu etkilerinin oldukça güçlü olduğu düşünülerek, simvastatin kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise hiperenflamatuvar durumlarda bile simvastatinin endotelial progenitör hücrelerin hayatta kalma ve farklılaşması üzerinde koruyucu etki gösterdiği kanıtlanmıştır (261). Devam eden araştırmalarla statinlerin progenitör hücrelerle beraber kök hücrelerin canlılığını, mobilizasyonunu, hasarlı dokuya yerleşimini, farklılaşmasını ve proliferasyonunu indüklediği de gösterilmiştir. Bu sebeple statinler miyokard enfarktüsü, kemik hasarları, vasküler lezyonlar gibi pek çok doku hasarında kök hücrelerin iyileştirici etkilerini geliştirmektedir (249, 262, 263).

Diyabetik yara tedavisinde, diyabetin neden olduğu hasarlar ortadan kaldırılmadığı sürece başarılı bir tedavi sağlanamamaktadır. Kök hücre tedavisi diyabetik yara patofizyolojisini hedef alan umut verici bir tedavi yolu olarak gözükmekte olup günümüzde kök hücreler üzerinde araştırmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Çünkü kök hücreler diyabetik yaralarda altta yatan anormal iyileşme mekanizmalarını ve bozulmuş hücre iletişimini desteklemektedir. İskemik ve yaralı dokularda kemokin ve büyüme faktörleri salgılanmasını sağlayarak, anjiogenezise ve ECM yeniden düzenlenmesine yol açar böylece yara iyileşmesine uygun ortam hazırlanmış olur (30). Kök hücre tipleri arasında, mezenkimal kök hücreler yara iyileşme fazlarının hepsinde yara yatağında tespit edilmiş olup kolay elde edilebilir olmaları, güçlü çoğalma ve farklılaşma kapasiteleri nedeniyle diyabetik yara tedavisi için özellikle umut vermektedir (26, 30, 33, 264). Diğer dokularda bulunan kök hücrelerde olduğu gibi, epidermal kökenli mezenkimal kök hücreler de homeostazı ve yara iyileşmesini önemli derecede desteklemektedir. İnterfoliküler epidermis, salgı bezleri ve kıl foliküllerinin kabarık kısmında bulunan

epidermal kök hücreler, yaşlanmış hücrelerin ölümünden sonra bu bölgelerdeki epidermis hücrelerin yenilenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. Epidermis tabakasının kendini yenilemesi sürecinde epidermal kök hücreler, yüksek proliferasyon hızları ve kendilerini yenileyebilmeleri sayesinde bu rolü üstlenmektedirler (26, 265, 266). Diyabetik yara tedavisi epidermin özellikle bazalden iyileşmesini sağlamak amacıyla bu tez kapsamında epidermal kökenli mezenkimal kök hücrelerin kullanması planlanmıştır.

Diyabetik yara tedavisinde mezenkimal kök hücrelerin uygulanma yolu en önemli noktalardan biridir. Sistemik veya lokal enjeksiyonla tedavinin önemli dezavantajları bulunmaktadır. Özellikle mezenkimal kök hücrelerin sistemik olarak uygulanması, hücreleri vücutta yaygın bir şekilde dağıtarak az sayıda kök hücrenin istenilen bölgeye ulaşmasına neden olmaktadır. Sistemik veya lokal enjeksiyonla yara bölgesine ulaşan kök hücreler ise korunmasız hücrelerin çoğalmasına karşı olan proteolitik, kronik inflamatuvar bir ortamla karşı karşıya geldiklerinden, hücreler yara yatağına tutunamayarak ölmekte ve istenilen terapötik etki sağlanamaktadır. Kronik yaraların bu olumsuz çevre koşulları, sistemik veya lokal enjeksiyonun dezavantajları nedeniyle sınırlı kullanımları gibi olumsuz nedenler, kök hücreleri lokal olarak hapseden koruyucu kök hücre taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Bu sebeple, günümüzde doku mühendisliği çalışmalarında yaygın bir yaklaşım olarak, doku rejenerasyonu ve yenilenmesinin doğal bir şekilde başlatılması için üç boyutlu poröz, biyoparçalanabilir doku iskelelerine spesifik canlı hücreler yüklenmektedir (267).

Belirtilen tüm bu bilgilerin ışığında diyabetik yaralar gibi iyileşme sürecinin pek çok noktada aksadığı, uzun süre iyileşme göstermeyen yaraların tedavisinde tek yönlü bir tedavi yaklaşımı yetersiz olacağından bu tez kapsamında çok yönlü bir yaklaşım planlanmıştır. Simvastatinin yara iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinin özellikle diyabetik yara tedavisinde etkili olacağı düşünülerek, simvastatin NLT sistemleri içinde hapsedilmiş ve doku iskelesi formülasyonu ile birleştirilmiştir. Bu yaklaşımla simvastatinin topikal olarak kontrollü salımının sağlanması, stabilitesinin, çözünürlüğünün ve etkinliğinin artırılması öngörülmüştür. Kök hücrelerin yara tedavisindeki önemi ve statinlerin kök hücre tedavisindeki olumlu etkileri nedeniyle

statinlere ek olarak tedaviye epidermal kökenli mezenkimal kök hücreler de eklenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada hem kök hücrelerin hem de lipid nanopartiküller simvastatinin aynı doku iskelesi formülasyonu içerisinde yara bölgesine topikal olarak uygulanmasıyla; diyabetik yara iyileşmesinde ayrı ayrı statin ve kök hücre uygulamalarına göre çok daha etkin bir iyileşme sağlanması, kök hücrelerin doku iskeleleri aracılığı ile yara bölgesinde optimum lokalizasyonu sağlanarak terapötik veriminin artırılması, simvastatinin nanopartiküller sistemler içine yüklenmesi ile ilacın stabilitesi ve kontrollü salımının sağlanması ve doku iskelelerinin üç boyutlu poröz yapısının hem nanopartikül hem de kök hücre taşınması için uygun bir iskele yapısı göstermesi, yara bölgesinde doku kaybını tamamlaması ile diyabetik yara tedavisinde var olan pek çok eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır. Bütün bu amaçların bir arada planlanması ile diyabetik yara iyileşmesinde uygulanacak daha önce denenmemiş çok modelli yeni bir topikal tedavi yöntemi oluşturulmuştur.

Çalışmamıza öncelikle simvastatinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile başlanmış ve HPLC ile miktar tayini yönteminin geliştirilmesiyle devam edilmiştir. Simvastatinin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla FT-IR, UV spektrumları çekilmiş ve erime derecesi tayini analizi yapılmıştır. Simvastatinin 10 µg/ml konsantrasyondaki UV spektrumunda 231 nm, 238 nm ve 247 nm'de bulunan absorpsiyon pikleri ve FT-IR spektrumunda simvastatinin kimyasal yapısına bağlı olan karakteristik pikler etkin maddenin saf olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1.-4.2.). Elde edilen FT-IR, UV spektrumu sonuçlarının literatürle uyumlu oldukları gözlenmiştir (193, 226). Son olarak simvastatinin erime derecesi tayini de gerçekleştirilerek erime derecesi kaynaklara uygun olarak erime başlangıcı 132°C ve erimenin tamamlanması 136°C olarak bulunmuştur (193). Erime derecesi yapıdaki ufak kirliliklerden dahi etkilendiğinden simvastatinin kaynaklara uygun erime derecesine sahip olması etkin maddenin kirlilik içermediği ve yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.

Simvastatinin miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemi için yapılan validasyon çalışmalarında, doğrusalığın, çizilen kalibrasyon doğrularından elde edilen 0,9999 regresyon katsayısı (r^2) değeri ile sağlandığı bulunmuştur (Şekil 4.4.).

Doğruluk ve kesinlik değerlendirmelerinde elde edilen değerlerin % bağıl hatalarının %1,5'ten, varyasyon katsayılarının %2'den küçük olması ve % geri kazanım değerlerinin de %98-102 arasında olması, analitik yöntemin gün içi ve günler arası doğru ve kesin değerler verdiğini göstermiştir (Tablo 4.1.-4.3.). HPLC ile elde edilen simvastatin piki, formülasyona katılan yardımcı maddelerle ve analiz ortamında bulunan bileşenlerle girişim yapmamaktadır, bu nedenle miktar tayini yöntemi özgün olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5.). HPLC stabilite analizinde incelenen süre boyunca elde edilen eğri altı alanlar ve ölçülen konsanrasyonlarda önemli bir fark gözlenmediğinden, simvastatin HPLC ile miktar tayini yöntemine dayanıklı bulunmuştur (Tablo 4.4).

Simvastatinin karakterizasyonu, miktar tayini yöntemi ve validasyonu tamamlandıktan sonra, etkin maddeyi hapsedecek olan nanoyapılı lipit taşıyıcı sistem formülasyonları (NLT) üzerinde çalışılmıştır. Literatürde NLT formülasyonları için biyomedikal uygulamalara uygun çok sayıda lipit karışımı tanımlanmıştır (65). Ancak uygun lipit karışımının seçimi için ana kriter etkin maddenin lipit matriksteki çözünürlüğüdür. Bu nedenle simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyon çalışmalarına geçilmeden önce lipit nanopartikül yapısını oluşturan uygun katı ve sıvı lipitin seçimi amacıyla lipit taraması deneyleri yapılmıştır (Bölüm 3.2.3.). En yüksek çözünürlük katı lipitler arasında Precirol ATO 5, sıvı lipitler arasında ise Maisine ve Peceol lipitlerinde gözlenmiştir. Bu lipitler kullanılarak yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucunda en uygun partikül büyüklüğü ve dağılımları Precirol ATO 5 ve Maisine kombinasyonunda elde edilmiştir. Bu nedenle lipit taraması deneyleri sonucunda formülasyon çalışmaları için ilk olarak Precirol ATO 5 ve Maisine lipitleri seçilmiştir.

Sıvı lipit taramalarında elde edilen sonuçlar literatürde yer alan simvastatin lipit çözünürlük çalışmaları ile uyumlu bulunmuştur (227, 268). Mahmoud ve ark. (227) simvastatinin ile yüklenmiş nanoemülsiyon formülasyonlarının tasarımı amacıyla farklı sıvı lipitler içinde simvastatinin çözünürlük çalışmalarını gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda Maisine ve Peceol, sırasıyla 66 mg/g ve 67 mg/g simvastatin çözünürlük değerleri ile, Labrafac Lipophile ve Labrafil M 1944 CS sıvı lipitlerine göre daha yüksek çözünürlük göstermiştir.

Simvastatinin lipitler içerisindeki çözünürlüğü ne kadar yüksekse, elde edilen NLT formülasyonuna etkin madde hapsedilme etkinliğinin de o kadar yüksek olması beklenmektedir. Ancak simvastatinin sıvı lipitlerdeki çözünürlüğünün formülasyonların karakterizasyonları üzerindeki etkisini incelemek ve literatürde yer alan oleik asit kullanılan NLT formülasyon çalışmaları ile karşılaştırma yapmak amacıyla simvastatinin yüksek çözünürlük gösterdiği Maisine ile birlikte düşük çözünürlük gözlenen oleik asit de NLT formülasyon tasarımı için seçilmiştir. Böylelikle simvastatinin yüksek çözünürlük ile daha fazla ilgi gösterdiği ve daha düşük çözünürlükle daha az ilgi duyduğu iki farklı lipit matriks yapısı oluşturulmuştur. NLT formülasyonunda kullanılacak katı lipit seçiminde ise lipit taraması sonucunda en yüksek simvastatin çözünürlüğü Precirol ATO 5 ile gözlemlendiğinden ve literatürde Precirol ATO 5 kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarında nanoboyutlarda homojen partikül dağılımları elde edildiğinden Precirol ATO 5 seçilerek sabit tutulmuştur (77, 269-271). Bu yaklaşıma benzer olarak Doktorovova ve ark.'nın (270) gerçekleştirdiği bir çalışmada flutikason propionate ile yüklenmiş NLT formülasyonlarının tasarlanmasında lipit matriks yapısında Precirol ATO 5 katı lipiti sabit tutarak Labrasol ve Softrigen 767 sıvı lipitleri ile farklı sıvı lipitlerin NLT formülasyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. NLT formülasyonları nanonoyutlarda başarılı bir şekilde elde edilmiş ve farklı sıvı lipit kullanımının formülasyonun partikül büyüklüğü ve dağılımını değiştirdiği gözlenmiştir. Pardeike ve ark. (271) ise Precirol ATO 5 ve oleik asit lipit karışımını kullanarak hazırladıkları itrakonazol yüklü NLT formülasyonları ile dar bir partikül dağılımı gösteren nanometre aralığında ve yüksek yükleme kapasitesine sahip nanopartiküller elde etmişlerdir.

NLT formülasyonlarında, katı lipit yapısına sıvı lipitlerin eklenmesi, oldukça düzenli bir yapı olan β -modifikasyon formunda bulunan katı lipit matriksinin erime derecesinin azaltılarak daha az düzenli ve etkin maddenin hapsedilmesi için daha çok oda oluşumlarının bulunduğu lipit matriks yapısına dönüşmesine neden olmaktadır. Bu düzensiz yapı ve odacıkların artması etkin maddenin yüklenme kapasitesini artırmakta ve etkin maddenin lipit matriksten sızmasının önüne geçmektedir (48, 77). Bununla birlikte etkin maddelerin sıvı lipitlerdeki çözünürlüklerinin katı lipitlere

göre daha yüksek olması nedeniyle sıvı lipit miktarının artırılması yüklenen ilaç miktarı artırmaktadır. Bu nedenle NLT formülasyonlarındaki sıvı:kati lipit oranının artırılması ile lipit matriksin erime derecesi azalarak daha düzensiz bir yapı içinde etkin maddenin sıvı lipitlerde çözünerek hapsedildiği düşünülmektedir (272). Bu sonuçlardan yola çıkılarak sıvı lipit oranının NLT formülasyonları üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla NLT formülasyon çalışmalarında farklı sıvı lipit oranları ile çalışılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla düşük sıvı lipit oranı olarak 50:50 sıvı:kati lipit oranı ve yüksek sıvı lipit etkisi için ise 70:30 sıvı lipit oranlarında çalışılmıştır. Literatürde yer alan pek çok NLT formülasyon çalışmalarında da benzer sıvı:kati lipit oranlarında formülasyon tasarımları yapılmıştır (203, 269).

Literatürde simvastatinin NLT formülasyonlarında lipit matriksin %5 ile %10'nu (a/a) kadar yüklenebildiğine dair yapılan çalışmalar bulunmaktadır (56, 72, 203). Yapılan lipit tarama deneyleri sonucunda ise %20'ye kadar etkin maddenin lipit matrikste çözündüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda NLT formülasyon çalışmalarında yüklenen etkin madde miktarının formülasyonlar üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kati ve sıvı lipit karışımında %10 ve %20 simvastatin konsantrasyonlarında çalışılmıştır.

Sonuç olarak tez çalışmaları kapsamında Maisine:Precirol ATO 5 ve Oleik asit:Precirol ATO 5 lipit kombinasyonları, 50:50 ve 70:30 sıvı:kati lipit oranları ve total lipit miktarının %10 ve %20 (a/a)'si kadar yüklenen simvastatin miktarları formülasyon parametresi olarak belirlenmiştir (Tablo 3.3.). Bununla birlikte tez çalışmalarının ilerleyen basamaklarında hazırlanacak olan doku iskelesi formülasyonlarında yüklenen simvastatin dozunun ve nanopartikül konsantrasyonunun artırılması amacıyla NLT formülasyonlarına ultrafiltrasyon işlemi uygulanacaktır. Bu nedenle in vivo çalışmalar için uygun bulunan NLT formülasyonları ultrafiltrasyona da uğratarak, süzme işleminin formülasyonların karakterizasyonları üzerinde oluşturduğu değişiklikler incelenmiştir.

NLT formülasyonlarında yer alan yüzey etkin maddelerin tipi ve konsantrasyonları da literatürdeki çalışmalara göre seçilmiştir. Literatürde yer alan çalışmalar yüzey etkin madde karışımları ile hazırlanan lipit nanopartiküllerin tek bir

yüzey etkin madde kullanılanlara kıyasla daha küçük partikül büyüklüğü ve daha iyi bir stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir (48). Bu nedenle bu tez çalışmasında hidrofilik ve lipofilik özelliklere sahip iki farklı yüzey etkin madde kullanılarak NLT formülasyonlarının hazırlanmasına karar verilmiştir. Formülasyonlardaki total lipit konsantrasyonu ile kullanılacak yüzey etkin maddelerin ve konsantrasyonlarının belirlenmesinde literatürde yer alan çalışmalar göz önüne alınarak çeşitli optimizasyon çalışmaları yapılmıştır (203, 270, 273). Sonuç olarak optimum total lipit konsantrasyonu %2 a/a, yüzey etkin madde kombinasyonu ve konsantrasyonu Tween 80 (%2,5 a/a) ve Lipoid S100 (%0,5 a/a) olarak belirlenmiştir. Tween 80, HLB değeri 15 olan hidrofilik ve non-iyonik bir polisorbat türevi yüzey etkin maddedir. KLN ve NLT sistemlerinin formülasyonlarında Tween 80 yaygın olarak kullanılmakta olup bu formülasyonlarda genellikle Lipoid S100 ile birlikte kullanılmaktadır (274). Lipoid S100 yüzey etkin maddesi ise 3 HLB değeri ile lipofilik özellik gösteren fosfatidilkolin kimyasal yapısındaki bir soya fasulyesi lesitimidir. Liu ve ark. (273) Precirol ATO 5 katı lipitini kullanarak hazırladıkları KLN formülasyonlarını Tween 80 ve soya fasulyesi lesitini yüzey etkin madde karışımının farklı oranlardaki karışımı ile stabilize etmişlerdir. Hazırlanan formülasyonlarda Tween 80 konsantrasyonu artması ile partikül büyüklüğünün azaldığı gözlemlenirken formülasyona soya lesitini eklendikçe optimum partikül büyüklüğü ve dağılımına ulaşıldığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç lipofilik yapıdaki yüzey etkin maddenin uygun partikül büyüklüğü ve dağılımının elde edilmesi için önemini vurgulamaktadır.

NLT formülasyonlarının hazırlanması için yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem özellikle üretim sırasında organik solvan kullanımına gerek duyulmadığından toksik kontaminasyon riski oluşturmamaktadır. Yara tedavisinde kullanılacak bir formülasyon tasarımında formülasyondan kaynaklanacak herhangi bir toksik etki gözlenmemesi gerektiğinden, formülasyonların uygulama amacı hazırlama yöntemi seçiminde en belirleyici etken olmuştur. Bunun yanı sıra yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi diğer hazırlama yöntemlerine göre homojen dağılım gösteren nanoboyutlarda partiküllerin üretimine olanak verebilen çok yönlü ve kolaylıkla ölçeklendirilebilen bir yöntem olması

nedeniyle istenilen özellikte NLT formülasyonlarının üretilebilmesini sağlamaktadır (51, 275). Vitorino ve ark. (99) simvastatin ve olanzapin yüklenmiş; lipit faz olarak tripalmitin ve oleik asit, yüzey etkin madde olarak Tween 80 kullanarak yüksek basınçlı homojenizasyon ve çözücü emülsifikasyon- evaporasyon yöntemi olmak üzere iki farklı yöntemle hazırladıkları NLT formülasyonlarını karşılaştırmışlardır. Elde edilen sonuçlarda yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile daha küçük partikül büyüklüğü ve PDI değerlerine sahip daha yüksek ilaç haspedilme etkinliği gösteren formülasyonlar elde edilerek optimum üretim yöntemi olarak yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi seçilmiştir. Tez çalışmalarında NLT formülasyonlarının hazırlanmasında Vitorino ve ark. (99) tarafından geliştirilen yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi üzerinde modifikasyon çalışmaları yapılmış ve sonuç olarak optimum hazırlama yöntemi NLT dispersiyonunun homojenizasyon öncesi, 80°C’de 10.000 rpm’de yüksek hızlı karıştırıcı altında 5 dk karıştırılmasının ardından 80°C’de 1.500 bar basınç altında iki kez devir edilerek homojenize edilmesi olarak belirlenmiştir.

Tüm değişkenler ve optimum şartlar belirlendikten sonra hazırlanan NLT formülasyonları öncelikle partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel açısından değerlendirilmiştir (Tablo 4.8.). Elde edilen partikül büyüklüğü sonuçları incelendiğinde tüm formülasyonların nanometre boyutunda, 0,34 PDI’nin altında ve genel olarak tek tepeli dağılımlar gösterdikleri gözlenmiştir. İki tepeli dağılım gösteren formülasyonlarda birinci pikin % yoğunluğu oldukça yüksek olup 100’e yakın bir değerdir ve bu nedenle formülasyonların tek tepeli dağılıma sahip olduklarını kabul edilmiştir (Tablo 4.8.). Formülasyonların PDI değerlerinin düşük olması ve tek tepeli bir dağılım eğiliminde olmaları nedeniyle partikül büyüklüğü değerlendirmeleri ortalama partikül büyüklüğü sonuçları üzerinden yapılmıştır. Ortalama partikül büyüklüğü değerleri 110,95 nm- 239,02 nm arasında değişmekte olup bu sonuçlar Maisine kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda 110,95 nm- 157,27 nm olmak üzere daha küçük boyutlarda ve dar bir aralıkta değişirken, oleik asitli formülasyonlarda boyutlar büyümekte ve sonuçlar formülasyonlar arasında daha geniş bir aralıkta 132,80 nm’den 239,02 nm’ye kadar değişmektedir. 10 nm üzerindeki partiküller sağlam ya da kısmen hasar gören deriye nüfuz etmeyerek lokal

etki göstermektedir (276, 277). Çalışmamızda doku iskelelerinin uygulanması yara üzerine yapılmakla birlikte naopartiküllerin doğrudan yara içine penetre olmadıkları, içerdikleri simvastatini kontrollü bir şekilde ortama saldıkları, ancak zamanla doku iskelesinin parçalanması sonucunda, yara iyileşmesinin ileri dönemlerinde yara ve kısmen iyileşmiş stratum korneum ile temasa gelecekleri düşünülürse hazırlanan NLT formülasyonlarının partikül büyüklükleri uygun bulunmuştur. Campbell ve ark. (277) polimerik nanopartiküllerin topikal uygulama sonrası memeli derisindeki birikimini inceleyerek partikül büyüklüğü 20 ila 200 nm arasında değişen nanopartiküllerin kısmen hasarlı deride dahi sadece stratum korneumun yüzeyine penetre olduklarını göstermişlerdir. Bu büyüklüklere sahip uygun şekilde formüle edilmiş nanopartiküller ile deri üzerinde veya yakınında tutulum sağlanarak uzun süreler boyunca kontrollü salımın sürdürülebileceği ilaç rezervuarları oluşturulmaktadır. Bu tez çalışması ile diyabetik yaraların tedavisi amacıyla lokal olarak uygulanan NLT formülasyonlarını içeren doku iskelelerinden simvastatinin uzun süreli kontrollü salımı hedeflendiğinden hazırlanan NLT formülasyonlarının bu özellikleri göstermesi beklenmektedir.

Yüksek basınçlı homojenizasyon yönteminin kullanıldığı diğer çalışmalarda benzer partikül büyüklüklerine sahip NLT formülasyonları elde edilmiştir (203, 278, 279). Bununla birlikte simvastatin ile yüklenmiş, yüksek stabilite ve uygun bir kontrollü salım sonuçları elde edilen KLN ve NLT formülasyonları üzerinde yapılan çalışmalarda partikül büyüklüğü yaklaşık 100 nm-300 nm aralığında değişmektedir (56, 99, 205, 229). Vitorino ve ark. (203) transdermal salım amacıyla yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemini kullanarak simvastatin yüklü NLT formülasyonları geliştirmişlerdir. Gliseril tripalmitat ve oleik asit lipit karışımının farklı oranlarda kullanıldığı bu formülasyonların partikül büyüklüğü 140 nm-209 nm arasında, PDI değerleri 0,283'ün altında değişirken zeta potansiyel değerleri yaklaşık -30 mV olarak bulunmuştur. Gözlemlenen bu sonuçlar tez çalışması kapsamında hazırlanan simvastatin yüklü NLT formülasyonları ile uyum sağlamaktadır.

Hazırlanan NLT formülasyonları farklı sıvı lipit miktarlarına göre karşılaştırıldığında, oleik asit içeren formülasyonlarda sıvı lipit miktarının artması ile partikül büyüklüğünde azalma gözlenirken, Maisine içeren formülasyonlarda %20

simvastatin yüklü formülasyonlar dışında ($p>0,05$) tam ters bir etki ile partikül büyüklüğü artmıştır ($p<0,05$). Oleik asitli formülasyonlarla uyumlu olarak, sıvı lipit miktarının NLT formülasyonları üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmaların büyük bir kısmında sıvı lipit miktarının artması ile partikül büyüklüğünün azaldığı gözlenmiştir (203, 269, 280-282). Oleik asit formülasyonları ile elde edilen sonuçlarla benzerlik gösteren bir çalışmada, Tiwari ve ark. (56) katı lipit olarak gliserol monostearat, sıvı lipit olarak ise oleik asit kullanarak poloksamer 407 yüzey etkin madde ile stabilize edilen simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonları geliştirmişlerdir. Farklı sıvı lipit, total lipit miktarı, sıvı lipit ve yüzey etkin madde miktarlarının formülasyonların partikül büyüklüğü üzerindeki etkileri incelendiğinde yüksek oleik asit miktarlarının düşük partikül büyüklüklerinde dağılımların oluşmasına neden olduğu gözlenmiştir.

