

İSMAIL ASLAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2019

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**BEYİNE HEDEFLENDİRİLMİŞ ROSUVASTATİN
İÇEREN LİPOZOMAL TAŞIYICI SİSTEMLERİN
FARELERDE OLUŞTURULAN BEYİN HASARININ
TEDAVİSİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZM. ECZ. İSMAİL ASLAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. ERDAL CEVHER

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2019

İTHAF

Anneme, Babama, Eşim Nurcihan ve oğlum C.Cihangir'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasına olanak sağlayan, desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, motive eden, çalışmama her şekilde destek olan Tez Danışmanım Sn. Prof. Dr. Erdal Cevher'e,

Çalışmamın tüm aşamalarında laboratuvarlarını, bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan kıymetli hocam Sn. Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a, Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) müdürü Sn. Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e, desteğini her zaman hissettiğim yakın arkadaşım Sn. Dr. Öğr. Üyesi İbrahim İnanç'a, Öğr. Gör. Kürşad Nuri Baydili'ye,

Bana her türlü yardımlarıyla destek olan başta Dr. Ahmet Burak Çağlayan olmak üzere Dr. Taha Keleştemur, Zeynep Balçıkanlı ve emekleri geçen diğer araştırma görevlilerine,

Bugüne kadar bana değerli katkılarıyla emeği geçen bütün hocalarıma,

Hayatım boyunca beni destekleyen aileme, zor zamanlarda hep yanımda duran, hayatımı paylaştığım biricik eşim Nurcihan Aslan ve neşe kaynağımız oğlum Cihangir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iv
İTHAF	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xvii
ÖZET	xix
ABSTRACT.....	xxii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Lipozomlar	3
2.1.1. Tanımı, Oluşum Mekanizması ve Sınıflandırması	3
2.1.2. Lipozom Hazırlama Yöntemleri	4
2.1.3. Lipozom Karakterizasyonu	10
2.1.4. Lipozomal İlaç Taşıma Stratejileri.....	11
2.2. Beyin	15
2.2.1. Beyine İlaç Hedeflendirme Mekanizmaları.....	19
2.2.2. Lipozomların Beyine İlaç Hedeflendirmedeki Rolü	26
2.2.3. Travmatik Beyin Hasarı	31
2.3. Rosuvastatin	37
2.3.1. Yapısı, Temel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	37
2.4. Kalsein	42
2.4.1. Yapısı, Temel Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44

3.1. RSV ile İlgili Deneyler	46
3.1.1. RSV'nin Spektrumu	46
3.1.2. RSV'nin FT-IR Spektrumu	46
3.1.3. RSV'nin Farklı Koşullarda Stabilité Çalışması	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
3.1.4. RSV'nin Kalibrasyon Eğrisi	46
3.1.5. RSV'nin Çözünürlük Çalışması.....	46
3.2. Lipozom İçerikleri	46
3.2.1. Fosfolipidler.....	46
3.2.2. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması.....	47
3.3. <i>In vitro</i> Çalışmalar	53
3.3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	53
3.3.2. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	54
3.4. <i>In vivo</i> Çalışmalar	57
3.4.1. Travmatik Beyin Hasarının Oluşturulması ve Uygulama	57
3.5. Analitik Metod Validasyonu	59
3.5.1. Doğrusallık	59
3.5.2. Doğruluk ve Kesinlik Çalışmaları	60
3.5.3. Tekrarlanabilirlik	60
3.5.4. Tekrar Üretilebilirlik	60
3.6. <i>In vivo</i> Verilerin Analizi.....	61
4. BULGULAR	62
4.1. RSV ile İlgili Bulgular	62
4.1.1. RSV'nin UV Spektrumu	62
4.1.2. RSV'nin FT-IR Spektrumu	63
4.1.3. RSV'nin Kalibrasyon Eğrisi.....	64
4.2. Analitik Metod Validasyon Çalışmaları	64

4.2.1. Doğrusallık	64
4.2.2. Doğruluk ve hassasiyet.....	65
4.2.3. Tekrarlanabilirlik	65
4.2.4. Tekrar Üretilirlik	67
4.2.5. Özgünlük	68
4.2.6. Stabilité.....	69
4.3. Çözünürlük ve pH Değerlendirme Çalışmaları	70
4.3.1. RSV'nin Çözünürlük ve pH Değerlendirme Çalışması	70
4.3.2. CAL'nin Çözünürlük pH Değerlendirme Çalışması.....	71
4.4. Lipozomlar ile İlgili Çalışmalar	72
4.4.1. Lipozomlardaki Calcein Tayini	75
4.4.2. Lipozomlardaki Hapsedilmiş RSV Tayini	77
4.4.3. Lipozomların PLM Görüntüleri.....	80
4.4.4. Lipozomların SEM Görüntüleri.....	81
4.4.5. Lipozomların AFM Görüntüleri	82
4.4.6. Lipozomların Stabilité Çalışmaları	83
4.4.7. Lipozomların <i>In Vitro</i> Sitotoksité Çalışmaları.....	96
4.4.8. <i>In vitro</i> Salım Çalışmaları	98
4.4.9. Kinetik Model Çalışmaları	99
4.4.10. <i>In vivo</i> Çalışmalar	100
5. TARTIŞMA	109
ETİK KURUL KARARI	118
KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ	143

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Tabaka sayısı ve boyutlarına göre lipozomların sınıflandırılması	5
Tablo 2.2. İçerik ve ilaç taşıma özelliklerine göre lipozomların sınıflandırılması	6
Tablo 2.3. Lipozom hazırlama yöntemleri, yöntemlerin üstünlükleri ve sakıncaları	10
Tablo 2.4. Lipozomlarda kullanılan karakterizasyon ve kalite kontrol yöntemleri	111
Tablo 3.1. Kimyasallar	44
Tablo 3.2. Cihazlar	45
Tablo 3.3. Ön çalışmalarda hazırlanan lipozom formülasyonları, içeriklerin molar oranları ve gözlemsel sonuçlar	50
Tablo 3.2. Optimize edilen 4 lipozom formülasyonu ve içeriklerin molar oranları	50
Tablo 3.4. <i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> uygulamaları yapılan formülasyon kodları ve açıklama tablosu	59
Tablo 4.1. RSV'nin iki farklı konsantrasyondaki ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tekrarlanabilirlik sonuçları(n=6)	65
Tablo 4.2. CAL'nin iki farklı konsantrasyondaki ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tekrarlanabilirlik sonuçları(n=6)	66
Tablo 4.3. RSV'nin iki farklı konsantrasyondaki ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tekrar üretilebilirlik sonuçları.	67
Tablo 4.4. CAL'nin iki farklı konsantrasyondaki ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tekrar üretilebilirlik sonuçları	68
Tablo 4.5. 0-24 saat arayla iki farklı konsantrasyonda ($20 \mu\text{g. mL}^{-1}$ - $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) oda sıcaklığında RSV'nin stabilite sonuçları (pH: 7.4)	69
Tablo 4.6. 0-24 saat arayla iki farklı konsantrasyonda ($4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) oda sıcaklığında CAL'nin stabilite sonuçları (pH: 7.4)	70
Tablo 4.7. RSV'nin çözünürlük çalışma sonuçları (n=6)	70
Tablo 4.8. RSV'nin farklı sıcaklıklarda pH değerlerindeki değişimlerine ait sonuçlar (n=6)	71
Tablo 4.9. CAL'nin çözünürlük çalışma sonuçları (n=6)	71
Tablo 4.10. CAL'nin farklı sıcaklıklarda pH değerlerindeki değişimlerine ait sonuçlar (n=6)	71

Tablo 4.11. CAL yüklü lipozom formülasyonuna ait absorbands değerleri ve etken madde yükleme kapasitesi (n=3).....	77
Tablo 4.12. Lipozom formülasyonlarının partikül büyüklükleri, büyüklük dağılımları, zeta potansiyelleri ve enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular (n=3)	77
Tablo 4.13. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)	84
Tablo 4.14. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3) ..	85
Tablo 4.15. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)	86
Tablo 4.16. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)	87
Tablo 4.17. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3)	88
Tablo 4.18. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)	89
Tablo 4.19. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)	90
Tablo 4.20. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3) ..	91
Tablo 4.21. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)	92
Tablo 4.22. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)	93
Tablo 4.23. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3)	94
Tablo 4.24. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)	95
Tablo 4.25. 3 gruba ait 4 farklı kinetik model sonuç tablosu.....	99
Tablo 4.26. Kalsein içeren formülasyonların beyin hasarlı bölgede oluşturduğu ışıma yoğunlukları ile tüm gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak karşılaştırılması	100
Tablo 4.27. Kalsein içeren formülasyonların ışıma yoğunluklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması	100
Tablo 4.28. RSV içeren formülasyonların uygulandığı hayvanlarda beyin hasar alanlarının ve tüm gruplar arasındaki 24 saat sonundaki farklılıkların istatistiksel olarak karşılaştırılması	102

Tablo 4.29. RSV içeren formülasyonların hasar alanlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması	103
Tablo 4.30. RSV içeren formülasyonların uygulandığı hayvanlarda beyin ödem skorlarının ve tüm gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	106
Tablo 4.31. RSV içeren formülasyonlarına ait ödem skorlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması	107



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Lipozom yapısı ve tabakalarının konumuna göre ilaç lokalizasyonu (3)	3
Şekil 2.2. Tabaka sayısı ve boyut büyüklüklerine göre lipozomlar (6)	5
Şekil 2.3. (a) PEG kaplı olmayan ve (b) PEG kaplanmış (stealth) lipozom (25)	13
Şekil 2.4. Arttırılmış geçirgenlik ve tutulma etkisi (32)	14
Şekil 2.5. İnsan beyninin ana bölümleri (40)	16
Şekil 2.6. KBB mikrovasküler yapısındaki dört temel hücre (59)	20
Şekil 2.7. KBB'den ilaç taşıma mekanizmaları (64)	21
Şekil 2.8. KBB engelinin aşılması için yaklaşımlar.....	21
Şekil 2.9. RSV'nin kimyasal yapısı (156)	38
Şekil 3.1. Lipozom hazırlama işlemi.....	49
Şekil 3.2. Hayvan çalışma protokolüne ait görüntüler	58
Şekil 4.1. RSV'nin 200-1000 nm arasındaki UV spektrumu (max. 243 nm).....	62
Şekil 4.2. RSV'ye ait FT-IR spektrumu	63
Şekil 4.3. RSV'nin 243 nm dalga boyundaki kalibrasyon eğrisi	64
Şekil 4.4. mPEG ₂₀₀₀ DSPE ye ait FT-IR spektrumu	72
Şekil 4.5. VHPKQHR peptidine ait FT-IR spektrumu.....	73
Şekil 4.6. mPEG ₂₀₀₀ DSPE ve VHPKQHR konjugatı ile birlikte ait FT-IR spektrumu..	74
Şekil 4.7. Kalseinin spektral analizdeki maksimum absorbens değeri ($\lambda_{max}=492nm$).....	75
Şekil 4.8. CAL'nin 492 nm dalga boyundaki kalibrasyon eğrisi (n=6)	76
Şekil 4.9. CAL yüklü lipozom formülasyonunun 1:1 (a/a) oranında Triton X-100 (%2,5) ile parçalanmasından sonra elde edilen CAL absorbens değeri (n=3)	76
Şekil 4.10. L1-L4 formülasyonlarının partikül büyüklükleri	78
Şekil 4.11. L1-L4 formülasyonlarının zeta potansiyelleri.....	78
Şekil 4.12. L1-L4 formülasyonlarının RSV enkapsülasyon etkinlikleri (%)	79
Şekil 4.13. L2 formülasyonuna ait PLM görüntüleri	80
Şekil 4.14. L2 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (x100.000).....	81
Şekil 4.15. L2 formülasyonuna ait AFM görüntüleri.....	82
Şekil 4.16. L2 formülasyonuna ait AFM histogramı	83
Şekil 4.17. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler	84

Şekil 4.18. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler.....	85
Şekil 4.19. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda (%) görülen değişimler	86
Şekil 4.20. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler	87
Şekil 4.21. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler.....	88
Şekil 4.22. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda görülen değişimler.....	89
Şekil 4.23. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler	90
Şekil 4.24. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler	91
Şekil 4.25. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda görülen değişimler.....	92
Şekil 4.26. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler	93
Şekil 4.27. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler.....	94
Şekil 4.28. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda görülen değişimler	95
Şekil 4.29. DOPE, DOPA, RSV ve mPEG ₂₀₀₀ DSPE nin farklı konsantrasyonlarda U 87 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisinin gerçek zamanlı analizine ait grafik	96
Şekil 4.30. RSV yüklenmemiş peptid bağlı olan ve peptid olmayan (PL ve L), RSV yüklenmiş peptid bağlı olan ve peptid bağlı olmayan (PRL ve RL) lipozomal dispersiyonların farklı konsantrasyonlarda (20,50,100 mM) U 87 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisinin MTT analizine ait grafik	98
Şekil 4.31. CAL-Kontrol, CAL-L2 ve P-CAL-L2'ye ait <i>in vitro</i> salım sonuçları (pH:7.4)	98
Şekil 4.32. CAL-Kontrol (A1,A2,A3), CAL-L2 (B1,B2,B3), P-CAL-L2 (C1,C2,C3) gruplarına ait floresans yoğunluk görüntüleri.....	108

Şekil 4.33. CAL içeren formülasyonların uygulandığı grupların floresans yoğunlukları	102
Şekil 4.34. 1)Kontrol 2) RSV 3) RL 4)PRL gruplarına ait beyin kesitleri.....	104
Şekil 4.35. 1)Kontrol 2) RSV 3) RL 4)PRL gruplarına ait beyin kesitleri hasar alanları	105
Şekil 4.36. RSV içeren formülasyonların uygulandığı grupların uygulamadan 24 saat sonra oluşan hasar alanları	106
Şekil 4.37. RSV içeren formülasyonların uygulandığı grupların uygulamadan 24 saat sonraki ödem skorları	108



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AFM: Atomik Kuvvet Mikroskobu

ATP: Adenozin trifosfat

A β : Amiloid- β peptit

BOS: Beyin omurilik sıvısı

CAL: Kalsein

CC: Coulter sayacı

CHEMS: Kolesterol hemisüksinat

CO₂: Karbon dioksit

DLS: Dinamik Işık Saçılımı

DMPG: Dimetilfosfatidil gliserol

DNA: Deoksiribonükleik asit

DOPA: Dioleil fosfatidik asit

DOPE: Dioleil fosfatidil etanolamin

DSPE: Distearoil fosfatidil etanolamin

DTX: Dosetaksel

EHT: Elektron yüksek gerilimi

EPR: Artırılmış geçirgenlik ve tutulma etkisi

ET-1: Endotelin-1

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FT-IR: Fourier Transform Infrared

GC: Gaz kromatografisi

GDNF: Glial hücre dizisi kaynaklı nörotrofik faktör

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

HMG CoA: 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A

HPH: Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ICAM-1: Hücrelerarası adezyon molekülü-1

KBB: Kan-beyin bariyeri

KBr: Potasyum bromür

LD: Lazer kırınım

LDLR: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü

LUV: Büyük tek tabakalı vezikül

MAK: Monoklonal antikor

MLV : Çok tabakalı vezikül

MMP: Matriks metalloproteinaz

MUV: Orta boyutlu tek tabakalı vezikül

NMR: Nükleer manyetik rezonans

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PDI: Polidispersite indeksi

PE: Fosfatidil etanolamin

PEG: Polietilen glikol

PLM: Polarize ışık mikroskobu

RAT: Reseptör aracılı taşıyıcı

RES: Retiküloendotelyal sistem

ROS: Reaktif oksijen türleri

RSV: Rosuvastatin

SAS: Süperkritik akışkan anti-çözücü sistemi

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

SLS: Statik ışık saçılımı

SUV: Küçük tek tabakalı vezikül

TEM: Transmisyon elektron mikroskobu

TR: Transferrin reseptörü

UV: Tek tabakalı vezikül

VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

VHPKQHR: Valin-Histidin-Prolin-Lizin-Glutamin-Histidin-Arginin

ÖZET

Aslan, İ. (2019). Beyine Hedeflendirilmiş Rosuvastatin İçeren Lipozomal Taşıyıcı Sistemlerin Farelerde Oluşturulan Beyin Hasarının Tedavisine Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji AD, Doktora Tezi, İstanbul.

Anahtar Kelimeler: Rosuvastatin, Lipozom, İlaç Hedeflendirme, Travmatik Beyin Hasarı, Beyin Ödemi.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 52955

Lipozomlar, hücre yapısına benzerliğinden ve aktif maddeleri membranlardan kolayca geçirebilmesinden dolayı, biyolojik membranlar için en iyi taşıyıcı sistemlerden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolesterol düşürücü olarak kullanılan Rosuvastatin (RSV)'nin beyin felci sonrası nöroprotektif etkiye de sahip olduğu belirlenmiştir. RSV'nin hidrofilik yapısından dolayı kan beyin bariyeri geçirgenliğinin az olması nedeniyle, uygun partikül boyutu ve dağılımına sahip yüzeyi modifiye edilmiş lipozomal taşıyıcı sistemlerin, RSV'nin hedef dokuya ulaşımını ve etkinliğini arttıracakları öngörülmüştür.

Travmatik beyin hasarı özellikle genç yaş nüfusunda en fazla ölüm ve sakatlık nedeni olmasına rağmen patofizyolojisi ve tedavisi konusunda yapılan çalışmalar henüz yeterli düzeyde değildir. Bu kapsamda klinikte nörodejeneratif hastalıkların tedavisi amacıyla henüz koruyucu bir ilaç geliştirilememiştir.

Tez kapsamında farelerde beyin travması sonrası oluşan hasar ve nöroenflamasyon üzerine RSV'nin etkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında geliştirilen RSV yüklü lipozomların yüzeyi hidrofilik PEG ve hasarlı bölgede eksprese edilen VCAM-1'e spesifik bir ligand ile modifiye edilerek beyine hedeflendirilmeye uygun hale getirilmiştir. Damar içi yolla uygulanan lipozomların etkinliği, beyin travması oluşturulmuş farelerde klasik tedavi uygulamaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Ön çalışmalar sonucunda optimize edilen L2 formülasyonunun partikül boyutu $95,5 \text{ nm} \pm 0,44$, polidispersite indeksi $0,160 \pm 0,001$, zeta potansiyeli $33,2 \text{ mV} \pm 0,12$, enkapsülasyon kapasitesi $\% 23,2 \pm 0,12$ olarak tespit edilmiştir. L2 formülasyonu ile hazırlanan floresans madde (kalsein) yüklü

lipozom formülasyonu, hedeflendirme peptidi içermeyen lipozom formülasyonuna beyin hasarlı bölgede daha yüksek birikim göstermiştir. Hedeflendirilmiş RSV yüklü lipozom formülasyonu uygulanmış farelerde 24 saat sonunda, beyin hasar alanlarında ve ödem düzeylerinde önemli azalma görülmüştür.



ABSTRACT

Aslan, I (2019). Investigation of the Effects of Systems in the Treatment of Brain Damage in Brain Targeted Liposomal Carrier Mice with Rosuvastatin. İstanbul University, Institute of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Technology. PhD Thesis. İstanbul.

Keywords: Rosuvastatin, Liposome, Drug Targeting, Traumatic Brain Injury, Brain Eudema.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project Number. 52955

Liposomes are one of the best delivery systems for biological membranes because they are similar to the cell structure and they can easily pass the active pharmaceutical ingredients through the membranes. In recent studies, it has been determined that Rosuvastatin (RSV) which is used as cholesterol lowering, has also been shown to have a neuroprotective effect after cerebral palsy. It has neuroprotective effect after cerebral palsy. Due to the hydrophilic structure of RSV, and due to the low permeability of the blood brain barrier, it has been envisaged that the surface modified liposomal delivery systems with appropriate particle size and distribution will increase the accessibility and efficiency effectiveness of RSV to the target tissue.

Although traumatic brain injury is the most common cause of death and disability especially in the young age population, studies on pathophysiology and treatment are not yet sufficient. In this context, a protective drug has not yet been developed in the clinic for the treatment of neurodegenerative diseases in the clinic.

In the scope of the thesis, the effect of RSV on damage and neuroinflammation caused by after brain trauma in mice was investigated. The surface of the RSV-loaded liposomes developed within the scope of the study was modified with a hydrophilic PEG and a specific ligand specific to the VCAM-1 expressed in the damaged area, making it suitable for targeting to the brain. The efficacy of intravenous liposomes was investigated in comparison with conventional treatment applications in brain-traumatized mice. As a result of the preliminary studies, the particle size of the optimized L2 formulation was $95.5 \text{ nm} \pm 0.44$, the polydispersity index was 0.160 ± 0.001 , the zeta potential was $33.2 \text{ mV} \pm 0.12$ and the encapsulation capacity was $23.2 \pm 0.12\%$. The fluorescence substance

(calcein) loaded liposome formulation prepared with the L2 formulation showed higher accumulation in the brain-damaged region of the liposome formulation without targeting peptide. Targeted RSV loaded liposomal formulation showed a significant reduction in brain damage sites and edema levels after 24 hours.



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hem hidrofilik hem de lipofilik özellik gösteren fosfolipid yapıdaki lipozomlar, yüzey özellikleri ve boyutları ayarlandıktan sonra, lokal veya sistemik yolla uygulanarak hedeflenen bölgeye ilaç taşınmasında başarılı sonuçlar vermektedir. Hücre yapısına benzerliğinden ve aktif maddeleri membranlardan kolayca geçirebilmesinden dolayı biyolojik membranlar için en iyi taşıyıcı sistemlerden biridir. Bu özellikleri sayesinde kozmetikten, biyoteknolojiye kadar pek çok alanda tercih edilirler. Hidrofilik maddeler (örneğin polietilen glikol) ile yüzeyleri modifiye edilen hedeflendirilmiş lipozomlar, sistemik dolaşımda uzun süre yıkıma uğramadan kalabilir (stealth) ve bu sayede hedef bölgede pasif yolla birikimleri sağlanabilir. Ayrıca, lipozomların yüzeylerine hedeflendirme ligandı bağlanarak, hedef doku ve hücrelerde bulunan reseptörlere veya hedef bölgede eksprese edilen adezyon bileşiklerine aktif olarak hedeflendirilmeleri sağlanabilmektedir. Kanser tedavisi için tümörlü dokulara lipozom formülasyonları kullanılarak yapılmış çok sayıda hedeflendirme çalışması bulunmaktadır. Kan beyin bariyerinin aşılmasında partikül boyutu da kritik öneme sahiptir. Genellikle 100 nm'nin üzerindeki partiküler taşıyıcı sistemlerin kan beyin bariyerinden geçemediği literatürde kayıtlıdır.

Travmatik beyin hasarı, özellikle genç yaşlarda en fazla ölüm ve sakatlık nedenlerinden biri olmasına rağmen, patofizyolojisi ve tedavisi konusunda yapılan çalışmalar henüz yeterli düzeyde değildir. Klinikte nörodejeneratif hastalıkların tedavisi amacıyla koruyucu bir ilaç bugüne kadar geliştirilememiştir. Nöroprotektif etkili olduğu düşünülen ve klinik çalışmaları yürütülen ilaçların hemen hemen tamamı, insanlarda karşılaşılan yan etkiler nedeni ile, başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Beyin travmasının tedavisinde kullanılacak ilaçların insanlarda iyi tolere edilebilmesi büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolesterol düşürücü olarak kullanılan Rosuvastatin (RSV)'nin beyin felci sonrası nöroprotektif etkiye de sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak RSV'nin hidrofilik özelliklerinden dolayı kan beyin bariyeri geçirgenliği az olduğundan, uygun partikül boyutuna sahip yüzeyi modifiye edilmiş lipozomal taşıyıcı sistemlerin, RSV'nin hedef dokuya ulaşımını ve etkinliğini arttıracakı öngörülmüştür.

Beyinin hasarlı dokusundaki mikrosirkülasyondan ve lökositlerin bu bölgede akümülyasyonundan sorumlu bileşikler, hücre adezyon molekülleridir. Beyinde travmatik hasar oluşan bölgede hipoksi sonrası, (i) apoptoz ve nekroz ile hücre ölümü; (ii) uyarıcı nörotransmitterlerin salımında artış, (iii) hücre içi kalsiyum miktarında artış, (iv) lökosit infiltrasyonunu içeren yangı olayları ile karşılaşmaktadır. Lökosit infiltrasyonunda en önemli faktörlerden biri ise vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) dir. VCAM-1'in spesifik ligandı, β 1 integrin ailesinden very late antijen-4 (VLA-4) tür. VCAM-1, lökosit plazma membranı üzerinde eksprese olarak integrin VLA-4'e bağlanır. VCAM-1 molekülleri hasarı takiben saatler içinde eksprese olur ve 24 saatte optimum seviyelere ulaşır. Ayrıca VCAM-1 ekspresyonu, enflamasyonlu alanlarındaki endotel hücrelerde oldukça belirgindir ve bu nedenle aterosklerotik modellerde ve çeşitli kanser modellerinde de potansiyel bir ilaç hedeflendiricisi olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında, farelerde beyin travması sonrası oluşan hasar ve nöroenflamasyon üzerine RSV yüklü lipozomal formülyasyonların etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. RSV yüklü lipozomların yüzeyi hidrofilik PEG ve hasarlı bölgede eksprese edilen VCAM-1'e spesifik bir ligand ile modifiye edilerek beyine hedeflendirilmeye uygun hale getirilmiştir. Damar içi yolla uygulanan lipozomların etkinliği, beyin travması oluşturulmuş farelerde klasik tedavi uygulamaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Lipozomlar

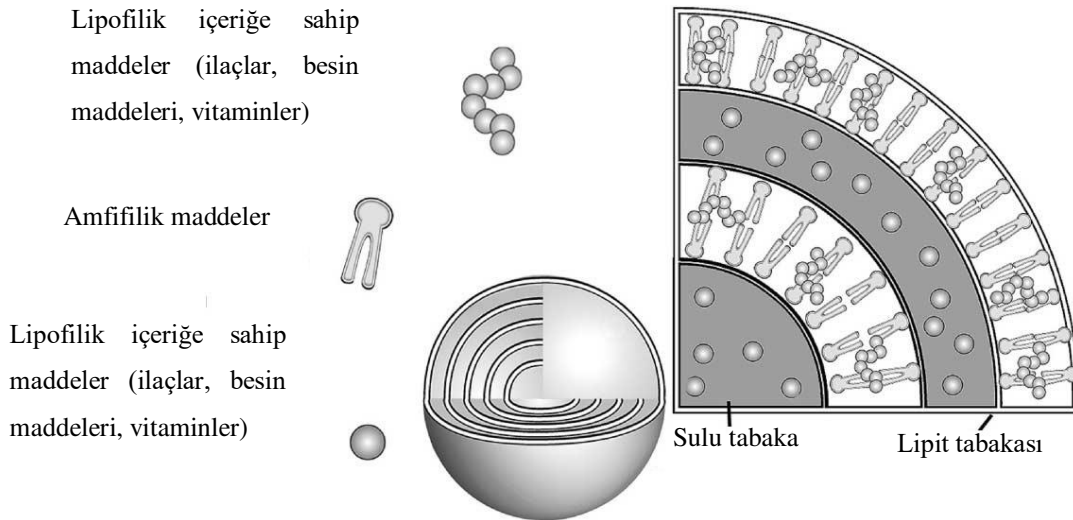
2.1.1.Tanımı, Oluşum Mekanizması ve Sınıflandırması

Kolloidal taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, Alec. D. Bangham tarafından 1960’larda biyolojik membran modelleme çalışmaları yapılırken keşfedilmiştir. Daha sonraları bulunan yapının ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabileceği ortaya konulmuştur (1,2).

Günümüzde yoğun bir şekilde üzerinde araştırma yapılan konulardan olan lipozomlar, polar lipid tabakaları ve bu tabakalar arasında bulunan sulu bir bölgeden oluşan, çoğunlukla küresel şekle sahip veziküllerdir. Lipozomların partikül boyutları nanometre ile mikrometre aralığında değişiklik gösterir (3,4).