NLT formülasyonları üzerinde yapılan pek çok çalışma göstermiştir ki formülasyon içerisinde yer alan sıvı lipit miktarı lipit nanopartiküllerin kristalizasyonu, erime derecesi ve polimorfik içeriğini doğrudan etkilemektedir. Sıvı lipitler katı lipitlerle karıştırıldığında polimorfik geçişlerle kristal matriks yapısına dönüşen katı lipit yapılarının aralarına yerleşerek polimorfik geçişler sonucunda oluşacak partikül büyüklüğündeki artışlara engel olmaktadır. Böylelikle sıvı lipit miktarının artması ile lipit matriksin kristalizasyonu ve erime derecesi azaltılarak daha küresel ve stabil özellikler gösteren partiküller oluşmaktadır (231, 232). Bununla birlikte lipit fazın viskozitesinin artmasının NLT formülasyonlarının yüzey gerilimini artırarak homojenizasyon verimini azalttığı ve bunun sonucunda partiküllerin agredasyona uğrayarak boyutlarının büyüdüğü gözlemlenmiştir (282, 283). Bu nedenle yüksek katı lipit oranlarında viskozite arttığından daha büyük partiküller elde edilmektedir (280). Ancak Hejri ve ark. (284) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada β -karoten ile yüklenmiş palmitik asit ve mısır yağı kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonlarında, düşük lipit faz konsantrasyonunda sıvı lipit miktarının artması ile partikül büyüklüğünün değişmediği gözlemlenmiştir. Bu nedenle yapılan bu çalışma sonucunda, lipit faz viskozitesinin düşük lipit faz konsantrasyonlarında partikül büyüklüğünü etkileyen ana faktör olmadığı belirtilmiştir. Maisine ile hazırlanan formülasyonlarda da literatürde yer alan

çalışmalarla farklı olarak sıvı lipit miktarının artması ile partikül büyüklüğünün küçülmemesinin %2 (a/a) lipit faz konsantrasyonunda, formülasyondaki Maisine miktarının partikül büyüklüğü üzerinde belirleyici bir değişken olmamasından kaynaklanabilmektedir. Bunun yanı sıra Maisine'nin yapıya katılması ile kristalize olmayan optimum düzensiz lipit matriks yapısının 50:50 sıvı:katı lipit oranlarında sağlandığı bu oranın üzerinde sıvı lipit eklenmesi durumunda partiküllerin agregasyon ve kristalizasyon davranışlarının değiştiği öngörülmüştür (92).

İki farklı sıvı lipit kullanılarak hazırlanan NLT formülasyonları karşılaştırıldığında, Fm-70-BOŞ ve Fo-70-BOŞ formülasyonları arasında partikül büyüklüğü ve PDI, Fm-50-BOŞ ve Fo-50-BOŞ formülasyonları arasında ise PDI değerlerinde fark gözlenmezken ($p>0,05$) diğer maisine ile hazırlanan formülasyonlarda, oleik asit içeren formülasyonlara göre daha küçük partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri elde edilmiştir ($p<0,05$). Yang ve ark. (92) tarafından yapılan sıvı lipit çeşidinin NLT formülasyonları üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada oleik asitle birlikte farklı sıvı lipitlerle hazırlanan NLT formülasyonları karşılaştırılarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Farklı sıvı lipitlerle hazırlanan formülasyonların kristalizasyon özellikleri ve dispersiyon stabilitesinin seçilen sıvı lipit çeşidi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Katı lipit olarak tristearin sabit tutularak farklı sıvı lipitlerle hazırlanan NLT formülasyonlarında zeytin yağ sıvı lipiti ile optimum NLT dispersiyonlarının elde edildiği, oleik asit ile hazırlanan formülasyonlarda ise önemli derecede agregasyonların meydana geldiği gözlenmiştir. Bu sonucun oleik asidin yapısındaki asit fonksiyonel gruplarının, sıvı lipit ile yüzey etkin madde arasındaki ara yüzeyde değişikliklere yol açmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Jores ve ark. (285) da kullanılan sıvı lipite bağlı olarak, sıvı lipitin nanopartikülün yapısında veya yüzeyinde bulunabileceğini ve dolayısıyla formülasyonun karakterizasyonunu etkilediğini ileri sürmüştür. Ayrıca simvastatinin oleik asitteki çözünürlüğünün düşük olması ilacın nanopartikül çekirdeğine olan ilgisini azaltarak ilacın sızma eğiliminin artmasına neden olabilmektedir. Böyle bir durum sonucunda daha az miktarda ilaç hapsedilmekte ve yüzeye adsorbe olmuş ilaç kristalleri nedeniyle formülasyonun partikül büyüklüğü ve dağılımı artış göstermektedir (272). Maisine ile hazırlanan formülasyonlar ise küçük

partikül büyüklüğü ve homojen partikül büyüklüğü dağılımları ile hedeflenen NLT dispersiyonu özelliklerini göstermişlerdir.

Formülasyonlara etkin madde yüklenmesi ve total lipit miktarındaki etkin madde yüzdesinin %10'dan %20'ye çıkarılması hem Maisine hem de oleik asit ile hazırlanan formülasyonlarda daha büyük partiküllerin oluşmasına neden olmuştur ($p<0,05$). Formülasyonlardaki etkin madde miktarının artırılması lipit matriksin viskozitesini artırdığından partiküllerin yüzey gerilimi artıp lipit matriksteki hareketlilik azalmaktadır. Bu nedenle etkin madde yüklendikçe formülasyonların partikül büyüklüğü artarak homojenliği bozulmaktadır (282). Özellikle %20 simvastatin içeren formülasyonlarda partikül büyüklüğünde çok daha büyük bir artış gözlenmiştir. Nnamani ve ark. (286) tarafından gelucire, phospholipon 85G ve transkütol ile yapılan çalışmada da NLT formülasyonlarına etkin maddenin eklenmesi ile partikül büyüklüğünün arttığı gösterilmiştir.

Ultrafiltrasyon işlemi ise NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde herhangi bir farklılığa neden olmamıştır ($p>0,05$). Zeta potansiyel değerlerinde de ultrafiltrasyonun bir farklılığa yol açmayarak, formülasyonlar arasında farklılık yalnız Fm-50-BOŞ formülasyonunun 2 kattan 5 kata konsantre edilmesi ve Fm-50-20 formülasyonunun ise 2 ve 5 kat konsantre edilmesi durumlarında gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu nedenle ultrafiltrasyon işleminin NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılımlarına zarar vermediği kabul edilerek doku iskelelerinin hazırlanması aşamasında kullanılması uygun bulunmuştur.

Monodispers, dar partikül büyüklüğü dağılımlarında, 0,25'den küçük olan PDI değerlerinin, %20 etkin madde içeren oleik asitli formülasyonlar dışında tüm formülasyonlarda sağlandığı görülmüştür (60). Simvastatinin oleik asitteki çözünürlüğü düşük olduğundan, etkin madde yüzdesinin artması partikül büyüklüğü dağılımında büyük miktarda genişlemeye neden olmuştur. Elde edilen bu sonuç literatürle uyumlu olarak, başarılı bir sıvı lipit seçiminin nano boyutlarda homojen büyüklük dağılımlarına sahip NLT formülasyonlarının oluşturulmasındaki önemini göstermektedir (199).

Nanopartiküller termodinamik olarak stabil olmayan sistemler olduğundan kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin stabilitesinin sağlanması için zeta potansiyel değerlerinin 20-30 mV aralığında olması gerekmektedir (60, 66, 230). Hazırlanan tüm formülasyonlar negatif bir yüzey yüküne sahip olup zeta potansiyel değerleri -17,03 ile -35,57 arasında değişmektedir. Genel olarak lipidlerin anyonik özellikleri nedeniyle lipid nanopartiküllerin yüzey yükü negatiftir (207, 287). NLT formülasyon yapısında kullanılan Tween 80 de non-iyonik bir yüzey etkin madde olduğundan partiküllerin yüzey yükü üzerinde etkisi bulunmamaktadır. Bu nedenle hazırlanan formülasyonların negatif yükü, lipidlerin yanı sıra Lipoid S100'ün yapısındaki anyonik fraksiyonlardan kaynaklanmaktadır (274). Sonuçlar üzerinde istatistiksel olarak yapılan karşılaştırmalarda sıvı lipid oranının, etkin madde yüklenmesinin ve ultrafiltrasyon işleminin formülasyonların zeta potansiyellerinde ilişkili bir farklılığa yol açmadığı ancak Maisine'den oleik asite geçilmesi durumunda tüm formülasyonların zeta potansiyel değerlerinin anlamlı derecede daha negatif olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bu sonucun oleik asitin sahip olduğu karboksilat fonksiyonel grupları nedeniyle Maisine'den daha yüksek bir negatif yüke sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (288). Aditya ve ark. (289) da gliserol monostearat, oleik asit, Tween 80 ve lesitin kullanarak hazırladıkları NLT formülasyonlarında oleik asit ve soya lesitini nedeniyle yüksek negatif yüke sahip partiküller elde etmişlerdir. Zeta potansiyel değeri 30 mV'un üzerinde olan nanopartikül sistemleri fiziksel olarak stabil kabul edilirken yaklaşık 20 mV olan sistemler ise kısa süreli olarak stabil kabul edilmektedir (60, 230). NLT formülasyonları hazırlanmalarının hemen ardından doku iskelesi formülasyonlarında kullanılacağından çalışmanın amacı için kısa süreli stabilitenin sağlanması yeterlidir. Ancak özellikle etkin madde yüklenmiş formülasyonlarda yaklaşık -30 mV ve üzerinde bir zeta değerine ulaşıldığından formülasyonların çoğunda fiziksel olarak stabilite de sağlanmıştır. Bununla birlikte, Tween 80 partikülleri sterik mekanizmalarla stabilize edebildiğinden hazırlanan NLT dispersiyonları oldukça kararlıdır (290).

Belirlenen NLT formülasyon tasarımı ile formülasyon parametreleri ve partikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyel özellikleri arasındaki etkileşim gösterilmiştir. Diyabetik yara tedavisinde lokal uygulama amacıyla hazırlanan NLT

formülasyonu için beklenen optimum özellikler: 20 nm-200 nm arasında değişen küçük bir partikül büyüklüğü (277), homojen bir dağılım için 0,25'in altında PDI ve parçacıklar arasında yüksek bir itme kuvveti yaratarak agregasyona engel olduğundan mümkün olan en yüksek zeta potansiyel değerinden oluşmaktadır (280). Partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri sonucunda optimum partikül büyüklüğü ve dağılımı Maisine kullanılarak 50:50 sıvı:kati lipid oranlarında hazırlanan formülasyonlarla elde edilmiştir. Bu nedenle tez çalışmasının ilerleyen karakterizasyon çalışmaları Maisine ile hazırlanan bu formülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir.

NLT sistemlere etkin madde yüklenmesi, etkin maddenin çözünürlüğü ile doğrudan bağlantılıdır. Hazırlanan NLT formülasyonlarının yükleme kapasitesi geliştirilen tüm formülasyonlar için yaklaşık olarak %100 bulunmuştur ($p>0,05$). Yüksek yükleme kapasitesi hapsedilme etkinliğinin de beklenen en üst düzeyde çıkmasına yol açmıştır. Literatürde yer alan simvastatin NLT çalışmaları incelendiğinde simvastatinin NLT formülasyonlarına yüksek oranda yükleme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür (72, 99, 282). Ali ve ark.'nın (72) gerçekleştirdiği bir çalışmada simvastatin NLT formülasyonlarının etkin madde yükleme kapasitesi $99,9\pm 0,8$ bulunurken, Vitorino ve ark. (99) tarafından yapılan başka bir simvastatin yüklü NLT formülasyonunda ise benzer şekilde yükleme kapasitesi $99,5\pm 0,3$ olarak bulunmuştur. Hidrofobik bir ilaç olan simvastatinin formülasyonlarda kullanılan lipidlerde yüksek çözünürlük göstermesi yükleme kapasitesinin yüksek olmasının en önemli etkenidir (282).

NLT formülasyonlarındaki lipid kristalizasyon ve modifikasyon özellikleri DSC analizleri gerçekleştirilerek incelenmiştir (Şekil 4.7.-4.12.). Elde edilen termogramlarda tüm NLT formülasyonları için benzer sonuçlar gözlenmiş ve sıvı lipitin yapıya girmesi Precirol ATO 5'in erime noktası ve entalpisinde düşmeye neden olarak daha geniş ve baskılanmış bir endotermik erime piki gözlenmiştir. Katı lipid erime pikinde gözlenen bu enerji düşüşü, kristal haldeki katı lipid ile sıvı lipitin etkileşimden kaynaklanmakta olup, bu etkileşim katı lipitin kristal yapısında düzensizliklere yol açarak etkin madde moleküllerinin yerleşmesi için uygun boşlukların oluşmasına izin vermektedir (274). Bu bağlamda yaklaşık $139,8^{\circ}\text{C}$ 'de

gözlenen saf simvastatine ait erime geçiş piki NLT formülasyonlarının hiçbirinde gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, simvastatinin lipit nanopartiküller içerisinde çözünerek, moleküler olarak disperse olmuş halde tamamen enkapsüle olduğunu desteklemektedir. Diğer araştırmacılar tarafından hazırlanan simvastatin yüklü NLT formülasyonlarında da, farklı lipit matris ve hazırlama yöntemleri kullanılmasına rağmen tez çalışmasında gözlenen sonuçlarla uyumlu olarak simvastatin erime pikinin gözlenmediği DSC termogramları elde edilmiştir (72, 207).

NLT formülasyon eksipiyanları ve simvastatin arasındaki etkileşimleri incelemek amacıyla DSC analizlerinin yanında FT-IR çalışmaları da gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13.-4.22.). Simvastatinin spektrumunda (Şekil 4.13.) gözlenen etkin maddeye ait pikler yapıya spesifik olup NLT formülasyonlarına ait spektrumlarda etkin maddeye özgü piklerin gözlenmesi etkin madde ile NLT formülasyon bileşenleri arasında etkileşim oluşmadığı ve etkin maddenin saf halde formülasyon yapısında bulunduğunu göstermektedir (269). Ancak etkin maddenin yüksek oranda enkapsüle edildiği, lipit nanopartiküller içerisinde moleküler düzeyde çözüldüğü durumlarda, saf maddeye ait karakteristik piklere rastlanmamaktadır (78). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen FT-IR analizleri sonucunda etkin madde yüklenmemiş ve yüklenmiş olan tüm NLT formülasyonlarının spektrumları oldukça benzerlik göstermekte olup simvastatinin karakteristik pikleri Precirol ATO 5'e ait piklerle yer değiştirmiştir. Bu durum simvastatinin lipit matris içerisinde tamamen çözünerek enkapsüle olduğunu ve bu nedenle saf yapısına ait özelliklerin gözlenmediğini kanıtlamaktadır. Sonuç olarak DSC ve FT-IR analizleri sonucunda elde edilen veriler simvastatinin lipit matris içerisinde tamamen çözüldüğünü desteklemektedir.

NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü sonuçlarının sağlamlasının yapılması ve nanopartiküllere ait morfolojik görüntülerin elde edilmesi amacıyla TEM görüntüleme çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.23.-4.34.). Elde edilen TEM görüntüleri NLT sistemlerine özgü olan küresel ve nano boyutları doğrulamaktadır (280, 284). Partiküllerin sınırları belirgin olup oldukça düzgün yapılardan oluştuğu görülmüştür. Formülasyona etkin madde ilavesi nanopartiküllerin şeklinde farklılığa yol açmamıştır. Ancak partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları ile benzer boyutlarda

partiküllerin görüntülenmesinin yanı sıra, genellikle ortalama partikül büyüklüğünden daha küçük partiküllere de rastlanmıştır. Bu farklılık literatürde TEM analizinin iki boyutlu görüntüler vermesi ve daha küçük boyutlarda partiküller yönünde eğiliminin olmasıyla açıklanmaktadır (57, 80, 81). Beloqui ve ark. (291) da örneklerin TEM analizi öncesi kurutulması nedeniyle nanopartiküllerde büzölmeler meydana gelerek orijinal formölasyon morfolojisine uymayan mikroskop görüntülerinin elde edildiğini öne sürmüşlerdir.

Maisine ve 50:50 sıvı:katı lipit oranı ile hazırlanan NLT formölasyonları ve bu formölasyonların ultrafiltrasyon uygulanarak iki ve beş kat konsantre hale getirilmiş dispersiyonlarının akış özellikleri ve 1500 sn^{-1} kayma hızındaki viskoziteleri değerlendirilmiştir (Şekil 4.35.). Formölasyonların akış özellikleri incelendiğinde Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-20 ve Fm-50-20-UF(+5KAT) formölasyonları için $\log(\text{Kayma Hızı}, 1/\text{sn})$ değerlerine karşılık $\log(\text{Kayma Gerilimi}, \text{mPa})$ grafiklerinden elde edilen n değerlerinin 1'e eşit çıkarak kayma hızının artması ile viskozitenin değişmediği newtonian akış özelliği gözlenirken diğer formölasyonların tümünde kayma hızı arttıkça viskozite değerlerinin azaldığı gözlemlenmiş ve 1'den küçük n değerleri ile pseudoplastik akış özelliği kanıtlanmıştır. Birçok koloidal sistem ve makromolekül solüsyonu, artan kayma hızıyla azalan viskozite yani pseudoplastik bir akış sergilemektedir (89, 292, 293). Newtonian olmayan bu akış davranışı, dispersiyon ortamında iletilen kayma geriliminin, Brown hareketlerinin randomize etkilerine karşı süspande haldeki partikülleri yönlendirme veya saptırma mekanizmaları ile açıklanmaktadır. Kayma hızıyla viskozitenin değişimi ise, partiküllerin yönlendirilmeleri veya saptırılmaları oluşan akışa karşı direncin düşmesinin bir sonucudur (293). Junyaprasert ve ark.'nın (89) yaptığı benzer bir çalışmada koenzim Q10 ile yüklenmiş setil palmitat ve MCT lipit karışımı ile hazırlanan NLT formölasyonunun pseudoplastik akış gösterdiği yapılan reolojik analizlerle gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında yapılan reolojik ölçümlerde de Fm-50-10, Fm-50-10-UF(2KAT), Fm-50-10-UF(5KAT) ve Fm-50-20-UF(2KAT) NLT formölasyonlarında literatürle uyumlu olarak pseudoplastik akış gözlenmekteyken Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT), Fm-50-20 ve

Fm-50-20-UF(+5KAT) formülasyonlarında newtonian akış gözlenmiştir. Ancak Lippacher ve ark. (91) da lipit nanaopartiküllerin akış özelliklerinin, düşük viskozitedeki Newtonian tipi süspansiyonlardan, % 40'a kadar lipit içeren yarı katı bir süspansiyonlara kadar değişebildiğini göstermiştir. Genel olarak ultrafiltrasyon işlemi ve etkin madde yüklenmesi formülasyonların newtonian akış özelliğinden pseudoplastik akışa yönelmesine neden olmuştur. Hazırlanan NLT formülasyonlarında lipit faz konsantrasyonu düşük olduğundan formülasyonların çoğunda dispersiyon ortamı olan suyun akış tipi yani Newtonian akış gözlenmiştir (91). Özellikle etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT) ve Fm-50-BOŞ-UF(5KAT) formülasyonlarının tümünde bu akış tipine rastlanmıştır. Ancak etkin madde ilavesi ve ultrafiltrasyon işlemleri ile formülasyonlardaki partikül derişiminin artması sonucunda Newtonian akıştan uzaklaşarak birçok kolloidal sistemde rastlanan pseudoplastik akış gözlenmiştir (89, 292, 293).

1500 sn⁻¹ kayma hızında gözlenen viskozite sonuçları değerlendirildiğinde etkin madde miktarının artmasının viskozitede artışa neden olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Bu sonucun formülasyonların partikül büyüklüklerindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Souto ve ark. (90) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü küçüldükçe viskozitesinin azaldığı ifade edilmiş olup yapılan bu çalışma elde edilen viskozite sonuçlarını desteklemektedir. Formülasyonların ultrafiltrasyon işlemi sonucu iki ve beş kat konsantre edilmesi viskozitelerinde artışa neden olmaktadır (p<0,05). Konsantre NLT formülasyonlarında sulu faz uzaklaştırılarak formülasyondaki lipit matriks miktarı artırılmaktadır, bu nedenle lipit miktarının artırılması viskozitede artışa yol açmaktadır. Benzer şekilde Lippacher ve ark.'nın (91) gerçekleştirdiği bir çalışmada, hazırlanan lipit nanopartikül formülasyonlarının lipit faz yüzdesinin reolojik özellikler üzerindeki etkisi incelenerek lipit konsantrasyonunun artmasıyla viskozitenin arttığı gösterilmiştir.

NLT formülasyonları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda Maisine kullanılarak 50:50 sıvı:kayı lipit oranlarında hazırlanan formülasyonların en uygun karakterizasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Naopartiküllere yüklenen simvastatin miktarının ve ultrafiltrasyon işleminin etkisi incelemek amacıyla

Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları üzerinde in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Salım çalışmaları öncesinde simvastatinin salım ortamındaki çözünürlüğü ve stabilitesi değerlendirilmiştir. Çözünürlük çalışmaları sonucunda simvastatinin pH 7,4 PBS tamponunda yeterli düzeyde çözünmesinin sağlanamadığı gözlenerek literatürde yer alan çalışmalardan hareketle çözünürlüğün artırılması amacıyla salım ortamına %0,5 (a/h) SDS eklenmiş ve çözünürlük çalışmaları yürütülmüştür (78). Yapılan çalışmalar sonucunda salım ortamı olarak seçilen %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponunda simvastatin yüksek bir çözünürlük göstermiş ve doygunluk konsantrasyonu 1,645 mg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen bu çözünürlük sonucu NLT ve doku iskelesi formülasyonları ile gerçekleştirilecek olan salım çalışmaları için gerekli olan sink koşulları sağlamaktadır.

In vitro salım ortamında stabilite çalışmaları incelendiğinde 37°C'deki %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponunda simvastatinin 48 saat sonunda %93,3'ünün korunduğu bu sürenin üzerinde ise %10'dan fazla etkin maddenin yapısal olarak bozulduğu gözlenmiştir. Bu bozunma literatürde simvastatinin bazik pH'lardaki sulu çözeltilerinde inaktif lakton yapısından, aktif hidroksi asit formuna hidrolize olması ile açıklanmıştır (239). Salım ortamındaki stabilite probleminin önüne geçmek amacıyla in vitro salım çalışmalarında salım ortamının en geç 48 saatte bir taze salım ortamı ile değiştirilmesine karar verilmiştir. Bu nedenle NLT ve doku iskelesi salım çalışmalarında örnek alma zamanları en fazla 48 saat boyunca ve 48 saat sonunda olacak şekilde belirlenmiştir.

NLT formülasyonlarından salım çalışmaları %0,5 (a/h) SDS içeren pH 7,4 PBS tamponunda 6 gün süreyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda tüm formülasyonların benzer bir salım profiline sahip olduğu gözlenmiştir. Formülasyonlar başlangıçta yüksek bir simvastatin salımı ile patlama salımı göstermişlerdir. Patlama salımının ardından etkin madde salımı yavaş bir hızda 24 saate kadar devam ederek platoya ulaşmıştır. 6 günün sonunda formülasyonlardan salınan kümülatif simvastatin yüzdeleri Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları için sırasıyla %63,45, %61,42 ve %61,89

olarak bulunmuş olup bu değerler arasında fark gözlenmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.36.). Bu sonuç yüklenen etkin madde miktarının ve konsantrasyon işleminin formülasyonların salınan kümülatif simvastatin yüzdeleri üzerinde önemli bir farklılığa yol açmadığını göstermektedir. Ancak salınan simvastatin miktarları karşılaştırıldığında ise Fm-50-10-UF(5KAT), Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları için sırasıyla 0,296, 0,251 ve 0,514 mg/mL simvastatin salımı elde edilerek formülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir derecede fark gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.37.). Fm-50-10-UF(5KAT) formülasyonuna göre yüklenen etkin madde miktarının iki katına çıkarıldığı Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonunda salınan simvastatin miktarının da yaklaşık olarak iki kat arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte 2 ve 5 kat konsantre edilmiş Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları arasında da konsantrasyon işlemi ile orantılı olarak salınan miktarda yaklaşık 2,5 kat artmıştır ($p<0,05$). NLT formülasyonlarının ultrafiltrasyonla konsantre edilmesi ile su fazı uzaklaştırılarak formülasyondaki nanopartikül ve dolayısıyla simvastatin konsantrasyonu artırılmaktadır. Bu nedenle farklı oranlarda konsantre edilen NLT formülasyonlarından konsantrasyon sayısı ile ilişkili olarak salınan etkin madde miktarında artması beklenmiştir. Nitekim elde edilen salım profillerinde istenilen bu etkinin tam olarak gözlenmesi, konsantrasyon işlemi ile doku iskelelerinin içerdiği simvastatin dozunun ayarlanabileceğini göstermiştir. Sonuç olarak hazırlanan NLT formülasyonlarındaki etkin madde miktarının artırılması salınan etkin madde miktarını da artırmaktadır. Benzer şekilde Hu ve ark. (294) da klobetosol ile yüklenmiş NLT formülasyonlarında gözlenen patlama salımı miktarının formülasyondaki etkin madde içeriğine bağlı olduğunu göstermişlerdir.

Formülasyonların salım profillerinin sıfırıncı derece ve Higuchi salım kinetiklerine uygunluğu incelenmiş ve elde edilen R^2 değerleri Higuchi kinetiğinde 1'e daha yakın olduğundan tüm formülasyonların Higuchi kinetik modeline uygun olduğu görülmüştür. Higuchi kinetiği, NLT formülasyonlarından salımın, çözünmeyen bir matriksten difüzyon kontrollü bir mekanizma ile zamanın kareköküyle orantılı olarak sağlandığını göstermektedir (295). Elde edilen bu sonuçlarla uyumlu olarak katı lipit nanopartiküllerden aseklofenak salım kinetiğinin

incelendiği bir çalışmada tasarlanan tüm formülasyonların Higuchi kinetiğine uygun salım profilleri gösterdikleri gözlenmiştir (296). Formülasyonların Higuchi kinetiğine göre elde edilen salım hızı sonuçları karşılaştırıldığında Fm-50-20 formülasyonunun iki ve beş kat konsantre edilmiş formülasyonları arasında fark bulunmazken ($p>0,05$), salınan simvastatin miktarının yaklaşık iki kat daha fazla olduğu Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonun salım hızı Fm-50-10-UF(5KAT) formülasyonuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuç olarak hapsedilen etkin madde miktarının artması, formülasyonların salım hızı ve miktarını da artırmaktadır. Bu artış, artan simvastatin miktarıyla, etkin maddenin termodinamik aktivitesinin artması ve Fick'in 1. difüzyon yasası gereği artan difüzyon hızı ile ilişkilidir (296, 297). NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve hapsedilme etkinliği etkin madde salımını esas olarak etkileyen parametrelerdir. Partikül büyüklüğünün azalması yüzey alanında artışa yol açtığından etkin maddenin salım hız ve miktarını artırmaktadır. Hapsedilme etkinliği yüksek olan formülasyonlarda ise salınan etkin madde miktarı yüksek olmaktadır (56). Farklı partikül büyüklüklerine sahip olan Fm-50-10-UF(5KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonlarının kümülatif salınan simvastatin yüzdeleri açısından fark gözlenmemesi ve salım hızları karşılaştırıldığında ise partikül büyüklüğü daha büyük olan Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonunun daha yüksek bir salım hızına sahip olması bu formülasyonlar arasındaki partikül büyüklüğü farkının salım özelliklerini etkileyecek seviyede olmadığını göstermektedir. Ancak %10 ve %20 hapsedilme etkinliği gösteren Fm-50-10-UF(5KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonlarından salınan simvastatin miktarı literatürle uyumlu olarak hapsedilme etkinliği ile ilişkilidir (56). Hapsedilen etkin madde miktarı arttıkça salınan miktar (mg/mL) ve salım hızı artmıştır ($p<0,05$). Benzer şekilde Teerachaindeekul ve ark. (297) da Q_{10} ile yüklenmiş NLT formülasyonlarının partikül büyüklükleri ile salım profilleri arasında anlamlı bir ilişkiye rastlamazken etkin maddenin salımının, yüklenen Q_{10} ve sıvı lipit miktarına bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Simvastatin yüklü NLT formülasyonları tasarlanması ile sulu dispersiyon halinde stabilite problemi bulunan simvastatinin stabilitesini artırmak ve partikül

büyüklüğü, zeta potansiyel, viskozite, pH ve fiziksel görünüş açısından uzun süre stabil bir koloidal taşıyıcı sistemin hazırlanması hedeflenmiştir. Bu nedenle 4°C ve 25°C’de saklanan etkin madde içermeyen Fm-50-BOŞ ve etkin madde içeren Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonları makroskobik özellikler, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, PDI, pH, viskozite ve formülasyondaki etkin madde stabilitesi yönünden 90 gün boyunca incelenmişlerdir.

Etkin madde içeren ve içermeyen NLT formülasyonların 90 gün sonunda 25°C ve 4°C’de makroskobik, pH ve viskozite özellikleri değerlendirildiğinde tüm formülasyonlarda hazırlandıkları güne kıyasla farklılık gözlenmemiştir. Formülasyonların yüksek yükleme kapasitesi ve zeta potansiyel değerleri sedimentasyon ve agregasyon gibi stabilite problemlerinin gözlenmesini engellemiştir. Bu nedenle fiziksel stabilite problemleri sonucunda görülebilecek viskozite ve pH değişimleri de gözlenmemiştir. Bu sonuç hazırlanan NLT formülasyonlarının makroskobik, pH ve viskozite açısından uzun dönem stabilitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Doktorovova ve ark. (270) Precirol ATO 5 kullanarak tasarladıkları NLT formülasyonu üzerinde stabilite çalışmaları gerçekleştirmiş ve formülasyonun 65 gün boyunca homojen disperse halini koruyarak herhangi bir fiziksel stabilite sorunu göstermediğini mikroskobik incelemelerle kanıtlamışlardır.

Partikül büyüklüğü ve dağılımı koloidal sistemlerin stabilitesinin değerlendirilmesi için en önemli parametrelerden biridir (281). Partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve PDI değerlerinde stabilite çalışmaları boyunca meydana gelen değişimler incelendiğinde tüm formülasyonlarda uzun dönem stabilite sağlanamamıştır. Fm-50-BOŞ, Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının partikül büyüklükleri, sırasıyla 4°C’de 104,33 nm-112,28 nm, 158,90 nm-176,23 nm, 182,08 nm-190,23 nm, arasında değişirken 25°C’de 110,37 nm-338,33 nm, 172,78 nm-219,33 nm, 184,17 nm-515,12 nm arasında değişmektedir. Fm-50-BOŞ formülasyonu partikül büyüklüğü açısından yalnız 25°C’de 3 gün stabil bulunmuştur ($p>0,05$), 7. günden sonra ise her iki saklama sıcaklığında partikül büyüklüğü artışlar göstermiştir ($p<0,05$). Fm-50-10 formülasyonunda ise partikül büyüklüğü hazırlandığı günden sonra stabilite çalışmaları süresince değişme göstermiştir

($p < 0,05$). 4°C 'de zamanla azalma gerçekleşirken ($p < 0,05$). 25°C 'de zamanla partikül büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Fm-50-20 formülasyonunda da partikül büyüklükleri yalnız 4°C 'de 15 gün stabil bulunmuş ($p > 0,05$), 90 güne kadar azalma ve artışlar gözlenmiştir. 25°C 'de ise stabilite çalışmaları süresince partikül büyüklüğü artmıştır ($p < 0,05$). Partikül büyüklüğünün azalması lipit matriksin kristalinitesindeki değişikliklerden ve polimorfik faz geçişlerinden kaynaklanırken büyüklüğün artması kristal büyümesi ve partikül agregasyonunun bir sonucudur (270, 282). Elde edilen PDI değerleri incelendiğinde 4°C 'de saklanan formülasyonların hepsinde 90 gün boyunca 0,3'ten daha düşük PDI değerleri gözlenirken, 25°C saklama sıcaklığında bu sınır yalnızca Fm-50-10 formülasyonunda 90 gün boyunca sağlanmıştır. Partikül büyüklüğü ve dağılımında gözlenen bu stabilite problemi diğer stabilite çalışmalarında da gözlemlendiğinden literatürle uyum göstermektedir (282, 298, 299). Souto ve ark. (299) α -lipoik asit ile yüklenmiş katı lipit nanopartiküllerin 20°C ve 4°C 'deki stabilitesini üç ay boyunca partikül büyüklüğü ve PDI açısından incelemiştir. Elde edilen sonuçlarda tüm koşullar altında partikül büyüklüğünün ilk günden itibaren önemli derecede arttığı gözlenmiş olup PDI değerleri ise üç ay boyunca artış ve azalmalar göstermiştir. Ancak hazırlanan katı lipit nanopartiküller topikal uygulama için uygun kıvamın elde edilmesi amacıyla krem veya jel gibi yarı katı formlara dönüştürüleceğinden oluşan viskoz jel ağı veya krem sistemi ile stabilitenin sağlanacağı öngörülmüştür. Bu nedenle stabil olmayan düşük viskoziteli, sulu dispersiyonlar halindeki lipit nanopartikül formülasyonlarının iyi bir hapsedilme etkinliği ve yükleme kapasitesi özelliğinin topikal uygulama için yeterli olacağı belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında hazırlanan NLT formülasyonları da diyabetik yaraların topikal tedavisi amacıyla doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanması için tasarlandıklarından, partikül büyüklüğü ve dağılımı stabilitesi sadece doku iskelelerinin hazırlanma sürecinde stabilitenin garantilenmesi için gereklidir.

Formülasyonların 25°C ve 4°C saklama süresince elde edilen zeta potansiyel değerleri karşılaştırıldığında, formülasyonların tümünde hazırlandıkları günden itibaren zeta potansiyel değerlerinin saklama süresi ve sıcaklığından bağımsız olarak azalma ve artmalar gösterdiği gözlenmiştir ($p < 0,05$). Lipit nanopartikül

formülasyonlarında gözlenen agregasyon ve jelasyon gibi stabilite problemleri genel olarak zeta potansiyelin mutlak değerinde azalma ile belirtilmektedir (271). 90 gün boyunca gözlenen sonuçlarda zeta potansiyelin mutlak değerinde belirgin bir düşüş oluşmayarak tüm formülasyonlar için küçük artış ve azalmaların birlikte görülmesi formülasyonların fiziksel stabilitesinin belirli bir seviyede korunduğunu göstermiştir. Sonuç olarak istatistiksel açıdan bazı farklılıklar görülmesine rağmen, 4°C’de saklanan tüm formülasyonlar 90 gün boyunca nanoboyutlarını koruyarak 200 nm’nin altında partikül büyüklüğü, elektrostatik stabilite oluşturabilecek düzeyde -11,68 mV -30,65 mV arasında değişen zeta potansiyel ve 0,3’ün altında PDI değerleri ile dar, monodispers büyüklük dağılımlarını korumuşlardır. Bu nedenle NLT formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve zeta potansiyellerinin korunması açısından en uygun saklama sıcaklığı 4°C bulunmuştur.

Simvastatin sulu ortamda özellikle bazik pH’larda yüksek düzeyde birinci derece kinetiğe uygun olarak parçalanmaya uğrayan bir etkin madde olup, stabilite problemleri göstermektedir. Sulu ortamlardaki stabilitesinin incelendiği bir çalışmada simvastatinin pH ve sıcaklık bağımlı olarak sulu ortamda hidrolize uğradığı gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada asidik pH değerleri olan pH 5’te bazik pH olan pH 8’e göre simvastatinin 160 kat daha fazla stabil olduğu ve sıcaklığın 25°C’den 60°C ve 80°C’ye çıkarılması ile bozunmanın 4,4 ve 7,9 kat arttığı gösterilmiştir (239). Simvastatinin stabilite sorununun üstesinden gelmek amacıyla bu tez çalışması kapsamında NLT formülasyonları hazırlanarak etkin madde stabilitesi 4°C ve 25°C’de 90 gün boyunca incelenmiştir. Fm-50-10 ve Fm-50-20 formülasyonlarının her ikisinde 4°C’deki saklama koşulunda 15 gün, 25°C’deki saklama koşulunda ise 3 gün süresince simvastatin miktarının %90’ından fazlası koruduğu gözlenmiştir. Sulu dispersiyonları halinde saatler içerisinde %10’dan fazla parçalanmaya uğrayan simvastatinin NLT formülasyonlarında etkin maddenin 15 güne kadar stabilitesinin korunması, simvastatinin lipit matriks içerisinde sızıntı oluşmadan tamamen hapsedilerek stabilitesinin artırıldığını göstermektedir. Benzer sonuçların elde edildiği Safwat ve ark. (282) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonlarının stabilitesi 2-8°C’deki bir soğutucu içerisinde 30 gün boyunca incelenmiştir. 30 günün sonunda

formülasyonların partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinin önemli derecede arttığı görülmüştür. Buna ek olarak simvastatinin yükleme kapasitesinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Ancak yükleme kapasitesindeki bu düşüş partiküllerden etkin maddenin sızması ile açıklanarak simvastatinin sulu ortamlarda bozunduğu araştırmacılar tarafından fark edilememiştir. Gözlenen bu stabilite problemlerini çözmek amacıyla NLT formülasyonları dondurarak kurutulmuş ve stabilite çalışmaları kurutulmuş formülasyonlarla tekrarlanarak stabilitenin sağlandığı gösterilmiştir.

Tüm stabilite sonuçları değerlendirildiğinde hazırlanan NLT formülasyonları için en uygun etkin madde ve partikül büyüklüğü stabilite sonuçları 4°C’de elde edildiğinden saklama sıcaklığı olarak 4°C seçilmiştir. Literatürde yer alan stabilite çalışmalarında da NLT formülasyonları için en uygun saklama sıcaklığı 4°C olarak seçilmektedir (282, 298).

NLT formülasyonlarında içerdikleri yüksek su oranı nedeniyle başlangıçtaki nanopartikül özellikleri ve kimyasal stabilitesinin korunması ile ilgili problemler gözlenebilmektedir (291). Dayanıklı olmayan NLT dispersiyonlarının uzun süre saklanabilmesi için literatürde yer alan çalışmalarda dondurarak veya püskürterek kurutma yöntemleri ile formülasyondaki suyun uzaklaştırılarak stabilitenin artırılabilceği gösterilmiştir (240, 241, 282). Bu çalışmada da hazırlanan NLT’ler bekletilmeden doku iskeleleri formülasyonları yapısına eklenerek dondurarak kurutulmuş ve elde edilen doku iskeleleri 4°C’de saklanmıştır. Böylece NLT formülasyonundaki su uzaklaştırılarak simvastatinin sulu ortamdaki stabilite sorunu ortadan kaldırılmıştır. Hazırlanan NLT formülasyonları bekletilmeden doku iskelesi formülasyonlarına hapsedileceğinden NLT formülasyonlarının stabilite analizi sonuçları çalışmanın amacı açısından uygundur.

Doku iskelesi formülasyonları üzerinde gerçekleştirilecek çalışmalara geçilmeden önce ön formülasyon çalışmaları yapılarak doku iskelesi formülasyonunda kullanılacak olan NLT formülasyonları, üretim yöntemi, polimer türleri ve oranları, nanopartikül konsantrasyonu ve yardımcı maddelerin seçimi için gereken değerlendirmeler yapılmıştır.

Doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılacak NLT formülasyonunun belirlenmesi amacıyla, yüksek hapsedilme etkinliği ve yüksek salım hızı gibi uygun karakterizasyonlara sahip olan Fm-50-20, Fm-50-20-UF(2KAT) ve Fm-50-20-UF(5KAT) formülasyonları ve bu formülasyonların etkin madde içermeyen karşılıkları olan Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-BOŞ-UF(5KAT) formülasyonları ile çalışılmasına karar verilmiştir. 5 kat konsantre edilmiş NLT formülasyonlarının yoğun lipid nanopartikül konsantrasyonu doku iskelesinin mekanik dayanıklılığında azalmaya yol açtığından bu formülasyonlarla hazırlanan doku iskelelerinde stabil bir iskele yapısı elde edilememiştir. Ancak 2 kat konsantre edilen ve konsantre edilmemiş NLT formülasyonları ile istenilen mekanik dayanıklılıkta ve amaçlanan dozda simvastatin içeren doku iskeleleri hazırlandığı için Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-20 ve Fm-50-20-UF(2KAT) formülasyonlarının kullanılması tercih edilmiştir. Konsantre edilmemiş etkin madde içeren NLT formülasyonu ile hazırlanan doku iskelelerinde simvastatin dozu 2 mg iken 2 kat konsantre edilmiş NLT formülasyonu ile hazırlanan formülasyonlarda 4 mg'dır. Bu dozlar literatürde yer alan doku iyileşmesi amacıyla topikal uygulanan simvastatin çalışmaları ile uyum sağlamaktadır (21, 123, 219-223). Yasasvini ve ark. (21) da yara iyileşmesi amacıyla geliştirdikleri simvastatin yüklü kitosan mikropartiküllerini içeren topikal hidrojellerin sıçanlar üzerindeki etkinlik çalışmalarında en uygun simvastatin dozunun 2.5 mg olduğunu bildirmişlerdir.

Gentile ve ark. (123) hazırladıkları kitosan:jelatin doku iskelesi formülasyonuna yüklenen PLGA mikropartikül konsantrasyonunun doku iskelesi karakterizasyonları üzerindeki etkisini inceleyerek bu parametrenin doku iskelesi formülasyonlarının su absorplama, parçalanma, por büyüklüğü ve mekanik özelliklerini etkilediğini göstermiştir. Bu çalışmadan yola çıkılarak bu tez çalışması kapsamında yüklenen nanopartikül konsantrasyonunun doku iskelesi karakterizasyonları üzerindeki etkisinin incelenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla düzgün doku iskelesi yapısının elde edildiği ultrafiltrasyonla iki kat konsantre edilmiş veya konsantre edilmemiş Fm-50-BOŞ, Fm-50-BOŞ-UF(2KAT), Fm-50-20 ve Fm-50-20-UF(2KAT) NLT formülasyonlarının hepsi kullanılarak iki

farklı nanopartikül konsantrasyonu içeren doku iskelesi formülasyonlarının hazırlanmasına karar verilmiştir.

Doku iskelelerinin hücrelerin adhezyonu, büyümesi ve farklılaşmasını destekleyebilecek biyomateryal özelliklerine sahip olması için biyouyumlu, biyobozunur ve hücrelerle yüksek etkileşim gösterecek malzemelerden oluşması gerekmektedir (127). Bu nedenle doku iskelelerinin üretiminde doğal kaynaklı polimerlerden kollajen, kitosan ve jelatinin kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılan ön formülasyon denemeleri sonucunda ise uygun fonksiyonel ve yapısal özellikler %2 (a/h) polimer konsantrasyonunda, 1:1 ve 2:1 (h/h) oranlarında kitosan (Protasan UP CL 213) ve kollajen (Dana Derisi Kollajeni, Tip III) polimer karışımları ile sağlanmıştır. Literatürde de bu polimerler kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonları üzerinde yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (125, 161, 214, 300, 301).

Doku iskelesi formülasyonlarının yapısına girecek olan polimerlerin seçiminin ardından kitosan ile iyonik bağlar kurarak çapraz bağlama işlemini gerçekleştiren sodyum tripolifosfat çapraz bağlayıcı ajanı kullanılarak doku iskelelerinin yapısal stabilitesinin artırılması amaçlanmıştır (127, 209, 212-214).

Formülasyon parametrelerinin belirlenmesinin ardından hazırlama yöntemi olarak dondurarak kurutma yöntemi seçilmiştir. Bu yöntem yara tedavisinde doku kaybının yerine geçecek üç boyutlu, birbirine bağlı poröz yapıya sahip doku iskelelerinin üretilmesine imkan vermekte ve diğer yöntemlere göre daha fazla üretim kolaylığı sunmaktadır (123-125). Optimum mekanik ve yapısal özellik gösteren doku iskeleleri üzerinde yapılan literatür taramaları ve deneysel çalışmalar sonucunda üretim koşulları -20°C 'de 24 saat dondurma ve ardından 24 saat liyofilizasyon olarak belirlenmiştir (209, 211).

Sonuç olarak, kitosan:kollajen polimer kombinasyonunun 1:1 ve 2:1 (h/h) polimer oranları, ultrafiltre edilmiş ve ultrafiltre edilmemiş NLT formülasyonlarının kullanılması, etkin madde yüklenmesi ve çapraz bağlama işleminin uygulanması formülasyon parametreleri olarak belirlenmiştir. Elde edilen doku iskelelerinin

morfolojisi, porozite ve por büyüklüğü dağılımı, su absorplama özellikleri, in vitro parçalanma, mekanik özellikleri, in vitro salım özellikleri ve sitotoksitesi incelenmiştir.

Doku iskeleleri, sadece hücreler ve önemli bileşenler için bir taşıyıcı oluşturmak için değil aynı zamanda hücrelerin etkin bir şekilde yönlendirilmesi ve doku oluşumuna adım adım yol gösterilmesi amacıyla formüle edilmektedirler. Bu hedefe ulaşmak için doku iskelelerinin yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin dikkate alınması gerekmektedir (153). Bu doğrultuda başarılı bir doku iskelesi üretimi için yüzey özellikleri, porozite ve por büyüklüğü, biyouyumluluk, bozunma ve mekanik güç gibi çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

Doku iskeleleri; hazırlama kolaylığı sunması ve Wistar albino sıçanların sırt bölgelerinde oluşturulacak yaralar için uygun çapta hazırlanabilmesi nedeniyle 24 kuyucuklu plaklarda hazırlanmıştır. Doku iskelesi formülasyonlarının in vivo çalışmalarda sıçanların sırt bölgelerinde oluşturulacak tam kalınlıkta yaralar üzerine uygulanması amaçlandığından iskelelerin kalınlıklarının sıçanların tam kalınlıktaki deri kalınlığı olan 2 mm kadar olması hedeflenmiş olup bu kalınlığın sağlanması için her bir kuyucuğa 0,5 mL kitosan-kollajen jel formülasyonu eklenmiştir. Doku iskelelerinin hazırlanma esnasında kalıptan düzgün ve hasarsız bir şekilde çıkarıldığına kanıtlanması amacıyla çap kalınlık tayini yapılmış ve hedeflendiği gibi tüm doku iskelesi formülasyonları için çap değeri yaklaşık olarak 1,52 cm iken kalınlık değeri ise 0,26 cm olarak bulunmuştur ($p>0,05$).

Doku iskelelerinin por büyüklüğü ve dağılımı, por şekli ve poroziteleri hücrelerin girişini, proliferasyon ve fonksiyon göstermesini, doku iskelesinin ise mekanik dayanıklılığını ve in vivo parçalanmasını belirleyen önemli parametrelerdir. Bununla beraber, etkin madde taşıyan doku iskelelerinde bu özellikler ilacın salım hızı ve kinetiğini de doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında doku iskelelerinin yüzey ve poröz yapı özellikleri SEM görüntülemelerinin yanı sıra porozite ve por büyüklüğü dağılımı tayini ile de değerlendirilmiştir.

SEM analizi öncesinde doku iskeleleri dijital fotoğraf makinası ile görüntülenerek formülasyonların dış görüntüleri arasındaki farklılıklar değerlendirilmiş ve tüm formülasyonlar beklenildiği gibi düzgün ince bir silindirik yapı göstermiştir (Şekil 4.38.). Yüzey özelliklerinin detaylı bir şekilde görüntülediği SEM görüntüleri incelendiğinde ise tüm doku iskelesi formülasyonlarının yüksek oranda porlu ve porlar arası bağlantıları bulunan bir yapıya sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.39.-4.42.). Hazırlanan doku iskelelerinin morfolojik görüntüleri literatürde yer alan dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış doku iskelelerinin SEM görüntüleri ile benzerlik göstermektedir (125, 161, 302). Yang ve ark. (216) da kitosan polimeri ile dondurarak kurutma yöntemi kullanarak hazırladıkları doku iskelelerinin SEM görüntülerini incelemiş ve formülasyonların yaprak benzeri yüksek porlu yapıları bu çalışmada da görüntülenmiştir.

Literatürde de belirtildiği gibi hücre yerleşimi için uygun ortamın oluşması ve doku onarımının sağlanabilmesi gerekli olan moleküllerin aktarımının kolaylaşması için ideal bir doku iskelesi birbiri ile bağlantılı açık bir por ağına ve yüksek poroziteye sahip olmalıdır (131, 303). Hazırlanan doku iskeleleri ile yara iyileşmesini destekleyecek bu özelliklerdeki üç boyutlu poröz yapı gözlemlendiğinden hedeflenen morfolojik yapıya ulaşılmıştır.

Doku iskelesi formülasyonlarının yüzey ve por görüntüleri sadece çapraz bağımsız ve bağlı formülasyonlar arasında farklılık göstermiştir (Şekil 4.39.-4.42.). Çapraz bağımsız tüm doku iskeleleri yaprak benzeri yapılarla daha uniform bir por dağılımına sahipken çapraz bağlı formülasyonlarda beklenildiği gibi por bağlantıları artmış ve yüzeydeki poröz görünüm azalarak daha yoğun bir görünüm elde edilmiştir. Bu durum çapraz bağlayıcı ajanın kitosan molekülleri ile iyonik bağlar kurarak porlar arasında bağlantılar oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Porların birbirleri ile bağlantılı olması özellikle yeni doku oluşumunda hücrelerin tutunması, çoğalması ve göçü için uygun bir alanın sağlaması açısından çok önemlidir (124). Çapraz bağlı ve bağımsız formülasyonlar arasında gözlenen bu yüzey farklılıkları Yao ve ark. tarafından (301) hazırlanan kitosan doku iskelesi formülasyonlarında da elde edilmiş olup çapraz bağlı formüllerde porlar arası bağlantıları arttığı ve daha yoğun bir yüzey görünümünün oluştuğu gözlenmiştir.

Doku iskelelerinin SEM analizi sırasında por duvarlarına yerleşmiş olan lipit nanopartiküllere ait görüntülere de rastlanmıştır (Şekil 4.43.). NLT formülasyonları doku iskelesinin por duvarlarına poröz yapıya zarar vermeden homojen bir şekilde dağılmış olup partiküller TEM görüntülerinde gözlemlendiği gibi sınırları belirgin küresel şekillerini korumaktadır. Partiküllerin büyüklükleri ise genel olarak ışık saçma tekniği ile elde edilen sonuçlarla uyum gösterirken mikron boyutlarına ulaşmış partiküllere de rastlanmıştır. Partikül büyüklüğündeki bu artışın doku iskelelerinin hazırlanması sırasında uygulanan işlemler nedeniyle agregasyonun oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer şekilde Nandagiri ve ark. (210) tarafından hazırlanan PLGA nanopartiküllerini içeren kitosan-jelatin doku iskelelerinde de agregasyona uğramış partikül görüntülerine rastlanmıştır.