Lipozomlar doğal membranların sentetik kopyaları olarak düşünülebilir. Yapılarında fosfolipidler, kolesterol ve yük verici birtakım maddeler bulunduran lipozomlar, hücre membran yapısına oldukça fazla benzerlik gösterir ve bu sayede biyolojik sistemlerle oldukça geçimlidir (4,5).

İlaç molekülleri sahip oldukları fizikokimyasal özelliklerine göre, lipozomun farklı bölgelerinde taşınabilir. Biyolojik sistemlerdeki hücrelere benzer şekilde lipozomlar; iç bölgelerinde hidrofilik ilaç etken maddelerini, membran kısımlarında ise yağ çözünürlüğü yüksek etken maddeleri ve amfifilik molekülleri tutma yeteneklerine sahiptir (6,7).



Şekil 2.1. Lipozom yapısı ve tabakalarının konumuna göre ilaç lokalizasyonu (3)

Gerek terapötik alanda gerekse tanı ve teşhis alanında kullanılan lipozomal taşıyıcı sistemler sahip oldukları pek çok avantajlı durumdan dolayı tercih edilirler. Bu avantajları aşağıdaki gibidir (5-10).

- Lipozomal taşıyıcı sistemler, biyoparçalanabilir olmalarının yanı sıra, biyogeçimli ve biyouyumlu özelliktedir. Yüksek derecede biyouyum göstermeleri, biyolojik membranların da yapısında olan içeriklerinden kaynaklanmaktadır.
- Yüksek derecede biyogeçimliliğe sahip olduklarından dolayı düşük sistemik toksisite ve sitotoksisiteye sahiptirler.
- Sahip oldukları hidrofilik ve lipofilik bölgeler sayesinde hem hidrofilik hem de lipofilik özellikteki ilaç etken maddelerinin taşınmasına olanak sağlarlar.
- Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler ile uzun ve kontrollü ilaç salımı oluşturmak mümkündür. Ayrıca kontrollü ilaç salımı sayesinde plazma ilaç konsantrasyonu istenilen süre istenilen seviyede tutulabilir.
- Terapötik olarak düşünüldüğünde ise uzatılmış salım yapan lipozomal sistemler, dozlama aralığını ve ilaç yarı ömrünü uzatmalarının yanı sıra toksik etkileri azaltırlar.
- Çeşitli büyüklüklerde ve yüzey özelliklerinde üretimleri mümkündür. Bu sayede ilaç etken maddelerinin etki gösterecekleri bölgeye aktif ve/veya pasif yolla hedeflendirilmesine imkan sağlarlar.
- Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler; oral, topikal, nazal, pulmoner, intramüsküler, intravenöz, subkütan ve oküler yol gibi pek çok alternatif veriliş yolu ile uygulanabilirler.
- Etken maddeyi enzimatik etkilerden korurlar ve ilaç stabilitesini arttırlar.

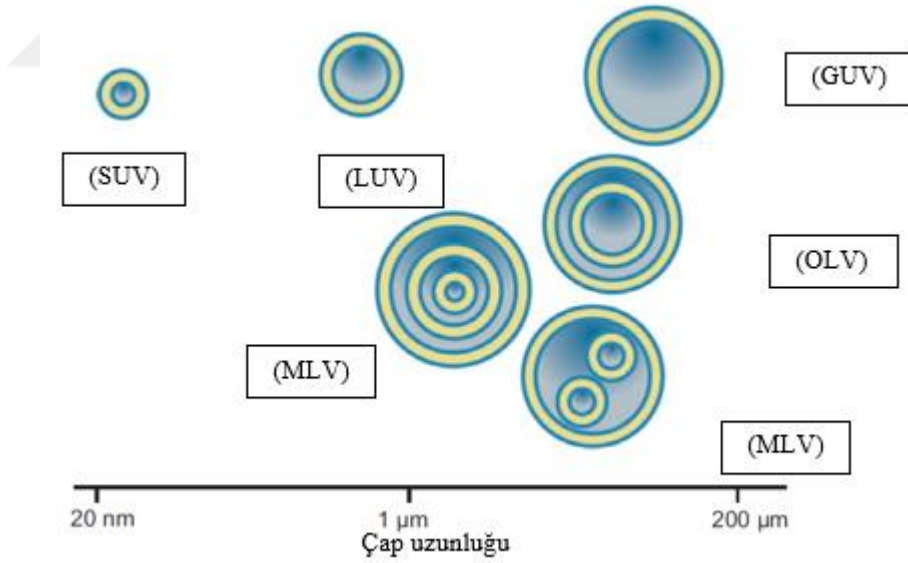
2.1.2. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

Lipozomlar, büyüklüklerine, hazırlama yöntemlerine, yüzey özelliklerine ve kan dolaşımında kalış özelliklerine göre sınıflandırılabilirler (4,8). Literatürde bu tip özelliklere göre yapılan sınıflandırmalar sıklıkla yer almaktadır. Tablo 2.1 ve Tablo 2.2’de, lipozomların ilaç taşıma özelliklerine, büyüklük ve tabaka sayılarına göre olan sınıflandırılma örnekleri verilmiştir.

Tablo 2.1. Tabaka sayısı ve boyutlarına göre lipozomların sınıflandırılması (5,8)

MLV (Multilamellar vesicles)	Çok tabakalı veziküller ($> 0,5 \mu\text{m}$)
OLV (Oligolamellar vesicles)	Oligolamellar veziküller ($0,1 - 1 \mu\text{m}$)
UV (Unilamellar vesicles)	Tek tabakalı veziküller (tüm boyut aralıkları)
SUV (Small unilamellar vesicles)	Tek tabakalı küçük veziküller ($20 - 100 \text{ nm}$)
MUV (Medium sized unilamellar vesicles)	Tek tabakalı orta büyüklükte veziküller
LUV (Large unilamellar vesicles)	Tek tabakalı büyük veziküller ($> 100 \text{ nm}$)
GUV (Giant unilamellar vesicles)	Tek tabakalı çok büyük veziküller ($> 1 \mu\text{m}$)
MVV (Multi vesicular vesicles)	Çok vezikülden oluşan veziküller ($> 1 \mu\text{m}$)

Lipozomlar Tablo 2.1’de bahsedildiği üzere boyutsal ve tabakasal olarak sınıflandırılabilirler. MLV tipinde olan lipozomlar eş merkezli lamellerden (ince tabakalardan) oluşurlar. Eş merkezli bu tip ince tabakalar, genellikle oligolamellar lipozomlar olarak adlandırılırlar ve 2 ila 5 çift tabakaya sahiptirler.



Şekil 2.2. Tabaka sayısı ve boyut büyüklüklerine göre lipozomlar (6)

Su tutma kapasitesinin fazla olması nedeniyle suda çözünen ilaçları yüksek oranda enkapsüle edebilen LUV ve MUV tipindeki lipozomlar 100 ila 1000 nm arasında değişen boyut aralığına sahiptir. Tek lipid tabakasına sahip bu grubun en küçük partikül boyutuna

sahip üyesi ise SUV tipindeki lipozomlardır ve 20 – 100 nm arasındaki boyut aralığında bulunurlar.

Tablo 2.2. İçerik ve ilaç taşıma özelliklerine göre lipozomların sınıflandırılması (4,8)

Lipozomun türü	İçerik	Karakteristik özellikleri
Geleneksel lipozomlar	Nötral ya da negatif yüke sahip fosfolipidler ve kolesterol	Retikuloendotel sistem'e (RES) hedeflendirmesi yapılabilir. Doz bağımlı farmakokinetik.
pH duyarlı lipozomlar	Fosfatidil etanolamin (PE), dioleil fosfatidil etanolamin (DOPE) ile birlikte kolesterol hemisüksinat (CHEMS), oleik asit	Zayıf bazların ve makromoleküllerin hücre içerisine taşınmasında kullanılır.
Katyonik lipozomlar	Katyonik lipidler (DDAB, DOSPA, DOTAP, DOPE)	Negatif yüklü makromoleküllerin taşınması için uygun sistemlerdir. Yüksek dozlarda toksisite gösterirler ve yapısal olarak stabil olmayan sistemlerdir.
Uzun süre dolaşımda kalan lipozomlar	Yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahip nötral lipidler Kolesterol ve %5-10 PEG-DSPE	Hidrofilik yüzey kaplama: düşük opsonizasyon ve bu nedenle RES tarafından eliminasyonu zordur. Uzun süre dolaşımda kalma ve dozdan bağımsız farmakokinetik.
İmmunolipozomlar	Geleneksel ya da dolaşımda uzun süre kalma yeteneğine sahip lipozomların yüzeyine antikor veya ligand bağlanması ile oluşurlar.	Hedef dokuya yönelik bağlanma ve hedef bölgede salım.

Lipozomların hazırlanması için kullanılan yöntemler; mekanik yöntemler, solvan dispersiyon yöntemi, deterjan uzaklaştırma yöntemi gibi geleneksel yöntemleri içermektedir. Geleneksel yöntemlerin yanı sıra, son on yılda geliştirilen yeni yöntemlerle farklı karakteristik özelliklere sahip lipozomlar üretilebilmektedir (2,4-5,8-11) Tablo 2.3'te özet şeklinde tüm yöntemler sunulmuştur.

2.1.2.1. Bangham Yöntemi

Bu yöntem, içerisinde organik bir faz bulunan cam balonda lipitlerin çözündürülüp daha sonra film tabakası oluturmak için organik fazın uzaklaştırılması esasına dayanır (4,8-11). Oluşan bu film tabakası su veya su bazlı bir tampon yardımı ile hidrate edilerek cam tabaka yüzeyinden toplanır. Lipozomal sistemlerin hazırlanması için ilk geliştirilen bu yöntem kullanılarak mikron boyutunda MLV'ler elde edilir. Sonikasyon ve ekstrüzyon gibi yöntemlerle MLV'lerin boyutları küçültülerek LUV ve SUV tipindeki lipozomlar hazırlanır.

2.1.2.2. Deterjan Uzaklaştırma Yöntemi

Lipozomal sistem oluşturmak için öncelikle deterjan – lipit miselleri oluşturulur ve daha sonra deterjan uzaklaştırılarak lipozomlar elde edilir. Yüksek oranda homojen lipozomların oluştuğu ve veziküllerin çok farklı çeşitlerde elde edilebildiği (MLV, OLV, LUV, SUV) bu yöntemin, hidrofobik ilaç yükleme kapasitesinin az olması, son ürün konsantrasyonunun düşük olması ve formülasyondan deterjanın tamamen uzaklaştırılamaması gibi bir takım olumsuz yönleri de mevcuttur (4-6,8,11).

2.1.2.3. Enjeksiyon yöntemleri

Etanol ve eter enjeksiyonu yöntemleri, temel olarak lipitlerin organik faz içerisinde çözündürülmesi ve daha sonra lipit çözeltisinin sulu ortama enjekte edilerek lipozom oluşturulması işlemlerini kapsamaktadır (4-8,11).

Etanol enjeksiyonu yöntemi basit bir yöntem olmasına karşın bazı lipitlerin etanolde az çözünmesi ya da uygun olmayan karıştırma gibi kısıtlamaları mevcuttur. Eter enjeksiyonu yöntemi ise, etanol enjeksiyonu yönteminden sulu faz ile karışmadığı için farklılık gösterir. Bu nedenle basit bir ısı uygulaması ile eter lipozomal üründen uzaklaştırılır.

Çalışmacılar eter enjeksiyonu yöntemini hidrofilik ve hidrofobik ilaçların enkapsülasyonu için kullanmışlar ve hidrofobik ilaçlar için %100'e varan oranlarda enkapülasyon etkinliği sağlamışlardır. Eter enjeksiyonu yöntemi ile, etanol enjeksiyonu

yöntemine göre daha konsantre lipozom formülasyonu hazırlanabilmekte ve elde edilen lipozomlar da yüksek ilaç taşıma kapasitesine sahip olmaktadır (4).

2.1.2.4.Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemleri

Yüksek basınçlı homojenizatörler, lipozomal ve lipid dispers sistem hazırlanmasına yoğun olarak kullanılmaktadır (4,12). Temel olarak üç farklı yolla lipozomal formülasyonların üretimi yapılabilmektedir. Bunlar; (i) önceden yapılmış lipozomal bir sistemin homojenizasyonu (ör: MLV), (ii) Solid lipid ve tampon çözeltinin karışım olarak uygulanması ve sonucunda SUV eldesi, (iii) organik lipid çözeltilerinin sulu faza enjeksiyonu ile yapılmaktadır (12).

Lipozom boyutları ve özellikleri basınç ve tekrarlayan homojenizasyon dizilerine bağlı olarak değişim gösterir. Ayrıca, başlangıç materyalinin homojenitesi, homojenizasyon şekli ve valf tipi, sıcaklık, lipid bileşimi ve içeriği ile ortamın iyonik gücü vezikül boyutunu etkileyen parametreler arasındadır (12).

2.1.2.5. Yeni yöntemler

Mikro akışkan teknoloji (Microfluidics technology) kullanılarak, çapları 500 µm ye kadar olan mikro kanallarda sulu fazın laminar akış halinde olduğu anda, üzerine dik bir şekilde gönderilen fosfolipit içerikli organik fazın karışması ya da seyreltilmesi ile mono dispers halde çapları 10nm ile 10 µm nin katları na sahip lipozomlar elde edilebilmiştir (13). Geliştirilen bu yeni yöntem mikro hidrodinamik odaklanma (MHF – micro hydrodynamic focusing) adı verilmektedir. Sulu faz ve organik fazın akış hızı oranları, mikro kanalların boyutları, organik faz içerisindeki lipid konsantrasyonu gibi kritik noktalar lipozom boyutunu ve ilaç taşıma kapasitesini etkileyen parametreler olarak karşımıza çıkmaktadır (14,15).

Literatürde lipozomal ürün hazırlamada kullanılan membran kontaktör isimli yeni bir yöntem de yer almaktadır. Bu yöntemde; yüksek basınçlı fosfolipit içeren etanol çözeltisi, istenen gözenek açıklığına sahip bir membrandan, içerisinde sulu faz bulunan kolona teğet olacak bir şekilde geçer. Sulu faz membrana dikey bir şekilde akış gösterirken bölgesel olarak organik fazda seyrelme görülür ve ani bir şekilde lipozomlar kendiliğinden

oluşmaya başlar. Daha sonra lipozom dispersiyonundan organik faz uzaklaştırılır (16,17). Membran kontaktör yöntemi ile yaklaşık 100 nm boyutunda yüksek ilaç taşıma kapasitesine sahip lipozomlar elde edilebilmektedir. Sulu faz akış hızı ve organik faz pompa basıncı ayarlanarak modifikasyonlara imkan verdiği için endüstriyel anlamda da kabul edilebilir bir yöntemdir (17).

Süperkritik çözücü ters faz uzaklaştırma (SRPE) yöntemi ile, fosfolipitlerin süperkritik özelliklerdeki karbondioksitte (CO_2) çözündürölmesi sonucunda lipozomal sistemler elde edilmektedir (18,19). Süperkritik değerlerde CO_2 , sıcaklık ve basınca bağlı olarak uygun bir çözücü özelliği gösterir. Bu yöntemle hazırlanan lipozomlar, geleneksel yöntemlere göre 5 kat daha fazla etken madde taşıma özelliği gösterir (18-20). Ayrıca bu teknolojinin çevre dostu olması, ucuz ve ilaç organik çözücü etkileşimini ortadan kaldırması en büyük avantajlarıdır.

Yine, süperkritik CO_2 'nin anti çözücü olarak kullanıldığı süperkritik antiçözücü (SAS) yöntemi de lipozomal formölasyonların hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu yöntemde, fosfolipit içeren organik çözeltiye anti çözücü olarak süperkritik CO_2 eklenmekte ve fosfolipitler çöktürölmektedir. Çökelti halindeki lipit tabakası sulu bir tampon yardımı ile hidrate edildiğinde, yüksek ilaç taşıma kapasitesine ve yüksek stabiliteye sahip lipozomlar elde edilebilmektedir (21,22).

Tablo 2.3. Lipozom hazırlama yöntemleri, yöntemlerin üstünlükleri ve sakıncaları (4,11)

Yöntem	Üstünlükleri	Sakıncaları
Bangham Yöntemi	Tek basamaklı işlem	Organik çözücü kullanımı, partikül boyutu kontrolü sağlanamaması, zaman sorunu, sterilizasyon problemleri
Deterjan Uzaklaştırma Yöntemi	Basit tasarım, homojen ürün, partikül büyüklüğü kontrolü	Organik çözücü kullanımı, deterjan kalıntısı riski, zaman sorunu, düşük enkapsülasyon etkililiği.
Ters Faz Uzaklaştırma Yöntemi	Basit tasarım, uygun enkapsülasyon etkinliği	Organik çözücü kullanımı, zaman sorunu, sterilizasyon problemleri
Enjeksiyon Yöntemleri	Tek basamaklı işlem	Organik çözücü kalıntısı riski, gözenek tıkanma riski, sterilizasyon problemleri
Yüksek Basıncılı Homojenizasyon Yöntemi (HPH)	Büyük hacimde üretim imkanı, basit tasarım, 100 nm partikül boyutu	Organik çözücü kalıntısı riski, sterilizasyon problemleri
Mikroakışkan Teknolojisi	Partikül boyu kontrolü imkanı, 29 nm ye kadar partikül boyutu	Büyük ölçekte üretim de zorluk, organik çözücü kalıntısı riski
Membran Kontaktor Yöntemi	Partikül boyu kontrolü imkanı, endüstriyel anlamda kullanılabilirlik, 100 nm partikül boyu, yüksek enkapsülasyon etkinliği	Organik çözücü kullanımı
Süperkritik CO ₂ kullanılan Yöntemler (SRPE ve SAS)	Partikül boyu kontrolü imkanı, yerinde sterilizasyon imkanı, düşük miktarda (sıfır yada sıfıra yakın) organik çözücü gereksinimi	Karmaşık sistem, maliyet sorunları.

2.1.3. Lipozom Karakterizasyonu

Lipozomlar için boyut ve zeta potansiyel ölçümleri, polidispersite indeksi, termodinamik özelliklerin saptanması gibi fiziksel karakterizasyon yöntemlerinin yanı sıra, kolesterol oto-oksidasyonu, antioksidan degradasyonu, aktif bileşen degradasyonu gibi kimyasal stabilite ölçümleri, farmakope bazlı mikrobiyal analizler ve temel karakterizasyon yöntemleri (pH, osmolarite, organik çözücü kalıntı analizleri ve ağır metal tayini) uygulanır (23,24).

Boyut ve polidispersite analizleri için, dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering – DLS), Coulter counter, mikroskobik analizler (Transmisyon Elektron Mikroskobu – TEM, cryo-TEM ve Atomik Kuvvet Mikroskobu – AFM) uygulanmaktadır (4,8,24).

Lipozomların fiziksel karakterizasyonunda ve özellikle stabilite ölçümlerinde en fazla dikkate alınan parametre elektriksel yük dağılımından ortaya çıkan zeta potansiyeldir. Ölçüm hücresi içerisinde bulunan lipozomlar üzerine uygulanan elektriksel alana ilave

olarak bir ışık demeti gönderilir ve lipozomların elektriksel kuvvet sonucu oluşan hareketi sonucundaki saçılan ışık demetindeki dalgalanmalar yardımı ile ölçüm gerçekleşir (24).

Tablo 2.4. Lipozomlarda kullanılan karakterizasyon ve kalite kontrol yöntemleri (23)

Temel karakterizasyon parametreleri	Yöntem
pH	pH metre
Osmolarite	Osmometre
Organik çözücü kalıntısı	NMR, Gaz Kromatografisi (GC)
Fosfolipit içeriği	TLC, HPLC
Fiziksel karakterizasyon parametreleri	
Zeta potansiyel	Elektroforetik hareket
Boyut (Mikron ve mikron altı ölçümler)	DLS (Dynamic Light Scattering) SLS (Static Light Scattering) LD (Laser Diffraction) CC (Coulter Counter)
Kimyasal parametreler	
Fosfolipit hidrolizi	TLC, HPLC
Kolesterol oto-oksidasyonu	TLC, HPLC
Antioksidan degradasyonu	TLC, HPLC
Mikrobiyolojik parametreler	
Sterilite	Farmakope yöntemleri
Endotoksin ölçümleri (pirojenite)	Farmakope yöntemleri

2.1.4. Lipozomal İlaç Taşıma Stratejileri

Lipozomlar medikal alanda tedavi ve teşhis amacı ile kullanılmaktadır (9,25). Hastalık açısından değerlendirildiğinde, çeşitli kanser türlerinin tedavisi başta olmak üzere otoimmün rahatsızlıkların ve enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (25). Tedavide başta parenteral uygulama yolu olmak üzere, oral, dermal ve pulmoner yolla uygulamaların tercih edildiği görülmektedir.

Lipozomların hücresel etkileşim mekanizmaları ise; adsorpsiyon (hücre yüzeyine lipozomun tutulması), endositoz (fagositoz yoluyla lipozomun hücre içerisine alınması), füzyon (hücre ile lipozomun dış kısmının birleşmesi), lipidlerin yer değiştirmesi (hücre ve

lipozom yüzeyindeki lipitlerin yer değiştirerek etkileşim göstermesi) olarak sıralanabilir (4-7, 26)

Lipozomal ilaçların hedeflendirilmesinde iki tip strateji izlenmektedir.

- Pasif hedeflendirme (uzun süre kan dolaşımında kalan lipozomlar)
- Aktif hedeflendirme (lipozom yüzeyine hedeflendirme ligandı bağlanması ile)

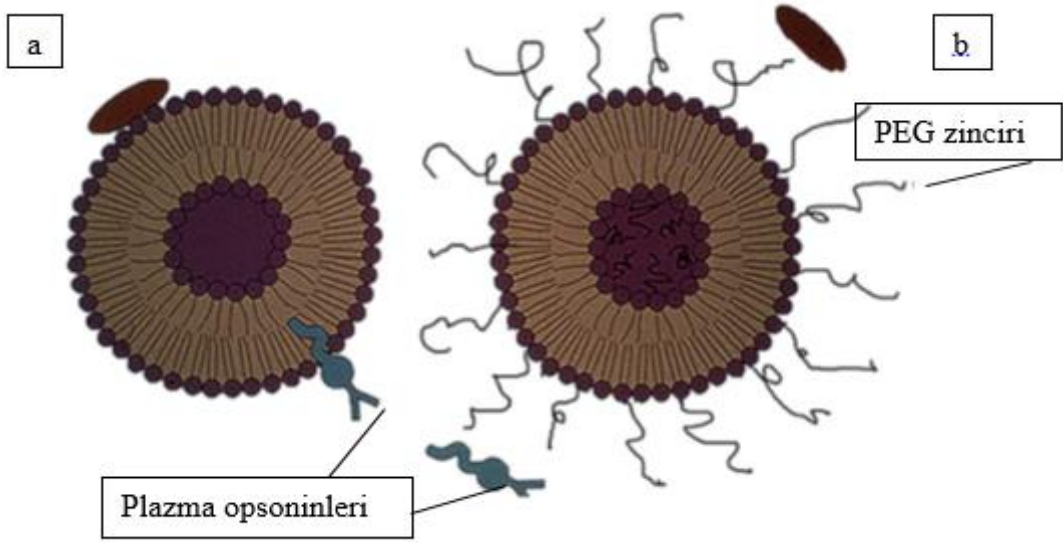
2.1.4.1. Lipozomların Pasif Hedeflendirilmesi (Uzun süre kan dolaşımında kalan lipozomlar, stealth lipozomlar)

Pasif hedeflendirme, vücudun fizyolojik ve anatomik özelliklerinin izin verdiği doğal yollar veya hastalık fizyolojisinin oluşturduğu durumlar sonucunda ilaç taşıyıcı sistemin etki göstereceği bölgeye ulaşması ile gerçekleştirilir (4).

Bu hedeflendirme tipi için izlenen stratejilerden birisi lipozomun boyutu ile ilgili olmuştur. Vücuttaki fizyolojik temizleme mekanizmalarından biri olan RES ve bu sistemin alt elemanları, küçük tek tabakalı lipozomları büyük çok tabakalı olanlara göre daha uzun sürede vücuttan uzaklaştırmaktadırlar. Yani, SUV tipi lipozomal sistemlerin kan dolaşımında kalış süreleri MLV tipinde olanlara göre daha fazladır (27).

Optimal tümör hedeflendirmesi için 100 nm boyutun kritik olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, uzun süre kan dolaşımında kalış ve uzatılmış salım eldesi için yüksek faz geçiş sıcaklığına sahip fosfolipit kullanımı, pasif hedeflendirmede büyük önem taşımaktadır (4,25,27).

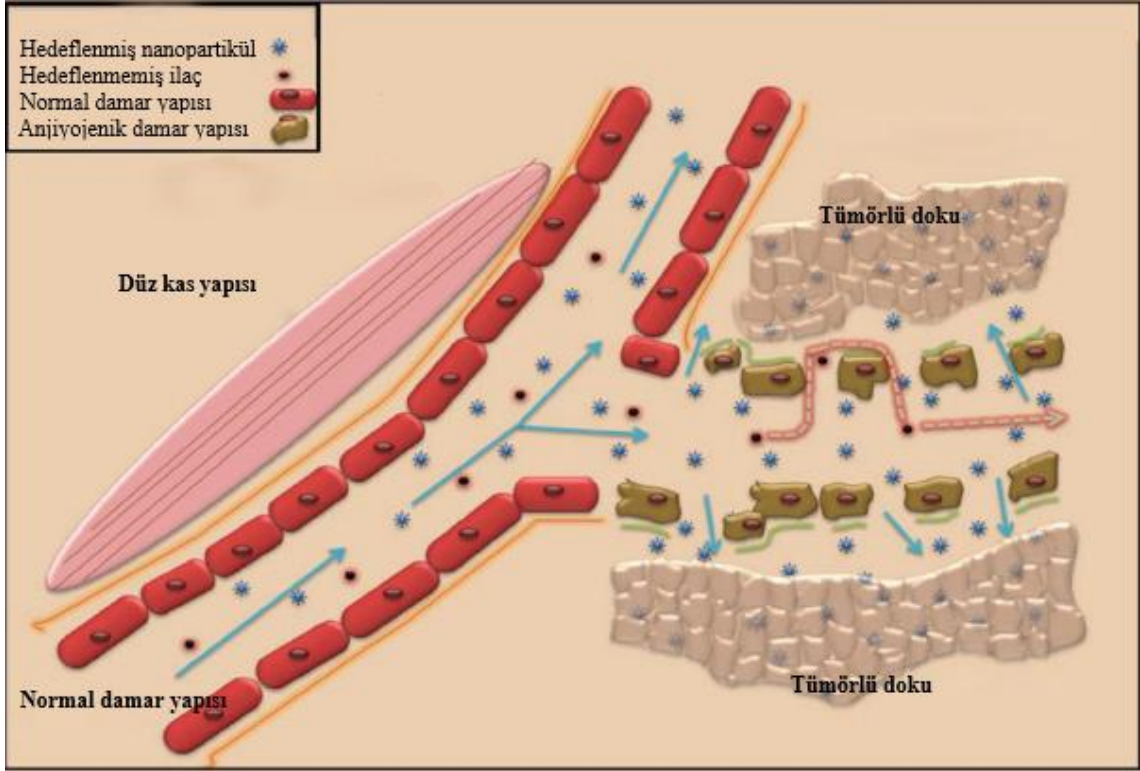
Lipozomların RES ile etkileşiminden kaçınmak ve bu sayede dolaşımında daha uzun süre kalabilmelerini sağlamak için lipozom yüzeyinin hidrofilik polimerler ile modifiye edilmesi, pasif hedefleme stratejilerinden en dikkat çekici olanıdır. Lipozomal yüzey modifikasyonu için çok sayıda hidrofilik polimer denenmiş ve polietilen glikol (PEG) ile olan türevlendirmenin olumlu sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir (25,27,28). PEG kaplı lipozomların, polimerden kaynaklanan sterik engelleme sonucunda, plazma proteinleri ve RES elemanları ile olan etkileşimlerinin (opsonizasyonun) azaldığı ortaya konulmuştur (27,29). Yüzeyi PEG ile modifiye edilmiş lipozomlar 'Stealth®' lipozomlar olarak da adlandırılırlar (25, 27-29).