Doku iskelelerinin porlu yüzey yapılarının SEM görüntüleri ile incelenmesinin ardından civalı porozimetre cihazı kullanılarak porozite ve por büyüklüğü dağılım değerleri elde edilmiştir. SEM analizleri sonucunda elde edilen sonuçlara benzer şekilde doku iskelelerinin çapraz bağlanması por büyüklüğü dağılımı sonuçlarını etkilemiş olup diğer formülasyon parametrelerinden polimer oranı ve ultrafiltrasyon uygulanması açısından farklılık bulunmamıştır ($p > 0,05$). Genel olarak çapraz bağırsız formülasyonlar 20 μm -130 μm aralığında dar bir dağılım, çapraz bağlı formüller ise 20 μm -200 μm gibi küçük ve büyük por boyutlarının bir arada görüldüğü geniş dağılımlar göstermiştir. Elde edilen por büyüklükleri SEM görüntülerinde gözlenen por büyüklükleri ile de doğrulanmaktadır. Sonuç olarak çapraz bağlama işlemi doku iskelelerinin por büyüklüklerini artırarak geniş bir por dağılımının oluşmasına neden olmaktadır. Bu durum, doku iskelelerinin çapraz bağlama amacıyla çapraz bağlayıcı ajanın çözeltisi içerisinde iki saat bekletilerek şişmeye bırakılmasından kaynaklanmaktadır. Bu süre içerisinde çapraz bağlayıcı ajan çözeltisini absorplayarak şişen matriks yapısındaki porlar da genişleyerek veya birleşerek büyümektedir (300). Ma ve ark. (161) kitosan:kollajen polimerlerini kullanarak dondurarak kurutma yöntemi ile hazırladıkları doku iskelelerini glutaraldehit çapraz bağlayıcı ajanı ile çapraz bağlamış ve por büyüklüklerindeki değişimi incelemişlerdir. Benzer şekilde çapraz bağlama por büyüklüğünü artırmış

ve doku iskelelerinin çapraz bağlama öncesi 100 µm olan ortalama por büyüklüğü çapraz bağlanma sonrası 200 µm'ye çıkmıştır.

Doku mühendisliğinde doku iskelelerinin porozite ve por büyüklüğü dağılımları hücrelerin penetrasyonu, çoğalması ve fonksiyon göstermesini etkileyen önemli bir parametredir. Hücrelerin doku iskelesi yüzeylerine penetre olarak canlılığını sürdürmesi doku iskelesi formülasyonunun por büyüklüğüne bağlıdır. Tercih edilen por büyüklüğü hücrenin boyutu ile ilişkili olarak hücre tipine ve doku iskelesi formülasyonunun bileşimine bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada yara iyileşmesinin desteklenmesi ve mezenkimal kök hücre taşınması amacıyla hazırlanan doku iskelesi formülasyonları için önemli olan hücreler düşünüldüğünde fibroblastlar için >90 µm, vasküler düz kas hücreleri için 63 µm-150 µm, mezenkimal kök hücreler için ise >30,4 µm por büyüklükleri hücrelerin doku iskelelerine adhezyonu için gerekmektedir (242, 243). Genel olarak deri üzerinde yapılan tüm doku mühendisliği çalışmalarında optimum por büyüklüğü dağılımının 15 µm ile 160 µm arasında olması istenilmektedir (242, 243, 304-306). Sonuç olarak hazırlanan çapraz bağlı formülasyonlar geniş bir por büyüklüğü dağılımı göstererek yara iyileşmesinde rol oynayan hücreler ve kök hücreler gibi pek çok hücre tipinin penetrasyonu ve proliferasyonu için gerekli olan por büyüklüklerine sahiptir. Bununla birlikte geniş por büyüklüğü dağılımı bu formülasyonları doku mühendisliği çalışmaları için çok yönlü kılmaktadır (244).

Doku iskelesi porlarına penetre olan hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmeleri için doku iskelelerinin hücrelerin besin maddelerinin girişine ve hücre artıklarının eliminasyonunu sağlayabilecek kadar yüksek permeabilite özelliğine sahip olması gerekmektedir. Permeabilite doğrudan doku iskelelerinin poroziteleri ile ilişkili olup porozitenin artması ile permeabilite artmaktadır. Bu nedenle ideal bir doku iskelesi formülasyonunun yüksek poroziteye sahip olması beklenmektedir (245).

Hazırlanan doku iskelelerinin porozite ve por büyüklüğü dağılım analizi sonucunda elde edilen porozite değerleri %64,81 ile %92,57 arasında değişmektedir (Tablo 4.20.). Formülasyonlar arasındaki polimer oranı, ultrafiltrasyon ve çapraz bağlanma farklılıkları % porozite sonuçlarında ilişkili bir farklılığa yol açmamıştır.

Bu sonuçlar doku mühendisliği çalışmaları için istenildiği gibi yüksek porozite değerleri olup doku iskelesi formülasyonları yara iyileşmesi ve kök hücre taşınması için uygun poroziteye sahiptir. Benzer sonuçlar Tan ve ark. (167) tarafından hazırlanan keratin/kitosan doku iskelesi formülasyonları ile de elde edilmiş olup, farklı polimer oranları kullanılarak hazırladıkları doku iskelesi formülasyonlarında %70'in üzerinde yüksek porozite sonuçları elde edilmiştir.

Su absorpsiyonu, doku iskelesi formülasyonlarının permeabilitesini etkileyen önemli bir parametredir. Doku iskelelerinin su absorplama özellikleri iskelelerin üç boyutlu yapısı ve hidrofiliğinin bir göstergesidir (123). Su absorplama kapasitesi dolayısıyla permeabilitesi yüksek olan bir doku iskelesi formülasyonu yaralı bölgenin daha hızlı bir şekilde rejenerasyonuna aracılık eder. Doku mühendisliği çalışmalarında yeterli deri rejenerasyonunun sağlanabilmesi için doku iskelesi formülasyonlarının başlangıç ağırlıklarının en az 80 katı kadar sıvıyı absorplaması gerekmektedir (161). Hazırlanan doku iskelesi formülasyonları ağırlıklarının yaklaşık olarak %671,31-%1093,61 katı arasında sıvı ile yüklenerek yüksek su absorplama özelliği göstermişlerdir (Şekil 4.46.). Hasar görmüş dokuların daha hızlı iyileşmesini sağlamak için doku iskelelerinde yüksek şişme derecesi istenen bir özelliktir. Elde edilen bu yüksek absorpsiyon davranışı büyük olasılıkla doku iskelelerinin yüksek porozite özelliklerinin bir sonucudur. Bu bulgularla uyumlu olarak Gentile ve ark. (123) da kemik rejenerasyonu amacıyla dondurarak kurutma yöntemi ile hazırladıkları kitosan-jelatin doku iskelelerinde % 1245±56 değerlerinde yüksek bir su absorpsiyonu gözlemlemişlerdir. Su absorpsiyonunu etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır bunlar; porozite, kullanılan biyomateryalin fizikokimyasal özellikleri, absorpsiyon ortamı, yüzey ıslanabilirliği /hidrofilik özelliği ve çapraz bağlama işlemidir (167). Hazırlanan formülasyonların tümü yüksek porozite sahip olup aynı absorpsiyon ortamı ve biyomateryaller kullanıldığından su absorplama derecesi esas olarak hidrofilik özellik ve çapraz bağlama işleminden etkilenmiştir. Çapraz bağırsız tüm doku iskelesi formülasyonlar çapraz bağlandıklarında su absorplama kapasitelerinin literatürle uyumlu olarak azaldığı gözlenmiştir (21, 124). Ancak bu azalma sadece 2:1 kitosan:kollajen polimer oranı ile hazırlanan doku iskelelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Genel olarak çapraz

bağlama derecesinin yüksek olması doku iskelelerinin su absorpsiyonunda azalmaya neden olmaktadır. Bu bulgu literatürde çapraz bağlama işlemi ile doku iskelesinin yapısında güçlü moleküler etkileşimlerin oluşması ile ilişkilendirilmiştir (124). Ultrafiltrasyon uygulanmamış NLT formülasyonları ile hazırlanan UF(-)Ç(+)₂:1-B ve UF(-)Ç(+)₂:1-SV formülasyonları ultrafiltre edilmiş formülasyonlarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek su absorplamışlardır ($p < 0,05$). Ultrafiltrasyon sonucu nanopartikül konsantrasyonunun artması, lipid nanopartiküllerin hidrofobikliği ve doku iskelelerinin toplam ağırlığının artması nedeniyle su absorpsiyon derecesini yüksek oranda azaltmıştır (123).

Doku rejenerasyonu amacıyla uygulanan doku iskelelerinin biyouyumlu, biyoparçalanabilir ve parçalanma ürünlerinin non-toksik ve resorbe edilebilir olması gerekmektedir (129). Doku iskelesi formülasyonlarının in vitro parçalanma davranışları 37 °C'deki pH 7,4 PBS çözeltisinde 28 gün süresince izlenmiştir. Elde edilen % kütle kaybı sonuçları karşılaştırıldığında 7, 14 ve 28. günlerin sonunda formülasyonların çapraz bağlanma durumuna göre farklı parçalanma özelliklerine sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.47.). 28 gün sonunda bu fark daha da artarak ultrafiltrasyon uygulanmış NLT formülasyonları ile hazırlanan çapraz bağlı ve bağırsız formülasyonlar için sırasıyla %53,49-%57,83 ve % 71,17-%79,17 kütle kaybı sonuçları elde edilmiştir. Çapraz bağlı formülasyonların yavaş parçalanma profiline sahip olmaları, çapraz bağlama işlemi ile hedeflenen yapısal stabilite artışının sağlandığını göstermektedir. İn vivo koşullarda kitosan hidrolize uğrayarak hızla parçalanmaktadır (307). Bu nedenle kitosan ile hazırlanan doku iskelesi çalışmalarında çeşitli çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak parçalanma seviyesi azaltılmaktadır (127, 209, 212-214). Glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan/kollajen doku iskelelerinin dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlandığı bir çalışmada da, elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak doku iskelelerinin parçalanma oranının azaldığı gösterilmiştir (161). Gentile ve ark. (123) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise kemik rejenerasyonu amacıyla simvastatin ile yüklenmiş PLGA nanopartiküllerini içeren kitosan-jelatin doku iskelesi formülasyonları hazırlanarak 37°C'deki pH 7,4 PBS çözeltisinde 10 gün boyunca parçalanma analizi gerçekleştirilmiştir. On gün sonunda doku iskelelerinin

parçalanma dereceleri %48-%61 arasında bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar çapraz bağlı formülasyonların parçalanma düzeylerinin literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir.

28 günün sonunda elde edilen kütle kaybı sonuçları ultrafiltrasyon uygulanmamış UF(-)Ç(+):2:1-B ve UF(-)Ç(+):2:1-SV formülasyonları için ise sırasıyla %67,54 ve %66,44 olarak gözlenmiştir. Bu formülasyonlar ultrafiltrasyon uygulanarak hazırlanan doku iskelesi karşılıklarına göre önemli derecede daha yüksek parçalanma göstermişlerdir ($p < 0,05$). Kütle kaybındaki bu farklılık, ultrafiltrasyon sonucu doku iskelesindeki lipit nanopartikül konsantrasyonunun artmasıyla kitosan ve kollajen polimerlerine göre daha hidrofobik yapıdaki lipit nanopartiküllerin doku iskelesinin hidrolize karşı duyarlılığını azaltmasından kaynaklanmaktadır. Benzer sonuçlar PLGA mikrokürelerini içeren jelatin/kitosan/hyaluronan doku iskelesi formülasyonuna ait parçalanma sonuçlarında da gözlenmiştir (246).

Yanık ve deri yaralanmalarında akut yara iyileşme süresi yaklaşık olarak 25 gündür, bu nedenle yara tedavisi amacıyla geliştirilen doku iskeleleri minimum 25 gün süren sabit bir parçalanma süresine sahip olmalıdır. Doku iskelelerinin hızlı bir şekilde bir kaç günde parçalanması üç boyutlu poröz yapının bozularak sıvı bir hal almasına yol açmakta bu nedenle iskelelerin yara kapanması üzerindeki olumlu etkisini ortadan kaldırmaktadır. Diğer taraftan, 3-4 hafta içinde sadece minimal düzeylerde parçalanan iskeleler ise yara iyileşme sürecini engellemektedir (308). Bu nedenle 28 gün süresince yavaş bir hızda yaklaşık olarak %53,49-%57,83 oranlarında parçalanan çapraz bağlı kitosan:kollajen doku iskeleleri yara tedavisi için ideal parçalanma özelliğine sahiptir.

Doku iskeleleri yaralı bölgeye uygulanmaları sırasında hasarlı dokunun özelliğine bağlı olarak belirli bir gerilime maruz kalmaktadır. Bu gerilim karşısında iskelelerin yapısal olarak yeterli derecede dayanıklı olması ve doku iskelelerine yerleşen hücrelerin canlılığı ve fonksiyonlarını gösterebilmeleri açısından belirli bir mekanik dayanıklılık göstermeleri gerekmektedir (167, 309). Bununla birlikte lenfatik sistem, sinir bağlantıları ve vaskülarizasyon gibi deri dokusunun

rejenerasyonunun gerçekleşmesi için fiziksel bir desteğe ihtiyaç duyulduğundan yara tedavisi amacıyla hazırlanan doku iskelelerinin uygun bir mekanik güce sahip olması oldukça önemlidir (167).

Hazırlanan doku iskelelerinin mekanik davranışlarını belirlemek amacıyla basınç testi uygulanarak elastik modül değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.48.). Doku iskelelerinin mekanik dayanıklılıkları sadece çapraz bağlanma ve ultrafiltrasyon uygulama durumlarına göre farklılık göstermiştir. Çapraz bağırsız formülasyonların elastik modül değerleri 0,045-0,058 (N/cm²) arasında değişirken çapraz bağlı formülasyonlarda ise bu değer yaklaşık olarak iki kat artış göstererek 0,143-0,170 (N/cm²) arasında değişmiştir. Sonuç olarak çapraz bağlama işlemi formülasyonların mekanik dayanıklılığını etkilemiş; çapraz bağırsız formülasyonlar daha yumuşak ve kırılğan bir yapı gösterirken çapraz bağlı formülasyonlar daha kararlı ve dayanıklı bir mekanik özellik sergilemiştir. Bu nedenle diyabetik yaralar gibi derin doku kayıplarının gözleendiği yaralarda yüksek mekanik dayanıklılığa sahip olan çapraz bağlı doku iskelelerinin daha uygun mekanik özelliklere sahip olduğu düşünülmüştür. Yao ve ark. (301) hazırladıkları kitosan doku iskelesi formülasyonlarının mekanik özelliklerini incelemiş ve genipin çapraz bağlayıcı ajanın formülasyona eklenmesi ile elastik modül sonuçları 2,256 kat artmıştır. Yapılan bu çalışmayla çapraz bağlamanın doku iskelelerinin mekanik dayanıklılığını önemli derecede artırdığı kanıtlanmıştır. Ultrafiltrasyon uygulanarak doku iskelesindeki nanopartikül konsantrasyonunun artırıldığı formülasyonlardan UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-B ve UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-SV formülasyonlarının mekanik dayanıklılıkları, ultrafiltrasyon uygulanmamış karşılıklarına göre daha yüksek bulunmuştur (p<0,05). Bu bulguların nanopartiküllerin doku iskelesi yapısında kuvvetlendirici bir destek materyali etkisi yaratması nedeniyle gözleendiği düşünülmektedir (123).

Farklı kitosan:kollajen polimer oranları 1:1 ve 2:1 (h/h), ultrafiltre ve ultrafiltre edilmemiş NLT formülasyonları ve çapraz bağlama işlemi doğrultusunda hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarının in vitro salım profilleri Şekil 4.49. ve 4.50.'de gösterilmektedir. Doku iskelelerinden 28 gün sonunda salınan kümülatif simvastatin yüzdeleri %66,29-%69,34 arasında değişerek fark göstermemiştir (p>0,05). Kümülatif salınan simvastatin yüzdeleri açısından salım profilleri

incelendiğinde çapraz bağlı ve bağımsız formülasyonlar kendi aralarında benzer profiller sergilemişlerdir. Çapraz bağlı formüller yavaş parçalanmaları nedeniyle simvastatini doku iskelesi yapısı içerisine daha uzun süre hapsederek çapraz bağımsız formülasyonlara göre daha kontrollü bir salım profili göstermişlerdir. Bununla birlikte simvastatin içeren lipit nanopartiküllerin çapraz bağlı iskele yapısında hapsolması formülasyonlardan salınan patlama salımı miktarını da değiştirerek bağlı formülasyonlar (%25,94-%35,52), bağımsız formülasyonların (%46,61-%57,98) yaklaşık olarak yarısı kadar simvastatin patlama salımı göstermiştir. Patlama salımını takiben çapraz bağlı formülasyonlar 8-10 günde, çapraz bağımsız formülasyonlar ise 4-6 günde platoya ulaşmıştır. Benzer salım profilleri Yao ve ark. (218) tarafından hazırlanan vankomisin içeren çapraz bağlı ve bağımsız kitosan/polivinilpirolidon doku iskelelerinde de gözlenmiş olup çapraz bağlı formülasyonlar daha düşük patlama salımı göstererek platoya daha uzun sürede ulaşmıştır.

Salınan simvastatin miktarları incelendiğinde (Şekil 4.50.) doku iskelesindeki simvastatin miktarının iki kat daha fazla olduğu ultrafiltrasyon uygulanmış formülasyonlardan salınan simvastatin miktarlarının da ultrafiltrasyon uygulanmamış formülasyonlara göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Sonuç olarak doku iskelesine yüklenen simvastatin miktarının artırılması ile salınan simvastatin miktarı da orantılı olarak artış göstermiştir. Kim ve ark. (310) da farklı konsantrasyonlarda deksametason yüklü PLGA doku iskelesi formülasyonları ile yaptıkları salım çalışmalarında yüklenen deksametason miktarının salınan miktar üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Doku iskelelerinin salınan kümülatif simvastatin miktarı profillerinin hangi salım kinetiğine uygun olduğu incelenmiş ve tüm formülasyonların Higuchi kinetiği modeline uygun olduğu görülmüştür. Bu durum doku iskelesi formülasyonlarından salımın zamanın kare köküyle orantılı olarak gerçekleştiğini ve difüzyon kontrollü bir mekanizma ile uzatılmış salımın sağlandığını göstermektedir. Formülasyonların Higuchi kinetiğine göre elde edilen salım hızı sonuçları karşılaştırıldığında ise çapraz bağlı formülasyonlar çapraz bağımsız formülasyonlara göre önemli derecede daha yüksek bir salım hızı göstermiş olup ($p<0,05$) bununla birlikte 2:1 kitosan:kollajen polimer oranı ile daha fazla kitosan içeren formülasyonların salım hızları, 1:1

kitosan:kollajen polimer oranı karşılığı olan formülasyonlarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha büyüktür ($p < 0,05$).

Doku iskelelerinden etkin madde salımını porozite, formülasyonun şişme ve su absorplama özellikleri, yüklenen etkin madde miktarı, etkin maddenin çözünürlüğü ve parçalanma özelliklerinin etkilediği bildirilmiştir (310). Bu çalışmada çapraz bağlı formülasyonların bağımsız formülasyonlara göre daha yüksek salım hızı göstermesi bu formülasyonların daha yavaş parçalanmaya uğraması sonucu daha düşük patlama salımı ile daha uzun sürede platoya ulaşmalarından kaynaklanmıştır. Kitosan oranının daha yüksek olduğu 2:1 kitosan:kollajen polimer oranları ile hazırlanan doku iskelelerinin salım hızlarının daha yüksek bulunması ise kollajene göre sudaki çözünürlüğü daha yüksek olan kitosanın doku iskelesinin su penetrasyonunu artırarak, yüklenen etkin maddenin salım hızını artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Simvastatinin çapraz bağlı doku iskelesi formülasyonlarında başlangıçta yüksek bir patlama salımı ile salınması simvastatinin başlangıç etkin dozunun sağlanması açısından önemlidir. Patlama salımını takiben kontrolü bir şekilde salımın devam etmesi ise yara iyileşmesi süresince idame dozunun sağlanması açısından istenilen bir özelliktir. Bu nedenle hazırlanan doku iskelesi formülasyonlarından 28 gün süresince yara tedavisi sağlayacak en uygun salım profili çapraz bağlı formülasyonlarla elde edilmiştir. Bu formülasyonlar arasında ise UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1 formülasyonu yüksek simvastatin salım hızı ve miktarı göstermesi nedeniyle optimum doku iskelesi formülasyonu olarak seçilmiş ve in vivo çalışmalarda kullanılmasına karar verilmiştir.

İn vivo çalışmalara geçilmeden önce seçilen UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-SV optimum doku iskelesi formülasyonu ile birlikte UF(-) $\text{Ç}(+)$ 2:1-SV formülasyonu ve bu formülasyonların etkin madde yüklenmemiş karşılıkları olan UF(+) $\text{Ç}(+)$ 2:1-B ve UF(-) $\text{Ç}(+)$ 2:1-B formülasyonlarının biyoyumluluklarının tespit edilmesi amacıyla sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Doku iskelesi formülasyonlarından önce simvastatinin sitotoksik dozunun belirlenmesi amacıyla 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ile 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralığında farklı konsantrasyonlarda simvastatinin kültür ortamı içerisinde çözeltileri

hazırlanıp L929 hücre hattına uygulanmış ve 24 saat sonra % hücre canlılığı değerleri ölçülmüştür. Hücrelerle direk temasta sitotoksik etkileri bilenen simvastatinin 25 µg/mL konsantrasyonunun üzerinde %50'nin altında bir hücre canlılığı gösterdiği gözlenmiştir (311, 312). Bu nedenle doku iskelesi formülasyonlarının sitotoksitesinin tayininde simvastatinden kaynaklanan toksisiteyi azaltmak amacıyla sitotoksik etki gözlenmeyen 25 µg/mL simvastatin konsantrasyonu sağlanacak şekilde doku iskeleleri tartılarak hücre kültürü çalışmaları için hazırlanmıştır. Zhou ve ark. (311) da 1 nM-10 µM aralığında farklı konsantrasyonlardaki simvastatinin insan yağ dokusundan türetilen stromal hücreler üzerindeki sitotoksitesini incelemiş ve oldukça düşük bir konsantrasyon olan 2 µM (0,84 µg/mL) simvastatinin üzerinde hücre büyümesi ve çoğalmasının belirgin bir şekilde azaldığını gözlemlemişlerdir.

Doku iskelesi formülasyonları için biyoyumluluk; istenmeyen lokal veya sistemik etki yaratmadan arzu edilen tıbbi tedavi işlevinin yerine getirebilmesinin yanı sıra moleküler ve mekanik sinyalizasyon sistemlerinin kolaylaştırılması da dahil olmak üzere, uygun hücrel aktiviteyi destekleyecek bir destek materyali olma kabiliyetini ifade etmektedir (313). Tez çalışması kapsamında da doku iskelelerinin biyoyumluluklarının değerlendirilmesi amacıyla etkin madde içeren ve içermeyen doku iskelesi formülasyonları 12 ve 24 saat boyunca L929 hücre hattı üzerine uygulanarak % hücre canlılığı sonuçları incelenmiştir (Şekil 4.52.). Elde edilen sonuçlarda 12 saat inkübasyonun sonunda etkin madde yüklenmemiş tüm doku iskelelerinin hücre canlılığı sonuçları kontrol grubu ile benzer bulunurken ($p>0,05$), etkin madde içeren formülasyonlarda hücre canlılığının UF(-)Ç(+):2:1-SV ve UF(+):Ç(+):2:1-SV için sırasıyla %77,95 ve %86,17 düştüğü gözlenmiştir ($p<0,05$). 24 saat inkübasyon sonununda ise tüm doku iskeleleri kontrol grubuna göre daha düşük hücre canlılığı göstermiş ($p<0,05$) ve % hücre canlılıkları UF(-)Ç(+):2:1-B, UF(-)Ç(+):2:1-SV, UF(+):Ç(+):2:1-B ve UF(+):Ç(+):2:1-SV formülasyonları için sırasıyla %86,49, %69,19, %86,60 ve %75,21 olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna göre daha düşük hücre canlılığı sonuçları gözlenmesine rağmen tüm doku iskelesi formülasyonlarında %50'nin üzerine bir hücre canlılığı elde edildiğinden formülasyonların L929 hücre hattı üzerinde toksik etki göstermediği sonucuna

varılmıştır (222). Etkin madde içeren doku iskeleleri içermeyen formülasyonlara göre her iki inkübasyon süresinde de daha düşük hücre canlılığı gösterirken ($p < 0,05$), ultrafiltrasyon işlemi doku iskelelerinin hücre canlılığı sonuçları üzerinde farklılığa yol açmamıştır ($p < 0,05$). Formülasyonların etkin madde yüklenmesine bağlı olarak daha fazla toksik etki göstermesi yukarıda bahsedilen simvastatinin sahip olduğu sitotoksik etkiden kaynaklanmaktadır. Ultrafiltrasyon işlemi ile yüklenen nanopartikül konsantrasyonunun artmasının doku iskelelerinin sitotoksitelerinde farklılığa yol açmaması ise NLT formülasyonlarından kaynaklanan bir sitotoksik etkinin bulunmadığını göstermiştir. Bununla birlikte etkin madde içeren formülasyonlar arasında ultrafiltrasyon işlemi ile artan nanopartikül konsantrasyonunun yanında simvastatinin de artmasının toksisitede artmaya yol açmaması, simvastatinin sitotoksik etki gözlenmeyen doz sınırlarında çalışılması nedeniyle gözlemlendiği düşünülmektedir.

Simvastatin lipit nanopartikülleri içeren doku iskelelerinin formülasyonunun ve karakterizasyonunun tamamlanmasından sonra çalışmanın sıçanlar üzerindeki in vivo etkinlik çalışmaları aşamasına geçilmiştir. İn vivo çalışmalar için en uygun özelliklere sahip doku iskelesi UF(+) \checkmark (+) $2:1$ -SV formülasyonu olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda etkin madde içermeyen boş lipit nanopartikülle hazırlanan doku iskelesi formülasyonu olarak da bu formülasyonun etkin madde içermeyen karşılığı olan UF(+) \checkmark (+) $2:1$ -B formülasyonu seçilmiş ve gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmaları sonucunda bu formülasyonların sitotoksik etki göstermediği kanıtlanarak in vivo çalışmalara geçilmiştir. Kök hücre içeren doku iskelesi grupları için seçilen UF(+) \checkmark (+) $2:1$ -SV ve UF(+) \checkmark (+) $2:1$ -B formülasyonları üzerine belirli konsantrasyondaki kök hücre süspansiyonu ekilmesi ile elde edilen doku iskeleleri kullanılmıştır. Serbest simvastatin içeren doku iskelesi grubu için ise UF(+) \checkmark (+) $2:1$ -SV formülasyonunun hazırlanması aşamasında Fm-50-20-UF(2KAT) nanopartikül dispersiyonu yerine eşdeğer konsantrasyonda simvastatin süspansiyonu kullanılarak hazırlanan doku iskelesi formülasyonları kullanılmıştır.

Sonuç olarak kontrol grubu dışındaki in vivo grupların her birine farklı bir doku iskelesi formülasyonu uygulanarak 14 ve 28 gün süresince yara iyileşmesi takip edilmiştir. Yara iyileşmesi gözlemsel olarak ve yaralı bölgenin fotoğraflamalarının

yapılmasının ardından, elde edilen fotoğraflar üzerinde image J programı ile hesaplanan yara alanı sonuçları üzerinden değerlendirilmiştir. 14. gün sonunda yara iyileşme süreci devam ettiği için in vivo grupların yara alanları esas olarak 28 gün sonunda elde edilen verilerle tartışılmıştır.

28. gün % yara alanları incelendiğinde, doku iskelesi uygulanan deney gruplarından ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu hariç, tüm grupların yara alanları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.60.). Herhangi bir terapötik ajan içermeyen ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ grubunun dahi kontrol grubuna göre daha iyi bir yara kapanması sağlanması, doku iskelesi taşıyıcı materyalinin de yara iyileştirici etkinliğini göstermektedir. Bu durum doku iskelelerinin, diyabetik yaralar gibi derin doku kayıplarının gözlemlendiği kronik yaralarda kaybedilen ECM yapısı yerine geçerek yeni doku oluşumunu destekleyen ve yarayı dış enfeksiyonlara karşı koruyan uygun iyileşme ortamını sağlamasından kaynaklanmaktadır. Doku iskeleleri özellikle poröz yapıları içerisinde hücrelerin proliferasyonunu, göçünü ve fonksiyonlarını destekleyerek doku rejenerasyonunu önemli ölçüde artırmaktadır. Bununla birlikte doku iskelesi yapısında yer alan kitosan ve kollajen polimerinin yara yüzeyine iyi bir adhezyon sağlayarak polimerlerin kendilerinin de yara iyileştirici etki göstermesi doku iskelesi formülasyonunun yara iyileştirici etkinliğini güçlendirmiştir (138, 213, 314). Natarajan ve ark. (314) tannik asit ile çapraz bağlanmış kollajen doku iskelelerinin yara iyileştirici etkinliğini sıçanlar üzerinde değerlendirmiş ve sadece kollajen polimerinden oluşan doku iskelelerinin kontrol grubuna göre önemli derecede yara iyileşmesi sağladığını göstermişlerdir.

28 gün sonunda ‘lipit nanopartikül simvastatin içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartikül simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grupları kontrol grubuna karşı gösterdikleri yara iyileştirici etkilerinin yanında bu grupların simvastatin içermeyen karşılıkları olan ‘boş lipit nanopartikül içeren doku iskelesi’ ve ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ gruplarına göre de anlamlı derecede daha düşük yara alanı göstererek ($p<0,05$) daha yüksek bir yara iyileşmesi göstermiştir. Bu sonuçlar simvastatinin yara iyileştirici etkinliğini kanıtlamıştır. Literatürde yer alan simvastatinin yara iyileştirici etkinliği üzerinde

gerçekleştirilen çalışmalarda da benzer şekilde geliştirilen yara modelleri üzerinde önemli derecede iyileşme gösterilmiştir (20, 21, 219, 220).

14 ve 28 gün süresince gerçekleştirilen deney gruplarının her ikisinde de ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yara kapanması açısından fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte ‘lipit nanopartiküller simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu ise ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grubuna göre anlamlı derecede daha fazla yara iyileşmesi göstermiştir ($p<0,05$). Bu durum simvastatinin nanopartikül içerisine hapsedilmeden, direk yaralı bölgeye uygulanmasının yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Öte yandan kontrollü ve uzatılmış bir simvastatin salımı sağlayan doku iskelesi formülasyonunun uygulandığı ‘lipit nanopartiküller simvastatin içeren doku iskelesi’ grubunda önemli derecede iyileşme gösterilmiştir. Simvastatinin nanopartiküller içerisine hapsedilmeden direkt uygulanması sonucu gözlenen yara iyileşmesi üzerindeki bu olumsuz etkinin simvastatinin sitotoksik etkisinden kaynaklanabileceği gibi literatürde yer alan çalışmalarla gösterilen simvastatin yüksek dozlarında doz artışına bağlı olarak gözlenen inflamatuvar yanıt nedeniyle oluşabileceği düşünülmektedir (21, 221, 315).

Literatürde yer alan pek çok çalışma ile gösterildiği gibi mikro/nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler etkin maddeyi bozunmaya karşı koruyarak biyoyararlanımlarını ve tedavi etkinliğini artırmaktadır (291, 316, 317). Bu nedenle simvastatinin taşıyıcı bir sistem içerisine enkapsüle edilmesi ile etkin maddenin yara bölgesinde hızla hidroliz olması önlenerek, uzatılmış ve kontrollü etkin madde salımı ile etkili bir yara tedavisi geliştirilmiştir. NLT ve doku iskelesi formülasyonlarının birleştirilmesi ile geliştirilen kombine bir ilaç taşıyıcı sistemle simvastatinin yara yatağında iyileşme süreci boyunca terapötik düzeyde kalması sağlanmakta ve böylece tedavi etkinliği ve hasta uyuncu artmaktadır. Orue ve ark. (318) tarafından yapılan güncel bir çalışmada antimikrobiyal bir peptit olan LL37 ile yüklenmiş NLT formülasyonları hazırlanarak LL37 çözeltisi ve LL37 yüklü NLT formülasyonlarının diyabetik yara modelleri üzerindeki etkinliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda LL37 yüklü NLT formülasyonlarının LL37 çözeltisine göre önemli

derecede daha iyi bir iyileşme sağladığı gösterilerek nanoyapılı taşıyıcı sistemler ile daha etkili bir yara tedavisinin sağlandığı kanıtlanmıştır.

14 ve 28 gün sürdürülen her iki deney sonuçlarında kök hücre ekilmiş doku iskelelerinin uygulandığı gruplar kök hücre içermeyen karşılıkları olan boş lipit nanopartikül ve lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi grupları ile karşılaştırıldığında yara alanlarında önemli derecede fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Bu nedenle yara alanı sonuçları açısından kök hücrelerin tek başına yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi gözlenmemiştir. Ancak yara kapanması yalnızca yara epitelinin kapanma derecesini göstermekte olup iyileşmenin kalitesi hakkında bilgi vermediğinden kök hücrelerin yara tedavisi üzerindeki etkinliği patolojik incelemeler sonucunda gözlenmiştir.

14 gün H&E boyama patoloji sonuçları değerlendirildiğinde kontrol ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubunda diğer gruplardan farklı olarak orta düzeyde inflamasyon varlığı gösterilmiştir ($p<0,05$). Daha önce yapılan çalışmalarda simvastatinin yüksek dozda inflamasyon yanıtını artırdığı gösterilmiş olmasına rağmen simvastatinin yavaş ancak kararlı salımının da inflamatuvar hücreleri yara iyileşmesi bölgesine çekebileceği düşünülmektedir (221). Serbest simvastatin grubunda kullandığımız simvastatin konsantrasyonun bahsedilen makaleden daha düşük olması bu gruptaki inflamasyon düşüklüğünü de açıklayabilmektedir.

14. gün tüm deney gruplarında epitelizasyon sonuçları karşılaştırıldığında ise kök hücre eklenen gruplarda epitelizasyon orta düzeydeyken diğer gruplarda hafif düzeyde bulunmuş olması önemlidir. Bu sonuçlar ile değerlendirildiğinde kök hücre, her ne kadar yara yüzeyi kapanma hızını etkilemese de epitel dokusu maturasyonunu artırması açısından önemlidir.

14. gün vaskülarizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi dikkate alındığında ‘lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi’ grubu diğer gruplara göre daha fazla vaskülarizasyon göstererek orta düzeyde skorlanmıştır. İstatistiksel olarak bakıldığında ise kontrol ve ‘serbest simvastatin içeren doku iskelesi’ grubuna göre

vaskülerizasyon anlamlıdır. Bu sonuç yavaş ve kontrollü salım gösteren simvastatinin vaskülerizasyonun artması üzerine olumlu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Literatürde simvastatinin vaskülerizasyon üzerine olumlu etkileri Bitto ve ark. (20) tarafından gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise farklı olarak uygulama yöntemi, konsantrasyonu ve simvastatinin nanopartikül içerisinden yavaş ve kontrollü salımının olması nedeniyle sadece lipit nanopartiküller simvastatin içeren grupta vaskülerizasyon daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu simvastatinin vaskülerizasyonu artırma üzerindeki etkilerini desteklemektedir.

H&E boyama sonucu yapılan 14. gün histopatolojik incelemenin fibroblastik proliferasyon sonuçları karşılaştırıldığında serbest simvastatin ve lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi grupları daha az fibroblastik proliferasyon göstermiştir ($p<0,05$). Bu sonuç literatürle uyumlu olarak mezenkimal kök hücrenin ve simvastatinin yara iyileşmesinde istenmeyen bir etki olan fibrozis gelişmesi üzerine olumlu etkisi olarak yorumlanmıştır (247, 248).

28. gün histopatolojik değerlendirmede tüm deney gruplarında inflamasyon gözlenmemiş ve vaskülerizasyon açısından da önemli bir fark bulunmamıştır. Grupların çoğunda yara iyileşmesinin tamamlanmış olmasının gruplar arası farklılığı azalttığı düşünülmüştür.

H&E boyamada histopatolojik incelemeye göre 28. gün epitelizasyon sonuçları değerlendirildiğinde ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunun diğer gruplara göre daha yüksek oranda epitelizasyona sahip olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$). Bu sonuçlar 14. gün sonuçları ile de uyumludur. Mezenkimal kök hücrenin simvastatin ile birlikte verilmesi literatüre uyumlu olarak simvastatinin kök hücrenin canlılığı ve proliferasyonunu artırmasından dolayı epitelizasyona katkı sunduğunu düşündürmektedir (249).

Aynı deney gruplarında 28. gün sonuçları fibroblastik proliferasyon varlığı açısından incelendiğinde tıpkı 14. gün sonuçları gibi serbest simvastatin ve kök hücrenin fibroblast proliferasyonunu azalttığı literatürle uyumlu olarak gözlenmiştir (247, 248).

14. ve 28. günde bcl-2 immünohistokimyasal boyamasının tüm gruplarda da gözlenmemesi simvastatin, nanopartikül ve doku iskelesinin programlı hücre ölümüne yol açmadığı ve biyolojik yapılarda güvenli olduğunu göstermesi açısından önemlidir.

14. ve 28. günlerde immünohistokimyasal olarak bölgedeki hücre proliferasyonunu gösteren Ki-67 boyaması sonuçlarına göre kök hücre içeren tüm gruplarda anlamlı olarak ($p<0,05$) proliferasyonun fazla olması mezenkimal kök hücrenin parakrin etki ile hücre proliferasyonuna sunduğu katkıyı literatürle uyumlu olarak göstermesi açısından önemlidir (250, 251).

14. günde CD31 ile yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarında kök hücre içeren gruplar olan ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ ve ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ deney gruplarında literatürle uyumlu olarak kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bir CD31 seviyesi elde edilmiştir (25, 187). Ayrıca simvastatin nanopartikül içeren doku iskelesi grubu serbest simvastatine göre daha yüksek CD31 boyanma oranı göstermesi açısından H&E sonuçlarındaki vaskülerizasyon oranları ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak kontrollü simvastatin salımının ve kök hücrenin vaskülerizasyon üzerine olumlu etkilerini desteklemektedir.

28. gün CD31 immünohistokimyasal boyama sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek vaskülerizasyon ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ deney grubunda, en düşük ise ‘lipit nanopartiküler simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubunda bulunmuştur. Elde edilen bulgular simvastatin açısından tartışıldığında doku kesitindeki damar yapıları sayılarak elde edilen vaskülerizasyon sonuçlarının endotel hücreleri varlığını gösteren ve damar gelişimi maturasyonunda önemli bir belirteç olan CD31 boyanması ile farklılık göstermektedir. Bu sonuçlar 28. gün sonunda simvastatinin vaskülerizasyonu artırmış görünmesine rağmen endotel maturasyonu üzerinde etkili olmadığını düşündürmektedir.

BrdU boyamaları sonucunda kök hücre içeren doku iskelesi gruplarındaki hücre sayıları karşılaştırıldığında ‘lipit nanopartikül simvastatin ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubu %10 kök hücre içeriği ile %4 oranında kök hücre bulunan ‘boş lipit nanopartikül ve kök hücre içeren doku iskelesi’ grubuna göre daha yüksek kök hücre bulundurmıştır (Şekil 4.71. ve 4.72.). Bu sonuç simvastatinin literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olarak kök hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu artırıcı etkisini desteklemektedir (249).

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen in vitro çalışmalar sonucunda, immünmodülatör, antiinflamatuar ve anjiyogenik etkileri ile yara tedavisinde olumlu etkiler gösteren simvastatinin yüksek çözünürlük gösterdiği lipitler kullanılarak nanoparçacıklı lipit taşıyıcı sistemler içerisine yüksek oranlarda yüklenmesi sağlanmıştır. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile hazırlanan formülasyonlar, Campbell ve ark. (277) tarafından daha önce belirtilmiş olan yaralı dokuda lokal olarak kontrollü salım sağlayabilecek nanoboyutlara sahip olup homojen partikül büyüklüğü dağılımı ve iyi bir stabilite oluşturabilecek yüksek zeta potansiyel değerleri göstermektedir (60, 66, 230). Vitorino ve ark. (203) da yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile hazırladıkları simvastatin yüklü NLT formülasyonlarında küçük partikül büyüklükleri ve PDI değerlerine sahip, yüksek ilaç hapsedilme etkinliği ile optimum özellik gösteren formülasyonlar elde etmişlerdir. Literatürde yer alan simvastatinin NLT formülasyonlarında lipit matriksin en fazla %10’nu (a/a) kadar yüklenme gerçekleştirilirken bu çalışma ile %20’ye kadar yükleme başarılmış ve yapılan DSC ve FT-IR analizleri ile simvastatinin lipit nanopartikül yapısında moleküler olarak disperse olmuş halde yüksek oranda enkapsüle olduğunu gösterilmiştir (56, 72, 203). NLT formülasyonları literatürde gözlenen salım profilleri ile uyumlu olarak yüzeye adsorbe olan ilaç molekülleri nedeniyle başlangıçta yüksek bir patlama salımı göstermiş ardından lipit matrikse hapsedilmiş simvastatinin salımı ile etkin madde salımı yavaş bir hızda devam ederek 24 saatte platoya ulaşmıştır (294, 319). Simvastatin ile yüklenmiş NLT formülasyonlarından hareketle doku iskelesi formülasyonları hazırlandığında doku iskelesinin yapısı ve parçalanma hızı simvastatinin salım hızını daha da yavaşlatacağından NLT formülasyonları ile istenilen bir salım profili elde edilmiştir.

Bununla birlikte stabilite çalışmalarında Alvarez-Lueje ve ark. (239) tarafından yapılan çalışma ile sulu dispersiyon halinde saatler içerisinde %10'dan fazla parçalanmaya uğrayarak stabilite problemleri gösterdiği belirtilen simvastatinin NLT formülasyonlarında 4°C'de 15 güne kadar stabilitesinin korunduğu gösterilerek simvastatinin lipit matrisi içerisinde sızıntı oluşmadan tamamen hapsedildiği başarılı stabil bir formülasyonun geliştirildiği kanıtlanmıştır.

NLT formülasyonlarının geliştirilmesinin ardından, simvastatin lipit nanopartiküllerini içeren doku iskelesi formülasyonları yara tedavisinde yeni bir ilaç taşıyıcı sistem oluşturmak amacıyla dondurarak kurutma yöntemi ile kitosan ve kollajen polimerleri kullanılarak hazırlanmıştır. Yasasvini ve ark. (21) ise yara tedavisinde kullanılmak üzere simvastatin yüklü kitosan mikropartiküllerini içeren polivinil alkol hidrojel doku iskelesi formülasyonlarını hazırlayarak kontrollü salım sağlayan ilaç taşıyıcı sistem geliştirmiş ve kontrol gruplarına göre önemli derecede daha yüksek yara iyileştirici etkinin sağlandığını göstermişlerdir. Yara iyileşmesinde hücrelerin penetrasyonu, çoğalması, fonksiyon göstermesi ve doku onarımının sağlanabilmesi gerekli olan moleküllerin aktarımının sağlanmasında oldukça önemli olduğu gösterilen birbiri ile bağlantılı açık bir por ağı, yüksek porozite ve permeabilite özellikleri hazırlanan doku iskelesi formülasyonları ile başarılı bir şekilde elde edilmiştir (131, 303). Konsantre lipit nanopartiküllerini içeren çapraz bağlı doku iskelesi formülasyonları da literatürle uyumlu olarak yara tedavisi için gerekli olan 28 gün süren yavaş parçalanma hızını göstermişlerdir (308). Aynı zamanda bu doku iskeleleri yaralı dokuda oluşan gerilime dayanabilecek ve yeni doku oluşumu için gerekli olan fiziksel desteği karşılayabilecek uygun bir mekanik güce sahiptir (167, 309). Simvastatin lipit nanopartiküllerinin doku iskelesi formülasyonları içinde uygulanması ile başlangıç ve idame dozunu sağlayacak ideal kontrollü salım profilleri elde edilmiştir. Özellikle çapraz bağlı formülasyonlarda Yao ve ark. (218) tarafından da gözlemlendiği gibi daha yavaş parçalanma özelliğinin sonucu olarak, NLT formülasyonlarında elde edilen yüksek simvastatin patlama salımının belirgin bir şekilde azaldığı gözlenmiş olup simvastatin salımı kontrolü bir şekilde devam ederek platoya daha uzun sürede ulaşılmıştır. Doku iskelesi formülasyonlarının biyouyumlulukları da sitotoksikite çalışmaları ile gösterilmiştir.

İn vivo çalışma sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde, simvastatinin ve yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin yara iyileştirici etkinliği üzerine gerçekleştirilen çalışmalarla uyumlu olarak, kontrollü ve uzatılmış simvastatin salımı sağlayan nanoyapılı lipit taşıyıcı sistem içine hapsedilmiş simvastatin içeren doku iskelelerinin yara kapanma hızı, vaskülarizasyon ve epitelizasyon üzerindeki olumlu etkileri ile yara iyileşmesini desteklediği gözlenmiştir (20, 21, 219, 220, 318). Bunun yanısıra simvastatin ve kök hücre içermeyen doku iskelelerinin yara kapanma hızını artırması doku iskelesi yapısındaki kitosan ve kollajen polimerlerinin daha önceki çalışmalarla kanıtlanmış olan yara iyileşmesindeki olumlu etkinliğinin varlığına işaret etmektedir (131, 133, 135). Simvastatin ve kök hücrenin birlikte kullanılması sonucunda literatürle uyumlu olarak simvastatinin kök hücrelerin canlılığını ve proliferasyonunu artırarak etkinliklerini artırdıkları gözlenmiştir (249). Bu sinerjik etki sonucunda özellikle artmış epitelizasyon, proliferasyon ve endotel matürasyonu tamamlamış bir vaskülarizasyon gözlemlenerek etkin bir yara iyileşmesi sağlanmıştır.

Bu çalışma ile kolesterol düşürücü bir etkin madde olan ve sadece oral yolla kullanılan simvastatinin yeni ilaç taşıyıcı bir sistem olan NLT içine hapsedilmesi ve daha sonra doku iskelesi haline getirilmesiyle diyabetik yaralar gibi kronik yaraların tedavisi için yeni bir yaklaşım getirilmektedir. Geliştirilen formülasyonlara kök hücrelerin ilavesi ile tedavi etkinliği daha fazla artırılarak diyabetik yaralar için umut verici bir tedavi yöntemi geliştirilmiştir.

6. SONUÇ

Diyabetik yara tedavisi oldukça kompleks olup çok yönlü bir tedavi yaklaşımı gerekmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında yara iyileşmesinde tedavi etkinliğini artıran, çok modelli yeni bir topikal tedavi yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yara iyileşmesinde ve kök hücre tedavisinde olumlu etkileri olduğu düşünülen simvastatinin; topikal olarak kontrollü salımını sağlayan, stabilitesini ve etkinliğini artıran NLT formülasyonları hazırlanmış ve kök hücrelerin yara iyileşmesindeki önemi nedeniyle simvastatine ek olarak tedaviye kök hücreler de eklenerek kök hücre ve simvastatin lipit nanopartiküllerini taşıyan, kaybedilen doku yerine geçerek yara iyileşmesini hızlandıran uygun biyoparçalanabilir polimerlerden oluşmuş doku iskeleleri geliştirilmiştir. Bu tez çalışması ile;

- NLT formülasyonları yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanılarak farklı sıvı lipit, sıvı:katı lipit ve simvastatin yükleme oranlarında başarılı bir şekilde hazırlanmış ve uygun yapısal özelliklere, yüksek yükleme kapasitesine sahip nanopartiküller elde edilmiştir.
- İn vitro salım çalışmaları, NLT formülasyonlarından salımın başlangıçta yüksek bir simvastatin patlama salımı ile hızlı daha sonra yavaş bir salım hızı ile devam ederek yaklaşık 12-24 saatte salım platoya ulaştığı ve salımın formülasyona yüklenen etkin madde miktarından ve formülasyonun konsantrasyonundan etkilenmediği gösterilmiştir.
- Stabilite çalışmaları sonucunda, sulu ortamda hidrolize uğrayarak stabilite problemleri gösteren simvastatinin NLT sulu süspansiyonları halinde stabilitesinin artırıldığı gözlenmiştir. NLT formülasyonları için en uygun etkin madde ve partikül büyüklüğü sonuçları 4°C'de elde edilmiştir.
- Doku iskelesi formülasyonları, doğal kaynaklı ve biyoparçalanabilir kitosan ve kollajen polimerleri ile farklı kitosan:kollajen polimer oranlarında, çapraz bağlı veya bağımsız olarak, simvastatin içeren/içermeyen ve ultrafiltre/ultrafiltre edilmemiş NLT formülasyonlarından hareketle dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak başarılı bir şekilde hazırlanmıştır.

- Yara iyileşmesinin desteklenmesi, simvastatin nanopartikülleri ve kök hücrelerin taşınması için uygun poröz yapı, su absorplama, parçalanma ve mekanik özellikler çapraz bağlı doku iskelesi formülasyonlarında gözlenmiştir.
- Doku iskelelerinin in vitro salım çalışmaları sonucunda, NLT formülasyonlarında gözlenen patlama salımının azaldığı ve daha kontrollü salım profillerinin elde edildiği gözlenmiştir. Formülasyonların salım özelliklerinin çapraz bağlanma durumu, lipit nanopartikül konsantrasyonu ve kitosan:kollajen polimer oranından etkilendiği bulunmuştur.
- Doku iskelelerinin L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir.
- Doku iskelesi formülasyonlarının yara iyileştirici etkilerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen in vivo çalışmalar sonucunda, lipit nanopartiküler simvastatin içeren doku iskelesi formülasyonlarının vaskülarizasyon ve epitelizasyon üzerinde olumlu etkiler göstererek yara iyileşme sürecini kısaltabileceği gösterilmiştir.
- Doku iskelelerine ilave edilen mezenkimal kök hücrelerin, simvastatin ile birlikte yara iyileşme sürecinde etkin bir rol aldığı ve özellikle epitelizasyon, proliferasyon ve endotel matürasyonu tamamlamış vaskülerizasyon sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırdığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak diyabetik yaralar için rejeneratif biyomalzemeler kullanarak, simvastatin ve kök hücre ilavesiyle fonksiyonlandırılmış, uzun süreli salım sağlayabilen 3 boyutlu doku iskelelerinin hazırlanması ile kronik yaraların iyileşmesinde yeni bir yaklaşım getirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol*. 1994;130(4):489-93.
2. Strodbeck F. Physiology of wound healing. *Newborn Infant Nurs Rev*. 2001;1(1):43-52.
3. Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery*. 2011;29(10):475-9.
4. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004;9:283-9.
5. Werdin F, Tenenhaus M, Rennekampff HO. Chronic wound care. *Lancet*. 2008;372(9653):1860-2.
6. McCarty SM, Percival SL. Proteases and delayed wound healing. *Adv Wound Care*. 2013;2(8):438-47.
7. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(2):185-206.
8. Stojadinovic A, Carlson JW, Schultz GS, Davis TA, Elster EA. Topical advances in wound care. *Gynecol Oncol*. 2008;111(2):70-80.
9. Ovington LG. Advances in wound dressings. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):33-8.
10. Ahmed I, Goldstein B. Diabetes mellitus. *Clin Dermatol*. 2006;24(4):237-46.
11. International diabetes federation diabetes atlas 7th edition [Internet]. 2015[Erişim Tarihi 5 Eylül 2017]. Erişim adresi: <http://www.diabetesatlas.org>.
12. Bastaki A. Diabetes mellitus and its treatment. *Int J Diabetes Metab*. 2005;13(3):111.
13. Rice JB, Desai U, Cummings AK, Birnbaum HG, Skornicki M, Parsons NB. Burden of diabetic foot ulcers for medicare and private insurers. *Diabetes care*. 2014;37(3):651-8.
14. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.
15. Jeffcoate WJ, Harding KG. Diabetic foot ulcers. *Lancet*. 2003;361(9368):1545-51.
16. Katti DS, Robinson KW, Ko FK, Laurencin CT. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;70(2):286-96.
17. Kanda N, Morimoto N, Takemoto S, Ayvazyan AA, Kawai K, Sakamoto Y, et al. Efficacy of novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor for dermis-like tissue regeneration. *Ann Plast Surg*. 2012;69(5):569-74.