Şekil 2.3. (a) PEG kaplı olmayan ve (b) PEG kaplanmış (stealth) lipozom (25)

Stealth lipozomlar RES elemanlarınca eliminasyona uğramadığı için dolaşımda uzun süre kalırlar. Bu tip lipozomal sistemlerin en güzel örneklerinden biri olarak Doxil® gösterilebilir. Kemoterapötik ilaç doksorubusin'in verilmesinde kullanılan bu lipozomal teknoloji, ilacın plazmada kalış zamanını artırmış ve yan etkilerini azaltmıştır (25).

Partikül boyutu, faz geçiş sıcaklığı ve yüzey modifikasyonu gibi özellikler, pasif olarak ilaç hedeflendirilmesinde önemli parametrelerdir. Hastalığa bağlı birtakım fizyolojik parametreler ise, pasif hedeflendirme için hazırlanan lipozomları daha avantajlı kılmaktadır. Gerek enflamasyona uğramış dokularda gerekse tümör dokularında endotel hücrelerarası boşluklar normal sağlıklı dokuya göre daha fazladır. Ayrıca tümör dokularındaki orantısız büyüme sonucunda ortaya çıkan fazladan damarlanma durumu ise tümörlü bölgenin daha fazla dolaşıma maruz kalmasına neden olmaktadır. Enflamasyon bölgelerinde ve tümör dokularında lenfatik akımın yetersiz kalması sonucu bölgedeki ilaç klerensi de oldukça düşüktür. Fizyolojik olarak bu durum literatürde artırılmış geçirgenlik ve tutulma etkisi (EPR – Enhanced permeation and retention effect) olarak geçmektedir (30-32). Hastalık fizyolojisinden köken alan bu durum; boyut, faz geçiş sıcaklığı ve yüzey modifikasyonu gibi yöntemlerden bir veya bir kaç ile pasif olarak hedeflendirilmiş taşıyıcı sistemleri geleneksel olanlara göre tedavide daha etkin kılmaktadır (30-32).



Şekil 2.4. Arttırılmış geçirgenlik ve tutulma etkisi (32)

Tedavide, pasif olarak hedeflendirilmiş sistemler her ne kadar etkin sonuçlar vermiş olsalarda, daha etkin ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için aktif ilaç hedeflendirme stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Aktif ve pasif hedeflendirme yapan taşıyıcı sistemler birlikte kullanılarak terapötik etkinliğin arttırılması ve güvenlik profillerinin (özellikle kemoterapide) iyileştirilmesi amaçlanmaktadır.

2.1.4.2. Lipozomların Aktif Hedeflendirilmesi

Lipozomların aktif hedeflendirilmesi, ilaç taşıyıcı lipozom sisteminin içerdiği etkin maddeyi hedef bölgeye (organ, doku, hücre veya hücre organeline) kadar spesifik bir şekilde teslim etmesi olarak özetlenebilir (4, 31, 32).

Lipozomal aktif hedeflendirme için lipit yapısında birtakım değişiklikler yapılması gereklidir. Bunun için ısıya veya pH'ya bağlı olarak ilaç salımında değişkenlik gösteren sistemler tasarlanmıştır (4). Bu tip lipozomal sistemler, fizyolojik uyaran aracılı aktif hedeflendirme yapan sistemler olarak isimlendirilmektedir.

Ayrıca yüzey modifikasyonlarına bağlı olarak, farklı uyarıcı destekli sistemlerde geliştirilmiştir. Bu uyarıcılar arasında manyetik dalgalar, ultrasonik dalgalar ve farklı dalga boylarındaki ışıklar sayılabilir (4,10,32). Bu tip tasarımlar ise dış uyarana bağımlı aktif hedeflendirme olarak adlandırılmaktadır.

Ligandlar (reseptör spesifik materyaller) ile yapılan yüzey modifikasyonları, adrese teslim hedeflendirme yapılabilmesi kullanılan en önemli aktif hedeflendirme tasarımlarıdır (31,33). Ligand örnekleri olarak; reseptöre özgü peptit/proteinler, monoklonal antikorlar (mAb), folik asit, transferrin gibi moleküller sayılabilir (32,34). Lipozomal sistemlerde aktif hedeflendirme yapılırken reseptöre özgü ligandlar hedeflendirici olarak seçilmektedir. Normal fizyolojik şartlarda vücutta dengeli bir şekilde dağılım gösteren folat reseptörleri, transferrin reseptörleri, asialoglikoprotein reseptörleri, lektin reseptörleri, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri (LDLR), somatostatin reseptörleri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi yapılar, bazı hastalık durumlarında belirgin olarak artmaktadır (32-34). Bu reseptörlere özgü antikorlar seçilerek hedeflendirme çalışmaları yapılmaktadır.

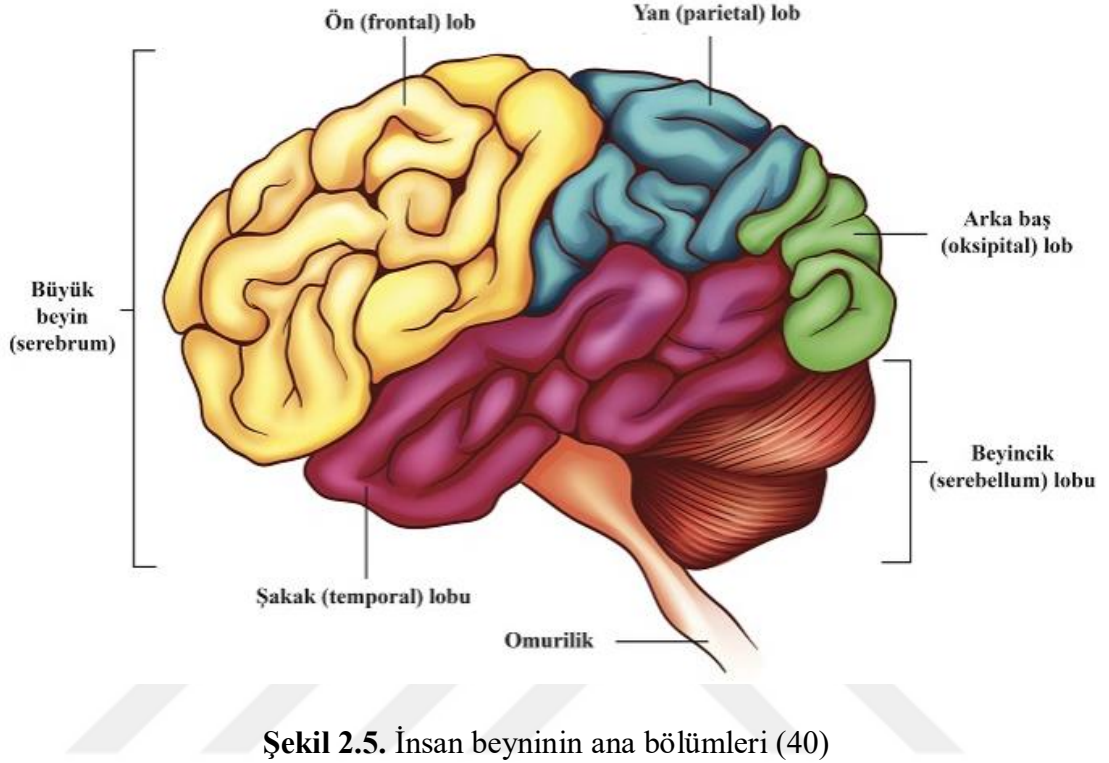
Aktif hedeflendirme çalışmalarında, lipozom ve ligand entegrasyonu esnasında yapılan işlemlerde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta ligand molekülünün lipide bağlandıktan sonra reseptöre olan özgünlüğünün ve afinitesinin değişmemiş olmasıdır. Buna ek olarak, seçilen antikorun immün sistemi uyarıcı özellikte olup olmadığı (immünojenisite) ve reseptör ile olan etkileşiminin tipi ve süresi de lipozomal aktif hedeflendirmede önem arz etmektedir (32,34).

2.2. Beyin

Beyin, vücudun çok yönlü ve en karmaşık organıdır. İnsanlarda beyin yaklaşık 1400 g civarında olup ortalama vücudun ağırlığının % 2'sini teşkil eder. (Bebeklerde %10'unu teşkil eder). Kan-beyin bariyeri (KBB) ve beyin omurilik sıvısı (BOS) gibi çok etkili bariyerler tarafından korunmaktadır (35).

KBB, beyni tehlikeli kimyasallardan veya toksik maddelerden korurken, beyindeki hücre fonksiyonları için ihtiyaç duyulan yaşamsal maddelerin geçişine müsaade eden spesifik kompleks sistemdir (36). İlaçların geliştirilmesinde en önemli sınırlayıcı faktörlerden birisi de KBB'dir (37). Çözünürlükleri ve molekül ağırlıklarına bakıldığında

çoğu ilaç KBB'yi geçememektedir (38). Hafızaya kaydetme, konuşma, bilinç, motor kontrol ve aktiviteleri ile duyu algısı-yorumlama gibi tüm görevlerin yöneticisidir (39). Aşağıda insan beyninin ana bölümleri gösterilmiştir.



Şekil 2.5. İnsan beyninin ana bölümleri (40)

Beyin lobları her bir beyin hemisferi frontal, parietal, temporal ve oksipital olmak üzere dört bölüme ayrılır. Beynin ön (frontal) lobunda talamus, hipotalamus, hipokampus, bazal ganglia, amigdala, serebral korteks bulunmaktadır. Beynin en yeni ve en geniş kısmıdır. İki yarı küreden oluşmuştur. Talamus; beynin giriş kapısıdır. Beynin tam ortasında yer alır ve her iki tarafta da birer tane bulunur. Hangi bilginin beyin ne tarafına gideceğini belirler. Korteksin aşırı bilgiye maruz kalıp boğulmasını engelleyerek filtre görevi görür.

Hipotalamus; birçok hayati fonksiyonu idare eden, beyin orkestra şefi gibidir. Talamusun yanında yer alır. Nöronlar ve hipotalamik hormonlar ile uyarılarak hipofiz bezinden (Sella Tursika-türk eğeri) salgılanan TSH, FSH/LH, ACTH, prolaktin hormonları ile vücuda dengesininde önemli rol oynar.

Hipofiz bezi, Hipotalamustan aldığı direktiflerle hormonları salgılar. Hormonlar da bazı dokulara veya organlara dağılımını ve işlevsel hale gelmesini sağlar.

Limbik sistem; amigdaladan, hipokampusdan ve singulat korteks den oluşur. Amigdala; sürekli çevreyi gözetler. Etrafta tehlikeli veya faydalı olabilecek olan şeyleri belirler. Duyguların ortaya çıktığı yerdir. Bu duyguları kullanıp kişiyi tehlikelerden uzak tutmaya ve faydalı olabilecek şeylere yaklaştırmayı sağlar. Negatif uyaranlara daha duyarlıdır. Stres ve heyecan tepkisinin verilebilmesini sağlar. Hipokampus; hafızanın oluşumunda rol oynar. Bu bölgeye zarar gelmesi öğrenme ve hatırlamada problemlere neden olabilir. Singulat korteks; duyuşal ve duygusal işlemlerde, acının deneyimlenmesinde oldukça önemlidir.

Bazal ganglionlar; motor hareketlerin kontrolü, duygular ve bilişsel fonksiyonlardan sorumludur. İsteğimiz ile başlatılan birçok hareketin daha sonra otomatik olarak devam etmesinde önemli bir rolü olduğu kabul edilir. Örneğin; ayakta futbol topunun sektirilmeye başlanması ve devam etmesi bunlardan biridir (41).

Ön (frontal) lob, yönetme ve karar verme gibi gelecekteki planlamada önemli bir rol oynar, vücut bölgelerinin hareketinin istemli kontrolü ve konuşmayı sağlamadan, davranış planlamasında kontrol edilmesinde ve ortaya konmasında sorumludur (42).

Frontal lob hasarı olan insanlar genellikle bilgi toplamak, önceki deneyimleri hatırlamak ve bu girdiye dayanarak karar vermekle uğraşırlar (43). Frontal lobun diğer birçok fonksiyonundan bazıları günlük fonksiyonların gerçekleşmesinde oynar:

Konuşma ve sözcük üretimi: Broca bölgesi, frontal lobdaki bir bölge olup, düşünceleri kelimelere dönüştürmeye yardımcı olur. Bu alandaki zarar, konuşma, dil anlama veya anlamlı konuşma yeteneğininde zayıflamalara neden olur (44,45).

Bazı motor beceriler: Frontal lob, yürüme ve koşma dahil olmak üzere gönüllü hareketleri koordine etmeye yardımcı olan birincil motor korteksi barındırır.

Nesneleri Karşılaştırma: Ön lob, bir maddeyi diğerinden ayırt etmenin yanı sıra, nesneleri kategorilere ayırmaya ve sınıflandırmaya yardımcı olur.

Anıları oluşturmak: Neredeyse her beyin bölgesi hafızada bir rol oynar, bu yüzden frontal lob benzersiz değildir. Bununla birlikte, araştırmalar uzun süreli anıların oluşturulmasında anahtar rol oynadığını göstermektedir.

Başkalarının duygularını anlama ve tepki verme: Ön lob, empati için hayati önem taşır.

Kişiliği şekillendirme: Dürtü kontrolünün, hafızanın ve diğer görevlerin karmaşık etkileşimi, bir kişinin anahtar özelliklerinin oluşturulmasına yardımcı olur. Frontal lobun hasar görmesi kişiliği kökten değiştirebilir.

Ödül arama davranışı ve motivasyonu: Beynin dopamine duyarlı nöronlarının çoğu frontal lobdadır. Dopamin, ödül ve motivasyon duygularını desteklemeye yardımcı olan beyindeki bir kimyasaldır.

Seçici dikkat dahil olmak üzere dikkatin yönetimi: Frontal lob dikkatlice düzgün bir şekilde yönetilemediğinde, dikkat eksikliği bozukluğu gibi durumlar gelişebilir (46,47).

Parietal (yan) lob bazı spesifik işlevleri yerine getirir. Korteksin bir parçası olarak, birçok sorumlulukları vardır ve duyuşal bilgileri saniyeler içinde işleyebilir. Parietal lob; farkındalık ve yön bulma gibi duyuşal bilgileri birleştirir. Parietal lob, tat, sıcaklık ve dokunma gibi bilgilerin entegre edildiği veya işlendiği yerdir. İnsanlarda parietal lob hasar görürse, dokunma hissi kaybolabilir (48-51).

Temporal Lob; Ses ve kokunun algılanması, aynı zamanda da yüzler, mekanlar gibi karmaşık uyaranların işlenmesi bu lob tarafından sağlanır (52). Fossa cranii media da sulcus lateralisin altında bulunur. Temporal lob korteksi başta duyma-işitme olmak üzere bazı duygu, hafıza ve konuşma fonksiyonları ile görevlidir. İşitme merkez alanları da bu lobta bulunur (53-55).

Oksipital Lob; Görsel bilginin işlendiği beyin bölgesidir, görsel algı sistemimizin merkezidir. Beynin önemli bir travma geçirmesi durumunda, görme alanı kusurları ve skotomlar gibi görsel-algısal sistemimizde ince değişiklikler oluşturabilir, ancak beynin arkasındaki konumlarından dolayı özellikle yaralanmalara karşı koruma altındadırlar ve küçük çaptaki travmalardan çok etkilenmez. Oksipital lobun peristriyat bölgesi, görsel olarak uzaysal işleme, hareket ayrımının yapılabildiği yerlerdir. Oksipital lobun hasar görmesi durumunda; ortamdaki nesneleri bulma zorluğu, renkleri belirleme zorluğu, halüsinasyonlar üretimi, görsel yanılsamalar nesneleri yanlış görmek, kelime körlüğü, kelimelerin tanınaması, çizilmiş nesneleri tanıma zorluğu, bir nesnenin hareketini tanıyamama, okuma ve yazma ile ilgili zorluklar ortaya çıkabilir (56-58).

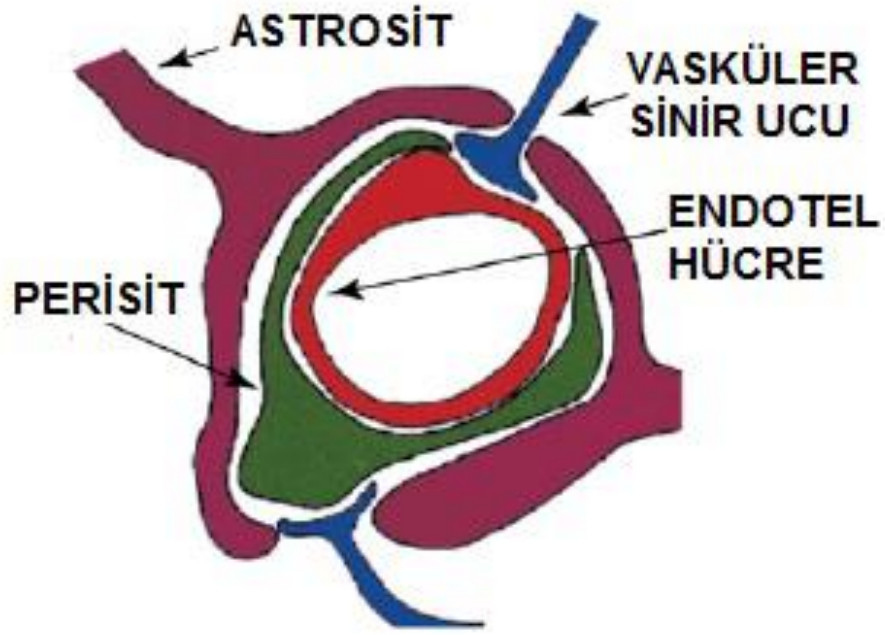
2.2.1.Beyine İlaç Hedeflendirme Mekanizmaları

Nörolojik ilaçlar ilaç endüstrisi için büyük potansiyel taşımasına rağmen, KBB'nin kısıtlayıcı özellikleri bu tip ilaçların gelişimlerini kısıtlamaktadır. Büyük molekülü ilaçların tamamı ve küçük molekülü ilaçların çoğu KBB'yi geçememektedir. Geçebilen ilaçlar ise, KBB içinde bulunan birden fazla endojen taşıyıcı sayesinde başarı sağlayabilmektedir. Bu sebeple, ilerleyen yıllarda beyne hedeflendirilmiş ilaç geliştirme planlamalarının, ilaçların endojen KBB taşıyıcıları vasıtasıyla beyne taşınmasını sağlayacak şekilde formüle edilmesi için, yeniden yapılandırılması gerekecektir (38).

1900'lü yıllardan beri varolduğu bilinen KBB, o zamanlarda, beyne ulaşmaya çalışan zarar verici madde veya kimyasallara karşı tampon görevi gördüğü düşünülen fizyolojik bir engel olarak kabul edilmekteydi. Günümüzde ise, bu bariyerin, plazma bileşenlerinin, alyuvarların ve lökositlerin beyne girişinde bariyer oluşturan bir yapı olduğu kabul edilmektedir. İskemik hasara, intraserebral hemorajiye, travmaya, nörodejeneratif süreçlere, enflamasyona ya da vasküler problemlere bağlı olarak bu yapıların beyne ulaşması, sinaptik ve nöral fonksiyonları bozucu nörotoksik ürünlerin oluşumuna sebep olmaktadır. KBB, sıkıca konuşlanmış olan beyin endotel hücrelerinden oluşmaktadır ve kan ile beyin arasındaki serbest dolaşımı ciddi şekilde sınırlandırmaktadır (59).

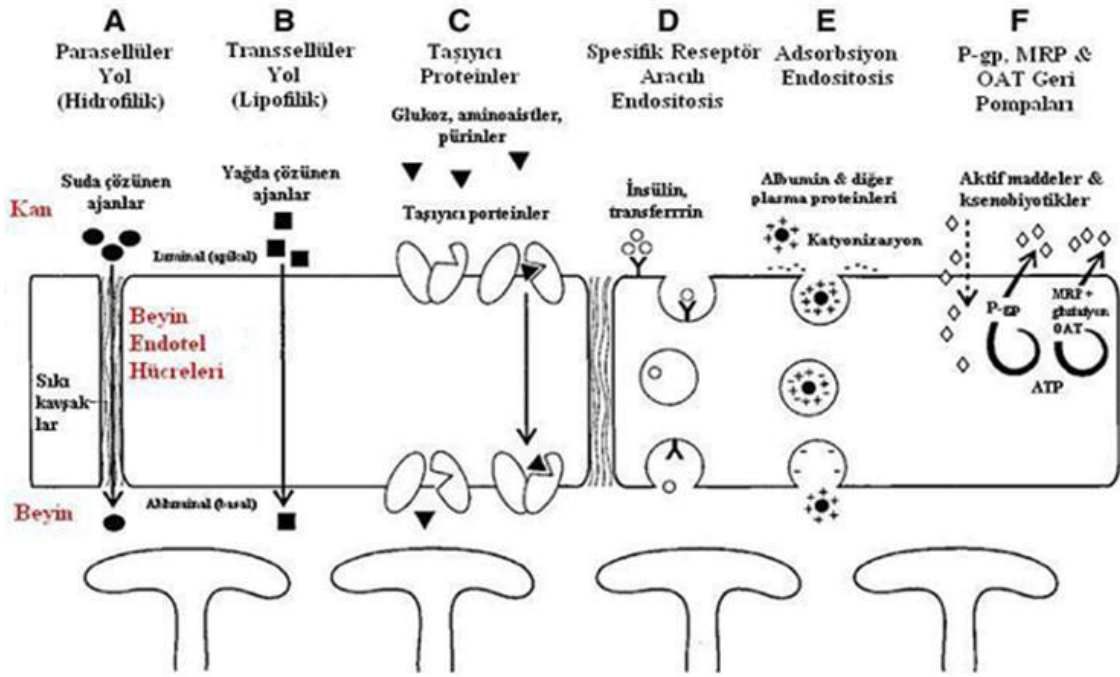
Sıkı bağlantı noktaları ile geçirgenliği kontrol altına alınan KBB'den hidrofilik bir etken maddenin geçebilmesi için, hücrelerarası endotelial engeli aşması gerekir. KBB boyunca hücrelerarası bu çift yönlü engelli geçiş farklı yollarla aşılabilmektedir. Bunlar; taşıyıcı aracılı taşıma, iyon taşıma, aktif dışa atım mekanizması ile taşıma, reseptör aracılı taşıma ve kaveol (caveolae) aracılı taşıma gibi yollardır (59-61).

Kan-beyin bariyerini meydana getiren önemli elemanlar şöyle sıralanabilir; kapiller damarların endotel hücreleri, damar çeperinin dış yüzeyinde bulunan ve yapısal destek sağlayıp pinositozda rol alan perisitler, biyokimyasal destek sağlayan ve sitokin salgılayan astrositler ve bazal membrandır (62).

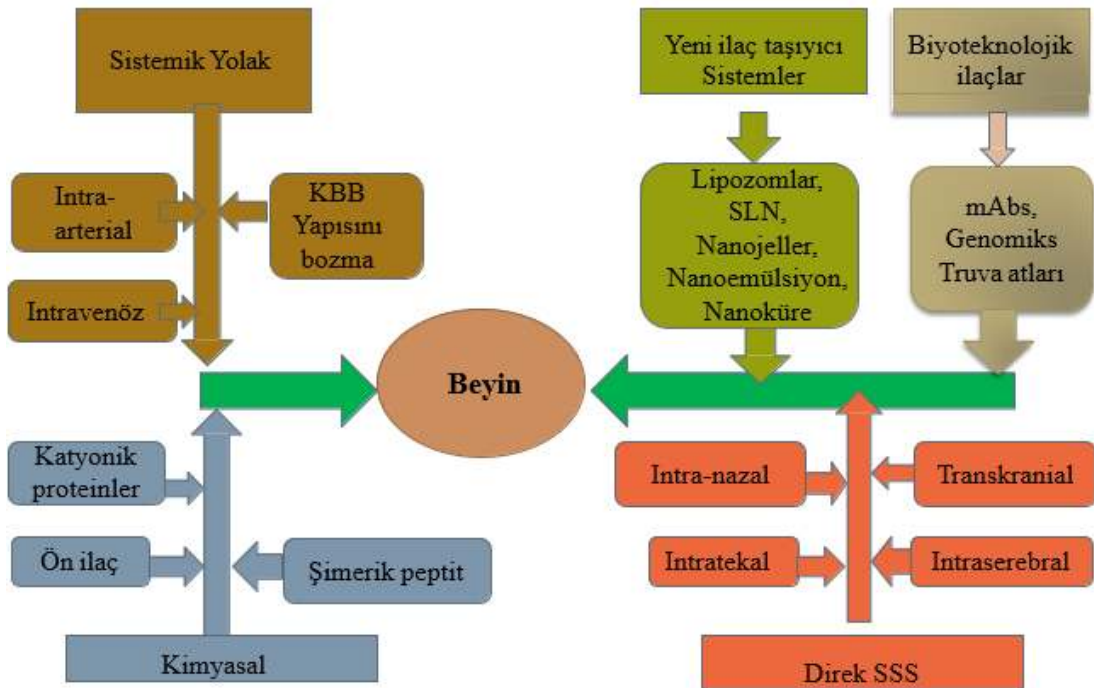


Şekil 2.6. KBB mikrovasküler yapısındaki dört temel hücre (59)

Beyin kapillerini oluşturan endotel hücreler arasında sıkı bağlantı noktaları bulunur. Kesintisiz bir bazal membrana sahiptirler. Bu bağlantı noktaları, KBB endotel hücreleri arasında yüksek bir elektrik direnci oluştururlar. Elektrik direnci diğer dokularda $3.33 \Omega/\text{cm}^2$ iken KBB’de $1500-2000 \Omega/\text{cm}^2$ olur. Bunun sonucunda paraselüler permeabilite düşer. Endotel hücrelerindeki mitokondri sayısı fazladır. Pinositik vezikülleri oldukça az ve fenestralar yoktur (62). KBB’yi geçecek olan bir madde; kapiller endoteli, internal stoplazmik alanı, daha sonra abluminal membran, perisit veya bazal laminayı aşmak zorundadır(63).



Şekil 2.7. KBB'den ilaç taşıma mekanizmaları (64)



Şekil 2.8. KBB engelinin aşılması için yaklaşımlar

Kan beyin bariyerinin aşılmasında partikül boyutu limitinin 100 nm nin altında olduğu ve bu boyutların üzerindeki partiküler taşıyıcı sistemlerin kan beyin bariyerinden geçemediği rapor edilmiştir (65). Bu sorunu aşmanın yollarından biri de yüzeylerine hedeflendirme ligandı bağlanarak, lipozomların hedef doku ve hücrelerde bulunan reseptör veya adezyon bileşiklerine hedeflendirilmesi sağlanabilmektedir (66).

Beyinde hasarlı dokudaki mikrosirkülasyondan ve lökositlerin bu bölgede akümülyasyonundan sorumlu bileşikler, hücre adezyon molekülleridir. Beyinde travmatik hasar oluşan bölgede hipoksi sonrası, (i) apoptoz ve nekroz üzerinden hücre ölümü; (ii) uyarıcı nörotransmitterlerin salımında artış, (iii) hücre içi kalsiyum miktarında artış, (iv) ve lökosit infiltrasyonunda içeren yangı olayları ile karşılaşmaktadır. Lökosit infiltrasyonunda en önemli faktörlerden biri ise endotel VCAM-1 molekülüdür. Spesifik ligandı, $\beta 1$ integrin ailesinden VLA-4 tür. VCAM-1 lökosit plazma membranı üzerinde eksprese olarak integrin VLA-4'e bağlanır. Hasarı takiben saatler içinde eksprese olan VCAM-1 molekülleri, 24 saatte optimum seviyelere ulaşır. Endotel hücrelerde VCAM-1 ekspresyonu vücutta enflamasyon alanlarında belirgindir. VCAM-1, aterosklerotik modellerde ve çeşitli kanser modellerinde de potansiyel bir ilaç hedeflendiricisi olarak kullanılmıştır (66).

Reseptör aracılı transport sistemleri etkin madde hedeflendirme için bir strateji olarak belirlenmiştir ve bu taktik "Truva Atı" olarak anılmaktadır. Normalde KBB'yi geçemeyen etken maddeler, KBB reseptörlerinden birine (transferrin, insulin gibi) karşı olan monoklonal antikor ile işaretlenerek KBB'yi geçmeleri sağlanabilmektedir.