18. Thakur RA, Florek CA, Kohn J, Michniak BB. Electrospun nanofibrous polymeric scaffold with targeted drug release profiles for potential application as wound dressing. *Int J Pharm.* 2008;364(1):87-93.
19. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fund Clin Pharmacol.* 2005;19(1):117-25.
20. Bitto A, Minutoli L, Altavilla D, Polito F, Fiumara T, Marini H, et al. Simvastatin enhances VEGF production and ameliorates impaired wound healing in experimental diabetes. *Pharmacol Res.* 2008;57(2):159-69.
21. Yasasvini S, Anusa RS, VedhaHari BN, Prabhu PC, RamyaDevi D. Topical hydrogel matrix loaded with simvastatin microparticles for enhanced wound healing activity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;72:160-7.
22. Hinson D, Chambliss K, Toth M, Tanaka R, Gibson K. Post-translational regulation of mevalonate kinase by intermediates of the cholesterol and nonsterol isoprene biosynthetic pathways. *J Lipid Res.* 1997;38(11):2216-23.
23. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6(9):1004-10.
24. Bracht L, Caparroz-Assef SM, Magon TF, Ritter AM, Cuman RK, Bersani-Amado CA. Topical anti-inflammatory effect of hypocholesterolaemic drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(7):971-5.
25. Babczyk P, Conzendorf C, Klose J, Schulze M, Harre K, Tobiasch E. Stem cells on biomaterials for synthetic grafts to promote vascular healing. *J Clin Med.* 2014;3(1):39-87.
26. Dahl MV. Stem cells and the skin. *J Cosmet Dermatol.* 2012;11(4):297-306.
27. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2010;316(14):2213-9.
28. Lee MJ, Kim J, Lee KI, Shin JM, Chae JI, Chung HM. Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy.* 2011;13(2):165-78.
29. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92(1):26-36.
30. Blumberg SN, Berger A, Hwang L, Pastar I, Warren SM, Chen W. The role of stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;96(1):1-9.
31. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(4):215-30.
32. Türsen Ü. Ülser tedavisinde yara örtüleri. *Turk J Dermatol.* 2013;7:61-71.
33. Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(1):44-50.

34. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008;180(4):2581-7.
35. Mudshinge SR, Deore AB, Patil S, Bhalgat CM. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *Saudi Pharm J.* 2011;19(3):129-41.
36. Blasi P, Giovagnoli S, Schoubben A, Ricci M, Rossi C. Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):454-77.
37. Bondi ML, Azzolina A, Craparo EF, Lampiasi N, Capuano G, Giammona G, et al. Novel cationic solid-lipid nanoparticles as non-viral vectors for gene delivery. *J Drug Target.* 2007;15(4):295-301.
38. Patlolla RR, Chougule M, Patel AR, Jackson T, Tata PN, Singh M. Formulation, characterization and pulmonary deposition of nebulized celecoxib encapsulated nanostructured lipid carriers. *J Control Release.* 2010;144(2):233-41.
39. Liu X, Zhang Z, Jiang Y, Hu Y, Wang Z, Liu J, et al. Novel PEG-grafted nanostructured lipid carrier for systematic delivery of a poorly soluble anti-leukemia agent Tamibarotene: characterization and evaluation. *Drug Deliv.* 2015;22(2):223-9.
40. Chen-yu G, Chun-fen Y, Qi-lu L, Qi T, Yan-wei X, Wei-na L, et al. Development of a quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. *Int J Pharm.* 2012;430(1-2):292-8.
41. Luan JJ, Zheng F, Yang XY, Yu AH, Zhai GX. Nanostructured lipid carriers for oral delivery of baicalin: In vitro and in vivo evaluation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015;466:154-9.
42. Schwarz C, Mehnert W, Lucks J, Müller R. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J Control Release.* 1994;30(1):83-96.
43. Morel S, Ugazio E, Cavalli R, Gasco MR. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 1996;132(1):259-61.
44. Bunjes H, Westesen K, Koch MH. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int J Pharm.* 1996;129(1):159-73.
45. Pardeike J, Hommoss A, Muller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int J Pharm.* 2009;366(1-2):170-84.
46. Weber S, Zimmer A, Pardeike J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86(1):7-22.
47. Wissing SA, Kayser O, Muller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(9):1257-72.
48. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(2-3):165-96.
49. Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J, Nasirpour A. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2013;19:29-43.

50. Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:131-55.
51. Muller RH, Radtke M, Wissing SA. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int J Pharm.* 2002;242(1-2):121-8.
52. Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Muller RH, Keck CM. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. *Int J Pharm.* 2011;406(1-2):163-72.
53. Muller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(1):3-19.
54. Gasco MR. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, U.S. Patent No. 5,250,236. Washington, DC: U.S; Patent and Trademark Office; 1993.
55. Fadda P, Monduzzi M, Caboi F, Piras S, Lazzari P. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: Influence of microemulsion microstructure. *Int J Pharm.* 2013;446(1-2):166-75.
56. Tiwari R, Pathak K. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int J Pharm.* 2011;415(1-2):232-43.
57. Silva AC, Gonzalez-Mira E, Garcia ML, Egea MA, Fonseca J, Silva R, et al. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;86(1):158-65.
58. Iscan Y, Hekimoglu S, Sargon MF, Hincal AA. DEET-loaded solid lipid particles for skin delivery: In vitro release and skin permeation characteristics in different vehicles. *J Microencapsul.* 2006;23(3):315-27.
59. Anwar IT, Hekimoğlu, S. Effect of Oil/Fat Ratio on the Physicochemical Properties of Nanostructured Lipid Carriers Containing Salicylic Acid. 15th International Pharmaceutical Technology Symposium; Sep 2010; Antalya, Turkey.
60. Lakshmi P, Kumar GA. Nanosuspension technology: A review. *Int J Pharm Sci.* 2010;2(4):35-40.
61. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials.* 2003;24(23):4283-300.
62. Obeidat WM, Schwabe K, Muller RH, Keck CM. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;76(1):56-67.
63. Kaszuba M, Connah MT. Protein and nanoparticle characterisation using light scattering techniques. Part Part Syst Charact. 2006;23(2):193-6.
64. Keck CM, Muller RH. Size analysis of submicron particles by laser diffractometry-90% of the published measurements are false. *Int J Pharm.* 2008;355(1-2):150-63.

65. Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(1):161-77.
66. Wissing SA, Muller RH. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J Control Release.* 2002;81(3):225-33.
67. Xu RL. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology.* 2008;6(2):112-5.
68. Choi SH, Jin SE, Lee MK, Lim SJ, Park JS, Kim BG, et al. Novel cationic solid lipid nanoparticles enhanced p53 gene transfer to lung cancer cells. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68(3):545-54.
69. Lim SJ, Kim CK. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int J Pharm.* 2002;243(1-2):135-46.
70. Giron D. Applications of thermal analysis and coupled techniques in pharmaceutical industry. *J Therm Anal Calorim.* 2002;68(2):335-57.
71. Bunjes H, Koch MHJ, Westesen K. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir.* 2000;16(12):5234-41.
72. Ali H, Shirode AB, Sylvester PW, Nazzal S. Preparation, characterization, and anticancer effects of simvastatin-tocotrienol lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2010;389(1-2):223-31.
73. Suryanarayan R. X-ray powder diffractometry. Brittain HG, editor. *Physical characterization of pharmaceutical solids.* New York: Marcel Dekker; 1995.
74. Ribeiro de Souza AL, Andreani T, Nunes FM, Cassimiro DL, De Almeida AE, Ribeiro CA, et al. Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles. Studies by DSC and SAXS. *J Therm Anal Calorim.* 2012;108(1):353-60.
75. Chen Y, Yang X, Zhao L, Almásy L, Garamus VM, Willumeit R, et al. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2014;455:36-43.
76. Bugay DE. Characterization of the solid-state: spectroscopic techniques. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;48(1):43-65.
77. Araujo J, Gonzalez-Mira E, Egea M, Garcia M, Souto E. Optimization and physicochemical characterization of a triamcinolone acetone-loaded NLC for ocular antiangiogenic applications. *Int J Pharm.* 2010;393(1):168-76.
78. Gambhire M, Bhalekar M, Shrivastava B. Bioavailability assessment of simvastatin loaded solid lipid nanoparticles after oral administration. *Asian J Pharm Sci.* 2011;6(6):251-8.
79. Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron.* 2012;43(2-3):85-103.

- 80.** Friedrich H, Frederik PM, De With G, Sommerdijk NA. Imaging of self-assembled structures: interpretation of TEM and cryo-TEM images. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(43):7850-8.
- 81.** Petersen S, Steiniger F, Fischer D, Fahr A, Bunjes H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;79(1):150-61.
- 82.** Domingo C, Saurina J. An overview of the analytical characterization of nanostructured drug delivery systems: towards green and sustainable pharmaceuticals: a review. *Anal Chim Acta.* 2012;744:8-22.
- 83.** Reimer L. Image formation in low-voltage scanning electron microscopy: Vol. 12. SPIE Press; 1993.
- 84.** Martini S, Herrera ML. Physical properties of shortenings with low- trans fatty acids as affected by emulsifiers and storage conditions. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2008;110(2):172-82.
- 85.** Freitas C, Müller R. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999;47(2):125-32.
- 86.** Schafer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(6):427-43.
- 87.** Tsai MJ, Wu PC, Huang YB, Chang JS, Lin CL, Tsai YH, et al. Baicalein loaded in tocol nanostructured lipid carriers (tocol NLCs) for enhanced stability and brain targeting. *Int J Pharm.* 2012;423(2):461-70.
- 88.** Andrade LM, Fatima Reis C, Maione-Silva L, Anjos JL, Alonso A, Serpa RC, et al. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(1):40-7.
- 89.** Junyaprasert VB, Teeranachaideekul V, Souto EB, Boonme P, Muller RH. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and in vitro skin permeation. *Int J Pharm.* 2009;377(1-2):207-14.
- 90.** Souto EB, Gohla SH, Muller RH. Rheology of nanostructured lipid carriers (NLC) suspended in a viscoelastic medium. *Pharmazie.* 2005;60(9):671-3.
- 91.** Lippacher A, Muller RH, Mader K. Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: rheological characterization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(3):561-7.
- 92.** Yang Y, Corona A, Schubert B, Reeder R, Henson MA. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. *J Colloid Interface Sci.* 2014;418:261-72.
- 93.** Yang Y, Corona A, Bhatia SR, Henson MA. The controlled aggregation and tunable viscosity of nanostructured lipid carrier dispersions. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2015;482:138-47.

- 94.** Das S, Ng WK, Tan RB. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(1):139-51.
- 95.** Yuan H, Wang LL, Du YZ, You J, Hu FQ, Zeng S. Preparation and characteristics of nanostructured lipid carriers for control-releasing progesterone by melt-emulsification. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2007;60(2):174-9.
- 96.** Liu D, Liu Z, Wang L, Zhang C, Zhang N. Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;85(2):262-9.
- 97.** Huang X, Chen YJ, Peng DY, Li QL, Wang XS, Wang DL, et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for Gambogic acid. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;102:391-7.
- 98.** Liu CH, Wu CT. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2010;353(2):149-56.
- 99.** Vitorino C, Almeida A, Sousa J, Lamarche I, Gobin P, Marchand S, et al. Passive and active strategies for transdermal delivery using co-encapsulating nanostructured lipid carriers: in vitro vs. in vivo studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;86(2):133-44.
- 100.** Ricci M, Puglia C, Bonina F, Di Giovanni C, Giovagnoli S, Rossi C. Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): in vitro and in vivo studies. *J Pharm Sci.* 2005;94(5):1149-59.
- 101.** Benson H, Mohammed Y, Grice J, Roberts M. Formulation Effects on Topical Nanoparticle Penetration. Hamblin MR, Avci P, Prow TW, editors. *Nanoscience in Dermatology.* Elsevier Health Sciences; 2016.
- 102.** Selvamuthukumar S, Velmurugan R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids Health Dis.* 2012;11(1):159.
- 103.** Zur Mühlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—drug release and release mechanism. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;45(2):149-55.
- 104.** Uner M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie.* 2006;61(5):375-86.
- 105.** Joshi MD, Müller RH. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009;71(2):161-72.
- 106.** Das S, Chaudhury A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(1):62-76.
- 107.** Luo Y, Chen D, Ren L, Zhao X, Qin J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J Control Release.* 2006;114(1):53-9.
- 108.** Hu L, Jia H, Luo Z, Liu C, Xing Q. Improvement of digoxin oral absorption in rabbits by incorporation into solid lipid nanoparticles. *Pharmazie.* 2010;65(2):110-3.

- 109.** Tsai MJ, Huang YB, Wu PC, Fu YS, Kao YR, Fang JY, et al. Oral apomorphine delivery from solid lipid nanoparticles with different monostearate emulsifiers: pharmacokinetic and behavioral evaluations. *J Pharm Sci* 2011;100(2):547-57.
- 110.** Araújo J, Gonzalez E, Egea MA, Garcia ML, Souto EB. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine*. 2009;5(4):394-401.
- 111.** Ludwig A, Unlu N, Van Ooteghem M. Evaluation of viscous ophthalmic vehicles containing carbomer by slit-lamp fluorophotometry in humans. *Int J Pharm*. 1990;61(1-2):15-25.
- 112.** Gonzalez-Mira E, Egea M, Souto E, Calpena A, Garcia M. Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology*. 2010;22(4):045101.
- 113.** Attama AA, Reichl S, Müller-Goymann CC. Diclofenac sodium delivery to the eye: in vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int J Pharm*. 2008;355(1):307-13.
- 114.** Wissing S, Lippacher A, Muller R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci*. 2001;52(5):313-24.
- 115.** Wissing S, Müller R. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *Int J Pharm*. 2002;242(1):377-9.
- 116.** Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Muller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm*. 2004;278(1):71-7.
- 117.** Teeranachaikeekul V, Boonme P, Souto EB, Müller RH, Junyaprasert VB. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of nile red-loaded NLC. *J Control Release*. 2008;128(2):134-41.
- 118.** Müller RH, Wissing S, Mäder K. UV radiation reflecting or absorbing agents, protecting against harmful UV radiation and reinforcing the natural skin barrier. U.S. Patent No. 6,814,959. Washington, DC: U.S; Patent and Trademark Office; 2004.
- 119.** Puglia C, Damiani E, Offerta A, Rizza L, Tirendi GG, Tarico MS, et al. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: characterization, in vitro penetration and photostability studies. *Eur J Pharm Sci*. 2014;51:211-7.
- 120.** Muller RH, Petersen RD, Hommoss A, Pardeike J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(6):522-30.
- 121.** Müller RH, Staufenbiel S, Keck CM. Lipid Nanoparticles (SLN, NLC) for innovative consumer care & household products. *Househ Personal Care*. 2014;9(2):18-25.
- 122.** Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
- 123.** Gentile P, Nandagiri VK, Daly J, Chiono V, Mattu C, Tonda-Turo C, et al. Localised controlled release of simvastatin from porous chitosan-gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;59:249-57.

- 124.** Karri VV, Kuppusamy G, Talluri SV, Mannemala SS, Kollipara R, Wadhvani AD, et al. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2016;93:1519-29.
- 125.** Mahmoud AA, Salama AH. Norfloxacin-loaded collagen/chitosan scaffolds for skin reconstruction: Preparation, evaluation and in-vivo wound healing assessment. *Eur J Pharm Sci.* 2016;83:155-65.
- 126.** Zhu N, Chen X. Biofabrication of tissue scaffolds. Pignatello R, editor. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications.* Rijeka: InTech; 2013.
- 127.** Zhong SP, Zhang YZ, Lim CT. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2(5):510-25.
- 128.** Kundu J, Pati F, Hun Jeong Y, Cho DW. Biomaterials for biofabrication of 3D tissue scaffolds. Forgacs G, Sun W, editors. *Biofabrication.* Elsevier; 2013.
- 129.** Lee HB, Khang G, Lee JH. Polymeric biomaterials. Wong J, Bronzino J, Peterson D, editors. *Biomaterials.* Boca Raton: CRC Press; 2003.
- 130.** Mao J, Duan S, Song A, Cai Q, Deng X, Yang X. Macroporous and nanofibrous poly(lactide-co-glycolide)(50/50) scaffolds via phase separation combined with particle-leaching. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2012;32(6):1407-14.
- 131.** Garg T, Singh O, Arora S, Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2012;29(1):1-63.
- 132.** Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 2001;221(1-2):1-22.
- 133.** Jacques PF. Wound Dressing Techniques. Dehn RW, Asprey DP, editors. *Essential Clinical Procedures E-Book.* Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2013.
- 134.** Wong VW, Rustad KC, Galvez MG, Neofytou E, Glotzbach JP, Januszyk M, et al. Engineered pullulan-collagen composite dermal hydrogels improve early cutaneous wound healing. *Tissue Eng Part A.* 2011;17(5-6):631-44.
- 135.** Ahmed S, Ikram S. Chitosan based scaffolds and their applications in wound healing. *Achiev Life Sci.* 2016;10(1):27-37.
- 136.** Patrulea V, Ostafe V, Borchard G, Jordan O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;97:417-26.
- 137.** Ji C, Shi J. Thermal-crosslinked porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(7):3780-5.
- 138.** Tchemtchoua VT, Atanasova G, Aqil A, Filee P, Garbacki N, Vanhooteghem O, et al. Development of a chitosan nanofibrillar scaffold for skin repair and regeneration. *Biomacromolecules.* 2011;12(9):3194-204.

- 139.** Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3640-8.
- 140.** Ninan N, Muthiah M, Park IK, Elain A, Thomas S, Grohens Y. Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2013;98(1):877-85.
- 141.** Ninan N, Muthiah M, Park IK, Kalarikkal N, Elain A, Wong TW, et al. Wound healing analysis of pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose based composite scaffolds. *Mater Lett.* 2014;132:34-7.
- 142.** Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R, Winslow DN, et al. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymers-Basel.* 1994;5:1068-77.
- 143.** Lee SB, Kim YH, Chong MS, Hong SH, Lee YM. Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials.* 2005;26(14):1961-8.
- 144.** Ji CD, Annabi N, Hosseinkhani M, Sivaloganathan S, Dehghani F. Fabrication of poly-(DL)-lactide/polyethylene glycol scaffolds using the gas foaming technique. *Acta Biomater.* 2012;8(2):570-8.
- 145.** Di Maio E, Mensitieri G, Iannace S, Nicolais L, Li W, Flumerfelt RW. Structure optimization of polycaprolactone foams by using mixtures of CO₂ and N₂ as blowing agents. *Polym Eng Sci.* 2005;45(3):432-41.
- 146.** Lim YM, Gwon HJ, Shin J, Jeun JP, Nho YC. Preparation of porous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds by gas foaming process and in vitro/in vivo degradation behavior using gamma-ray irradiation. *J Ind Eng Chem.* 2008;14(4):436-41.
- 147.** Thomson RC, Wake MC, Yaszemski MJ, Mikos AG. Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Adv Polym Sci.* 1995;122:245-74.
- 148.** Liu X, Ma PX. Phase separation, pore structure, and properties of nanofibrous gelatin scaffolds. *Biomaterials.* 2009;30(25):4094-103.
- 149.** Rezabeigi E, Wood-Adams PM, Drew RAL. Production of porous polylactic acid monoliths via nonsolvent induced phase separation. *Polymer.* 2014;55(26):6743-53.
- 150.** Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv.* 2010;28(3):325-47.
- 151.** Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng.* 2006;12(5):1197-211.
- 152.** Ying Yang IW. Image analysis and quantification of tissue scaffolds. Tomlins P, editor. *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds.* Elsevier Science; 2015.
- 153.** Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int J Polym Sci.* 2011;2011.
- 154.** Luo Y, Engelman G, Auguste DT, Ferreira LS, Karp JM, Saigal R, et al. 3D Scaffolds. Vacanti JP, editor. *Principles of tissue engineering.* Academic press; 2014.

- 155.** Yannas I, Lee E, Orgill DP, Skrabut E, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(3):933-7.
- 156.** Brauker JH, Carr- Brendel VE, Martinson LA, Crudele J, Johnston WD, Johnson RC. Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture. *J Biomed Mater Res A*. 1995;29(12):1517-24.
- 157.** Whang K, Healy K, Elenz D, Nam E, Tsai D, Thomas C, et al. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng*. 1999;5(1):35-51.
- 158.** Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 2001;7(6):679-89.
- 159.** Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013;19(6):485-502.
- 160.** Ye WP, Du FS, Jin WH, Yang JY, Xu Y. In vitro degradation of poly (caprolactone), poly (lactide) and their block copolymers: influence of composition, temperature and morphology. *React Funct Polym*. 1997;32(2):161-8.
- 161.** Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(26):4833-41.
- 162.** Kaur K, Singh K, Anand V, Bhatia G, Kaur R, Kaur M, et al. Scaffolds of hydroxyl apatite nanoparticles disseminated in 1, 6-diisocyanatohexane-extended poly (1, 4-butylene succinate)/poly (methyl methacrylate) for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:780-90.
- 163.** Chen DC, Lai YL, Lee SY, Hung SL, Chen HL. Osteoblastic response to collagen scaffolds varied in freezing temperature and glutaraldehyde crosslinking. *J Biomed Mater Res A*. 2007;80(2):399-409.
- 164.** Han F, Dong Y, Su Z, Yin R, Song A, Li S. Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin–chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *Int J Pharm*. 2014;476(1):124-33.
- 165.** Mahmood SK, Zakaria MZAB, Razak ISBA, Yusof LM, Jaji AZ, Tijani I, et al. Preparation and characterization of cockle shell aragonite nanocomposite porous 3D scaffolds for bone repair. *Biochem Biophys Rep*. 2017;10:237-51.
- 166.** Archana D, Upadhyay L, Tewari R, Dutta J, Huang Y, Dutta P. Chitosan-pectin-alginate as a novel scaffold for tissue engineering applications. *Indian J Biotechnol*. 2013;12:475–82.
- 167.** Tan HB, Wang FY, Ding W, Zhang Y, Ding J, Cai DX, et al. Fabrication and Evaluation of Porous Keratin/chitosan (KCS) Scaffolds for Effectively Accelerating Wound Healing. *Biomed Environ Sci*. 2015;28(3):178-89.
- 168.** Dado D, Levenberg S, Cell–scaffold mechanical interplay within engineered tissue. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(6):656-64.

- 169.** Tan X, Tan Y, Chow C, Tor S, Yeong W. Metallic powder-bed based 3D printing of cellular scaffolds for orthopaedic implants: A state-of-the-art review on manufacturing, topological design, mechanical properties and biocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;76:1328-43.
- 170.** Ramezanifard R, Seyedjafari E, Ardeshiryajimi A, Soleimani M. Biomimetic scaffolds containing nanofibers coated with willemite nanoparticles for improvement of stem cell osteogenesis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;62:398-406.
- 171.** Davidenko N, Campbell JJ, Thian ES, Watson CJ, Cameron RE. Collagen-hyaluronic acid scaffolds for adipose tissue engineering. *Acta Biomater.* 2010;6(10):3957-68.
- 172.** Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *J Invest Dermatol.* 2007;127(5):1018-29.
- 173.** Veleirinho B, Coelho DS, Dias PF, Maraschin M, Ribeiro-do-Valle RM, Lopes-da-Silva JA. Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. *Int J Biol Macromol.* 2012;51(4):343-50.
- 174.** Dvir T, Timko BP, Kohane DS, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol.* 2011;6(1):13-22.
- 175.** Yildirimer L, Thanh NTK, Seifalian AM. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. *Trends Biotechnol.* 2012;30(12):638-48.
- 176.** Chung HJ, Park TG. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(4-5):249-62.
- 177.** Yoon JJ, Kim JH, Park TG. Dexamethasone-releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas-foaming/salt-leaching method. *Biomaterials.* 2003;24(13):2323-9.
- 178.** Ninan N, Muthiah M, Bt Yahaya NA, Park IK, Elain A, Wong TW, et al. Antibacterial and wound healing analysis of gelatin/zeolite scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014;115:244-52.
- 179.** Clark RAF. *The molecular and cellular biology of wound repair.* 2nd ed. New York: Springer Science & Business Media; 1996.
- 180.** Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release.* 2000;64(1-3):91-102.
- 181.** Losi P, Briganti E, Errico C, Lisella A, Sanguinetti E, Chiellini F, et al. Fibrin-based scaffold incorporating VEGF- and bFGF-loaded nanoparticles stimulates wound healing in diabetic mice. *Acta Biomater.* 2013;9(8):7814-21.
- 182.** Wang W, Lin S, Xiao Y, Huang Y, Tan Y, Cai L, et al. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sci.* 2008;82(3-4):190-204.
- 183.** Ruys AJ. *Biomimetic Biomaterials: Structure and Applications.* Amsterdam: Elsevier Science; 2013.