KBB taşıyıcı vektörü-ilâç konjugatlarının tasarımının en önemli yönü, KBB iletim vektörünün ve onun kognat reseptör aracılı taşıyıcı (RAT) sisteminin seçilmesidir. RAT ile KBB taşımacılığı *in vivo* olarak umut vaat eden sistemlerdir (67).

RAT ile geçtiği bilinen ve en çok çalışılan reseptörlerden biri olan transferrin reseptörü (TR), beyne demir verilmesine aracılık etmek için beyin kılcalları tarafından yüksek oranda eksprese edilir. TR'nin doğal ligandı demir bağlayıcı protein olan transferrindir (68,69). TR, moleküller arası disülfid bağları ile birleşmiş 90 kDa molekül ağırlığındaki iki alt birimi içeren bir transmembran glikoproteindir ve her bir alt birim bir transferrin molekülüne bağlanma kabiliyetine sahiptir. Taşıma mekanizmasına ilişkin

sorular bulunmasına rağmen, transferrin ligandı beyne hedeflendirme için kullanılmıştır (70-73).

Beyine etkin maddeyi ulaştırma vektörleri; peptidler, modifiye edilmiş proteinler ve peptidomimetik monoklonal antikorlardır (MAK). Bu vektörler KBB'deki reseptörlere bağlanırlar. İnsan insülin reseptörüne ait murin 83-14 MAb, antikor dizisi tarafından immünojenik sıçan dizilerinin çoğunun yerini aldığı bir kimerik antikor oluşturmak üzere genomik olarak yapılandırılıp, insanlarda kullanılabilen potansiyel bir ilaç hedefleme vektörüdür (74).

In vivo olarak KBB'yi oluşturan beyin kılcal endoteli yoluyla ilaç hedeflendirilmesi, KBB üzerinde peptit transitoz sistemlerini hedef alan peptidomimetik monoklonal antikorlarla sağlanabilmiştir. OX26 monoklonal antikoru gibi sıçan transferrin reseptörüne yönelik murin monoklonal antikorları, sıçandaki transferrin reseptörü üzerinde KBB yoluyla hedeflenmiştir. Bununla birlikte, mevcut çalışmalar, OX26 monoklonal antikorunun farelerde etkili bir beyin dağıtım vektörü olmadığını göstermektedir. Yapılan çalışmalarda fare transferrin reseptörü üzerine, 8D3 ve RI7-217 monoklonal antikorları hedeflendirilmiş, her iki antikorun da KBB'de benzer permeabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir (75).

Amiloid- β peptid ($A\beta$), damarlar üzerinde etkileşime girerek nöronal bozukluk ve demansın altında yatan hücrel stresin yayılmasına aracılık eder. Genetik olarak manipüle edilmiş farelerde yapılan sistemik $A\beta$ infüzyonu çalışmalarında proinflatuar sitokinlerin ekspresyonuna yol açtığı gösterilmiştir. Transjenik fare modelinde, glikasyon ürün-ligand etkileşim inhibisyonun beyin parankimindeki $A\beta$ birikimini bastırdığı gösterilmiştir. Bu bulgular, vasküler glikasyon ürünleri'nin $A\beta$ 'den kaynaklanan patojenik sonuçlarını azaltmada etkili olduğunu düşündürmektedir (76).

Apolipoproteinlerin, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin beyne taşınmasında muhtemel rolü ile ilgili yapılan bir araştırmada, hegzapeptid dalargin yüklenen poli (bütir siyanoakrilat) nanopartikülleri, polisorbitat 80 ile ön kaplama yapılmadan veya yapıldıktan sonra apolipoproteinler AII, B, CII, E veya J ile kaplanmıştır. Buna ek olarak, loperamid yüklü nanopartiküller, apolipoprotein E ile tek başına kaplanarak veya polisorbitat 80 ile önkaplama yapılarak hazırlanmıştır. Polisorbitat 80 ile ön kaplama sonrasında farelere intravenöz enjeksiyondan sonra, ağrı kesici eşik, kuyruk kaldırma testi ile ölçülmüştür.

Sonuçlar sadece polisorbata 80 ve/veya apolipoprotein B veya E ile kaplanmış dalargin veya loperamid yüklü nanopartiküllerin, ağrı kesici etki sağlayabildiğini göstermiştir. Bu etki, polisorbata 80 ile ön kaplama ve daha sonra apolipoprotein B veya E ile yapılan üst kaplamadan sonra önemli ölçüde artış göstermiştir. Apolipoprotein E eksikliği olan farelerde ağrı kesici etkisi ise önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonuçlar, apolipoprotein B ve E'nin, KBB boyunca poli (bütil siyanoakrilat) nanoparçacıklara bağlanan ilaçların taşınmasına aracılık ettiğini göstermiştir. Polisorbata 80 kaplanmış nanopartiküller, enjeksiyon sonrası apolipoproteinleri kandan absorbe ederek, reseptör aracılı endositoz yoluyla beyin kılcal endotelyal hücreleri tarafından alınabilen lipoprotein parçacıklarını taklit ettiğini göstermiştir. Bağlanmış ilaçlar daha sonra endotelyal hücreler içinde serbest bırakıldıktan sonra difüzyon ile veya alternatif olarak transsitoz ile beyne ulaştırılabilmektedir (77).

Membran transferrin reseptör aracılı endositoz veya transferrin bağlı demirin ve transferrin reseptörünün kompleksi haline getirilmesi, hücresel demir alımının ana yoludur. Bu etkili hücresel alım yolu, sadece antikanser ilaçları ve proteinleri değil, aynı zamanda terapötik genleri de transferrin reseptör ekspresyonuna neden olan bir yoldur. Elde edilen konjugatlar, ilaçların sitotoksitesini ve seçiciliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Gen terapisi için kullanılan viral vektör seçeneğine potansiyel bir alternatif olarak lipozomlarla DNA'nın transferrine bağlanması gösterilmiştir (71).

Ateroskleroz ile ilişkili hastalıklı hücrelerde düzensiz mikroRNA (miRNA) inhibisyonu, hayvan modellerinde terapötik etkinliğe yol açmıştır ve insanlarda hastalıkları tedavi etmek için önerilmiştir. Ancak, sistemik taşıma yoluyla istenmeyen yan etkilere neden olması ise sorun olmuştur. Bu nedenle, bazı çalışmalarda polielektrolit kompleks miselleri içeren miRNA inhibitörüne iki farklı peptit sekansı eklenmiştir. Peptitlerden birisi olan Arginin-Glutamik Asit-Lizin-Alanin, aterosklerozun bir fare modelinde lezyona özgü hedeflemeyi gösteren bir misellar sisteminde kullanılmıştır. Diğer peptid ise Valin-Histidin-Prolin-Lizin-Glutamin-Histidin-Arginin (VHPKQHR) olarak tespit edilmiştir ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ile vasküler endotelyal hücrelere hedeflendirilmiştir. Çalışmada *in vitro* test ile aterosklerotik lezyonlarla ilişkilendirilen hücrelere, mikroRNA inhibitörlerinin lezyon ve hücreye, özel taşıma etkinliği ile peptit-hedefli polielektrolit kompleks miseller oluşturularak uygulama yapılmıştır. Çalışma sonucunda, misellerin (fibrin-hedefleme) ve VHPKQHR içeren misellerin (VCAM-1

hedeflemesi), sırasıyla makrofajlar ve insan endotelial hücrelerine miRNA inhibitörleri ulaştırmak için kullanılabileceğini göstermiştir (78).

Yağda çözünen, pH 7.4 civarında iyonize olmayan ve 500 dalton altındaki ilaç hammaddeleri KBB engelinden geçiş yapabilmektedir. Ancak suda çözünen, hidrojen bağına sahip küçük bileşenler ve hidrofilik ilaç hammaddelerin KBB engelini aşması için farklı ulaştırma yöntemleri bulunmuştur (79, 80).

KBB'yi aşarak ilaç taşınması için fizyolojik metodlardan birisi olan taşıyıcı aracılı taşınma sistemleri, kanda dolaşan şeker ve peptid yapılarının beyine ulaştırılması için uygun bir yöntemdir. Taşınacak maddenin yapısına ve çeşidine göre taşıma çeşidi de değişmektedir; örnek olarak glukoz yapısındaki şekerler için heksoz taşıma yöntemi, fenilalanin gibi diğer nötral amino asitler için nötr amino asit taşıma yöntemi, glutamat gibi maddelerde asidik amino asit taşıma yöntemi, arginin için bazik amino asit taşıma yöntemi, b-alanin için b-amino asit taşıma yöntemi, kolin ve tiamin için kolin taşıma yöntemi, laktat ve kısa zincirli yağ asitleri için monokarboksilik asit taşıma yöntemi, purin bazları için nükleozit taşıma yöntemi, mepiramin için amin taşıma yöntemi, bazı hormonlar için ve vazopressin için peptid taşıma yöntemleri kullanılmaktadır (81).

Bazı etken maddeler, proteinik yapıdaki vektörlere bağlanarak KBB'den yüzeylere tutundurulma aracılığı ile veya reseptör aracılığıyla taşınmaktadır (82). Yüzeye tutundurulma aracılığı ile taşınmada katyonik madde veya proteinler ile anyonik biyolojik membran arasındaki elektrostatik etkileşme ile olmaktadır. Bu yöntemin temel ilkesi, primer amin gruplarının oluşturulması ve bunların endotel hücrelerinin negatif yüklü gruplarına bağlanmasıdır (83). Reseptör aracılıklı taşınma ile karşılaştırıldığında daha az afinite sağladığı fakat daha yüksek kapasiteli olduğu tespit edilmiştir. Bu yöntemin yüklü proteinlerin tutundurulma yoluyla KBB'den etkin madde geçiş etkinliği ve büyük moleküllerin transferi için ideal bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir (84).

Katyonik albuminin, ilaç etken maddelerini KBB'den transferi için ideal taşıyıcılardan birisi olduğu rapor edilmiştir (85,86). Albumin normal şartlarda asidik pH'ya sahip olup KBB'den geçişi çok azdır, fakat yüzey karboksil gruplarına kovalent amid yapılarıyla bağlanarak katyonik hale getirildiğinde pH 4-5 civarından 8'e çıkar ve katyonik hale gelen albümin KBB'den kolaylıkla geçer (87,88). Buna karşın bazı katyonik plazma

proteinlerinin aşırı immünojenik etkileri yüzünden böbrek fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri rapor edilmiştir (89).

Immunoglobulin G gibi antikorlar, KBB'den geçtikleri için antikor katyonizasyonu yöntemi ile beyine ilaç hedeflendirmede kullanılmışlardır (90,91). Yapılan çalışmalarda glikoproteinlerin düşük toksikolojik özellikleri sebebiyle beyindeki primer endotel hücrelere yüksek bağlanma kapasitesine sahip oldukları için ilaç taşınmasında uygun maddeler olduğu gösterilmiştir (92,93).

2.2.2.Lipozomların Beyine İlaç Hedeflendirilmesindeki Rolü

KBB'den etken maddelerin geçişini ve beyne ilaç hedeflendirmeyi sağlayan yöntemlerden biri de nanotaşıyıcıların kullanılmasıdır (94,95). Nanotaşıyıcılar, ilaçların permeabilitesini artırarak, beyin endotel hücreleri arasında sıkı bağlantıların açılmasına yardımcı olabilirler. Nanoformülasyonların bazılarının yapıları itibariyle, yüzey aktif madde özelliği vardır. Endotel hücre zarının aşılmasında, membranların akışkanlaşmasına ve dolayısıyla kan beyin bariyeri yoluyla ilaç geçirgenliğinin artışına yardımcı olurlar. Nanoformülasyonlar ile ilaçların beyne ulaştırılması için beyin kılcallarındaki endotelial hücreler tarafından endositoza uğratarak yapıldığı gösterilmiştir (96-98).

Yapılan araştırmalar, çeşitli düzeylerde aktif veya pasif olarak ve kan dolaşımında uzun süre kalabilen PEGlenmiş lipozomların, kontrollü ve uzatılmış salınımlı lipozomların, nükleik asit polimerler, ligand-hedefli lipozomların beyne hedeflendirmede uygun taşıyıcılar olduklarını göstermektedirler. *In vitro* çalışmalarda, beyne hedeflendirilmiş lipozomal sistemlerin kullanılmasıyla, hücre dizilerinde önemli ölçüde ilaç konsantrasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (99,100).

Lipozomların hedeflendirmede çok yönlü ilaç taşıyıcı sistemler olduğu, toksik olmadığı ve nonimmünojenik olduğu bilinmektedir. Lipozomların yüzeyini PEG ile kaplamak, “gizlilik-görünmezlik” özellikleri sağlar ve vücuttaki dolaşımını büyük ölçüde uzatır. Reseptör aracılı taşımayı artırmada çeşitli hedefleme ligandları, hedeflenen ilacı ulaştırmada lipozomları işlevsel hale getirir. Lipozomlar uzun süre kan dolaşımında kalabildikleri için, hedeflendirme ligandlarıyla birlikte hedef dokudaki birikimi büyük ölçüde artırabilirler (101).

Hedefleyici bir ligand olan tripeptid glutatyon ile birleştirilen PEG'lenmiş lipozom uygulamasının, beyne ilaç iletimini arttırmak için güvenli ve çok yönlü bir yöntem olduğu gösterilmiştir (102). Yapılan çalışmada beyindeki glial hücrelere veya KBB hücrelerine hedeflenen mannoz ve sentetik glikozit içeren lipozomların başarıyla hedeflendiği görülmüştür. (103).

Sülfatid lipozomların, osmotik tedavi ile veya otsutol olmadan kan-beyin bariyerini geçip geçemeyeceğini belirlemek için, sıçanlarda internal karotid arterden lipozomlar uygulanmıştır. Sülfatid lipozomların ozmotik tedavi ile KBB'yi geçebildikleri gözlemlenmiş olup bu sayede, ozmotik tedavi ile lipozomların akümüasyonunu önleyen retiküloendotelial sistemin, çeşitli beyin hastalıklarının tedavisi için yararlı olabileceği öngörülmüştür (104).

Dosetaksel (DTX) *in vitro* olarak glioma hücrelerine karşı çok etkili olduğu bilinmektedir. DTX'in KBB yoluyla *in vivo* geçişi ilacın fizikokimyasal ve farmakolojik özellikleri nedeniyle son derece zordur. Yapılan bir çalışmada, DTX yüklü nanolipozomlar geliştirilerek beyindeki katı tümör (gliyom) gibi hastalıkları tedavi edilmesi hedeflenmiştir. KBB'yi geçmek suretiyle DTX gönderimi için çalışmalar yapılmış sonuç olarak nanolipozomlar, gliomayı DTX ile tedavi etmek için teşvik edici bir taşıyıcı olduğu belirtilmiştir (105).

Lipozomlara hapsedilen adenosin trifosfat (ATP), beyin iskemik ataklarına maruz kalan sıçanlara, karotid arterlerin kelepçelenmesi ve sistemik kan basıncının düşürülmesi ile intraserebroventriküler ve intrakarotidal olarak uygulanmıştır. Çalışmada lipozoma tutundurulan ATP'nin beyin ölümünden önce iskemik atak sayısını artırdığını göstermiştir. Sonuçlar, beyindeki ATP için yeni perspektifler açarak, bu uygulamanın beyin iskemi durumlarında insan resüsitasyonunda potansiyel olarak yararlı olduğunu göstermektedir (106).

İmmünelipozomlar üzerine yapılan bir çalışmada, sıçan glial hücreleri üzerinde bir antijene 5–113 antikoru (immün olmayan) ile yönlendirilmiştir. Fosfatidil etanolamin lipozomlar ve bu konjuge antikolar, diğer lipitler ve sitomegalovirüs promotörünün kontrolü altında bir p-galaktosidaz plazmid ile yapılandırılmıştır. Yetişkin sıçanların beyin veya omuriliğine üç farklı antikordan biri ile oluşturulmuş immünelipozomlar enjekte edildiğinde, nöronal etiketlemede bir artış ve glial etiketlemede bir artış olmuştur. Bu

veriler, immünolipozomların beyinde ve merkezi sinir sistemine gen verilmesi için etkili bir transfeksiyon sistemi sağlayabileceğini düşündürmüştür (107).

Lipozom uygulamalarının temel başarıları sterik stabilizasyon, ilaçların pH ve iyon gradyanları ile yüklenmesi ve anyonik nükleik asitlerle katyonik lipozom komplekslerine dayanan lipopleksler ya da proteinlerin lipozom uygulaması olarak sayılabilmektedir. Bununla birlikte, ilaç salım hızı üzerinde kontrol eksikliği; pH ve iyon gradyanlarının uygulanmadığı ilaçların yeterli yüklenememesi; biyolojik engelleri geçersiz kılacak araçların olmaması; terapötik olarak etkin aktif hedefleme zorluklarını da beraberinde getirmektedir (108).

İskemik beyin hasarı patogenezinde süperoksit radikallerinin rolü incelenen bir çalışmada lipozomlanmış Bakır çinko (CuZn)-süperoksit fokal serebral iskeminin bir modeli olarak kan-beyin bariyerini ve hücre zarlarını verimli bir şekilde geçirebilen lipozomlanmış süper oksid dismutaz iskemik hemisfer ve kontralateral kortekste 24 saat sonra izlenmiştir. Lipozom-CuZn-süperoksit dismutaz tedavisi ile hasar boyutlarının azaldığı görülmüştür. Bu veriler süperoksit radikallerinin odak sonrası hasar boyutunun önemli belirleyicileri olduğunu ve fokal serebral iskemik hasarın tedavisi için değerli olduğunu göstermiştir (109).

Paklitaksel için bir folat reseptör hedefli lipozomal formülasyon çalışmasında folat reseptörünü hedefleyen paklitakselin yeni bir lipozomal formülasyonu sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Bu formülasyon, geleneksel Cremophor EL-bazlı formülasyon ile ilişkili toksisitesinin üstesinden gelmek ve uzun süreli sistemik dolaşım zamanının avantajlarını ve sıkça epitelyal kanser hücreleri üzerinde aşırı eksprese edilen folat reseptörlerinin seçici hedeflenmesini sağlamak üzere tasarlanmıştır. Formülasyonda dipalmitoil fosfatidilkolin / dimiristoil fosfatidilgliserol / monometoksi bileşimiyle başarılı hedeflendirme sağlanmıştır (110).

Kan-beyin bariyerinde ilaç taşıyıcılarının modülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada aktif transport proteinleri hakkında araştırmalar yapılmıştır. Taşıyıcı protein fonksiyonunu modüle etmek için yeni yaklaşımlar, taşıyıcı bazlı immünolipozom ve nanopartiküler sistemler gibi hedefe yönelik ve hedefe özgü ilaç verme sistemleri ile problemlerin üstesinden gelindiği gösterilmiştir (111).

Santral sinir sistemine lipozomal taşıyıcıların ulaştırılmasında KBB ve kan-tümör bariyer modifikasyonunun etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda intravenöz uygulanan, indiyum işaretlenmiş lipozomların santral sinir sistemine biyo-dağılımı araştırılmıştır. KBB ve kan-tümör bariyeri, etoposidin intrakarotid uygulaması kullanılarak modifiye edilmiş ve tümör-implante edilmemiş hemisferlerde meningeal tümör tutulumunun varlığı, lipozomların alımını 10 kat artırdığı rapor edilmiştir. Bu bulgular, santral sinir sistemi tümörlerinin tedavisi için beyne ilaç hedeflendirmede, lipozomal terapötik protokollerin tasarlanmasında klinik uygulanabilirliğe sahip olabileceğini göstermektedir (112).

In vitro ve *in vivo* deri altı tümörlü modellerde de lipozomların beyin tümör hücrelerine monoklonal antikor 2C5 aracılı bağlanması üzerine yapılan bir çalışmada, insan beyin tümör hücrelerini spesifik olarak tanıyabilmesi ve beyin tümör hücrelerine *in vitro* ve *in vivo* olarak hedeflenen lipozom için spesifik bir ligand olarak monoklonal antikor 2C5'in araştırmaları yapılmıştır. Monoklonal antikor 2C5'in beyin tümör hücrelerine olan afinitesi akış sitometrisi ile test edilmiştir. 2C5-immünolipozomların beyin tümör hücreleri ile *in vitro* etkileşimi, floresan mikroskobu ile incelenmiştir. *In vivo* birikim çalışmalarında kayda değer olumlu sonuçlar görülmüştür (113).

İmmünolipozomları kullanarak antineoplastik ajan daunomisin'in beyne ulaştırılması ile ilgili bir çalışmada, immünolipozomlar (antikor-yönelimli lipozomlar), sıçan beynine verilmiştir. Bu çalışmada tiyole edilmiş bir antikorun, PEG ile sterik olarak stabilize edilmiş maleimidlenmiş 85-nm lipozomlara konjugasyonuna izin veren bir birleştirme prosedürü uygulanmıştır. Antikor, PEG-konjuge edilmiş bağlayıcı lipidin terminal ucuna bağlanmıştır. Bu sayede transferin reseptörüne OX26 monoklonal antikor tarafından bağlanması, optimal beyin iletimi ile sonuçlanmış ve bu sonuca ek olarak yüksek antikor yoğunlukları gözlenmiştir. İmmünolipozomların beyindeki seviyelerinin 24 saat boyunca gözlemlenmesi, bu lipozomların beyin dokusunda biriktiğini ortaya çıkarmıştır. Tek bir lipozom 10.000 ilaç molekülü taşıyabildiği için; monoklonal antikorun ilaç taşıma kapasitesini, büyüklük olarak 4 logaritmik sıraya kadar artırmıştır. Sonuç olarak, sıçan beynine daunomisin'in spesifik OX26 aracılı hedeflemesi, bir immünolipozom bazlı ilaç taşıyıcı sisteminin kullanılmasıyla elde edilmiştir (114-116).

İmmün sistemin fagositik hücrelerinin, özellikle de nötrofiller ve monositlerin, beyne ilaçların taşıyıcıları olarak kullanılabileceği ile ilgili bir çalışmada, fagositik

hücreleri hedeflemek için; negatif yüklü nano boyutlu lipozomlar, KBB'den geçemeyen bir nörolojik ilaç olan serotonin enkapsüle edilerek formüle edilmiştir. Lipozomal alendronat ile uygulama sonrası, monositlerin inhibisyonu ile sonuçlanmasına rağmen, nötrofillerin inhibisyonu ile sonuçlanmadığından ve beyin iletimi olmadığından, monositlerin beyine hedeflendirilmesinde lipozomların ana taşıyıcıları olduğu belirtilmiştir (117).

Beyine ilaç hedeflendirme ve beyin gliomunda terapötik etkinliği geliştirmek için peptid (AYGRKKRRQRRR) ile modifiye edilmiş lipozomlar, beyine ilaç formülasyonunu ulaştırma etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmada beyin glioma tedavisinde peptid, doksorubisin yüklü lipozomun hazırlanması için kolesterol ile konjuge edilmiştir. Sonuç olarak, peptid ilaveli modifiye lipozomun KBB'yi geçmesi, lipozomun yüzeyi üzerindeki peptid ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Peptid ile modifiye edilmiş lipozom, beyin gliomunda terapötik etkinliği artırabildiği sonucu ortaya çıkmıştır (118).

Beyine ilaç hedeflemesi için lipozoma hapsedilmiş polietilenimin / oligodeoksineotit polileksleri ile yapılan çalışmada, ilaçların intravenöz uygulamalardaki hedeflendirilmelerinin retikulo endotelyal sistem tarafından eliminasyonu nedeniyle sınırlı olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, sistemik dolaşım süresini uzatmak ve retikulo endotelyal sistemine ilaç alımının önlenmesi açısından çalışmada PEG'lenmiş lipozom teknolojisi uygulanmıştır. PEG-stabilize lipozom serum içinde stabil kalmıştır. İntravenöz uygulama sonrasında, PEG-stabilize lipozom'daki DNA, hapsedilmemiş polilekslere kıyasla, sistemik dolaşımdan önemli ölçüde daha düşük bir hızda elimine edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca, PEG-stabilize lipozom'un transferrin reseptörüne spesifik antikor ile hedeflenmesi, tutulan oligodeoksineotit'in biyodağılımını yeniden yönlendirmiş ve hedeflenen organda, yani beyinde önemli birikime yardımcı olduğu tespit edilmiştir (119).

Lipozomlar, spesifik ligandları yüzeylerine bağlayarak spesifik dokulara hedeflendirilebilen taşıyıcılardır. Uzun süre sistemik dolaşımda kalan lipozomlar, yüzeylerinin belirli kimyasal ve biyolojik olarak inert sentetik polimerler ile oluşturulmasıyla da hazırlanmıştır. Mevcut lipozomal hazırlama sistemleri, uzun ömürlülük ve hedeflenebilirliği bir araya getirebilir.

Lipozomları proteinler (enzimler), peptitler ve DNA dahil olmak üzere çeşitli biyolojik olarak aktif maddeler ile yüklemek için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Lipozomların *in vivo* özellikleri, farmakokinetikleri, birçok modelde araştırılmıştır. Lipozomlara hapsedilen ilaçlar, istenmeyen toksik veya immünojenik etkileri tetiklemez ve fagositik hücreler tarafından etkisiz hale getirilemez özelliklere sahip olması beklenmektedir.

Lipozom hedeflemesi için özet olarak halihazırda kullanılan ligandlar, antikorları ve bunların fragmanlarını, folat, transferrin ve bazı peptidleri içerir. Lipozomlar, uyarana duyarlı hale getirilebilir, beyindeki veya vücuttaki kanser gibi patolojik alanların karakteristiklerini oluşturarak ilacı pH duyarlı olarak ve farklı sıcaklıklarda serbest bırakabilirler (120).

2.2.3.Travmatik Beyin Hasarı

Son yıllarda ciddi travmatik beyin hasarı olan hastalarda mortalite ve iyileşmedeki azalma, “beyinde şişmeye bağlı ödem sebebiyle oksijenli kanı sıkma” yaklaşımına bağlandığı düşünülmüştür. İntrakraniyal basıncın izlenmesi ve serebral hipoperfüzyonun tedavisi ile serebral perfüzyonun nicel değerlendirmesinin ikincil hasarı azaltacağı öngörülmektedir (121). Yapılan araştırmalarda travmatik beyin hasarına bağlı olarak dünyadaki 1.1 milyon acil servis vakasınının 235.000 i hastaneye yatış ile ve 50.000 i de ölümle sonuçlanmaktadır (122). Travmatik beyin hasarı ile ilişkili nöral hasar mekanizmaları, birincil (etki sırasında ortaya çıkanlar) ve ikincil (yaralanmadan birkaç gün sonra meydana gelenler) olarak sınıflandırılmıştır ve bunlar genel olarak beyin yanıtının bir sonucudur (123,124).

Travmatik beyin hasarı, beyin fonksiyonlarında geçici veya kalıcı etki bırakarak beyin dokusuna zarar veren bir durumdur (125). Yapılan çalışmalarda gözlem ve bilgisayarlı tomografi taraması gibi artan risk göstergeleri olarak birkaç kriter belirlenmiş, ancak bu kriterlerin bile yeterli olamayacağı düşüncesiyle hastalığın teşhisinde bazı ilave kriter önerileri sunulmuştur. Bu kriterler; acil durumlarda karışıklık veya farkındalık, kafatası kırığı, nörolojik belirtiler veya şiddetli baş ağrısı veya kusma, zor değerlendirme (özellikle genç yaş, zehirlenme), diğer yüksek riskli tıbbi durumlar (örneğin antikoagülan kullanımı) sayılmaktadır (126). Travmatik beyin hasarı olan hastanın tedavisi, son yıllarda

intrakraniyal patofizyolojinin daha iyi anlaşılmasıyla hızla ilerleyen bir alandır. Sıvı kısıtlaması ve hiperventilasyon gibi birçok konvansiyonel tedavi artık önerilmemektedir. Hipotermi gibi diğer önerilen tedaviler tartışmalıdır (127). Bu gibi zorluklar sebebiyle travmatik beyin hasarı tedavisi yapılana kadar, tedavi için aşırı ücretler ödenmeye devam edilecektir. ABD'de tıbbi maliyetler ve üretkenlik kaybı da dahil olmak üzere travmatik beyin hasarı'nın ekonomiye maliyeti, yıllık 60 milyar dolar civarındadır (128).

Travmatik beyin hasarı, özellikle genç nüfusta en fazla ölüm ve sakatlık nedeni olmasına rağmen, patofizyolojisi ve tedavisi konusunda yapılan çalışmalar henüz yeterli düzeye ulaşmamıştır. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisi amacıyla henüz koruyucu bir ilaç da geliştirilememiştir. Nöroprotektif etkili olduğu düşünülen ve klinik çalışmaları yapılan ilaçların büyük çoğunluğu, yan etkilerinin fazlalığı nedeniyle başarısız olmuştur. Beyin travmasının tedavisinde kullanılacak ilaçların insanlarda iyi tolere edilebilmesi büyük önem taşımaktadır (129).

Travmatik beyin hasarı için oluşturulan hayvan modelleri ve bu hayvanlarla yapılan çalışmalar, genç erişkinlerde ölüm ve sakatlığın ana nedeni olan bu problemin karmaşık patojenezini aydınlatmada kritik bir rol oynamıştır. Yapılan çalışmalarda, kafa travmasında nöropatolojik süreçlerin araştırılması için farklı hayvan modellerinin nasıl yararlı olduğunu tartışılmıştır (130).

Fokal korteks travmasından sonra beyin hasarının, glial hücre dizisi kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) geninin adenoviral olarak verilmesiyle azaltılabileceği ile ilgili araştırmalarda bu faktörün sıçanlarda kortikal soğuk yaralanmaya karşı koruduğu görülmüştür. Çalışmada, E1 bölgesinde silinmiş bir adenoviral vektörün GDNF genini eksprese eden bir vektör aracılı enjeksiyonları, sıçan sensorimotor korteksine stereotaktik olarak uygulanmış ve bir gün sonra serebral korteksin soğuk lezyonları indüklenmiştir. Lezyonlar yaralanmadan bir gün sonra belirgin bir şekilde ödem ile ilişkilendirilmiştir. Sonuçta, adenoviral GDNF uygulamasının fokal korteks travmasında koruyucu olduğunu göstermiştir (131).

Travmaya veya iskemiye bağlı beyin hasarlarında terapötik proteinlerin, ilaçların dokulara ve KBB içerisine ulaştırılması, büyüklükleri ve biyokimyasal özellikleri sebebiyle sınırlıdır. Farelerde fokal serebral iskemi sonrası 11-amino asitli insan immün yetmezlik virüsü proteini transdüksiyon bölgesi, daha büyük peptitlerle birleştirildiğinde

bile hücre zarlarını ve KBB'yi geçebildiği rapor edilmiştir. Çalışmalarda glial türetilmiş nörotrofik faktör füzyon proteininin fokal serebral iskemide koruyucu olduğu, iskemik veya travmaya bağlı hasar bölgelerine ulaşılabilceği görülmüştür (132-135).

Travmatik beyin hasarı sırasında ortaya çıkan doku hasarı, serbest radikal üretimi ve N-metil-d-aspartat tipi glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu da dahil olmak üzere çeşitli patofizyolojik olayların bir sonucudur. Travmatik beyin hasarının kompleks patofizyolojisi düşünüldüğünde, hasar sırasında ortaya çıkan farklı olayları hedefleyen nöroprotektif bileşiklerin veya bunların kombinasyonunun hasarın tedavisinde olumlu bir yaklaşım olabileceği düşünülmüştür. Travmatik beyin hasarı sonrası farelerde farklı patofizyolojik olayları hedeflemede melatonin ve memantin üzerine yapılan çalışmalarda, hem N-metil-d-aspartat tipi glutamat reseptörlerinin antagonisti olan memantini, hem de serbest radikal süpürücü olan melatonin, travmatik beyin hasarı tedavisi için kullanılmışlardır. Burada, tek başına veya memantin ile birlikte uygulanan melatoninin, sinyal yollarının aktivasyonu, hasar gelişimi ve DNA fragmentasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde her iki bileşik de beyin hasarını orta derecede ve DNA fragmentasyonunun yoğunluğunu önemli ölçüde azaltmıştır. Kombinasyon halinde kullanıldığında beyin hasarı ve DNA fragmentasyonunu önemli ölçüde azalttığı ve bunun sebebinin de azalmış p38 ve ERK-1/2 fosforilasyonu ile ilişkilendirildiği rapor edilmiştir (136-139).

Beyinde hasarlı dokudaki mikrosirkülasyondan ve lökositlerin bu bölgede akümülyasyonundan sorumlu bileşikler, hücre adezyon molekülleridir. Beyinde travmatik hasar oluşan bölgede kısaca, hipoksi sonrası (i) apoptoz ve nekroz üzerinden hücre ölümü; (ii) uyarıcı nörotransmitterlerin salınımında artış, (iii) hücre içi kalsiyum miktarında artış, (iv) ve lökosit infiltrasyonunda içeren yangı olayları ile karşılaşmaktadır. Lökosit infiltrasyonunda en önemli faktörlerden biri ise endotel VCAM-1 (Vasküler hücre adezyon molekülleri) molekülüdür. Spesifik ligandı, Beta1 integrin ailesinden VLA-4 (Very late antigen 4) tür. VCAM-1 lökosit plazma membranı üzerinde eksprese olarak integrin VLA-4'e bağlanır. VCAM-1 molekülleri hasarı takiben saatler içinde eksprese olur, 24 saatte optimum seviyelere ulaşır. Endotel hücrelerde VCAM-1 ekspresyonu vucutta enflamasyon alanlarında belirgindir. VCAM-1, aterosklerotik modellerde ve çeşitli kanser modellerinde de potansiyel bir ilaç hedeflendiricisi olarak tespit edilmiştir (66).

KBB'nin bozulması, travmatik beyin hasarının bir sonucu olabilir ve akut olaydan birkaç gün, hatta yıllar boyu sürebilir. İkincil KBB yıkımı hasardan saatler veya günler

sonra başlayabilir, ödem, nöroinflamasyon ve hücre ölümü gibi süreçlerle ilişkilidir ve potansiyel olarak tedavi edilebilir olduğu düşünülür. Deneysel veriler, KBB yıkımının Alzheimer hastalığı, bilişsel ve psikolojik bozukluklar ile epilepsi gibi uzun süreli travmatik beyin hasarı komplikasyonlarının klinik sonucuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu durumunun hızlı tespiti ve izlenmesi için yeni, pratik ve verimli teşhis araçları için acil bir çözüm ihtiyacı bulunmaktadır. KBB'nin aracılık ettiği hasarın modifiye edilmesine yönelik acil tedavi stratejileri söz konusu olsa da, bu yıkımdan kaynaklanan ikincil hasarın önlenmesi veya tedavisi için kabul edilen hiçbir tedavi protokolü bulunmamaktadır (140-144).

T lenfositlerin infiltrasyonu, transplant rejeksiyonunda ve birkaç otoimmün bozuklukta önemlidir, ancak travmatik beyin hasarında T lenfositlerin rolü büyük ölçüde bilinmemektedir. Travmatik beyin hasarı sonrası beyindeki bağışıklık hücrelerinin trafiği araştırıldığında endotel düzeyindeki reaktif oksijen türlerinin atılımının, aktive edilmiş T lenfositlerinin infiltrasyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. İmmün hücre infiltrasyonu, sıçanlarda T lenfositlerin, nötrofillerin ve makrofajların / mikrogliolar üzerine yapılan analizlerde T lenfosit ve nötrofil infiltrasyonu 24 saatte ve makrofajlar / mikrogliolar hasardan 7 gün sonra en yüksek seviyeye çıkmıştır. Hasarı takiben 24 saatte endotel adezyon molekülleri, ICAM-1 ve VCAM1 'in ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmıştır. Endotel seviyesindeki serbest radikallerin inhibisyonunun hasar sonrası T lenfosit ve nötrofil infiltrasyonunu etkilediği sonucuna varılmıştır. T lenfosit infiltrasyonunun azalmasının, hasar sonucunu iyileştirmede önemli bir özellik olduğu belirtilmiştir. T lenfosit trafiğini mikrovasküler seviyede hasar oluşan beyine hedeflemenin, travmatik beyin hasarı tedavisinde yeni bir nörokoruma kavramını oluşturduğu ileri sürülmüştür (145).

Matriks metalloproteinazlar (MMPler), hücre dışı matrisi bozan bir proteolitik enzim ailesidir; damar yapısındaki bozulmalarla vazogenik ödemlere yol açabilen kritik enzimlerdir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) vazoperik ödemdeki MMP'lerin rolünü araştırmak için, transgenik fareler kullanılarak soğuk hasar (cold injury) önce ve sonra jelatinaz aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlar, soğuk hasardan sonra ROS üretiminin, MMP'lerin indüksiyonuna ve aktivasyonuna katkıda bulunabileceğini ve böylece endotel hücre hasarını ve yaralanma sonrası vazogenik ödem gelişimini artırdığını göstermiştir. Böylece transgenik farelerde bakır ve çinko süperoksit dismutaz aşırı

ekspresyonu, soğuk yaralanmaya bağı beyin travması sonrası matriks metalloproteinazların indüksiyonunu ve aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (146,147).

Travmatik beyin hasarına yanıt olarak serebral gen ekspresyonları değişir ve travma tedavisi, ekspresyon artışıyla gelişebilir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda kontrollü kortikal etki ile soğuk hasara maruz bırakılmış ve yaralanma sonrası çeşitli zamanlarda, neokorteks ve hipokampustan mRNA izole edilmiş ve transkripsiyonel değişiklikler kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gen dizi analizi kullanılarak incelenmiştir. Düzenlenmiş transkriptlerin ürünleri, stres, iltihaplanma ve bağışıklık tepkileri ve doku yeniden modellemesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel mekanizmalarda görülmektedir. Aynı zamanda reaktif astrositleri, oligodendrositleri ve mikrogliaları karakterize eden artmış transkript seviyeleri tespit edilmiş, kemokini eksprese eden dağınık hücre kümelerinin yeni bir modeli gösterilmiştir. Özellikle, benzer hücre kümelerine yerleştirilen transkript ile antijen sunan dendritik hücreleri karakterize eden integrin alfa X' te sürekli bir artış bulunmuştur. Buna karşın, T-hücresi reseptörü alfa transkript ise çok az bir artış göstermiştir. İndüklenen P-selektin endotelial hücrelerdeki ekspresyon seviyesi ve mikroglia kaynaklı kemokinler, dendritik hücrelere farklılaşan ekstravaze edici inflamatuvar monositlerin perivasküler birikimini yönlendirebilmektedir. Hasar sonrası sekonder travmanın, iltihaplı süreçleri ve farmakolojik nöroproteksiyon için varsayılan hedefleri içeren kemokin sinyallerini içerdiği gösterilmiştir (148-150).

Özellikle fare gibi küçük kemirgenler, genetik manipülasyon için, bu türün gelişim, embriyoloji ve diğer moleküler yönleri hakkında geniş bilgi birikimi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, beyin ödemi ve nöronal yaralanma alanında nörobiyoloji araştırmaları için farelerin kullanımı yaygın olmamıştır. Farelerde soğuk yaralanmaya bağı beyin ödemi ve nöronal apoptoz mekanizmalarını inceleyen model üzerine yapılan çalışmalarda serum albümin izleyicisi Evans Blue'nun ekstravazasyonu ile gösterilen KBB geçirgenliği, yaralanmadan hemen sonra artmış ve 24 saatte kontrol seviyesine dönmüştür. Soğuk yaralanmaya bağı ödem ve özellikle oksijen radikallerinin dahil olduğu ikincil lezyon gelişiminin mekanizması aşırı eksprese edilmiş bakır, çinko ile süperoksit dismutaz transgenik fareleri kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda özellikle oksijen radikalleri, süperoksit anyonu, soğuk yaralanmaya aracılık ettiği görülmüştür. Ayrıca apoptozisin soğuk yaralanmayı takiben beyin hasarına katkıda bulunup bulunmadığını incelenmiştir. Bu çalışmalarda, uygulamanın soğuk yaralanmaya

bağlı ödem ve ikincil hasarı geliştirmeye aracılık ettiğini ve apoptotik hücre ölümü indüklediği gösterilmiştir. Farelerde soğuk yaralanma modelinin, genetik olarak değiştirilmiş hayvanlarda beyin ödemi ve apoptoz patogenezi incelemek için uygun bir hayvan modeli olduğu gösterilmiştir (151).

Beyin hacminin genişlemesine yol açan beyin ödemi; kafa içi basıncını arttırdığı, serebral perfüzyonu, oksijenlenmeyi bozduğu ve ek iskemik yaralanmalara katkıda bulunduğu için travmatik beyin hasarı sonrası morbidite ve mortalite üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Konvansiyonel olarak, iki ana tip travmatik beyin ödemi vardır: vazojenik KBB bozulması nedeniyle hücre içi su birikimi ve hücre içi su toplama nedeniyle sitotoksik etkiye neden olur. Diğer tip ise ozmotik beyin ödemi, kan ve doku arasındaki ozmotik dengesizliklerden kaynaklanır. Hasardan sonra nadiren, beyin omurilik sıvısı çıkışının tıkanmasıyla ilişkili bir hidrosefali beyin ödemi ile karşılaşılır.

Hasarın ardından, vazojenik ve / veya sitotoksik beyin ödemi arttıran çeşitli aracı maddeler salınır. Bu maddeler glutamat, laktat, H^+ , K^+ , Ca^{2+} , nitrik oksit, araşidonik asit ve metabolitleri, serbest oksijen radikalleri, histamin ve kinindir. Bu nedenle, serebral anaerobik metabolizma ve laktik asidozdan kaçınmak, H^+ ve laktatı kontrol etmek için faydalıdır. Ancak, başarılı deneysel çalışmalara rağmen, hemen hemen hiçbir bileşik inhibitör aracı, yürütülen klinik çalışmalarda yararlı sonuçlar gösterememiştir. Bu nedenle, travmatik beyin hasarı hastalarında anti-ödem tedavisi hala spesifik değil, semptomatiktir (örneğin, mannitol infüzyonu, kontrollü hiperventilasyon). Yıllar boyunca, vazogenez beyin ödemi hasar sonrası yaygın ödem türü olarak kabul edilmiştir. Ancak, mekanik hasar modellerinin gelişimi ve manyetik rezonans görüntülemenin kullanılması, hasar sonrası sitotoksik ödemin belirleyici patofizyolojik önemi olduğunu ortaya koymuştur (152).

2.3. Rosuvastatin

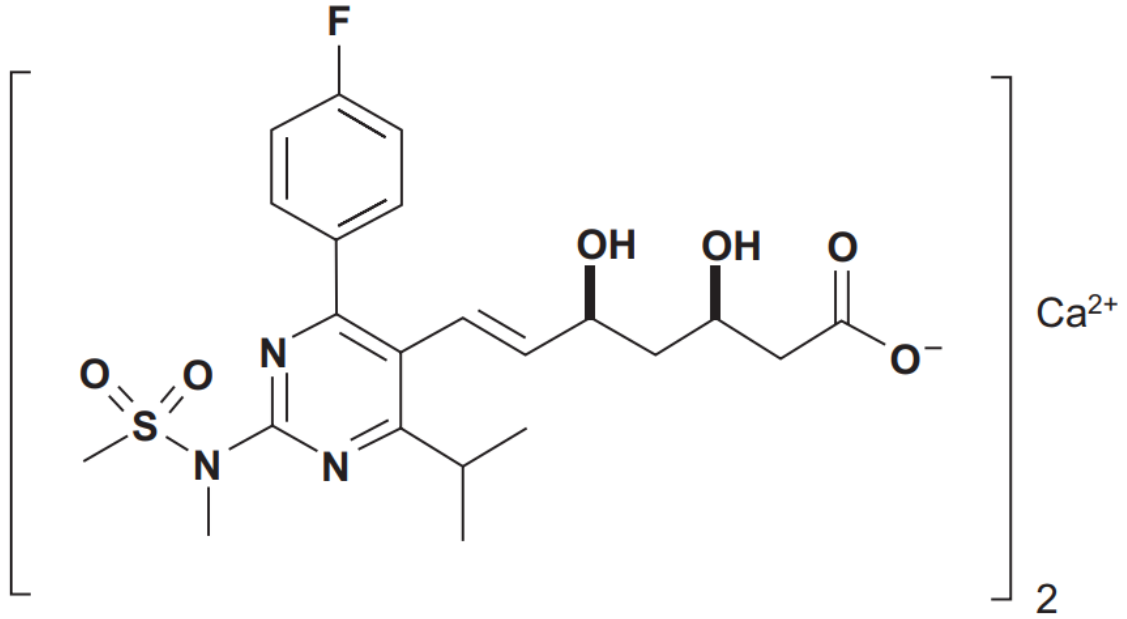
2.3.1. Yapısı, Temel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Statin grubu ilaçlarının başlıca terapötik etkisi, esas olarak karaciğerde 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibisyonunun bir sonucu olarak dolaşımdaki aterojenik lipoprotein seviyelerinde azalmayı sağlamaktır. Statinlerin aterojenik lipoproteinleri azaltma düzeyleri farklılık göstermektedir. İdeal bir statinin özelliği, karaciğerdeki farmakodinamik aktiviteyi en üst düzeye çıkarabilmesidir. Ayrıca iskelet kası gibi bazı hassas dokularda karaciğer dışındaki inhibitör aktiviteyi en aza indirebilmesidir. Ek olarak, diğer ilaçlarla istenmeyen etkileşim riski düşüktür. Diğer statinler ile karşılaştırıldığında ise RSV, HMG-CoA redüktazın nispeten güçlü bir inhibitörü olduğu ve karaciğer hücrelerinde bir dizi non-hepatik hücreye kıyasla yüksek bir seçicilik derecesine sahip olduğu tespit edilmiştir. RSV, karaciğerde diğer statinlere göre nispeten daha az miktarda metabolize olur. Orta derecede sistemik biyoyararlanıma ve nispeten uzun bir eliminasyon yarılanma ömrüne sahiptir. Bu kriterler temelinde, RSV, statin sınıfının farmakolojik özelliklerini optimize etme yolunda önemli bir adımı temsil etmektedir (153,154).

RSV (10 mg ve 80 mg) nin, aynı dozlarda uygulanan atorvastatin (10 mg ve 80 mg) ile karşılaştırıldığında, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol düşürücü etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür. Yine RSV (10 mg) nin, hem simvastatin hem de pravastatinin 20 mg'ı ile karşılaştırıldığında, LDL seviyesini daha fazla düşürdüğü gösterilmiştir. RSV, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyesini %8 ila %12 oranında artırabileceğini göstermiştir. RSV, hidrofilik özelliklerinden dolayı, insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ve fibroblast gibi dokularda zayıf penetrasyon gösterir. RSV kendine özgü farmakolojik ve farmakokinetik etki sağlayan moleküler değişikliklere sahip bir ajandır. Bu nedenle hiperlipideminin tedavisi için yeni ve özgün bir HMG - CoA redüktaz inhibitörüdür (155).

RSV (RSV kalsiyum) sentezlenmiş bir bileşik olup enantiyomeri olarak kalsiyum tuzu olarak formüle edilmiş ve uygulanmıştır; Kimyasal yapısı bis{(E)-7-[4-(4-florofenil)-6-isopropil-2-[metil (metiylsulfonil) amino] pirimidin-5-il] (3R,5S)-3,5-dihidroksihept-6-

enoik asit} kalsiyum şeklindedir. RSV kalsiyum'un formülü ($C_{22}H_{27}FN_3O_6S$) $2Ca$ dur. Molekül ağırlığı 1001.14 g/mol dır. Erime derecesi $122^{\circ}C$ dir. Element halindeki ölçümsel verileri; C: %51,01, H: %5,64, N: %8,10, F: % 3,66 olarak verilmiştir. pKa değeri ise 3,8 dir. Yapısal formülü, Şekil 2.9'da gösterilmiştir. RSV kalsiyum, beyaz ve amorf yapıdadır. Su ve metanol içinde az çözünen, etanol içinde daha az çözünebilen toz bir maddedir (156).



Şekil 2.9. RSV'nin kimyasal yapısı (156)

RSV, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, serivastatinin geri çekilmesinden bu yana onaylanan ilk statin grubu ilaçtır. Yüksek etkiye sahip olmasına rağmen, bu durum güvenliği ile ilgili önemli tartışmalar yaratmıştır. RSV ve diğer tüm statinler için, ticari kullanımdan önceki en büyük ön onayı, veri tabanına dayanan klinik kullanımlar için onaylanması olmuştur. Bu veri tabanında, RSV, 40 mg en yüksek onay dozuyla, diğer onaylanmış statinlere benzer bir güvenlik profiline sahip olmuştur. Tüm statinlerde olduğu gibi, doz 40 ila 80 mg arasında titre edildiğinde olumsuz etkilerde belirgin bir artış gözlemlenmiş ve RSV de benzer bir doz / toksisite ilişkisi göstermiştir. 80 mg için yürütülen ön onay veri çalışmalarında, % 1.0 ($n = 16$) miyopati insidansı ve 7 hastada rabdomiyoliz gelişmiştir. Bununla birlikte, 40 mg'lık dozun, diğer statinlere benzer bir miyopati oranına sahip olduğu rapor edilmiştir (157).

RSV (Crestor®, AstraZeneca, Birleşik Krallık), 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A redüktaz inhibisyonunda hepatik hücrelerde seçici etkinliğe ve farmakolojik özelliklere

sahip yeni bir statindir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolü azaltmak, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) kolesterolü artırmak ve dislipidemik durumların düzenlenmesinde günde bir kez 10–40 mg dozlarda kullanımı için onaylanmıştır (158,159)

Hafif /orta düzey hiperkolesterolemi vakalarında yapılan bir çalışmada hastalara 10–40 mg dozlarda verilen RSV'nin LDL kolesterolü % 52-63 oranında azalttığı gösterilmiştir. 10 mg dozdaki RSV'nin LDL kolesterolü, 10 mg dozdaki atorvastatin ile 10–40 mg dozlardaki simvastatin ve pravastatin'den daha fazla düşürdüğü belirtilmiştir. Hastaların her biri karşılaştırıldığında düşük LDL kolesterol hedeflerine ulaşmada önemli ölçüde başarı sağlanmıştır.

RSV ayrıca HDL seviyelerinde belirgin yükselme sağlar ve bu etkiyi doz aralığında korur. RSV, hipertrigliseridemi veya diyabetik hastalar da dahil olmak üzere karışık dislipidemisi olan hastalarda trigliseridleri, LDL kolesterolü ve diğer lipid ölçümelerini olumlu bir şekilde değiştirir ve bu gibi birçok hasta için bir monoterapi seçeneği oluşturabilir. RSV, tek başına veya kombinasyon halinde kullanıldığında, diğer mevcut statinlere benzer bir güvenlik profili sergiler ve rutin klinik uygulamada kullanım için önemli avantajlar sunar (160,161).

Yapılan çalışmalarda, doza bağlı etkiyi, orta doz tedavisi ile karşılaştırıldığında, yoğun doz statin tedavisinde % 12 daha yüksek diyabet geliştirme riski ile doğrulamıştır. Bu meta-analizde, büyük bir kardiyovasküler olaydan korunan her üç hasta için diyabet geliştirmiştir. Daha yüksek diyabet gözlemi için hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, statin tedavisiyle indüklenen periferik insülin sinyalizasyonunun bozulma olasılığını düşündürmesine rağmen, herhangi bir riskli durum oluşmamıştır. Statin tedavisinin kardiyovasküler yararları, diyabet geliştirme riskinden daha ağır bastığı belirlenmiştir(162,163).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolesterol düşürücü olarak kullanılan RSV'nin beyin felci sonrası nöroprotektif etkiye de sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak konvansiyonel olarak hazırladıkları ve uyguladıkları RSV'nin ödem veya serebral kan akışı üzerinde herhangi bir etkilerinin olmadığı rapor edilmiştir (164).

Beyin elektrik aktiviteleri ile ilgili yapılan bir çalışmada HMG-CoA redüktazı olan RSV epileptik semptomları düzenlediği ve antiepileptik ilaçlara alternatif olabileceği rapor edilmiştir (165). Parkinson tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalarda SH-SY5Y hücrelerinde,

indüklenmiş nörotoksisiteye karşı RSV'nin nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Statinlerin dopaminerjik nörotoksisite üzerindeki nöro-koruyucu etkisi, otofajinin modülasyonu yoluyla parkinson tedavisine yönelik yeni bir tedavi stratejisi olarak düşünülmüştür (166).

İnme veya geçici iskemik atak hastalarında RSV'nin serebral kan akımı üzerine etkilerinin değerlendirmesi çalışmasında, intrakranial arteriyel aterosklerotik stenozlu hastalarda perfüzyon durumunda RSV tedavisi ile yapılan denemelerde RSV'nin güvenli ve etkili olup olmadığını değerlendirmiştir. İntrakranial arteriyel aterosklerotik stenozlu serebral hemodinamik durumu iyileştirmede güvenilir verilere ulaşılmış ve hastalarda RSV tedavisi ile perfüzyon artışı arasında ilişkili olduğu tespit edilmiştir (167).

Serebral iskemide reperfüzyon hasarının iyileşmesi ile ilgili çalışmasında RSV'nin inflamatuvar yanıt ile apoptoza etkileri araştırılmıştır. Çalışma, inflamatuvar sitokinlerin, apoptoz yollarını ortaya çıkardığını ortaya koymuş ve oksidatif stres araçlarının, bilateral tarafından indüklenen serebral iskemide yer aldığı görülmüştür. RSV'nin anti-inflamatuvar, anti-apoptoz ve anti-oksidan etkileri ile serebral iskemide reperfüzyon yaralanmasında olumlu etkileri görülmüştür (168).

Deneyisel beyin travması RSV ile kortikal kılcal dolaşımın artışı nitrik oksit üretimi ile ilişkildiği çalışmada travmatik beyin hasarında RSV tedavisi sonra mikrodolaşımının perfüze kapillerlerin sayısının arttığı ve bu etkinin artmış nitrik oksit ve azalmış prostasiklin ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (169).

RSV'nin, sıçanlarda nükleer faktör-Kappa B aktivasyonu ve süperoksit oluşumunu baskılama yoluyla anevrizmal subaraknoid hemoraj sonrası erken beyin hasarını iyileştirmesi üzerine yapılan çalışmalarda antioksidan, antienflamatuvar özellikleri ve sonuçları olumlu bulunmuştur (170).

RSV'nin iskemik beyin hasarı ve mekanizması üzerindeki koruyucu etkisi üzerine yapılan çalışmada RSV'nin iskemik beyin hasarı üzerindeki nöral korumasının mekanizmaları, endotelial nitrik oksit sentezi ekspresyonunu arttırmak, indüklenbilir nitrik oksit sentezi ve aktive edilmiş kaspaz-3'ün ekspresyonunu inhibe etmesi olarak değerlendirilmiştir (171).

RSV, astrositlerin aktivasyonunu ve ERK42 / 44'ün fosforilasyonunu inhibe ederek L5 spinal sinir transeksiyonu ile sıçanlarda mevcut morfin toleransını zayıflatması üzerine yapılan çalışmada, nöropatik ağrının tedavisi sırasında morfin toleransı oluştuğunda

antinosiseptif etkisini geri getirmek için morfin ile RSV birlikte kullanılmıştır. Çalışma sonucunda RSV'nin astrositlerin aktivasyonu üzerindeki engelleyici etkisi görülmüştür. Ayrıca ERK42 / 44 ve lomber omurgada TNF ve IL-1 ekspresyonu ile morfin toleransını azaltmıştır (172).

Multifokal inmede yüksek doz RSV tedavisinde travmaya bağlı serebral yağ embolisi sendromu üzerine yapılan vaka çalışmasında şiddetli yağ embolisi sendromu olan kişilerde bu tedavi potansiyel olarak yararlı olabileceği düşünülmüştür (173). Travmatik omurilik hasarı oluşturulmuş sıçanlara karşı RSV'nin nöroprotektif etkileri üzerine yapılan çalışmada, biyokimyasal, histopatolojik, ultrayapısal analizler ve fonksiyonel testler üzerine araştırmalar yapılmıştır. RSV'nin antiapoptotik yolla spinal kord hasarına etki ederek lipid peroksidasyonunu azaltarak antiinflamatuvar, antioksidan etki göstermiştir. Bu sonuçların ışığında, RSV'nin potansiyel nöroprotektif ajan olduğu tespit edilmiştir (174).