- 184.** Perumal S, Ramadass S, Madhan B. Sol-gel processed mupirocin silica microspheres loaded collagen scaffold: a synergistic bio-composite for wound healing. *Eur J Pharm Sci.* 2014;52:26-33.
- 185.** Morimoto N, Takemoto S, Kawazoe T, Suzuki S. Nicotine at a low concentration promotes wound healing. *J Surg Res.* 2008;145(2):199-204.
- 186.** Liem PH, Morimoto N, Ito R, Kawai K, Suzuki S. Treating a collagen scaffold with a low concentration of nicotine promoted angiogenesis and wound healing. *J Surg Res.* 2013;182(2):353-61.
- 187.** Wong VW, Gurtner GC. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. *Exp Dermatol.* 2012;21(10):729-34.
- 188.** Chen JS, Wong VW, Gurtner GC. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. *Front Immunol.* 2012;3:192.
- 189.** Shen T, Pan ZG, Zhou X, Hong CY. Accelerated healing of diabetic wound using artificial dermis constructed with adipose stem cells and poly (L-glutamic acid)/chitosan scaffold. *Chin Med J.* 2013;126(8):1498-503.
- 190.** Pasha MK, Muzeeb S, Basha SJ, Shashikumar D, Mullangi R, Srinivas NR. Analysis of five HMG-CoA reductase inhibitors atorvastatin, lovastatin, pravastatin, rosuvastatin and simvastatin: pharmacological, pharmacokinetic and analytical overview and development of a new method for use in pharmaceutical formulations analysis and in vitro metabolism studies. *Biomed Chromatogr.* 2006;20(3):282-93.
- 191.** Brookes Z, McGown C, Reilly C. Statins for all: the new premed?. *Br J Anaesth.* 2009;103(1):99-107.
- 192.** Stancu C, Sima A. Statins: mechanism of action and effects. *J Cell Mol Med.* 2001;5(4):378-87.
- 193.** Moffat AC, Osselton D, Widdop B, Clarke EGC. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: In Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem Material. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2011.
- 194.** United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia (USP 31-NF 26). Rockville: United States Pharmacopeial Convention Incorporated; 2007.
- 195.** O'Neil MJ. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13th ed. New Jersey: Merck; 2001.
- 196.** Plosker GL, McTavish D. Simvastatin. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy in hypercholesterolaemia. *Drugs.* 1995;50(2):334-63.
- 197.** Garcia MJ, Reinoso RF, Sanchez Navarro A, Prous JR. Clinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003;25(6):457-81.
- 198.** Zhang YZ, Zhang JH, Jiang TY, Wang SL. Inclusion of the poorly water-soluble drug simvastatin in mesocellular foam nanoparticles: Drug loading and release properties. *Int J Pharm.* 2011;410(1-2):118-24.

- 199.** Harisa GI, Alomrani AH, Badran MM. Simvastatin-loaded nanostructured lipid carriers attenuate the atherogenic risk of erythrocytes in hyperlipidemic rats. *Eur J Pharm Sci.* 2017;96:62-71.
- 200.** Zhang ZW, Bu HH, Gao ZW, Huang Y, Gao F, Li YP. The characteristics and mechanism of simvastatin loaded lipid nanoparticles to increase oral bioavailability in rats. *Int J Pharm.* 2010;394(1-2):147-53.
- 201.** Imanparast F, Faramarzi MA, Vatannejad A, Paknejad M, Deiham B, Kobarfard F, et al. mZD7349 peptide-conjugated PLGA nanoparticles directed against VCAM-1 for targeted delivery of simvastatin to restore dysfunctional HUVECs. *Microvasc Res.* 2017;112:14-9.
- 202.** Eroglu H, Nemutlu E, Turkoglu OF, Nacar O, Bodur E, Sargon MF, et al. A quadruped study on chitosan microspheres containing atorvastatin calcium: preparation, characterization, quantification and in-vivo application. *Chem Pharm Bull.* 2010;58(9):1161-7.
- 203.** Vitorino C, Almeida J, Goncalves LM, Almeida AJ, Sousa JJ, Pais AA. Co-encapsulating nanostructured lipid carriers for transdermal application: From experimental design to the molecular detail. *J Control Release.* 2013;167(3):301-14.
- 204.** Das S, Ng WK, Kanaujia P, Kim S, Tan RB. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2011;88(1):483-9.
- 205.** Shah M, Chuttani K, Mishra AK, Pathak K. Oral solid compritol 888 ATO nanosuspension of simvastatin: optimization and biodistribution studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011;37(5):526-37.
- 206.** Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med.* 1954;99(2):167-82.
- 207.** Harisa GI, Badran MM. Simvastatin nanolipid carriers decreased hypercholesterolemia induced cholesterol inclusion and phosphatidylserine exposure on human erythrocytes. *J Mol Liq.* 2015;208:202-10.
- 208.** Haaparanta AM, Jarvinen E, Cengiz IF, Ella V, Kokkonen HT, Kiviranta I, et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(4):1129-36.
- 209.** Shokrgozar MA, Fattahi M, Bonakdar S, Ragerdi Kashani I, Majidi M, Haghighipour N, et al. Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration. *Iran Biomed J.* 2012;16(2):68-76.
- 210.** Nandagiri VK, Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Matsiko A, Ramtoola Z, et al. Incorporation of PLGA nanoparticles into porous chitosan–gelatin scaffolds: influence on the physical properties and cell behavior. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011;4(7):1318-27.
- 211.** Alizadeh M, Abbasi F, Khoshfetrat A, Ghaleh H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(7):3958-67.

- 212.** Liu P, Deng Z, Han S, Liu T, Wen N, Lu W, et al. Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. *Artif Organs*. 2008;32(12):925-31.
- 213.** Lin HR, Chen KS, Chen SC, Lee CH, Chiou SH, Chang TL, et al. Attachment of stem cells on porous chitosan scaffold crosslinked by Na₅P₃O₁₀. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2007;27(2):280-4.
- 214.** Shimojo A, Perez A, Galdames S, Brissac I, Santana M. Stabilization of porous chitosan improves the performance of its association with platelet-rich plasma as a composite scaffold. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;60:538-46.
- 215.** Santamaría VA, Deplaine H, Mariggió D, Villanueva-Molines A, García-Aznar J, Ribelles JG, et al. Influence of the macro and micro-porous structure on the mechanical behavior of poly (l-lactic acid) scaffolds. *J Non Cryst Solids*. 2012;358(23):3141-9.
- 216.** Yang B, Li X, Shi S, Kong X, Guo G, Huang M, et al. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydr Polym*. 2010;80(3):860-5.
- 217.** Farokhi M, Mottaghitalab F, Ai J, Shokrgozar MA. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *Int J Pharm*. 2013;454(1):216-25.
- 218.** Yao Q, Li W, Yu S, Ma L, Jin D, Boccaccini AR, et al. Multifunctional chitosan/polyvinyl pyrrolidone/45S5 Bioglass scaffolds for MC3T3-E1 cell stimulation and drug release. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;56:473-80.
- 219.** Asai J, Takenaka H, Hirakawa S, Sakabe J, Hagura A, Kishimoto S, et al. Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis. *Am J Pathol*. 2012;181(6):2217-24.
- 220.** Adami M, Prudente Ada S, Mendes DA, Horinouchi CD, Cabrini DA, Otuki MF. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions. *J Dermatol Sci*. 2012;66(2):127-35.
- 221.** Özeç I, Kiliç E, Gümüş C, Göze F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *J Craniofac Surg*. 2007;18(3):546-50.
- 222.** Bae MS, Yang DH, Lee JB, Heo DN, Kwon YD, Youn IC, et al. Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing simvastatin as a bone tissue regeneration scaffold. *Biomaterials*. 2011;32(32):8161-71.
- 223.** Assaf K, Duek EAR, Oliveira NM. Efficacy of a combination of simvastatin and poly (DL-lactic-co-glycolic acid) in stimulating the regeneration of bone defects. *Mat Res*. 2013;16(1):215-20.
- 224.** Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjoui Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;93(2):228-34.
- 225.** Salem H, Ciba R, Rapoport DH, Egana JT, Reithmayer K, Kadry M, et al. The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold based skin regeneration. *Biomaterials*. 2009;30(5):789-96.

- 226.** Muntean AT-V. Analysis of drug related impurities by infrared spectrometry in the class of statins. *Analysis*. 2013;61:6.
- 227.** Mahmoud H, Al-Suwayeh S, Elkadi S. Design and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery systems of simvastatin aiming dissolution enhancement. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2013;7(22):1482-500.
- 228.** Srinivas C, Mohd AB, Huidrom S, Rao A, Diwan PV. Development and validation of simvastatin in microemulsion formulation using RP-HPLC. *Inter J Pharm Pharma Sci*. 2012;4:1-6.
- 229.** Padhye SG, Nagarsenker MS. Simvastatin Solid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery: Formulation Development and In vivo Evaluation. *Indian J Pharm Sci*. 2013;75(5):591-8.
- 230.** Mitri K, Shegokar R, Gohla S, Anselmi C, Muller RH. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *Int J Pharm*. 2011;414(1-2):267-75.
- 231.** Jennings V, Thünemann AF, Gohla SH. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm*. 2000;199(2):167-77.
- 232.** Awad TS, Helgason T, Weiss J, Decker EA, McClements DJ. Effect of omega-3 fatty acids on crystallization, polymorphic transformation and stability of tripalmitin solid lipid nanoparticle suspensions. *Cryst Growth Des*. 2009;9(8):3405-11.
- 233.** Octadecanoic acid, diester with 1,2,3-propanetriol [Internet]. 2010 [Erişim Tarihi 5 Eylül 2017]. Erişim adresi: <http://www.guidechem.com/cas-132/1323-83-7.html>
- 234.** 2-linoleoylglycerol [Internet]. 2015 [Erişim Tarihi 5 Eylül 2017]. Erişim adresi: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4517636.html>
- 235.** Oleic acid [Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 5 Eylül 2017]. Erişim adresi: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7228241.htm
- 236.** Polysorbate 80 [Internet]. 2017 [Erişim tarihi 5 Eylül 2017]. Erişim adresi: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polysorbate8012345900565611?lang=en®ion=TR>
- 237.** Lecithin [Internet]. 2017 [Erişim Tarihi 5 Eylül 2017]. Erişim adresi: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1242041.htm.
- 238.** United States Pharmacopeial Convention. The Dissolution Procedure: Development and Validation. The United States Pharmacopeia (USP 30-NF 25). Rockville: United States Pharmacopeial Convention Incorporated; 2006.
- 239.** Alvarez-Lueje A, Valenzuela C, Squella JA, Nunez-Vergara LJ. Stability study of simvastatin under hydrolytic conditions assessed by liquid chromatography. *J AOAC Int*. 2005;88(6):1631-6.
- 240.** Xia D, Shrestha N, Van de Streek J, Mu H, Yang M. Spray drying of fenofibrate loaded nanostructured lipid carriers. *Asian J Pharm Sci*. 2016;11(4):507-15.

- 241.** Varshosaz J, Eskandari S, Tabbakhian M. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. *Carbohydr Polym.* 2012;88(4):1157-63.
- 242.** O'Brien FJ, Harley B, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26(4):433-41.
- 243.** Ge J, Guo L, Wang S, Zhang Y, Cai T, Zhao RC, et al. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev.* 2014;10(2):295-303.
- 244.** Atila D, Keskin D, Tezcaner A. Cellulose acetate based 3-dimensional electrospun scaffolds for skin tissue engineering applications. *Carbohydr Polym.* 2015;133:251-61.
- 245.** Powell HM, Boyce ST. Fiber density of electrospun gelatin scaffolds regulates morphogenesis of dermal-epidermal skin substitutes. *J Biomed Mater Res A.* 2008;84(4):1078-86.
- 246.** Tan H, Wu J, Lao L, Gao C. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009;5(1):328-37.
- 247.** Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, Stegemann A, Schatz S, Treiber N, et al. TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *J Invest Dermatol.* 2014;134(2):526-37.
- 248.** Louneva N, Huaman G, Fertala J, Jimenez SA. Inhibition of systemic sclerosis dermal fibroblast type I collagen production and gene expression by simvastatin. *Arthritis Rheum.* 2006;54(4):1298-308.
- 249.** Xu H, Yang YJ, Yang T, Qian HY. Statins and stem cell modulation. *Ageing Res Rev.* 2013;12(1):1-7.
- 250.** Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, LeRoux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(2):142-9.
- 251.** Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells.* 2007;25(10):2648-59.
- 252.** Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet.* 2005;366(9498):1719-24.
- 253.** Noor S, Zubair M, Ahmad J. Diabetic foot ulcer-A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. *Diabetes Metab Syndr.* 2015;9(3):192-9.
- 254.** Rinkel WD, Luiten J, van Dongen J, Kuppens B, Van Neck JW, Polinder S, et al. In-hospital costs of diabetic foot disease treated by a multidisciplinary foot team. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017.
- 255.** Turner NJ, Badylak SF. The use of biologic scaffolds in the treatment of chronic nonhealing wounds. *Adv Wound Care.* 2015;4(8):490-500.
- 256.** Liu J ZH, Dai X, Sun S, Machens HG, Schilling AF. Biomaterials for Promoting Wound Healing in Diabetes. *J Tissue Sci Eng.* 2017;8(1):193.

- 257.** Rezvanian M, Amin MCIM, Ng SF. Development and physicochemical characterization of alginate composite film loaded with simvastatin as a potential wound dressing. *Carbohydr Polym.* 2016;137:295-304.
- 258.** Muller RH, Runge S, Ravelli V, Mehnert W, Thunemann AF, Souto EB. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *Int J Pharm.* 2006;317(1):82-9.
- 259.** Gainza G, Pastor M, Aguirre JJ, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, et al. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. *J Control Release.* 2014;185:51-61.
- 260.** Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rossig L, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res.* 2003;92(9):1049-55.
- 261.** Henrich D, Seebach C, Wilhelm K, Marzi I. High dosage of simvastatin reduces TNF-alpha-induced apoptosis of endothelial progenitor cells but fails to prevent apoptosis induced by IL-1beta in vitro. *J Surg Res.* 2007;142(1):13-9.
- 262.** Park JB. Combination of simvastatin and bone morphogenetic protein-2 enhances the differentiation of osteoblasts by regulating the expression of phospho-Smad1/5/8. *Exp Ther Med.* 2012;4(2):303-6.
- 263.** Xu J, Liu XF, Chen JL, Zacharek A, Cui X, Savant-Bhonsale S, et al. Simvastatin enhances bone marrow stromal cell differentiation into endothelial cells via notch signaling pathway. *Am J Physiol Cell Ph.* 2009;296(3):535-43.
- 264.** DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol.* 2013;4(201.10):3389.
- 265.** Yang RH, Xie JL, Shu B, Liu XS, Chen XD, Ruan SB, et al. An improved method for the isolation and culture of rat epidermal stem cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(11):2529-34.
- 266.** Uzarska M, Porowinska D, Bajek A, Drewa T. Epidermal stem cells biology and potential applications in regenerative medicine. *Postepy Biochem.* 2013;59(2):219-27.
- 267.** Ma PX, Choi JW. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.* 2001;7(1):23-33.
- 268.** Kang BK, Lee JS, Chon SK, Jeong SY, Yuk SH, Khang G, et al. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *Int J Pharm.* 2004;274(1):65-73.
- 269.** Patil-Gadhe A, Pokharkar V. Montelukast-loaded nanostructured lipid carriers: part I oral bioavailability improvement. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(1):160-8.
- 270.** Doktorovová S, Araújo J, Garcia ML, Rakovský E, Souto EB. Formulating fluticasone propionate in novel PEG-containing nanostructured lipid carriers (PEG-NLC). *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75(2):538-42.

- 271.** Pardeike J, Weber S, Zarfl HP, Pagitz M, Zimmer A. Itraconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary treatment of aspergillosis in falcons. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;108:269-76.
- 272.** Saupe A, Wissing SA, Lenk A, Schmidt C, Muller RH. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) structural investigations on two different carrier systems. *Biomed Mater Eng.* 2005;15(5):393-402.
- 273.** Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Xu H, Yang X. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int J Pharm.* 2007;328(2):191-5.
- 274.** Fang J-Y, Fang C-L, Liu C-H, Su Y-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(2):633-40.
- 275.** Puglia C, Blasi P, Rizza L, Schoubben A, Bonina F, Rossi C, et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation. *Int J Pharm.* 2008;357(1):295-304.
- 276.** Prow TW, Grice JE, Lin LL, Faye R, Butler M, Becker W, et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):470-91.
- 277.** Campbell CS, Contreras-Rojas LR, Delgado-Charro MB, Guy RH. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. *J Control Release.* 2012;162(1):201-7.
- 278.** Lv W, Zhao S, Yu H, Li N, Garamus VM, Chen Y, et al. Brucea javanica oil-loaded nanostructure lipid carriers (BJO NLCs): Preparation, characterization and in vitro evaluation. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2016;504:312-9.
- 279.** Tetyczka C, Griesbacher M, Absenger-Novak M, Frohlich E, Roblegg E. Development of nanostructured lipid carriers for intraoral delivery of Domperidone. *Int J Pharm.* 2017;526(1-2):188-98.
- 280.** Rodrigues da Silva GH, Ribeiro LNM, Mitsutake H, Guilherme VA, Castro SR, Poppi RJ, et al. Optimised NLC: a nanotechnological approach to improve the anaesthetic effect of bupivacaine. *Int J Pharm.* 2017;529(1-2):253-63.
- 281.** Lason E, Sikora E, Ogonowski J. Influence of process parameters on properties of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) formulation. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(4):773-7.
- 282.** Safwat S, Ishak RAH, Hathout RM, Mortada ND. Nanostructured lipid carriers loaded with simvastatin: effect of PEG/glycerides on characterization, stability, cellular uptake efficiency and in vitro cytotoxicity. *Drug Dev Ind Pharm.* 2017;43(7):1112-25.
- 283.** Pradhan M, Singh D, Murthy SN, Singh MR. Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *Steroids.* 2015;101:56-63.
- 284.** Hejri A, Khosravi A, Gharanjig K, Hejazi M. Optimisation of the formulation of β -carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. *Food Chem.* 2013;141(1):117-23.


- 285.** Jores K, Haberland A, Wartewig S, Mader K, Mehnert W. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and Raman spectroscopy. *Pharm Res.* 2005;22(11):1887-97.
- 286.** Nnamani PO, Hansen S, Windbergs M, Lehr CM. Development of artemether-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for topical application. *Int J Pharm.* 2014;477(1-2):208-17.
- 287.** Elmowafy M, Ibrahim HM, Ahmed MA, Shalaby K, Salama A, Hefesha H. Atorvastatin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs): strategy to overcome oral delivery drawbacks. *Drug Deliv.* 2017;24(1):932-41.
- 288.** Vargas M, Albors A, Chiralt A, González-Martínez C. Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocoll.* 2009;23(2):536-47.
- 289.** Aditya NP, Shim M, Lee I, Lee Y, Im MH, Ko S. Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: in vitro digestion and antiproliferative activity. *J Agric Food Chem.* 2013;61(8):1878-83.
- 290.** Mendes AI, Silva AC, Catita JA, Cerqueira F, Gabriel C, Lopes CM. Miconazole-loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for local delivery to the oral mucosa: improving antifungal activity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;111:755-63.
- 291.** Beloqui A, Solinis MA, Rodriguez-Gascon A, Almeida AJ, Preat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine.* 2016;12(1):143-61.
- 292.** Schwarz JC, Weixelbaum A, Pagitsch E, Löw M, Resch GP, Valenta C. Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *Int J Pharm.* 2012;437(1):83-8.
- 293.** Krieger IM, Dougherty TJ. A mechanism for non-Newtonian flow in suspensions of rigid spheres. *J Rheol.* 1959;3(1):137-52.
- 94.** Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye YQ, Zeng S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm.* 2006;314(1):83-9.
- 295.** Bhaskar K, Krishna Mohan C, Lingam M, Prabhakar Reddy V, Venkateswarlu V, Madhusudan Rao Y. Development of nitrendipine controlled release formulations based on SLN and NLC for topical delivery: in vitro and ex vivo characterization. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008;34(7):719-25.
- 296.** Kishore N, Dhanalekshmi U, Raja M, Bhavani S, Reddy PN. Design and in vitro evaluation of solid-lipid nanoparticle drug delivery for aceclofenac. *J Dispers Sci Technol.* 2012;33(1):96-102.
- 297.** Teeranachaideekul V, Souto EB, Junyaprasert VB, Muller RH. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007;67(1):141-8.
- 298.** Lin WJ, Duh YS. Nanostructured lipid carriers for transdermal delivery of acid labile lansoprazole. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;108:297-303.

- 299.** Souto EB, Muller RH, Gohla S. A novel approach based on lipid nanoparticles (SLN) for topical delivery of alpha-lipoic acid. *J Microencapsul.* 2005;22(6):581-92.
- 300.** Adekogbe I, Ghanem A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26(35):7241-50.
- 301.** Yao C-K, Liao J-D, Chung C-W, Sung W-I, Chang N-J. Porous chitosan scaffold cross-linked by chemical and natural procedure applied to investigate cell regeneration. *Appl Surf Sci.* 2012;262:218-21.
- 302.** Lu B, Wang T, Li Z, Dai F, Lv L, Tang F, et al. Healing of skin wounds with a chitosan-gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. *Int J Biol Macromol.* 2016;82:884-91.
- 303.** Lee CT, Lee YD. Preparation of porous biodegradable poly (lactide-co-glycolide)/hyaluronic acid blend scaffolds: Characterization, in vitro cells culture and degradation behaviors. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(12):1411-20.
- 304.** Ma J, Wang H, He B, Chen J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 2001;22(4):331-6.
- 305.** Lee WF, Chen YJ. Studies on preparation and swelling properties of the N-isopropylacrylamide/chitosan semi- IPN and IPN hydrogels. *J Appl Polym Sci.* 2001;82(10):2487-96.
- 306.** Yang J, Shi G, Bei J, Wang S, Cao Y, Shang Q, et al. Fabrication and surface modification of macroporous poly (L- lactic acid) and poly (L- lactic- co- glycolic acid)(70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(3):438-46.
- 307.** Wan Y, Wu H, Wen D. Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering, 1. Preparation and characterization. *Macromol Biosci.* 2004;4(9):882-90.
- 308.** Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res.* 1980;14(1):65-81.
- 309.** Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26(36):7616-27.
- 310.** Kim H, Kim HW, Suh H. Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2003;24(25):4671-9.
- 311.** Zhou Y, Ni Y, Liu Y, Zeng B, Xu Y, Ge W. The role of simvastatin in the osteogenesis of injectable tissue-engineered bone based on human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 2010;31(20):5325-35.
- 312.** Sukul M, Min YK, Lee SY, Lee BT. Osteogenic potential of simvastatin loaded gelatin-nanofibrillar cellulose- β tricalcium phosphate hydrogel scaffold in critical-sized rat calvarial defect. *Eur Polym J.* 2015;73:308-23.
- 313.** Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008;29(20):2941-53.


- 314.** Natarajan V, Krithica N, Madhan B, Sehgal PK. Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2013;101(4):560-7.
- 315.** Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol.* 2005;76(11):1861-70.
- 316.** Chiellini F, Piras AM, Errico C, Chiellini E. Micro/nanostructured polymeric systems for biomedical and pharmaceutical applications. *Nanomedicine.* 2008;3(3):367-93.
- 317.** Gainza G, Chu WS, Guy RH, Pedraz JL, Hernandez RM, Delgado-Charro B, et al. Development and in vitro evaluation of lipid nanoparticle-based dressings for topical treatment of chronic wounds. *Int J Pharm.* 2015;490(1-2):404-11.
- 318.** Garcia-Orue I, Gainza G, Girbau C, Alonso R, Aguirre JJ, Pedraz JL, et al. LL37 loaded nanostructured lipid carriers (NLC): A new strategy for the topical treatment of chronic wounds. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016.
- 319.** Parashar AK, Kakde D, Chadhar V, Devaliya R, Shrivastav V, Jain U. A review on solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled and targeted delivery of medicinal agents. *Curr Res Pharm Sci.* 2011;2:37-47.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi



DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 02.12.2013
Protokol No. : 2013/68

Proje yürütücüsünün adı soyadı: Prof. Dr. Süeda Hekimoğlu
Projenin başlığı : **Diyabetik Yara Tedavisinde Kullanılmak Üzere Nanopartiküler Statin ve Kök Hücre İçeren Doku İskelelerinin Formülasyonu**
Proje ekibi : Doç. Dr. Hakan Eroğlu, Araş. Gör. Dilara Öztürk, Bio. Meral Tiryaki, Dr. Ferda Pınarlı, Prof. Dr. Tuncay Delibaşı

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Wistar Hannover Rat,
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 12 haftalık, 280- 350 gr

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına karar verildi.

<p>Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI (Kurul Başkanı) <i>(KATILMADI)</i></p> <p>Doç. Dr. Ekrem YETER (Üye) <i>(Signature)</i></p> <p>Ecz. İlhan ÇAYIR (Üye) <i>(Signature)</i></p>	<p>Doç. Dr. Osman YÜKSEL (Başkan Vekili) <i>(Signature)</i></p> <p>Vet. Hek. Başak BOZTOK ÖZGERMEN (Üye) <i>(Signature)</i></p> <p>Ecz. Mine BARUT (Üye) <i>(Signature)</i></p>
---	---

İrfan Baştuğ Caddesi No:12 Dışkapı-Altındağ/ANKARA • Telefon: 0 312 596 20 00 • Faks: 0 312 318 66 90 • www.diskapieah.gov.tr

EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

Journal of Drug Delivery Science and Technology 41 (2017) 280–292



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

Formulation and characterization of tissue scaffolds containing simvastatin loaded nanostructured lipid carriers for treatment of diabetic wounds



Dilara Orgul, Hakan Eroglu, Sueda Hekimoğlu*

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Sıhhiye, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2017

Received in revised form

18 July 2017

Accepted 4 August 2017

Available online 7 August 2017

Keywords:

Simvastatin

Nanostructured lipid carrier

NLC

Tissue scaffold

Wound healing

Diabetic wound

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to develop novel three-dimensional (3D) and biodegradable tissue scaffolds (TSs), consisting of biological polymers and simvastatin (SV)-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for the treatment of diabetic wounds. NLCs were prepared via high-shear homogenization and freeze-drying was used for NLC-incorporated TSs. The resulting NLC suspension contained spherical nanosized (110–158 nm) homogeneous particles (PDI < 0.16) with >99% encapsulation efficiency. The NLCs were characterized via differential scanning calorimetry and Fourier transform infrared spectroscopy analysis. TSs have 3D high porous structure (74.38%) and sufficient large pore size (~100–200 μm), low weight loss (57.7%), high absorption capacity (710.88%) and good mechanical strength. Incorporation of NLCs into TSs delayed the initial SV release and generated a more controlled release profile. Biocompatibility of the TSs was shown using MTT assay. The results suggest that TSs can be considered as suitable candidates for diabetic wound treatment.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Impaired wound healing, which results in ulceration, is an important complication of diabetes mellitus (DM) and its risk is about 25% for DM patients over their lifetime [1].