Antidepresanlar ile RSV'nin eşzamanlı uygulanması sonrası sıçanlarda oksidatif stres parametrelerinin tahmini ile ilgili çalışmada; enzim sisteminin artan aktivitesiyle RSV ve antidepresanlar ile kombine tedavi sırasında oksidatif stres değişimi üzerine tespitler yapılmıştır (175). Tek başına kullanılan çalışmada RSV ile ön tedavi uygulamasıyla, fokal serebral iskemi / reperfüzyon yaralanmasına karşı, oksidatif stres ve inflamasyonun zayıflaması yoluyla korunduğu tespit edilmiştir (176).

RSV, süperoksit üretimini inhibe ederek Zucker obez sıçanlarda serebrovasküler fonksiyonu iyileştirdiği belirtilmiştir (177). Travmatik kafa yaralanması sonrası RSV'nin sitokinler üzerine etkisi araştırılmış ve akut hasar sonrası uygulanan RSV tedavisinin bazı antiinflamatuvar sistemik etkileri indüklediğinden, fonksiyonel iyileştirici olarak ilişkilendirilmiştir (178). RSV kaspaz-3 aktivitesini azalttığı ve Aβ'ye maruz kalan insan nöroblastoma SH-SY5Y hücrelerinde a-sekretazı artırdığı belirlenmiş ve mikroglianın da azaltılmasıyla Alzheimer hastalığının önlenmesinde önemli bulgulara ulaşılmıştır (179,180,181). Kortikal nöronlarda nitrik oksit inhibisyonuna bağlı ve ERK 1 / 2 yolu aktivasyonu kaynaklı nöroproteksiyonun RSV indüksiyonu ile mümkün olduğu görülmüştür (182). RSV'nin nitrik oksit sentaz ekspresyonu modülasyonu ile omurilikteki iskemi hasarına karşı koruduğu tespit edilmiştir (183). Ancak RSV'nin kan beyin bariyeri geçirgenliğinin az olduğu düşünüldüğünde, uygun partikül boyutuna getirilmiş ve yüzeyi modifiye edilmiş lipozomal taşıyıcı sistemlerin, RSV'nin etkinliğini ve hedef dokuya ulaşımını arttıracakları öngörülmektedir. RSV'nin zayıf çözünürlüğü ve geçirgenliği, düşük

mutlak biyoyararlanım problemiyle karşı karşıya kalma ve emilimi sınırlayıcı faktörlerdir, bu yüzden yapılan çalışmalarda niozomal bir formül yapılarak *in vitro* koşullarda çözünmesini ve geçirgenliğinin iyileştirilmesi amaçlanmıştır (184). Tüm bu sınırlamalardan dolayı RSV içeren lipozomların yüzeyi hidrofilik PEG ve VCAM-1 spesifik ligand ile modifiye edilerek beyine hedeflendirilmeye uygun hale getirilmiştir. Beyin travması oluşturulmuş farelere damariçi yolla uygulandıktan sonra lipozomların etkinliği, klasik tedavi uygulamaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2.4. Kalsein

2.4.1. Yapısı, Temel Özellikleri ve Kullanım Alanları

Floresan kalsein canlı hücrelere uygulandığında ışıma veya yansıtma özelliği olan ve 495/550 nm aralığında spektrofotometrik olarak tespit edilebilen bir maddedir (185,186). Membran geçirimsiz bir floresan olan kalsein, yüksek konsantrasyonlarda belirli bir süre sonra kendi kendine floresan ışıma özelliği kaybolur (187). Kalsein, yüksek konsantrasyonlarda kendi kendine sönmesi nedeniyle lipozomların içerik salınım davranışlarını incelemek için yaygın şekilde floresan işaretleyiciler olarak kullanılmıştır. Bu moleküller yüksek konsantrasyonda bir lipozom tarafından kapsüllendiğinde, floresanları ihmal edilebilir. Böylece, sadece lipozomun dışına bırakıldığında bu markör molekülleri güçlü bir floresan özellik sergiler (188,189).

Beyin kesitlerindeki nöronal canlılığı değerlendirmek için konfokal floresan analizi için kalsein kullanılmıştır. Floresan prosedürüne göre hipoksiye maruz sıçanların hipokampal dilimleri nöronların canlılığını değerlendirmek için bir yöntem belirlenmiştir. 10 dakikalık bir oksijen-glukoz yoksunluğunda canlı hücreler yeşil olan kalsein ve ölü hücrelerin çekirdeğini kırmızı lekeleyen etidyum homodimer 6 lekeli dilimler, daha sonra konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir (190,191).

Hidrofilik olan kalsein, hücre içindeki bölümlerin içine sıkışabilmektedir. Hücreler iki değerlikli kobalt katyonu ile yüklendiğinde, hücre içi kalsein floresan ışığı sönebilir ancak mitokondriyal matriste sönmez, bu yüzden mitokondriyal geçirgenliğin geçici ve uzun süreli değişikliklerde mitokondriyal kalsein floresanı hücrelerde doğrudan izlenebilmiştir (192-194). Farklılaşan nöronal hücrelerde intrasellüler klorür iyonu konsantrasyonu ve nörit gelişimindeki rolü üzerine yapılan çalışmada kalsein, hassas

floresan boya olan N-(etoksikarbonilmetil)-6-metoksikinolinyum bromür için iç standart olarak kullanılmıştır (195).

Beyin dilimlerine taşıyıcıların çoklu ilaç direnciyle bloke edilmesi sebebiyle, geliştirilmiş floresan (kalsiyum göstergesi olarak) madde alımının iyileştirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada kalsein kullanılmıştır (196). Hipoksi-toleranslı neonatal CA1 nöronlarında uyarılmış glutamat salınımı ve glutamat reseptör aracılı kalsiyum hipokampal dilimlerde değişiklikler ve canlılık ilişkisi çalışmalarında floresan madde olarak kalsein kullanılmıştır (197,198). Kalsiyum-geçirgen reseptörünün murin neokortikal nöronlarda aktivasyonunda floresan tespitinde kalsein kullanılmıştır (199).

Bu çalışmada, optimum seçilen lipozom formülasyonuna floresan madde kalsein kullanılmış, hazırlanan formülasyonlar farelere damar içi uygulamayla verilerek beyindeki akümüasyonları 1. 6 ve 12. saatlerde izlenmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Tablo 3.1. Kimyasallar

96 kuyucuklu plaka (Costar, ABD)

Sığır serum albumini, fraksiyon V (Sigma, Almanya)

Cell freezing medium-DMSO (Sigma, Almanya)

Diyaliz Tüpü- Visking dialysis tubing 20/32 (Serva, Almanya)

DOPE (Lipoid, Almanya)

DOPA (Lipoid, Almanya)

m(PEG2000)-DSPE (Lipoid, Almanya)

Kalsein (Sigma, Almanya)

Rosuvastatin Kalsiyum (Astra Zeneca, İngiltere)

High glucose Dulbecco's modified eagle's medium (Sigma, Almanya)

Fetal sığır serumu-FBS (Sigma, Almanya)

Hücre kültür kabı (25 cm², 75 cm² ve 150 cm²) (SPL, Güney Kore)

Hücre süzgeci- Cell Strainer 70 µm (SPL, Güney Kore)

Metanol (Merck, Almanya)

Kloroform (Merck, Almanya)

PBS tablet pH 7.4 (Genaxxon Bioscience, Almanya)

Penisilin-streptomisin (Sigma, Almanya)

Petri kabı-60 mm x15 mm (SPL, Güney Kore)

Stop solution (Biolegend, ABD)

Trypsin-EDTA çözeltisi-%0,025 (Sigma, Almanya)

Tris/glycine/SDS buffer-10X (BioRad, ABD)

Tween 20 (GeneMark, Tayvan)

Kullanılan diğer organik solvent ve sarf maddeleri analitik saflıktadır.

Tablo 3.2. Cihazlar

96 kuyucuklu plaka okuyucu-Multiskan Ex (ThermoLab Systems, ABD)

Derin dondurucu (-80°C) (ThermoScientific, ABD)

Distile su aleti-Pure Lab Option (Elga, Fransa)

Etüv (Heraeus, Almanya)

ATR-FTIR Spektroskopisi (Perkin Elmer, ABD)

Hassas terazi-TB Series (Denver Instruments, ABD)

Invert Mikroskop-CXX41 (Olympus, Japonya)

Karbon dioksit inkübatörü (ThermoScientific, ABD)

Liyofilizatör- Virtis (SP Scientific, ABD)

Manyetik Karıştırıcı (IKA, Almanya)

Orbital Çalkalayıcı (Thermo Electron Corporation, ABD)

Otoklav (Tutnauer, Hollanda)

pH Metre (Inolab, WTW, Almanya)

Rotaevaporatör-Hei-VAP (Heidolph, Almanya)

Santrifüj- Allegra X-22R (Beckman Coulter, ABD)

Santrifüj- Allegra X-30 (Beckman Coulter, ABD)

Sınıf II Laminar Akış Kabini- (MSC Advantage, ThermoScientific, ABD)

Sıvı Azot Tankı-Arpege 70 (CryopAL, Fransa)

Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) (Leo Supra, Zeiss, Almanya)

Ultrasonik banyo (Sonorex, Bandelin, Almanya)

Ultrasonic Prob (Hielscher, Almanya)

Spektrofluorometre 8454 UV-Visible System (Agilent, ABD)

Partikül Boyutu Analiz Cihazı, Malvern Nano ZS (Malvern, İngiltere)

3.1. RSV ile İlgili Çalışmalar

3.1.1. RSV'nin Spektrumu

RSV'nin 200-1000 nm arasındaki Ultraviyole spektrumu alınarak maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu bulunmuştur.

3.1.2. RSV'nin FT-IR Spektrumu

RSV'nin FT-IR spektrumu Potasyum Bromür (KBr) diskleri kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga boyları arasında taranarak alınmıştır.

3.1.3. RSV'nin Kalibrasyon Eğrisi

RSV'nin 200-1000 nm arasındaki ultraviyole spektrumu alınarak maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu bulunduktan sonra, beş farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

3.1.4. RSV'nin Çözünürlük Çalışması

Çözünürlük çalışmalarında RSV'nin 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ile 200 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ olmak üzere minimum ve maksimum konsantrasyonlarında fosfat tamponu içerisinde çözünürlükleri incelenmiştir. Bütün numuneler ışıktan korunmuştur. Ayrıca, bu numuneler oda sıcaklığında (25°C) ve su banyosunda 50°C'ye maruz bırakılmıştır. Daha sonra bu çözeltilerdeki pH ve absorpsiyon değişimleri 0. ve 24. saatlerde belirlenmiştir.

3.2. Lipozom İçerikleri

3.2.1. Fosfolipidler

3.2.1.1. Fosfolipidlerin Saflikları

Ürünlerin analiz sertifikalarında, fosfolipidlerin saflık oranlarının % 98'in üzerinde olduğu bildirilmiştir. İçeriklerinde lizofosfatidik asit ve lizoetanolamin ise bulunmamaktadır.

3.2.1.2. Fosfolipid Tayini

Fosfolipidlerin tayini için FT-IR spektrumları Potasyum Bromür (KBr) diskleri kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga boyları arasında taranarak piklerde literatürdeki sonuçlardan farklılık olup olmadığı tayin edilmiştir.

3.2.2. Lipozom Formülasyonlarının Hazırlanması

Ön çalışma olarak 20 lipozom formülasyonu hazırlanmış ve faz ayrımı görülmeyen 4 formülasyon ile çalışmalara devam edilmiştir. Lipozom dispersiyonları film tekniği yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (200). Tablo 3.3 de belirtildiği şekilde uygun molar oran kombinasyonları ile hazırlanan formülasyonlar, 100-250 mL balonlarda 0,1 mM konsantrasyonda ve istenen hacimde, 5 mg lipid/ mL organik solvent olmak üzere kloroform/metanol karışımı ile 3/1 (hacim/hacim) oranında çözücü ile iyice çözülmüştür. İnce film veya kuru film metoduyla hazırlanıp 100-400 mBar basınç altında rotaevaporatör yardımıyla 100-200 rpm dönüş hızında 30-40°C sıcaklıkta organik solvent ortamdan iyice uzaklaştırılmıştır. Azot gazından geçirilen kurutulmuş balonda, içerisinde çözücü kalıntısı varsa ortamdan uzaklaştırmak için vakumlu etüv (25-30 °C) içerisinde 1 gün süreyle bekletilmiştir (over night process).

Lizofosfatidil etanolamin ve lizofosfatidik asit oluşumunu engellemek için vakumlu etüvde 1 gece tutulan film halindeki lipid karışımı, etüvden alındıktan sonra su fazı ilavesi sürecine geçilmiştir. Hidrofilik ilaçlar sulandırma işlemi esnasında lipozom formülasyonuna karıştırılır. Çalışmamızda hidrofilik bir ilaç kullandığımız için 20 mg/kg RSV uygulama dozunda 0.1 ml (fareye uygulanabilecek hacim) içinde 0,5 mg etken madde olacak şekilde fosfat tampon çözeltisi kuru film içeren balona konmuştur. Lipozomların sulandırılması işlemi kullanılan fosfolipidlerin faz geçiş sıcaklığının üzerinde yapılması gerektiğinden, fosfolipidin tipine ve faz geçiş sıcaklığına göre 25-60°C aralığında ve faz geçiş sıcaklığının 10-20°C üzerinde çalışılmıştır. Filmin cam yüzeyinden küresel şekilde ayrılabilmesi ve halı şeklinde katlanıp Multi lamellar vezikül (MLV) oluşturmaları için 1-3 mm çapında şeffaf cam boncuklar kullanılmıştır.

Süt görünümünde oluşturulan MLV'lerin ortalama boyutları 1-5 µm civarındadır. Ancak, beyine hedeflendirilecek olmaları ve KBB'nin yaklaşık 200-220 nm aralığında olması sebebiyle, lipozomların çaplarını küçültmek ve çok tabakalı vezikülleri tek tabakalı hale getirmek gerekmektedir. Küçük tek tabakalı veziküllerin (SUV) hazırlanmasında, fiziksel ajitasyon (vorteksleme), tip sonikasyon ve ekstrüzyon işlemleri uygulanarak vezikül boyutları 50-150 nm arasına getirilebilmektedir. Bu kapsamda, sırasıyla vorteksleme, tip sonikasyon (aşırı ısınmayı önlemek ve vezikülleri korumak amacıyla buz banyosu içerisinde) ve ekstrüzyon (50-100 nm polikarbonat membran filtrelerden 8-10 kez geçirilerek) işlemleri uygulanarak lipozomlar hazırlanmıştır. Lipozomların içine hapsedilmemiş ilaçlar ise diyaliz yöntemi veya ultrasantrifüjleme işlemi ile ayrılmış ve süpernatant çözeltileri alınarak hapsedilemeyen etken madde miktarı hesaplanmıştır. Lipozomların etken madde yükleme kapasitesini hesaplamak için, veziküller öncelikle uygun bir yüzey aktif madde (Triton X-100) ilave edilerek parçalanmış ve çözeltiye geçen etken madde miktarı spektroskopik yöntemlerle tayin edilmiştir. Lipozomların oksidatif degradasyonunu önlemek amacıyla, tüm işlemler azot gazı altında yapılmıştır. 20 farklı formülasyonla yürütülen optimizasyon çalışmalarından sonra, farklı oranlarda PEG₂₀₀₀DSPE:DOPE:DOPA kombinasyonlarını içeren 4 formülasyon ile çalışmalara devam etme kararı alınmıştır. Formülasyonlar Tablo 3.1 de belirtilmiştir.

Lipozomların yüzeyine hedeflendirme peptidi bağlamak için, 10:1 fosfolipid karışımına karşılık gelecek şekilde peptit içeren dispersiyona 150 mg EDC ilave edilerek 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırılıp bağlanmaya hazır hale getirilmiştir. Daha sonra peptit çözeltisine, lipozom:VCAM-1 spesifik peptit mol oranı 10:1 olacak şekilde, lipozom formülasyonları ilave edilip ışıktan uzakta oda sıcaklığında 2 saat boyunca 100 rpm'e ayarlanmış manyetik karıştırıcıda peptit bağlama işlemi yapılmıştır. Serbest peptitleri ve EDC'i uzaklaştırmak için 12 saat boyunca fosfat tamponu içerisinde karşı diyaliz işlemi uygulanmıştır. EDC ve serbest peptitleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla, peptit bağlanmış lipozom dispersiyonları 15000 rpm'de santrifüjlenerek 2 kez fosfat tamponu içinde tekrar dağıtılıp santrifüj işlemi tekrarlanmıştır.



Şekil 3.1. Lipozom hazırlama işlemi

Tablo 3.3. Ön çalışmalarda hazırlanan lipozom formülasyonları, içeriklerin molar oranları ve gözlemsel sonuçlar

Kod	Lipozom İçeriği	Molar Oranlar	Gözlemler
A-1	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	60:35:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
A-2	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	75:20:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
A-3	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	85:10:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
A-4	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	61:35:4	Faz ayrımı (PDI >0.5)
A-5	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	62:35:3	Faz ayrımı (PDI >0.5)
A-6	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	63:35:2	Faz ayrımı (PDI >0.5)
A-7	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	64:35:1	Faz ayrımı (PDI >0.5)
A-8	DOPE:DMPG:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	60:35:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-1	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	60:35:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-2	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	75:20:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-3	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	85:10:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-4	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	61:35:4	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-5	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	62:35:3	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-6	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	63:35:2	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-7	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	64:35:1	Faz ayrımı (PDI >0.5)
B-8	DOPE:CHOL:mPEG ₂₀₀₀ -DSPE	60:35:5	Faz ayrımı (PDI >0.5)
L-1	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA	5:70:25	Süt görünümü (PDI<0.5)
L-2	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA	5:60:35	Süt görünümü (PDI<0.5)
L-3	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA	5:55:40	Süt görünümü (PDI<0.5)
L-4	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA	5:45:50	Süt görünümü (PDI<0.5)

Tablo 3.2. Optimize edilen 4 lipozom formülasyonu ve içeriklerin molar oranları

Kod	Lipozom İçeriği	Molar Oranlar
L1	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA + 1 mg/mL RSV (20 mg/kg)	5:70:25
L2	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA + 1 mg/mL RSV (20 mg/kg)	5:60:35
L3	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA + 1 mg/mL RSV (20 mg/kg)	5:55:40
L4	mPEG ₂₀₀₀ DSPE:DOPE:DOPA + 1 mg/mL RSV (20 mg/kg)	5:45:50

3.2.2.1.Lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımının Ölçülmesi

Partikül büyüklüğü (Z-ortalama ϕ) ve büyüklük dağılımı (Polidispersite indeksi, PDI), foton korelasyon spektroskopisi (Nano-ZS Malvern Instruments Ltd., UK) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Her bir örnek için 3 ölçüm yapılmıştır (n=3). KBB'yi aşması için taşıyıcı sistemin ortalama partikül boyutunun 100 nm'nin altında olması ve partikül büyüklüğü dağılımının da dar aralıkta olması tercih edilmektedir. PDI değerinin mümkün olduğunca küçük olması monodispers dağılımın daha iyi olduğunu ve polidispers partiküllerin ortamda olmadığını göstermektedir.

3.2.2.2.Lipozomların Zeta Potansiyelinin ölçülmesi

Lipozomların zeta potansiyeli elektroforetik ışık saçılım tekniği ile (Nano-ZS Malvern Instruments Ltd. UK) ölçülmüştür. Lipozomlar su içerisinde disperse edildikten sonra zeta potansiyel ölçüm küvetine konulmuş ve elektroforetik hareketliliğin ölçülmesiyle elde edilen veriler zeta potansiyeli değerine çevrilmiştir. Her bir örnek için üç ölçüm yapılmış ve ortalama değerler ile standart sapmaları hesaplanmıştır.

3.2.2.4. Lipozom Formülasyonlarına Yüklenen Kalsein ve RSV Miktarının Hesaplanması

3.2.2.4.1. Lipozom Formülasyonlarına Yüklenen Kalsein Miktarının Hesaplanması

Kalsein yüklü lipozomların hazırlanmasında, mPEG₂₀₀₀:DSPE:DOPE kombinasyonu 5:60:35 mol oranında kullanılmıştır.

Lipozom içeriğine giren maddeler tartılarak 100 mL'lik balona alınarak yaklaşık 10-15 mL 3:1 (h/h) oranında kloroform:metanol karışımında çözündürülmüştür. Rotaevaporatör kullanılarak, 400 mBar'la başlayarak kademeli olarak basınç 20 mBar'a düşene kadar, 200 rpm dönüş hızında organik solvent karışımı ortamdan uzaklaştırılmış ve balonun iç yüzeyinde ince fosfolipid filmi elde edilmiştir. İçinden azot gazı geçirilen balon, organik çözücü karışımının tamamen uzaklaşması için vakumlu etüv içerisinde 12 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra, fosfolipid filmi, sulandırma işlemine alınmıştır. Sulandırma işleminde 10 mmolar kalsein içeren 30 mL pH 7.4 fosfat tamponu balona ilave edilerek, 47°C ve 50 rpm de dönen rotaevaporatörde lipozom (MLV, >1000 nm) oluşturma

işlemi gerçekleştirilmiştir. Lipozomların boyutlarını küçültmek için (<1000 nm) buz banyosunda 20 saniyelik periyotlarla (10 saniye dinlendirme) 5 dakika boyunca ultrasonikasyon (UP400S, Hielscher, Almanya) işlemi uygulanmıştır. Ardından, lipozom dispersiyonu, 47°C'ye ayarlanmış ekstrüdüde (LiposoFast LF-50, Avestin, İngiltere) azot gazı altında sırasıyla ikişer kez 800 nm, 400 nm ve 200 nm por çapına sahip filtrelerden geçirilmiştir.

Santrifüjleme işleminden sonra elde edilen lipozomlar, yüzey aktif madde (Triton X-100) ilave edilerek parçalanmış ve çözeltideki CAL içeriği 492 nm'de spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Yükleme kapasitesi, toplam ilaç içeriğinin yüzdesi olarak ifade edilen lipozom pelletlerindeki CAL'nin enkapsüle edilen yüzdesel değeri olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.4.2. Lipozom Formülasyonlarına Yüklenen RSV Miktarının Hesaplanması

Santrifüjlemeden sonra elde edilen RSV yüklü lipozomlar, yüzey aktif madde (Triton X-100) ilave edilerek parçalandı ve çözeltideki RSV içeriği 243 nm'de spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Yükleme kapasitesi, toplam ilaç içeriğinin bir yüzdesi olarak ifade edilen lipozom pelletlerindeki RSV'nin enkapsüle edilen yüzdesel değeri olarak hesaplanmıştır.

3.2.2.5. Lipozom Formülasyonlarının Polarize Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

Lipozomların vezikül tipi ve morfolojik özellikleri polarize ışık mikroskobu (PLM) kullanılarak incelenmiştir. Lipozomların görüntülenmesinde mikroskopik büyütme: 100X olarak görüntülenmiştir.

3.2.2.6. Lipozom Formülasyonlarının Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi

Lipozomların yüzey özelliklerini görüntülemek amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri incelenmiştir. Lipozomlar için SE2 detektörü kullanılmıştır. Dedektör ve tarama alanı arasındaki çalışma mesafesi 9 mm olarak ayarlanmıştır. Uygulanan elektron yüksek gerilimi 1,00-5,00 kV olarak belirlenmiştir. Büyütmeler sırasıyla 2,00, 5,00, 10,00, 15,00 ve 50,00 KX şeklindedir. SEM çalışması ile lipozom yüzeylerinin bütünlüğü incelenmiştir.

3.2.2.7. Lipozom Formülasyonlarının Atomik Kuvvet Mikroskobu ile İncelenmesi

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) çalışmaları, standart silisyum nitrür (Si_3N_4) uçları ve 5–20 nN'lik tipik kuvvet kullanılarak temas modunda gerçekleştirilmiştir. 5-10 μL lipozom dispersiyonu mika substratların üzerine damlatıldı, oda sıcaklığında kurutularak AFM altında incelenmiştir.

3.2.2.8. Lipozom Formülasyonlarının Fiziksel Stabilitesi

Bölüm 3.2.2 de belirtildiği gibi hazırlanan optimum lipozom formülasyonlarından L2 ve L4 için, yükleme kapasiteleri hesaplanmış olan RSV içeriklerinin 180 gün boyunca sızmalarını takip edebilmek için iki farklı sıcaklık ortamında (4 $^{\circ}\text{C}$ ile 25 $^{\circ}\text{C}$, %60 bağıl nem) fiziksel stabilite çalışmaları yapılmıştır. Liyofilize edilen formüller, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 180. Günlerde parçacık boyutları, zeta potansiyeli, polidispersite indeksi ve RSV miktarları üzerinden yükleme kapasiteleri hesaplanmıştır.

3.3. *In vitro* Çalışmalar

3.3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1.1. U-87 Hücre Kültürü

Hücre çalışmalarında, insan beyin glioblastoma (U-87) ve Homo sapiens beyin glioblastoma (A-172) hücre hatları kullanılmıştır. U-87 hücreleri, 75 cm^2 'lik flasklarda %10 FBS , 100 IU/mL penisilin ve 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomisin ilave edilmiş DMEM-HG (Gibco, ABD) besiyerinde 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de %5 CO_2 içeren atmosferik şartlarda çoğaltılmıştır. Tek katlı hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştıktan sonra, flask zeminine tutunmuş olan hücreler tripsin-EDTA (Gibco) çözeltisi ile ayrılmıştır. Sonrasında sitotoksitesite çalışmaları için, süspande edilen hücreler 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucukta 30,000 hücre olacak şekilde ekilmiştir.

Ayrıca lipozomların *in vitro* sitotoksitesi MTT testi ile ölçülmüştür. MTT testi A-172 (ATCC® CRL-1620™) insan glioblastoma hücreleri kullanılarak yapılmıştır. Büyüme ortamı olarak DMEM, high glucose %10 (v/v) FBS ve 100 mg/mL streptomisin eklenerek kullanılmıştır.

Örneklere DMEM high glucose ile dilusyon yapılmıştır. Lipozomların 2 saat inkübasyonundan sonra örnekler pipet yardımıyla alınmıştır. 200 µl medium ve 50 µl PBS içinde 2 mg/ml olacak şekilde çözündürülmüş MTT, hücrelere ilave edilerek 4 saat inkübe edilmiştir. Medium alındıktan sonra mor MTT formazan kristallerinin çözünmesi için 200 µl DMSO ilave edilmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. 570 nm'de absorbanslar ölçülmüştür. Hücre canlılığı örneklerin absorbans değerlerinin negatif kontrolün absorbansına bölünmesi ile yüzde olarak hesaplanmıştır.

MTT çalışmasında, *in vivo* deneylerde etkin madde olarak kullanılan RSV'nın ve lipozom taşıyıcı sistemi bileşenlerinin hücresel düzeydeki toksisitelerini belirlemek için farklı konsantrasyonlardaki (20, 50 ve 100mM) RSV yüklenmemiş peptid bağlı olan ve peptid olmayan (PL ve L); RSV yüklenmiş peptid bağlı olan ve peptid bağlı olmayan (PRL ve RL) lipozomal dispersiyonların A172 insan glioblastoma hatlarına toksikolojik etkileri incelenmiştir.

3.3.1.2. Lipozom Formülasyonlarının Hücre Canlılığına Etkisinin Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (RTCA) Cihazı ile İncelenmesi

Hücrelerin yaşayabilirliği, 37°C'de 5% CO₂ içeren atmosferik şartlarda gerçek zamanlı hücre analizi cihazı (ACEA, xCELLigence) kullanılarak 60 saat boyunca takip edilmiştir. Altın kaplı 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 7,5x10³ hücre ekilmiş, ertesi gün PEG₂₀₀₀DSPE, DOPE, DOPA, CALCEIN, RSV maddeleri, 1:1, 1:5 ve 1:20 fosfat buffer içerisinde seyreltme oranları ile hazırlanarak hücrelere verilmiştir. 60 saat boyunca gerçek zamanlı hücre analizi takibi yapılmıştır (201). 60 saat sonunda hücre canlılığına olan etkileri incelenerek beyin hücreleri için sitotoksik olup olmadığı araştırılmıştır.