Traditionally, there are several treatment options for diabetic wound management such as topical (for example, ointment, gels) and systemic drug treatments, dressing for occlusion and dampening, debridement and even surgical approaches, if necessary. Unfortunately, the present treatment options do not provide satisfactory results for the treatment of diabetic wounds. Hence, diabetic wound treatment has become an important issue for clinicians and patients in some cases necessitates long recovery period of the patients [2–4].

Conventional treatment approaches do not have long-term effects and the dosage must be repeated. Therefore, controlled release systems that provide prolonged effects are of great interest in chronic wound treatment. Furthermore, epidermal coating and the formation of an external barrier are very important factors in

wound treatment for the prevention of infection, reduction of water/blood loss, protection of oxidative stress and control of pain. Increasing evidence indicates that dermis layer should also be involved in skin substitutes for an effective wound healing. For this purpose, researchers as a common approach have started to use biodegradable 3D tissue scaffolds (TSs) for wound healing [4,5]. Three-dimensional TSs not only gradually degrade in wound healing, but also provide adhesion, growth and differentiation of cells and transport of extracellular matrix (ECM) components by acting as an ECM analogue [6].

Materials that are isolated from natural sources are increasingly preferred in clinical applications of TSs because of their higher biological acceptability, cellular interaction, renewability and easier chemical modification. Among these materials, collagen, which is the most abundant protein in mammalian tissues and a major protein of the ECM, has a remarkable reputation [5,7]. During the wound healing process, collagen also supports the organization of newly formed collagen fibrils and granulation tissue in the damaged area and stimulates new tissue growth and wound debridement [8]. Due to these well-known effects of collagen and its biocompatibility, biodegradability, simplicity and variety of manufacturing methods, collagen based TSs have been widely used for wound healing in recent years [5,9,10]. However, collagen-based

* Corresponding author.

E-mail addresses: dilara.ozturk207@gmail.com (D. Orgul), ehakan@hacettepe.edu.tr (H. Eroglu), hsueda@hacettepe.edu.tr (S. Hekimoğlu).<http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.08.001>

1773-2247/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Formulation and Characterization of Tissue Scaffolds Containing Simvastatin Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Treatment of Diabetic Wounds

D. Örgül, H. Eroğlu, S. Hekimoğlu

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey

*E-mail: horgul@hacettepe.edu.tr



INTRODUCTION

Diabetic wounds are rapidly progressing, chronic, non-healing complication of diabetes (1). In recent years, the use of tissue scaffold (TS) comes into prominence among the healing perspectives for diabetic wounds (2). Simvastatin (SV) is also effective on wound healing depending on its immune-modulator, anti-inflammatory and angiogenic effects (3). Therefore, in this study new TS formulations, which consist of biological polymers and including SV loaded nanostructured lipid carriers (NLC) were evaluated for a new perspective as an alternative therapeutic option with the aim of topical treatment of diabetic wounds.

METHODS

* Preparation of the scaffolds

Before TS preparation, initially NLC formulations were prepared by high shear homogenization technique (Figure 1a). Later Protasan UP CL 213 (PRO) and Collagen Type III (COL) were dispersed separately in NLC, and then sponge-like porous structures were generated by freeze-drying method (Fig. 1b). Independent variables of TSs are shown in Table 1.

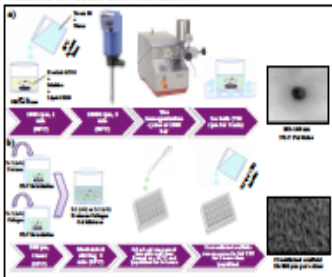


Figure 1. Scheme of preparation of a)NLC and b)Scaffold formulations

* Characterization of the Scaffolds

- The morphology of TSs was observed by a scanning electron microscopy (Quanta 400F Field Emission, Germany) device.
- Porosity and pore size distribution analysis was performed on a mercury porosimeter (Poremaster 60, USA).
- Swelling degree of TSs was determined by swelling dry TSs known weight in phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 for 24 h at 37 °C.
- Degradation of TSs were examined by the weight loss of previously weighed TSs, which was monitored as a function of incubation time in PBS at 37 °C.
- The mechanical strength of TSs was measured on a Texture Analyzer (TA-XTPlus, UK).
- In vitro release studies of TSs were performed at 480 rpm and 37°C, using horizontal agitator with thermostated water bath (Memmert, Germany). Each TS was immersed in 5 mL of pH 7.4 PBS containing % 0.5 SDS (w/v). At various time points, release medium was withdrawn completely and replaced with the equal volume of fresh medium. The samples were analyzed by a validated HPLC method.
- To investigate the cytotoxicity of TSs, C(+):2:1-SV and C(+):2:1-B, the MTT assay was performed. L929 cells were used to check the compatibility of TS for wound treatment.

RESULTS AND DISCUSSION

* Morphology studies

SEM images showed that all TSs have a three dimensional porous microstructures and interconnecting network (Fig. 2).

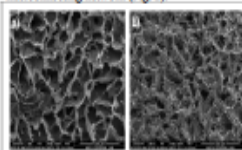


Figure 2. SEM images of TSs (x200) a) uncrosslinked b) crosslinked

* Porosity and pore size distribution

Porosity and pore size distribution of the TSs were shown in Table 2.

Table 2. Porosity and pore size distribution results of the TSs

Formulation Code	Porosity %	Pore Size Distribution (µm)
C(-):1-B	75.98	20-300
C(+):1-B	74.25	20-300
C(-):2-B	82.20	30-300
C(+):2-B	81.35	30-300
C(-):1-SV	92.97	30-300
C(+):1-SV	70.25	30-300
C(-):2-SV	86.38	20-300
C(+):2-SV	74.38	20-300

18th International Pharmaceutical Technology Symposium, Antalya, 2016

* Swelling and in vitro degradation studies

All TSs showed high absorption behaviour and close to 7-fold swelling (about 700% degree of swelling) within 24 h. In vitro degradation results of TSs are given in Figure 3.

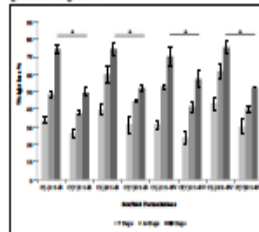


Figure 3. Degradation properties of TSs for 28 days in PBS pH 7.4 at 37 °C (n=3)(* p<0.05).

* Mechanical strength

The mechanical properties of the TSs are shown in Figure 4. The crosslinked TSs all had higher elastic modulus in comparison to uncrosslinked TSs (p<0.05) (4).

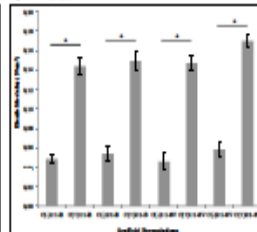


Figure 4. Elastic modulus of TSs (n=6)(* p<0.05).

* In vitro release studies

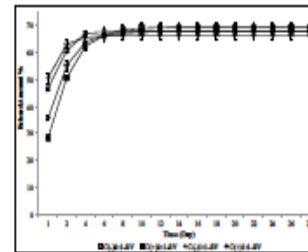


Figure 5. Release profile of Simvastatin from various formulations (n=6)

The release of SV from all TSs was found to be fitted to Higuchi kinetic model. Crosslinked TSs, because of their lower degradation behaviour, were characterized with a faster release rate, later reaching plateau and an approximately two-fold lower initial burst release than uncrosslinked ones (p<0.05) (5). Also release rates of 2:1 polymer ratio were higher than 1:1 (p<0.05). This is due to the higher water solubility of PRO than COL, that was increased penetration of water into TS therefore the release rate of SV increased (6).

* Cytotoxicity studies

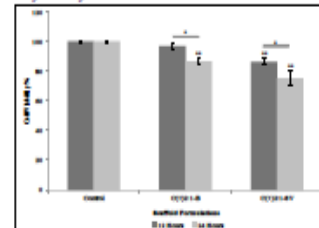


Figure 6. Cytotoxic effect of blank and drug loaded TSs on the L929 cell line (n=6) (* p<0.05, ** p<0.05 compared to the control).

As seen in Figure 6, all TSs showed non-toxic effect on the L929 cell line due to cell viability greater than 50%.

CONCLUSIONS

The results of this study showed that, crosslinked TS might be considered as suitable candidates for wound treatment depending on good characteristic results especially high porosity, low degradation rate and controlled release profile.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by TUBITAK 1003 - Primary Subjects R&D Funding Program with the Project No. 213M686. Dileş Örgül was supported by PhD Scholarship Program (2211) of TUBITAK.

1. LaPlante W.L., et al., *Lasers*, 2002, 14(6), 202.
 2. Yin, H.H., et al., *Wound Repair and Regeneration*, 2003, 11, 303.
 3. Hekimoğlu, S., et al., *Pharmazie*, 2010, 65, 208.
 4. Örgül, D., et al., *Appl. Biol. Sci.*, 2015, 9(1), 2015.
 5. Yin, Q., et al., *Water Sci. Eng. C Water Sci. Technol.*, 2011, 13, 111.
 6. Örgül, D., et al., *Biomed Res Int*, 2015, 1(1), 2015.



Formulation and In Vitro Evaluation of Simvastatin Loaded Nanostructured Lipid Carriers

D. Örgül¹, H. Eroğlu¹, S. Hekimoğlu¹

¹Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey
*E-mail: hsuoda@hacettepe.edu.tr



INTRODUCTION

Simvastatin commonly used as an effective cholesterol lowering agent. It is well known that regardless of the mechanism of cholesterol lowering effects, simvastatin is also effective on wound healing depending on immune-modulator, anti-inflammatory and angiogenic effects (1). It is noteworthy that the limited topical use of simvastatin has been previously investigated for chronic wound healing (1-2). Therefore, in this study nanostructured lipid carrier (NLC) formulations were evaluated for creating a new perspective as an alternative therapeutic option with the aim of topical treatment of wounds.

METHODS

Preparation of NLC Formulations

NLC formulations were prepared by high shear homogenization technique using a APV Lab 2000 (APV, Germany) high pressure homogenizer (Fig. 1) and several independent variables were investigated (Table 1).

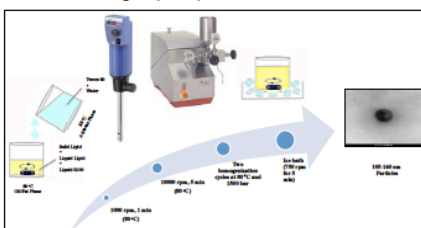


Figure 1. Scheme of preparation of NLC formulations

Table 1. Formulations used in studies

Formulation Code	Lipid Matrix	Liquid:Solid Lipid Ratio	Simvastatin % (w/w) in the total lipid amount
Fm-50-Blank	Massina*Praciroc ATO 5	50:50	-
Fm-50-10	Massina*Praciroc ATO 5	50:50	% 10
Fm-50-20	Massina*Praciroc ATO 5	50:50	% 20
Fm-70-Blank	Massina*Praciroc ATO 5	70:30	-
Fm-70-10	Massina*Praciroc ATO 5	70:30	% 10
Fm-70-20	Massina*Praciroc ATO 5	70:30	% 20

Characterization of NLC Formulations

- Particle size and Polydispersity index (PDI) measurements were carried out at 25 °C with Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK).
- Transmission Electron Microscope (TEM) observations were conducted on a FEI Tecnai G2 Ruh BioTwin (Netherlands) electron microscope at 80 kV.
- DSC analysis (DSC Q100, TA Instruments, USA) was evaluated at 20 – 200 °C with a heating rate of 10 °C/min and 5 mg weighted samples were sealed in aluminum pans.
- Entrapment efficiency (EE%) and drug loading (DL%) were calculated as:
EE% = Total amount of SV – Free amount of SV / Total amount of SV x100
DL% = Total amount of SV – Free amount of SV / Total amount of the lipids x100
- In vitro release studies of formulations were performed in thermostated water bath (Memmert, Germany) at 37 °C using horizontal agitator (480 rpm). Certain ultrafiltered NLC formulations were suspended in pH 7.4 PBS containing % 0.5 SDS (w/v). Samples centrifuged at selected time points then the clear supernatants were withdrawn completely and replaced with fresh media. The samples were analyzed by a validated HPLC method at 238 nm (3).
- Statistical analysis was conducted by Mann Whitney U test for comparisons between Independent groups. 0.05 was taken as a p value, to indicate statistical significance (p<0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Particle size and PDI results

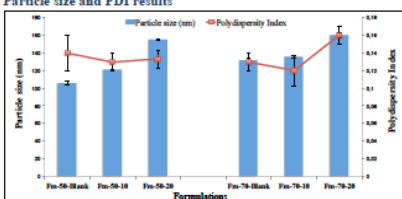


Figure 2. Relation between NLC formulations and results of particle size and PDI (n=6, X±SD)

2nd Edition of Nanotech France 2016 International Conference and Exhibition (1-3 June) Paris

It was found that when SV amount was increased, particle size of all formulation increased (p<0.05). The increase of liquid/lipid ratio used in NLC, causes significant increases in particle size distributions (p<0.05) (Fig. 2). All formulations have significantly high entrapment efficiency (>99%) and maximum drug loading (10% or 20%) values.

TEM Images

All formulations were as a suspension of spherical nanosized homogeneous particles (Fig. 3).

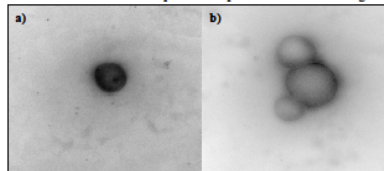


Figure 3. TEM images of NLC formulations (x30000) a) Blank NLC b) SV loaded NLC

DSC Thermograms

The entrapment of simvastatin in the lipid matrix was verified by the absence of endothermic peaks according to DSC analysis (Fig. 4).

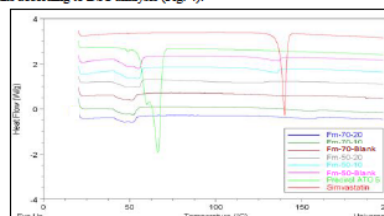


Figure 4. DSC thermogram of NLC formulations and ingredients

Release studies

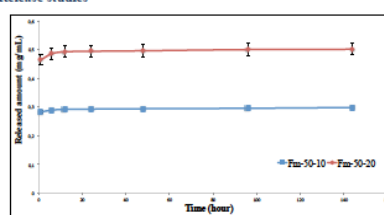


Figure 5. Release profile of Simvastatin from various formulations (n=6)

The release of simvastatin from the NLC formulations was characterized by an initial burst release which is followed by a sustained release period for 6 day (Fig.5). For assessing the similarity of Fm-50-10 and Fm-50-20 dissolution profiles, the similarity factor (f_2) was calculated and release profiles were found as non-similar ($f_2 < 50$). It was clearly calculated that Fm-50-20 formulation released approximately two-fold simvastatin concentration with respect to Fm-50-10 formulation.

CONCLUSION

The results of this study showed that, simvastatin loaded NLC formulations had nanosized particle distribution, high entrapment efficiency and sustained release time of the active ingredient. Depending on these in-vitro characteristics, these nanosized carriers might be considered as suitable candidates for wound treatment either alone or in combination with scaffold structures. Further studies are currently focused on the combination of these nanocarriers with scaffold structures.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by TÜBİTAK 1003 - Primary Subjects R&D Funding Program with the Project No.213M686.

REFERENCES

- Elito, A., et al. "Simvastatin enhances VEGF production and accelerates impaired wound healing in experimental diabetes." *Pharmacological research* 57.2 (2008): 159-169.
- Ami, J., et al. "Topical simvastatin accelerates wound healing in diabetes by enhancing angiogenesis and lymphangiogenesis." *The American journal of pathology* 181.6 (2012): 2217-2224.
- Öztaş, D., et al. "Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for Simvastatin." *17th International Pharmaceutical Technology Symposium, Antalya/Turkey Sep 8-10(2014), Abstract Book pp: 296-301.*



DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR SIMVASTATIN

D. Öziürk¹, H. Eroğlu¹, S. Hekimoğlu¹

¹Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara

*E-mail: husein@hacettepe.edu.tr



INTRODUCTION

Statins are the generally known as cholesterol lowering agents. Simvastatin is commonly used as an effective cholesterol lowering agent. Besides their well known effects, they are known to be involved in many cellular processes through cholesterol dependent/independent mechanisms. It is well known that regardless of the mechanism of cholesterol lowering effects of statins, they are also efficient in wound healing depending on their immune-modulator, anti-inflammatory and angiogenic effects (1,2).

For the quantification of simvastatin, there exist many high performance liquid chromatography (HPLC) methods (3,4). In these methods, either the retention time of simvastatin is too long or the sensitivity of the existing method is not suitable enough. Therefore, the aim of this study is to develop a new HPLC method for the quantification of simvastatin and to validate this method.

METHODS

-High Performance Liquid Chromatography Conditions

A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method is optimized for the determination simvastatin. For this purpose, the HPLC system used was equipped with an UV detector and C18 (5µm;15cmx4.6mm) column was used for the separation of simvastatin. The optimized mobile phase for the quantification of simvastatin was determined as a mixture of methanol : 50 mM NaH₂PO₄ (pH 4.5) : acetonitrile at the ratio of 1:3:6 (v/v/v). Flow rate of the mobile phase was set as 1 ml/min and UV detection was carried out at wavelength of 238 nm after an injection volume of 20 µl of the sample. The temperature of the column was kept constant at 45 °C.

-Analytical Method Validation

The optimized analytical method has been validated through the parameters of selectivity, linearity, accuracy, precision (repeatability/reproducibility), sensitivity and stability according to the ICH guidelines.

The selectivity of the method was evaluated by analyzing blank mobile phase sample.

For the linearity of the method, a calibration curve that is consisting of 8 concentration points, and 6 different set of samples within the range of 0.25-32 µg ml⁻¹ was prepared by diluting the secondary stock solution (100 µg ml⁻¹) with the mobile phase.

For the accuracy of the method, 3 different concentration points such as low (0.25 µg ml⁻¹), medium (4 µg ml⁻¹) and high (16 µg ml⁻¹) were selected within the calibration range and 6 different samples at these points were prepared. These samples were analyzed and the results that were calculated were compared with the standard values.

The precision of the analytical method has evaluated with repeatability and reproducibility of a series of concentration, with in the calibration range, 0.25, 4 and 16 µg ml⁻¹. Afterwards, the results were compared by determining the RSD values of the samples.

The sensitivity of the analytical method was investigated by determining the Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ).

The stability studies were carried out 0.25, 4 and 16 µg ml⁻¹ concentrations of simvastatin samples and these samples were kept at 37 °C for 3 days. Samples were analyzed at 24, 48 and 72 hours over three replicates and the RSD of the results were calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

-Selectivity

In the evaluation of the selectivity, simvastatin was well resolved from baseline (Figure 1) and there was no matrix effect from mobile phase at the same time of simvastatin.



Figure 1. Representative chromatogram of simvastatin (8 µg ml⁻¹)

-Linearity

The correlation coefficient (R²) was calculated as 0.99985 indicating the goodness of the linearity.

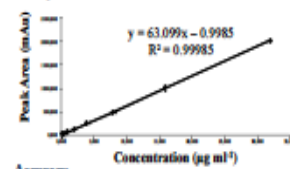


Figure 2. Calibration curve for simvastatin analysis

-Accuracy

Table 1. Accuracy results for Simvastatin analyses

Simvastatin Concentration (µg ml ⁻¹)	Observed Concentration Mean (µg ml ⁻¹)	RSD %	Bias %	Recovery %
0.25	0.2512	1.6190	0.4675	100.4675
4	3.9409	0.2925	1.4782	98.5218
16	15.7802	0.6945	1.3738	98.6263

-Precision

Table 2. Precision results for Simvastatin analyses

Simvastatin Concentration (µg ml ⁻¹)	Repeatability		Reproducibility	
	Observed Concentration Mean (µg ml ⁻¹)	RSD %	Observed Concentration Mean (µg ml ⁻¹)	RSD %
0.25	0.2498	0.2990	0.3101	1.6073
4	3.9269	0.0277	3.9559	0.2087
16	15.8428	0.0250	15.9928	0.0846

-Sensitivity

The LOD and LOQ values were found to be 8.5 ng ml⁻¹ and 28 ng ml⁻¹, respectively.

-Stability

Table 3. Stability results for Simvastatin analyses

Simvastatin Concentration (µg ml ⁻¹)	Observed Concentration Mean (µg ml ⁻¹)		
	0.25	4	16
Hours			
0. hour	0.2493	3.9266	15.8459
24. hour	0.2498	3.9276	15.8359
48. hour	0.2498	3.9239	15.8486
72. hour	0.2535	3.9102	15.8459
Mean (µg ml ⁻¹)	0.2506	3.9221	15.8441
RSD%	0.6731	0.1782	0.0306
Recovery%	100.2400	98.0519	99.0255

Stability studies showed that simvastatin would be stable during the release test from the formulations.

CONCLUSIONS

As a result, this new method was found to be a feasible method for the quantification of simvastatin with a short retention time and good peak resolution from the baseline. In addition, this method has been validated through the parameters of selectivity, linearity, accuracy, precision, sensitivity and stability and considered suitable for the quantification of simvastatin in different pharmaceutical dosage forms such as SLN/NLC and tissue scaffolds.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by T.C.İTAK 1003 - Primary Subjects R&D Funding Program with the Project No.213M686.

References

1. Awg, J., et al., *Am J Pharmol*, 181, 2217-24, 2012.
2. Bittu, A., et al., *Pharmacol Res*, 57, 159-69, 2008.
3. Srinivas, C., et al., *Int J Pharm Pharm Sci A*, 1-4, 2012.
4. Novakova, L., et al., *Trends in Analytical Chemistry*, 27(4), 352-367, 2008.

9. ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Dilara ÖRGÜL
Doğum Tarihi : 23.06.1989
Doğum Yeri : Ankara, Türkiye
Adres (İş) : Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK)
 Sögütözü Mahallesi 2176. Sokak No:5 Çankaya/Ankara
Telefon (İş) : +90 312 218 36 53
(GSM) : +90 505 432 58 19
e-posta : dilaraorgul@gmail.com

EĞİTİM

2012-2017 : Doktora 2012-2017 (Akademik Başarı: 3,88 /4,00)
 Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik
 Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara
 2007-2012 : Lisans (Akademik Başarı: 3,56/4,00 Fakülte 3. sù)
 Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara

MESLEKİ DENEYİM

2017- : Eczacı
 Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK)
 2013-2017 : Araştırma Görevlisi
 Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
 Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

ÇALIŞMA ALANLARI

- İlaç taşıyıcı sistemler
 - Topikal ilaç taşıyıcı sistemler
- Kontrollü salım sağlayan dozaj şekilleri
 - Nanopartikül formülasyonları
- Kronik yara tedavisi
- Doku iskelesi formülasyonları
- İlaç formülasyonlarında doğal ve sentetik polimerler

ULUSLARARASI YAYINLAR

- Orgul D, Eroglu H, Hekimoglu S. Formulation and characterization of tissue scaffolds containing simvastatin loaded nanostructured lipid carriers for treatment of diabetic wounds. J Drug Deliv Sci Technol. 2017; 41: 280-92.

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER

- Örgül D, Eroğlu H, Hekimoğlu S. Formulation of Tissue Scaffolds Containing Simvastatin Loaded Nanostructured Lipid Carriers For The Treatment of Diabetic Wound. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS); Antalya/Turkey; Sep 18-21 (2016). Abstract Book pp: 239-241.
- Örgül D, Eroğlu H, Hekimoğlu S. Formulation and In Vitro Evaluation of Simvastatin Loaded Nanostructured Lipid Carriers. Nanotech France 2016 International Nanotechnology Conference and Exhibition; Paris/France; Jun 1-3 (2016).
- Öztürk D, Eroğlu H, Hekimoğlu S. Development And Validation Of High Performance Liquid Chromatography Method For Simvastatin. 17th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS); Antalya/Turkey; Sep 8-10 (2014). Abstract Book pp: 298-301.

- Uğur AB, Örgül D, Hekimoğlu S, Çetin M. Cytotoxic Effects of Nanoemulsion and Nanoemulsion Based Gel Containing Daidzein on SK-MEL30/An1 Cells. 3rd International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development; Erzurum/Turkey; Oct 5-7 (2017). Abstract Book pp: 122.
- Uğur AB, Örgül D, Çetin M, Hekimoğlu S. Formulation And Characterisation Daidzein-Loaded Nanoemulsions. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS); Antalya/Turkey; Sep 18-21 (2016). Abstract Book pp:262-264.

PROJELER

- Diyabetik yara tedavisinde kullanılmak üzere nanopartiküler statin ve kök hücre içeren doku iskelelerinin formülasyonu, TÜBİTAK 1003-Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı, Proje No: 213M686, 2014-2016.

ÖDÜLLER

- En İyi Poster Ödülü: Örgül D, Eroğlu H, Hekimoğlu S. Formulation of Tissue Scaffolds Containing Simvastatin Loaded Nanostructured Lipid Carriers For The Treatment of Diabetic Wound. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS); Antalya/Turkey; Sep 18-21 (2016). Abstract Book pp: 239-241.