3.3.2. *In vitro* Salım Çalışmaları

Lipozom formülasyonlarından *in vitro* CAL ve RSV salımının incelenmesinde diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan lipozomlar 2 mL pH7.4 fosfat tamponu çözünme ortamında dağıtılarak diyaliz tüpüne (12000 Da MWCO Serva, Almanya) yerleştirilmiştir. Diyaliz tüpleri, beher içerisindeki 100 mL pH 7,4 tuz içeren fosfat tamponu (PBS) na yerleştirilmiş ve salım çalışması 37±0,5°C'de manyetik karıştırıcıda 100 rpm de gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında salınan etken madde miktarını tayin etmek için ortamdan 1 mL örnek alınmış ve ortama alınan miktarda

ve sıcaklıkta taze pH 7.4 PBS ilave edilmiştir. Alınan örneklerde CAL miktarı spektrofotometrik ve RSV miktarı ise spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmiştir.

3.3.2.1. *In vitro* Salım Kinetikleri

3.3.2.1.1. Sıfırıncı Derece Kinetik

Bu kinetik modeline göre, dozaj formundan birim zamanda salınan etken madde miktarı sabittir. Sıfırıncı derece kinetik, modifiye edilerek salım yapan farmasötik dozaj formlarından etkin maddenin salımını belirlemek amacıyla sık sık kullanılmaktadır. Sıfırıncı derece hız ifadesi aşağıdaki denklemde verilmektedir. t 'ye karşı Q_t değerleri grafiğe aktarıldığında eğimi k_0 olan bir doğru elde edilmektedir. (202,203).

$$Q_t = Q_0 + k_0 \cdot t$$

Q_t : t anında salınan kümülatif etkin madde miktarı (mg)

Q_0 : Etkin maddenin çözeltideki başlangıçtaki miktarı (mg)

k_0 : Sıfır derece çözünme hız sabiti (mg/sa)

t : süre (sa)

3.3.2.1.2. Birinci Derece Kinetik

Birinci derece kinetikte, ilaç salım hızı ilaç derişimine bağlıdır. Kalan ilaç yüzdesinin logaritması ile zaman (saat) grafiği bir doğru verir. Birinci dereceden kinetiğe sahip örneklerden matriks çözülme/dağılma kontrollü salım yapan sistemler, matriks difüzyon kontrollü salım yapan sistemler, uzatılmış kontrollü salım yapan dozaj formları bu tip çözünme kinetiğine uymaktadır.

Bu kinetiğe göre hız ifadesi aşağıdaki eşitlikle verilmektedir. Birinci derece kinetikte t 'ye karşı $\ln C$ değerleri grafiğe geçirildiğinde eğimi k olan bir doğru elde edilmektedir. (204, 205).

$$\ln C = \ln C_0 - k \cdot t$$

C : t anında çözünmeden kalan kümülatif etken madde miktarı (mg)

C_0 : Başlangıçtaki etken madde konsantrasyonu (mg)

k: Birinci derece çözünme hız sabiti (sa⁻¹)

t: zaman (sa)

3.3.2.1.3.Higuchi Kinetik Modeli

Matris sistemlerden etken madde salımını belirlemek amacıyla oluşturulan ilk matematiksel kinetik model Higuchi tarafından önerilmiştir. Kontrollü etken madde salımı elde etmek için bilinen yaklaşımlar arasından en yaygın kullanılanı hidrofilik matris sistemidir. Hidrofilik matrislerden etken madde salımı, zaman içinde şişmeye bağlı olarak difüzyon yol uzunluğu arttığı için, azalma göstermektedir. Eşitlik aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır. Denklemden belirtildiği üzere herhangi bir t anında açığa çıkan etken madde miktarı zamanın karekökü ile orantılıdır (202,203).

$$Q = k_H \cdot t^{1/2}$$

Q: t anında açığa çıkan kümülatif etkin madde miktarı

k_H: Higuchi salım hız sabiti (sa^{-1/2})

t: zaman (dak)

3.3.2.1.4.Hixson Crowell Küpkök Kuralı

Hixson Crowell küpkök kuralı, yüzey alanında ya da çapında değişiklik olan partikül ya da tablet formlarından etken madde salımını tanımlamaktadır. Eş boyutlu partiküllerden oluşan etken madde için, partiküllerin küpköküne dayanan çözünme hızını açıklayan bir eşitlik türetilmiştir (202,203).

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = \kappa \cdot t$$

Q₀: Etken maddenin başlangıçtaki miktarı (mg)

Q_t: t anında açığa çıkan kümülatif etken madde miktarı (mg)

κ: Hixson-crowell eşitliğine ait hız sabiti (mg^{1/3}/sa)

t: zaman (sa)

3.4. *İn vivo* Çalışmalar

3.4.1. Travmatik Beyin Hasarının Oluşturulması ve Uygulama

Travmatik beyin hasarı farelerde soğuk travma modeli kullanılarak oluşturulmuştur. Fareler, ketamin hidroklorür (4 mg/kg) ve ksilazin hidroklorür (11 mg/kg) kombinasyonu kullanılarak anestezi ile uyutularak stereotaksik cihaza yerleştirilmiştir. Dişçi turu kullanılarak (3 mm çapında, 2.5 mm lateral ve 2.5 mm posterior hattında) pariyetal kraniyotomi yapılmıştır. Likit nitrojen içeren bakır uçlu tüp (2.5 mm çapında) 60 sn süreyle duraya temas ettirilerek travma oluşturulmuştur. Hayvanların rektal sıcaklığı hemotermik battaniye kullanılarak 36.5-37.0°C arasında sabit tutulmuştur.

Formülasyonlar her bir uygulamada 100 µL olacak şekilde damariçi uygulamayla farelere enjekte edilmiştir. Açılan deri bölgesi dikilerek hayvanlar post travmatik iyileşme için kafeslerine geri bırakılmıştır. Fareler 24. saatte sakrifiye edilerek beyinleri çıkarılmış ve -20°C de dondurulmuş ve kriyostat cihazı yardımıyla 18 µm'lik kesitler alınmıştır. Krezil violet boyama ile boyanan kesitlerde hasar alanı ve beyin ödemi hesaplanmıştır. Hesaplamalar ImageJ yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda *in vivo* uygulamalarda farelerdeki beyin hasarının iyileştirilmesine yönelik bazı parametreler izlenmiştir (206). Ayrıca CAL içeren lipozomlar 1, 6 ve 12 saat boyunca fareler üzerinde izlenmiş ve sonrasında floresans görüntülemeleri yapılarak hasarlı bölgede akümüülasyon yoğunlukları hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Hayvan çalışma protokolüne ait görüntüler

Tablo 3.4. *In vitro* ve *in vivo* uygulamaları yapılan formülasyon kodları ve açıklama tablosu

Formülasyon Kodu	Formülasyon Açıklaması
Kontrol	Plasebo izotonik çözelti (pH 7.4 PBS)
CAL-Kontrol	Kalsein (100 μ M)- izotonik çözelti (pH 7.4 PBS)
CAL- L2	Kalsein (100 μ M) + L2 lipozom formülasyonu
P-CAL-L2	Kalsein (100 μ M) + L2-peptid lipozom formülasyonu
RSV	Rosuvastatin içeren izotonik çözelti
L	L2 lipozom formülasyonu
PL	L2-peptid lipozom formülasyonu
RL	Rosuvastatin yüklü L2 lipozom formülasyonu
PRL	Rosuvastatin yüklü L2-peptid lipozom formülasyonu

3.5. Analitik Metod Validasyonu

Analiz edilecek maddenin miktarının belirlenmesi için analitik yöntem, uygulamadaki işlemler ve kullanılan yöntemin güvenilirliği açısından doğrulanır. Bir ölçüm sisteminde hem doğru hem de kesin olduğu takdirde bu doğrulama işlemine analitik validasyon denir. Gerekli parametreler için, aşağıdaki adımlar uygulanarak analitik validasyon sağlanır ve bunlar; doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, aralık ve yöntem tekrarlanabilirliği, tekrarlanabilirlik, duyarlılık, özgünlük, stabilite şeklindedir (207-209).

3.5.1. Doğrusallık

Analitik bir yöntemle deneysel bulguların doğrusalılığı, deneysel bulguların numunedeki doğrudan veya dolaylı madde konsantrasyonu ile uygunluğu kontrol edilerek sağlanır. Kalibrasyon eğrileri, Bölüm 2.2.1.2'de açıklandığı gibi elde edilmiştir. Stok çözeltilerinin hazırlanmasından sonra, RSV'nin beş farklı konsantrasyonu (10, 20, 50, 100 ve 200 μ g.mL⁻¹) ve CAL'nin beş farklı konsantrasyonu (4, 8, 12, 16, 20 μ g/mL⁻¹) arasında elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri, karşılık gelen RSV ve CAL konsantrasyonlarının altı tekrarlı tespitini çözeltilerin absorbanları ile gerçekleştirerek çizilmiştir. Tanımlayıcı katsayılar (korelasyon-r ve determinasyon-r²) hesaplanmış ve denklemin doğrusalılığı gösterilmiştir.

3.5.2. Doğruluk ve Kesinlik Çalışmaları

Analitik yöntemin doğruluğu, belirtilen koşullar altında elde edilen tekrarlı değerlerin gerçek değere yakınlığını ifade etmektedir

Bu parametrenin belirlenmesi, yöntem validasyonunda tekrarlanabilirlik ve tekrarlanabilirlik elde etme sürecindeki temel adımlardan biridir.

Analitik yöntemin kesinliği, numunelerin istatistiksel olarak anlamlı sayıda aynı konsantrasyonlarda ardışık olarak ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Kesinlik için sayısal değer yoktur; standart sapma (SS), standart hata (SH) veya varyasyon katsayısı (VK) değerlendirmede kullanılır. Bu ölçümlerin aritmetik ortalaması, SH ve VK, kesinliğinin değerlendirilmesi için hesaplanmıştır. Önerilen yöntemin doğruluğu, kısa süreli (gün içi) ve günlük (günler arası) kesinliklerle farklı konsantrasyonda RSV'nin ve CAL'in en az üç tekrarı gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir.

3.5.3. Tekrarlanabilirlik

Stok çözeltilerden elde edilen RSV için üst ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve alt ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CAL için üst ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve alt ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve konsantrasyonlarındaki çözeltilerin absorbansları spektrofotometrik ve spektrofluorometrik olarak sırasıyla 243 nm ve 492 nm de altı kez ölçülmüştür. Bu absorbanslardan elde edilen konsantrasyonlar için SH ve VK değerleri hesaplandı. VK, % 2'den daha küçük ise analitik yöntem tekrarlanabilir. Aynı metodoloji, gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirliği göstermek için farklı günlerde (0. gün ve 2. gün) tekrar edilmiştir.

3.5.4. Tekrar Üretilirlik

Stok çözeltilerden "ayrı ayrı" elde edilen RSV için üst ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve alt ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CAL için üst ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve alt ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) konsantrasyonlarındaki çözeltilerin absorbansları spektrofotometrik ve spektrofluorometrik olarak sırasıyla 243 nm ve 492 nm de altı kez ölçüldü. Bu absorbanslardan elde edilen konsantrasyonlar için SH ve VK değerleri hesaplanmıştır. VK değerinin %2'den daha küçük bulunması analitik yöntemin tekrar üretilebilirliğini göstermektedir.

Kullanılan analitik yöntemin sadece RSV'yi veya diğer yardımcı maddeleri kapsadığını belirlemek için, formülasyon yardımcı maddelerinin spektrumu 200-1000 nm arasında alınmıştır. Yine analitik yöntemin sadece CAL'i veya diğer yardımcı maddeleri kapsadığını belirlemek için, formülasyon yardımcı maddelerinin spektrumu 200-1000 nm arasında alınmıştır. Etken madde ile yardımcı maddeler arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığı incelenmiştir.

3.5. *İn vivo* Verilerin Analizi

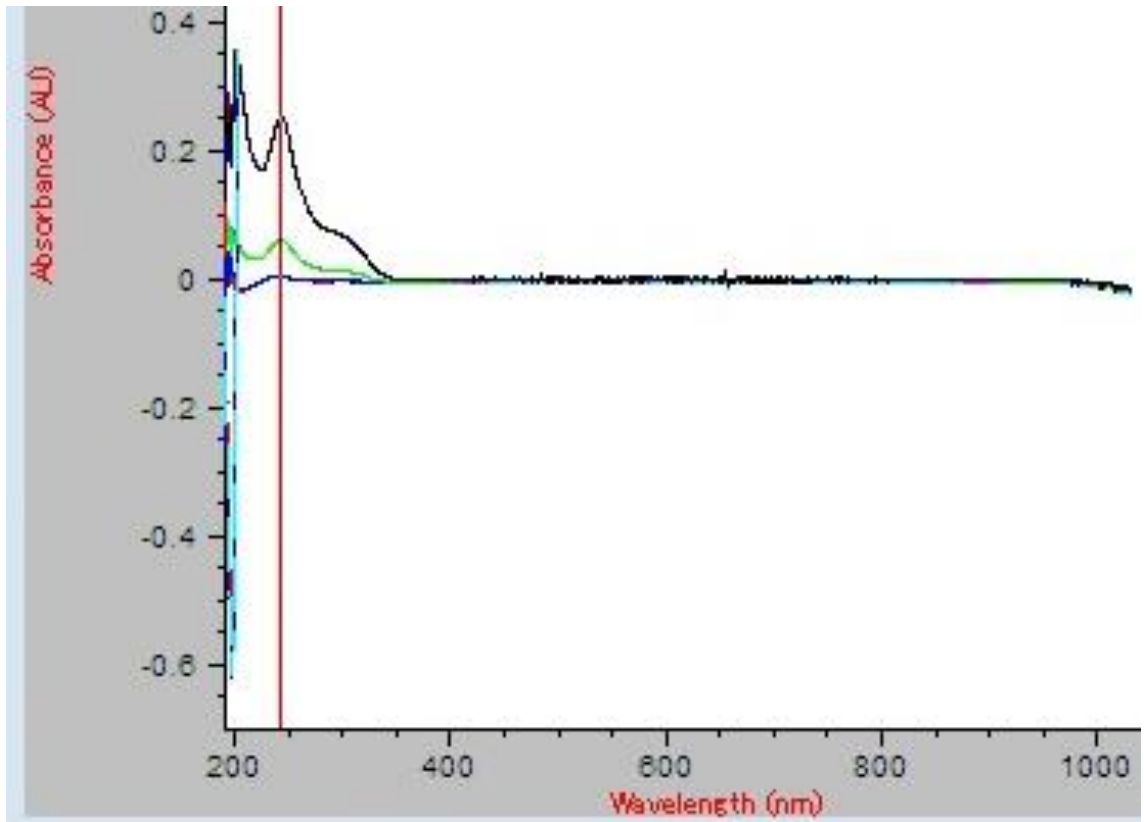
İn vivo verilerin analizi SPSS 21 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizlere başlamadan önce kullanılacak istatistiksel yöntemler belirlenmiştir ve elde edilen verilerin parametrik testlerin kullanımı için uygun olup olmadıkları incelenmiştir. İncelemeler neticesinde; uygulama gruplarına düşen denek sayısının 30'dan az olması sebebiyle parametrik olmayan istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. İki'den çok kategori içeren değişkenlerin sürekli değişkenlerle karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H testi kullanılmış ve gruplar arasında farklılık çıkması durumunda gruplar Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmıştır. Çalışmada güven aralığı $\alpha=0,05$ alınmıştır.

4.BULGULAR

4.1.RSV ile İlgili Bulgular

4.1.1. RSV'nin UV Spektrumu

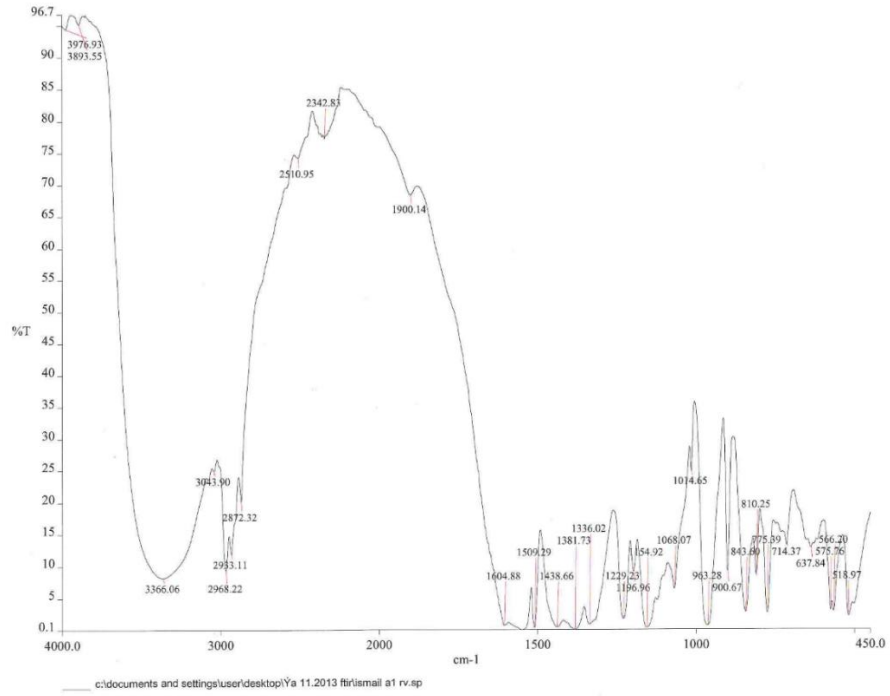
Etken madde olarak seçilen RSV'nin 200-1000 nm arasındaki Ultraviyole spektrumu alınarak 243 nm'de maksimum absorpsiyon verdiği bulunmuştur.



Şekil 4.1. RSV'nin 200-1000 nm arasındaki UV spektrumu (max. 243 nm)

4.1.2.RSV'nin FT-IR Spektrumu

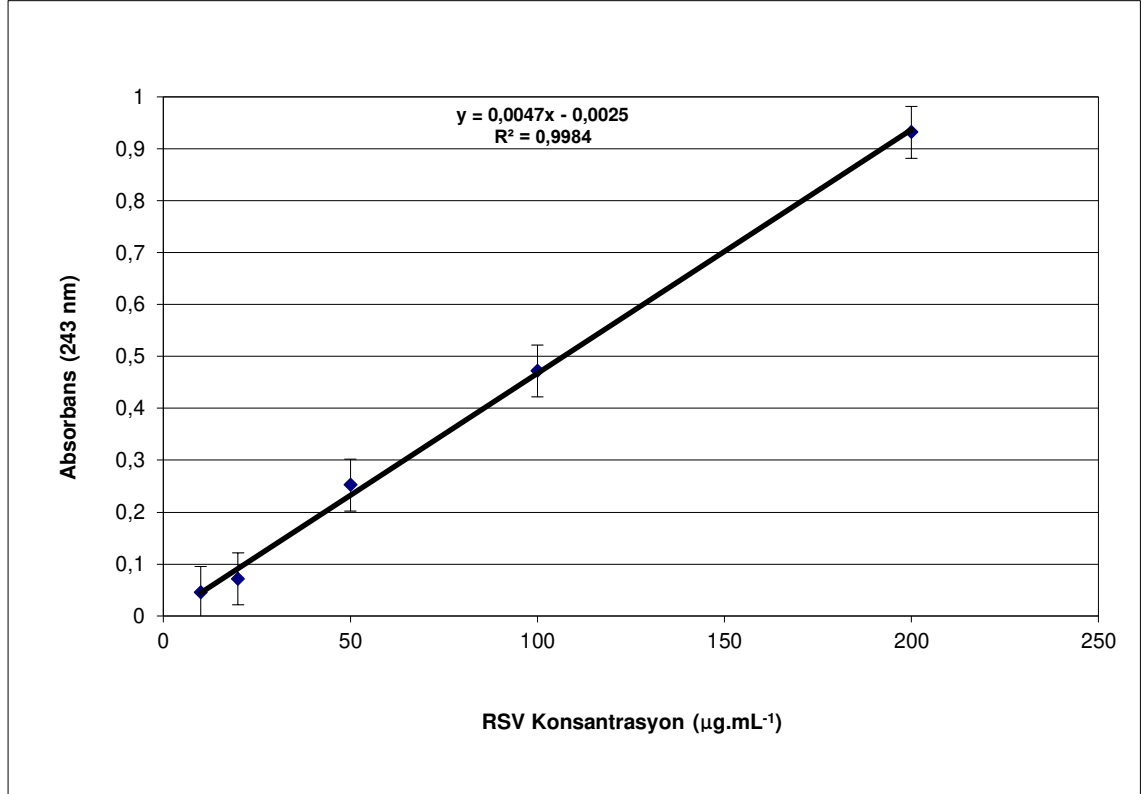
FT-IR spektrumları, potasyum bromür diskleri kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga boyları arasında taranarak alınmıştır (Şekil 4.2). 3366, 2968 ve 1435 cm^{-1} de çıkan pikler RSV'nin karakteristik pikleridir. Bu pikler siklik amin, C-H ve C=O gerilmelerine ve O-H bükülmelerine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.2. RSV'ye ait FT-IR spektrumu

4.1.3.RSV'nin Kalibrasyon Eğrisi

Etken madde olarak seçilen RSV'nin 200-1000 nm arasındaki ultraviyole spektrumu alınarak maksimum absorbsiyon verdiği 243 nm dalgaboyu bulunduğundan sonra beş farklı konsantrasyonlarda kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. RSV'nin 243 nm dalga boyundaki kalibrasyon eğrisi

4.2.Analitik Metod Validasyon Çalışmaları

4.2.1.Doğrusallık

pH: 7.4 fosfat tamponu içindeki RSV için kalibrasyon eğrisinde elde edilen 0,998'lik bir determinasyon katsayısına (r^2), 5 farklı konsantrasyondaki sonuçlarda doğrusallığı göstermektedir (Şekil 4.3). Aynı şekilde fosfat tamponu (pH: 7.4) içindeki CAL için kalibrasyon eğrisinde elde edilen 0,999'lik bir determinasyon katsayısına (r^2), 5 farklı konsantrasyondaki sonuçlarda doğrusallığı göstermektedir.

4.2.2.Doğruluk ve hassasiyet

RSV'nin ve CAL'nin kalibrasyon eğrisinin doğruluğu ve kesinliği, aynı konsantrasyon seviyelerinde tekrarlanabilirliği, gün içi ve günler arası ölçümlerle değerlendirilmiştir. **Tablo 4.7 ve Tablo 4.9 da sonuçlar verilmiştir.**

4.2.3.Tekrarlanabilirlik

İki farklı (en düşük ve en yüksek) konsantrasyonda ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) belirlenen RSV'nin analitik yönteminin tekrarlanabilirliği altı kez SH ve VK değerleri elde edilmiştir. VK değerleri % 2' den az bulunmuştur. Aynı yöntem ve metodoloji, farklı günlerde (0. gün ve 2. gün), Tablo 4.1'de gösterildiği gibi gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirliğini göstermek için yapılmıştır. Ayrıca CAL için iki farklı konsantrasyonda ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) analitik yönteminin tekrarlanabilirliği altı kez ve SH ve VK değerleri elde edilmiştir. VK değerleri % 2' den az bulunmuştur. Aynı yöntem ve metodoloji, farklı günlerde (0. gün ve 2. gün), Tablo 4.2'de gösterildiği gibi gün içi ve günlerarası tekrarlanabilirliğini göstermek için yapılmıştır.

Tablo 4.1. RSV'nin iki farklı konsantrasyondaki ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tekrarlanabilirlik sonuçları

Numune	Absorbans	Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	VK (%)
$20 \mu\text{g.mL}^{-1}$	0,081	20,25	$20,375 \pm 0.262$	0.013
	0,082	20,50		
	0,082	20,50		
	0,083	20,75		
	0,081	20,25		
	0,080	20,00		

200 µg.mL ⁻¹	0.798	199,5	199,375 ± 0.647	0.003
	0.795	198,75		
	0.798	199,5		
	0.801	200,25		
	0.794	198,5		
	0.799	199,75		

Tablo 4.2. CAL ‘nin iki farklı konsantrasyondaki (4 µg.mL⁻¹- 20 µg.mL⁻¹) tekrarlanabilirlik sonuçları(n=6)

Numune	Absorbans	Konsantrasyon	Ortalama ± SS	VK (%)
4 µg.mL ⁻¹	0,195	4,03	4,043 ± 0.032	0.008
	0,195	4,03		
	0,196	4,06		
	0,198	4,10		
	0,194	4,01		
	0,195	4,03		
20 µg.mL ⁻¹	0.974	19,74	19,84 ± 0.104	0.005
	0.985	19,96		
	0.980	19,86		
	0.984	19,94		
	0.972	19,70		
	0.979	19,84		

4.2.4. Tekrar Üretilirlik

İki farklı konsantrasyonda RSV için ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ve CAL için ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) saptanan analitik yönteminin tekrar üretilebilirliği çalışması yapılmıştır. Veriler stok çözeltilerden ayrı olarak hazırlanarak elde edilmiştir ve tekrar SH ve VK değerleri elde edilmiştir. VK değerleri % 2'den az bulunmuştur (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4).

Tablo 4.3. RSV'nin iki farklı konsantrasyondaki ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ - $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) tekrar üretilebilirlik sonuçları

Numune	Absorbans	Konsantrasyon	Ortalama $\pm$ SS	VK (%)
$20 \mu\text{g.mL}^{-1}$	0.079	19.75	19.542 ± 0.431	0.022
	0.081	20.25		
	0.078	19.5		
	0.078	19.5		
	0.077	19.25		
	0.076	19		
$200 \mu\text{g.mL}^{-1}$	0.811	202.75	$202,375 \pm 1.394$	0.007
	0.815	203.75		
	0.810	202.5		
	0.801	200.25		
	0.815	203.75		
	0.805	201.25		

Tablo 4.4. CAL'nin iki farklı konsantrasyondaki (4 µg.mL⁻¹-20 µg.mL⁻¹) tekrar üretilebilirlik sonuçları

Numune	Absorbans	Konsantrasyon	Ortalama ± SS	VK (%)
4 µg.mL ⁻¹	0.198	4.09	4.115 ± 0.055	0.014
	0.202	4.17		
	0.202	4.17		
	0.196	4.05		
	0.196	4.05		
	0.200	4.13		
20 µg.mL ⁻¹	0.982	19.90	19.955 ± 0.042	0.002
	0.988	20.02		
	0.984	19.94		
	0.984	19.94		
	0.986	19.98		
	0.984	19.94		

4.2.5.Özgünlük

Kullanılan analitik metodun sadece RSV'yi veya diğer bileşenlerini, formülasyon katkı maddelerinin spektrumlarını kapsayıp kapsamadığını veya aynı dalga boyunda çakışıp çakışmadığını belirlemek (fosfolipidler) için, 200-1000 nm dalga boyları arasında alınmıştır. Ayrıca analitik metodun sadece CAL'yi veya diğer bileşenlerini, formülasyona ilave edilen maddelerinin spektrumlarının etken madde ile aynı dalga boylarında pik verip vermediğini belirlemek (fosfolipidler) için, 200-1000 nm dalga boyları arasında alınmıştır. Özgünlük, yöntemin diğer bileşenlerin varlığında RSV ve CAL içeriğini ayırabilme ve

ölçebilme kabiliyetidir. Bu sonuçlara göre 243 nm, RSV için spesifik bir dalga boyudur ve formülasyonun diğer bileşenleri, etken maddeyle 243 nmde çakışmamaktadır.

4.2.6.Stabilite

Çalışma süresince RSV'nin fosfat tamponu (pH: 7.4) içindeki stabilitesini incelemek için, 20 µg. mL⁻¹ ve 200 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlardaki RSV çözeltilerinin absorbansları ilk hazırlandıklarında ve hazırlandıktan 24 saat sonra ölçüldü. CAL'in fosfat tamponu (pH: 7.4) içindeki stabilitesi ise, 4 µg. mL⁻¹ ve 20 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlardaki CAL çözeltilerinin absorbansları ilk hazırlandıklarında ve hazırlandıktan 24 saat sonra ölçülmüştür. 24 saat sonunda çözelti konsantrasyonlarındaki değişiklikler istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6). VK verileri % 2'den az bulunmuştur.

Tablo 4.5. 0-24 saat aralya iki farklı konsantrasyonda (20 µg. mL⁻¹- 200 µg.mL⁻¹) oda sıcaklığında RSV'nin stabilite sonuçları (pH: 7.4)

Zaman (saat)	Konsantrasyon (µg.mL⁻¹)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg.mL⁻¹) Ortalama ± SS	VK(%)
0	20	20.375± 0.362	0.02
24	20	20,250 ± 0.262	0.01
0	200	199.75 ± 2.996	0.02
24	200	197.25 ± 5,812	0.03

Tablo 4.6. 0-24 saat aryla iki farklı konsantrasyonda (4 µg. mL⁻¹- 20 µg.mL⁻¹) oda sıcaklığında CAL'nin stabilite sonuçları (pH: 7.4)

Zaman (saat)	Konsantrasyon (µg.ml⁻¹)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg.mL⁻¹) Ortalama ± SS	VK(%)
0	4	4,03± 0.015	0.01
24	4	4,01 ± 0,012	0.01
0	20	20,08 ± 0,102	0.01
24	20	19.88 ± 0,128	0.01

4.3.Çözünürlük ve pH Değerlendirme Çalışmaları

4.3.1.RSV'nin Çözünürlük ve pH Değerlendirme Çalışması

Tablo 4.7. RSV'nin çözünürlük çalışma sonuçları (n=6)

SAKLAMA KOŞULU	BAŞLANGIÇ (µg.mL⁻¹)		2 GÜN SONRA ÖLÇÜM (µg.mL⁻¹)	
ODA SICAKLIĞI (25⁰C)	20	200	19.86 ± 0.11	199.30 ± 0.78
BUZDOLABI SICAKLIĞI (4⁰C)	20	200	19.92 ± 0.10	199.52 ± 0.55
1 SAAT (50⁰C)	20	200	19.88 ± 0.15	199.12 ± 0.65

Tablo 4.8. RSV’ nin farklı sıcaklıklarda pH değerlerindeki değişimlerine ait sonuçlar (n=6)

	ODA SICAKLIĞI (25⁰C)	BUZDOLABI (4⁰C)	1 SAAT (50⁰C)
BAŞLANGIÇ	7.40 ± 0.01	7.40 ± 0.01	7.40± 0.01
2 GÜN SONRA ÖLÇÜM	7.39 ± 0.01	7.40 ± 0.01	7.38± 0.01

4.3.2.CAL’nin Çözünürlük pH Değerlendirme Çalışması

Tablo 4.9. CAL’nin çözünürlük çalışma sonuçları (n=6)

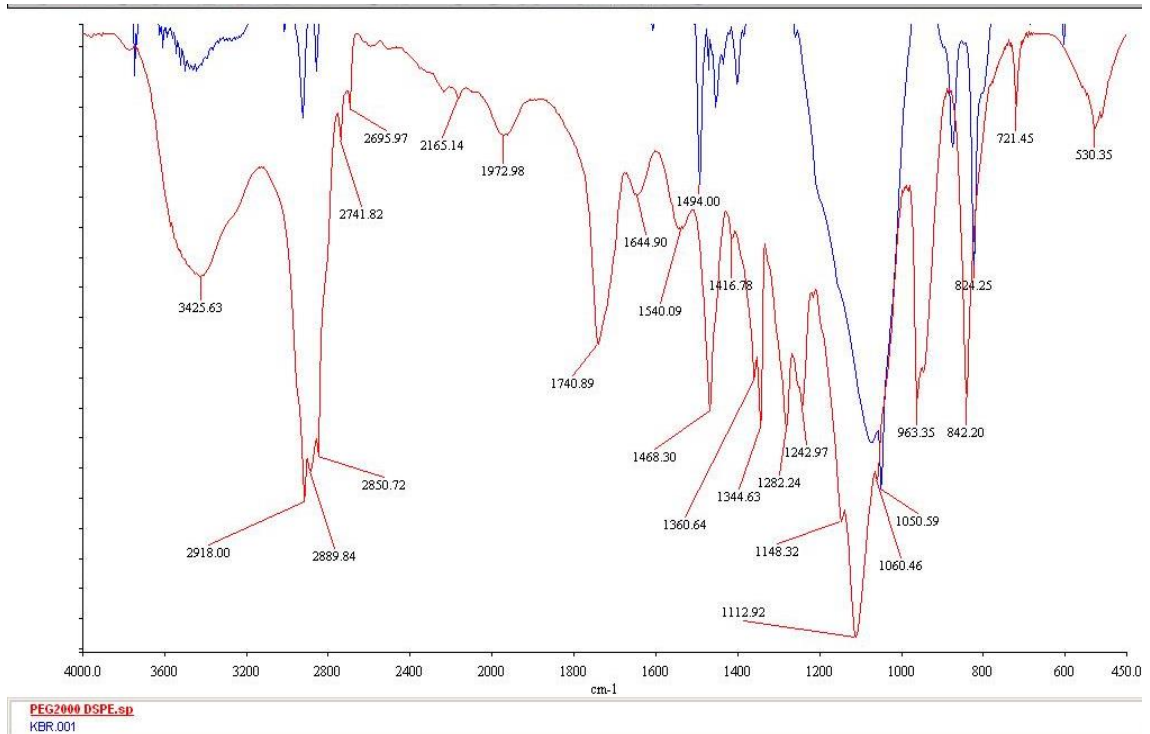
SAKLAMA KOŞULU	BAŞLANGIÇ (µg.mL⁻¹)		2 GÜN SONRA ÖLÇÜM (µg.mL⁻¹)	
ODA SICAKLIĞI (25 ⁰C)	4	20	3.92 ± 0.02	19,90 ± 0.12
BUZDOLABI SICAKLIĞI (4 ⁰ C)	4	20	3,96 ± 0.01	19,94 ± 0.08
1 SAAT 50 ⁰ C	4	20	3,90 ± 0.01	19.86 ± 0.16

Tablo 4.10. CAL’nin farklı sıcaklıklarda pH değerlerindeki değişmelerine ait sonuçlar (n=6)

	ODA SICAKLIĞI (25⁰C)	BUZDOLABI (4⁰C)	1 SAAT (50⁰C)
BAŞLANGIÇ	7.40 ± 0.01	7.40 ± 0.01	7.40± 0.01
2 GÜN SONRA ÖLÇÜM	7.38 ± 0.01	7.39 ± 0.01	7.38± 0.01

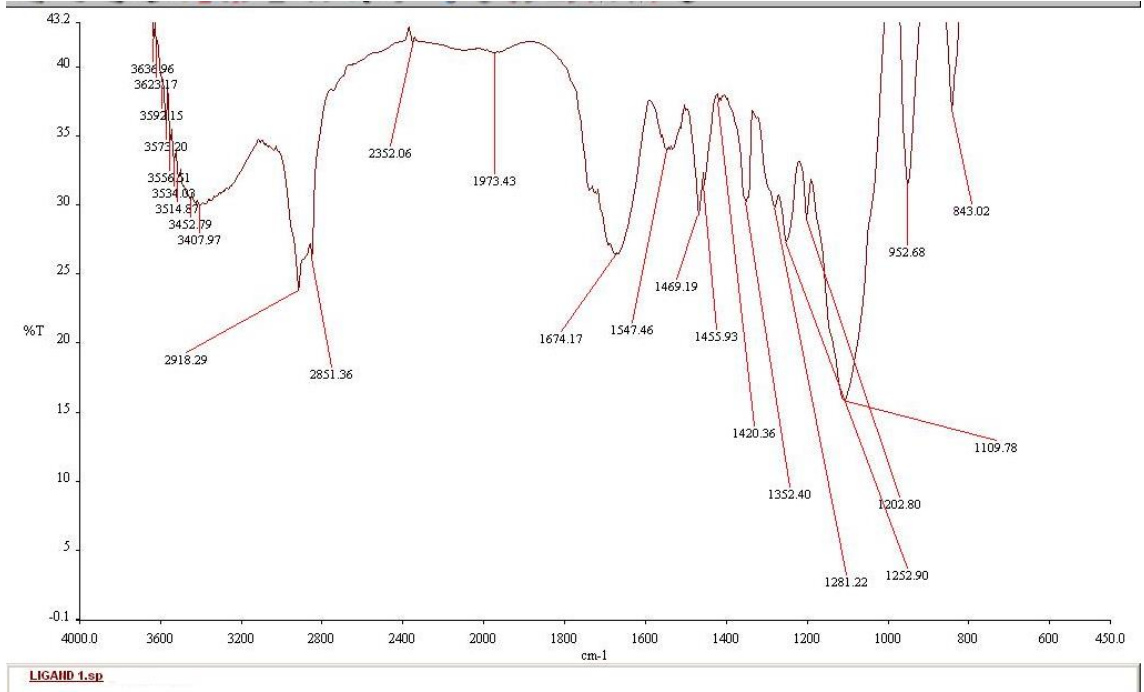
4.4.Lipozomlar ile İlgili Çalışmalar

Çalışmada hedeflendirme ligandı olarak VCAM-1'e seçici olarak bağlanan ve VLA-4 homologu VHPKQHR peptidi kullanılmıştır. Ligand, lipozomal formülasyonlarına mPEG₂₀₀₀DSPE üzerinden kovalan yolla bağlanmıştır. Ligandın mPEG₂₀₀₀DSPE ye bağlanıp bağlanmadığı FT-IR çalışmaları ile ispatlanmıştır. mPEG₂₀₀₀DSPE, VHPKQHR peptidi ve mPEG₂₀₀₀DSPE+VHPKQHR konjugatının FT-IR sonuçları Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6. da verilmiştir.



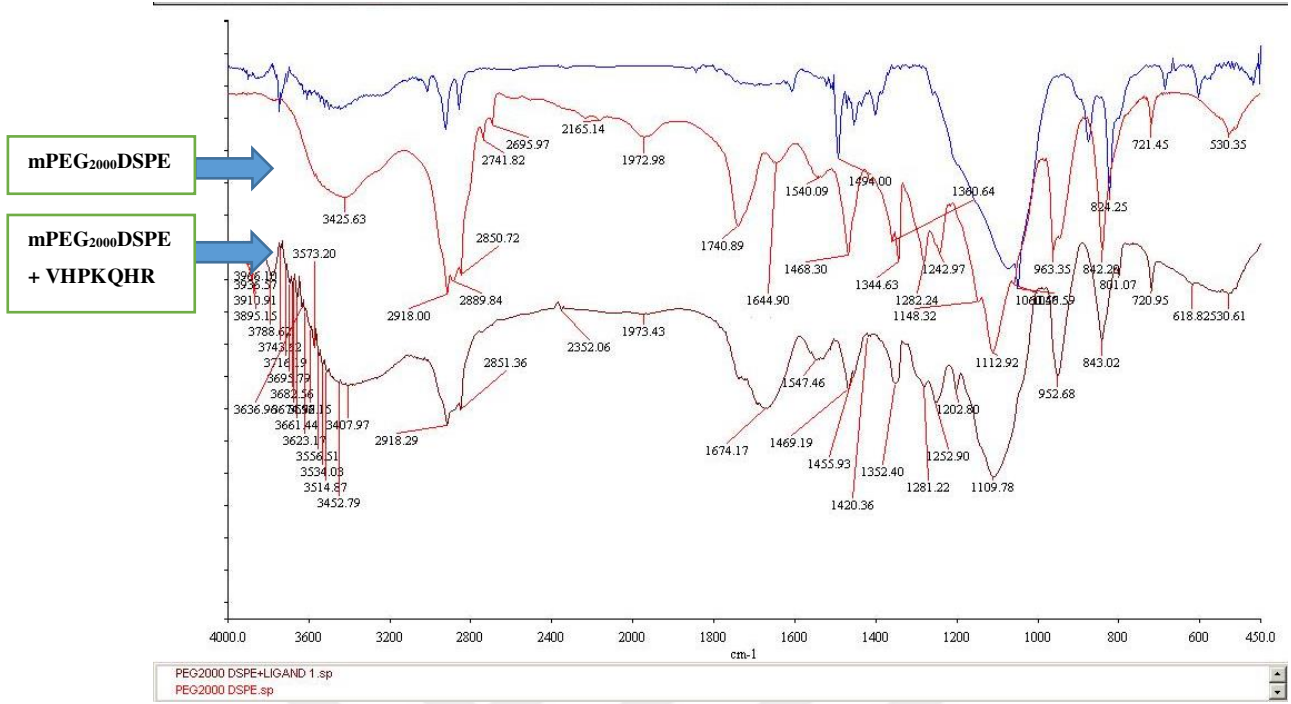
Şekil 4.4. mPEG₂₀₀₀DSPE ye ait FT-IR spektrumu

Şekil 4.4' te verilen sonuçlara göre 2850 ve 2918 cm⁻¹ de çıkan pikler asimetrik ve simetrik -CH₂ gruplarından kaynaklanmaktadır. 1740 cm⁻¹ de çıkan pikler -C=O gruplarına aittir.



Şekil 4.5. VHPKQHR peptidine ait FT-IR spektrumu

VHPKQHR peptidinin FTIR karakterizasyonu sonucunda elde edilen pikler Şekil 4.5'te verilmiştir. 1352 cm⁻¹ pik noktası peptidin sarmal yapısından kaynaklı olduğunu göstermiş ve literatür ile uyum içindedir. Ayrıca 2850 ve 2918 cm⁻¹ de çıkan pikler asimetrik ve simetrik -CH₂ gruplarından kaynaklanmaktadır.

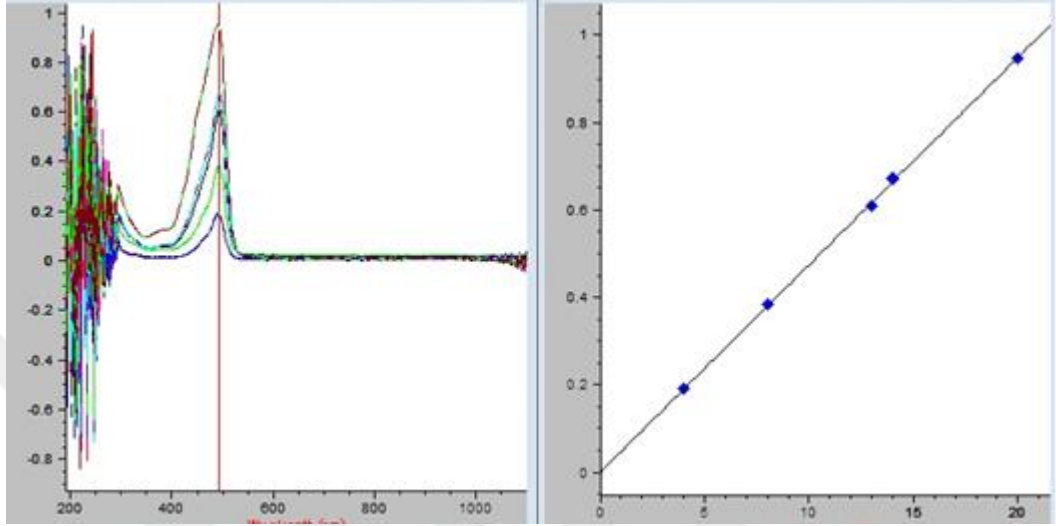


Şekil 4.6. mPEG2000DSPE ve VHPKQHR konjugatı ile birlikte ait FT-IR spektrumu

mPEG2000DSPE ve VHPKQHR konjugatı ile birlikte yapılan FTIR analizinde (Şekil 4.6) bu iki yapıya ait karakteristik pikler olan 2918, 2851, 1973, 1740, 1674, 1547 ve 1109 cm^{-1} elde edilmiş ve bağlanmalar gösterilmiştir.

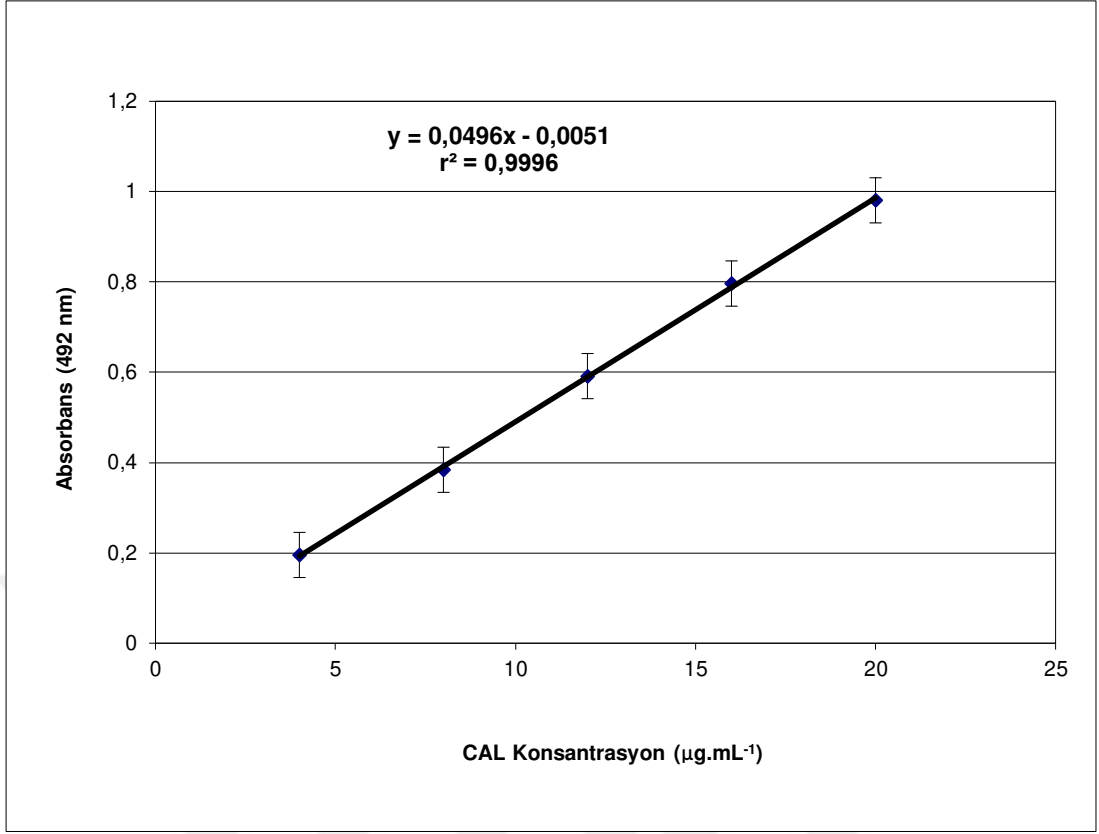
4.4.1. Lipozom formülasyonunun CAL hapsedme Kapasitesinin Tayini

CAL için kalibrasyon eğrisi çizilerek L2 formülasyonunun CAL yükleme kapasitesi hesaplanmıştır. CAL için geliştirilen spektrofotometrik yöntemde, etken maddenin 492 nm’de maksimum absorbans verdiği Şekil 4.7 gösterilmiştir.



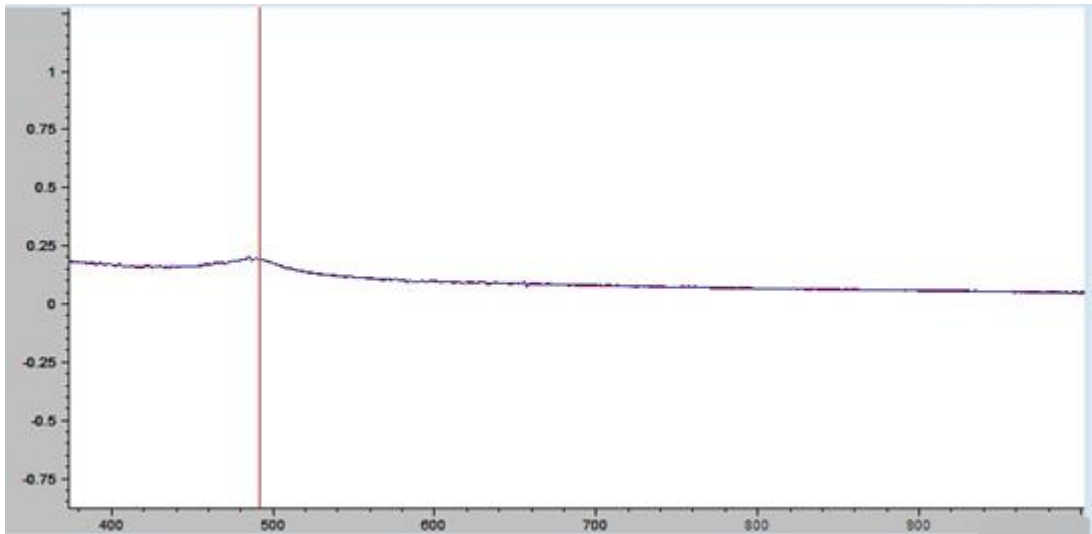
Şekil 4.7. Kalseinin spektral analizdeki maksimum absorbans değeri ($\lambda_{\max}= 492\text{nm}$)

CAL floresans maddesini hedeflendirme bölgesinde görüntüleme amacıyla kullanacağımız için 6 tekrarlı ve 5 noktalı (4 ile 20 µg/mL arasında) kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Spektrofotometrik yöntemle 492 nm de dalga boyunda çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.8. CAL'nin 492 nm dalga boyundaki kalibrasyon eğrisi (n=6)

Yukarıdaki kalibrasyon eğrisi ve denkleminde yararlanılarak L2 optimum formülasyonu ile hazırlanan CAL yüklü lipozom formülasyonuna ait absorbans değerleri tablosu ve absorbans görüntüsü aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.9. CAL yüklü lipozom formülasyonunun 1:1 (a/a) oranında Triton X-100 (%2,5) ile parçalanmasından sonra elde edilen CAL absorbans değeri (n=3)

Tablo 4.11. CAL yüklü lipozom formülasyonuna ait absorbans değerleri ve etken madde yükleme kapasitesi (n=3)

	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	Ortalama $\pm$ SD	CV (%)	Yükleme kapasitesi (%)
Absorbans	0,210	0,212	0,213	0,2117 $\pm$ 0,0015	0,008	8,75 $\pm$ 0,01

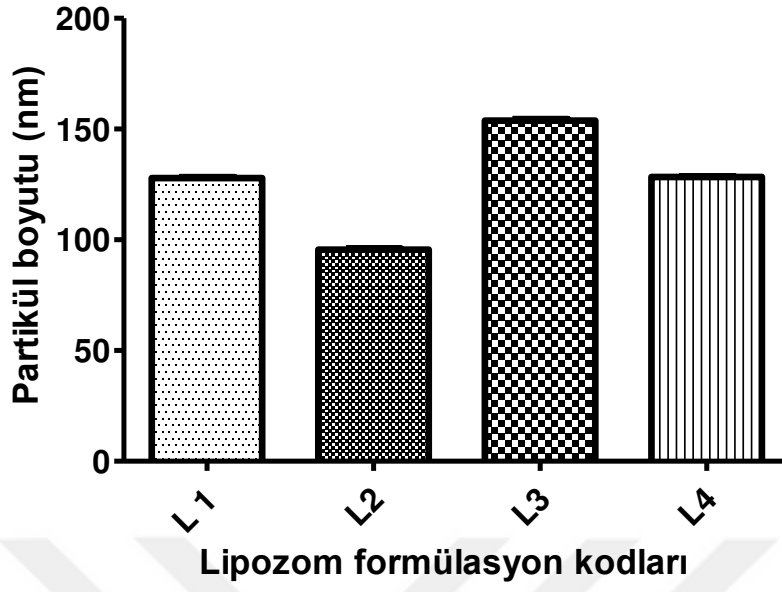
Yüklenen kalsein yüzdesi, lipozomların **Triton X-100 (%2,5)** ile parçalanmasından sonra kalseinin verdiği absorbanslar üzerinden hesaplanmış ve optimum formül olan L2'nin içerisinde **%8,75** kalsein değeri bulunarak kalseini hapsedebildiği ispatlanmıştır.

4.4.2.Lipozom formülasyonlarının RSV Hapsetme Kapasitelerinin Tayini

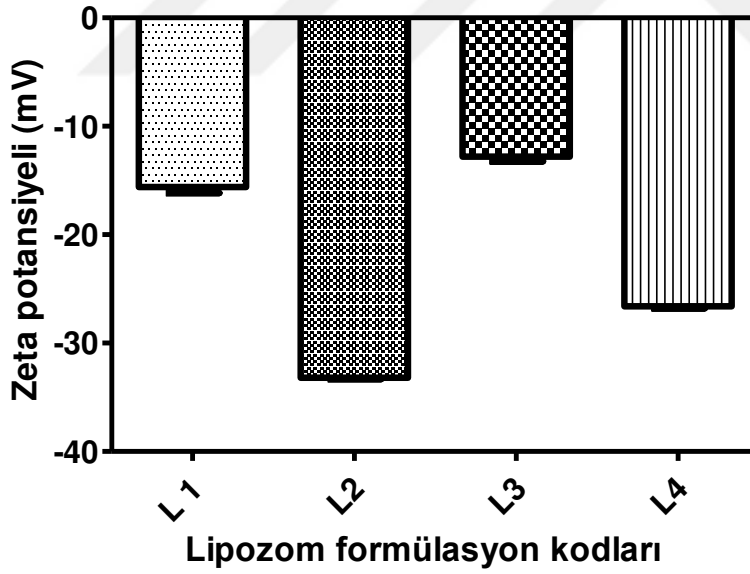
Farklı oranlarda mPEG2000DSPE:DOPE:DOPA içeren lipozom formülasyonlarının partikül büyüklükleri, büyüklük dağılımları, zeta potansiyelleri ve enkapsülasyon kapasiteleri Tablo 4.12 deki verilmiştir.

Tablo 4.12. Lipozom formülasyonlarının partikül büyüklükleri, büyüklük dağılımları, zeta potansiyelleri ve enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular (n=3)

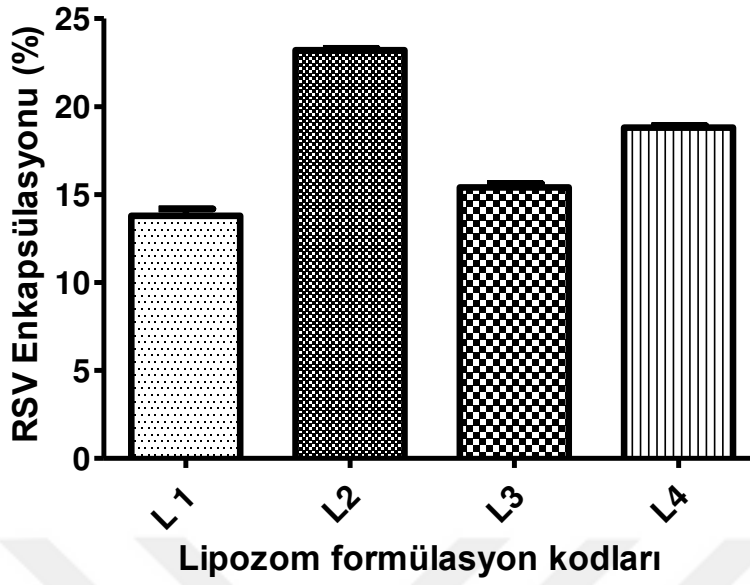
Kod	Fosfolipit molar oranları	Partikül büyüklüğü (nm $\pm$ SS)	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	PDI $\pm$ SS	Enkapsülasyon etkinliği (% $\pm$ SS)
L1	5:70:25	127,9 $\pm$ 0,42	-15,6 $\pm$ 0,56	0,241 $\pm$ 0,010	13,8 $\pm$ 0,38
L2	5:60:35	95,5 $\pm$ 0,44	-33,2 $\pm$ 0,12	0,160 $\pm$ 0,001	23,2 $\pm$ 0,12
L3	5:55:40	153,8 $\pm$ 0,68	-12,8 $\pm$ 0,42	0,219 $\pm$ 0,020	15,4 $\pm$ 0,22
L4	5:45:50	128,4 $\pm$ 0,21	-26,6 $\pm$ 0,18	0,091 $\pm$ 0,001	18,8 $\pm$ 0,11



Şekil 4.10. L1-L4 formülasyonlarının partikül büyüklükleri



Şekil 4.11. L1-L4 formülasyonlarının zeta potansiyelleri

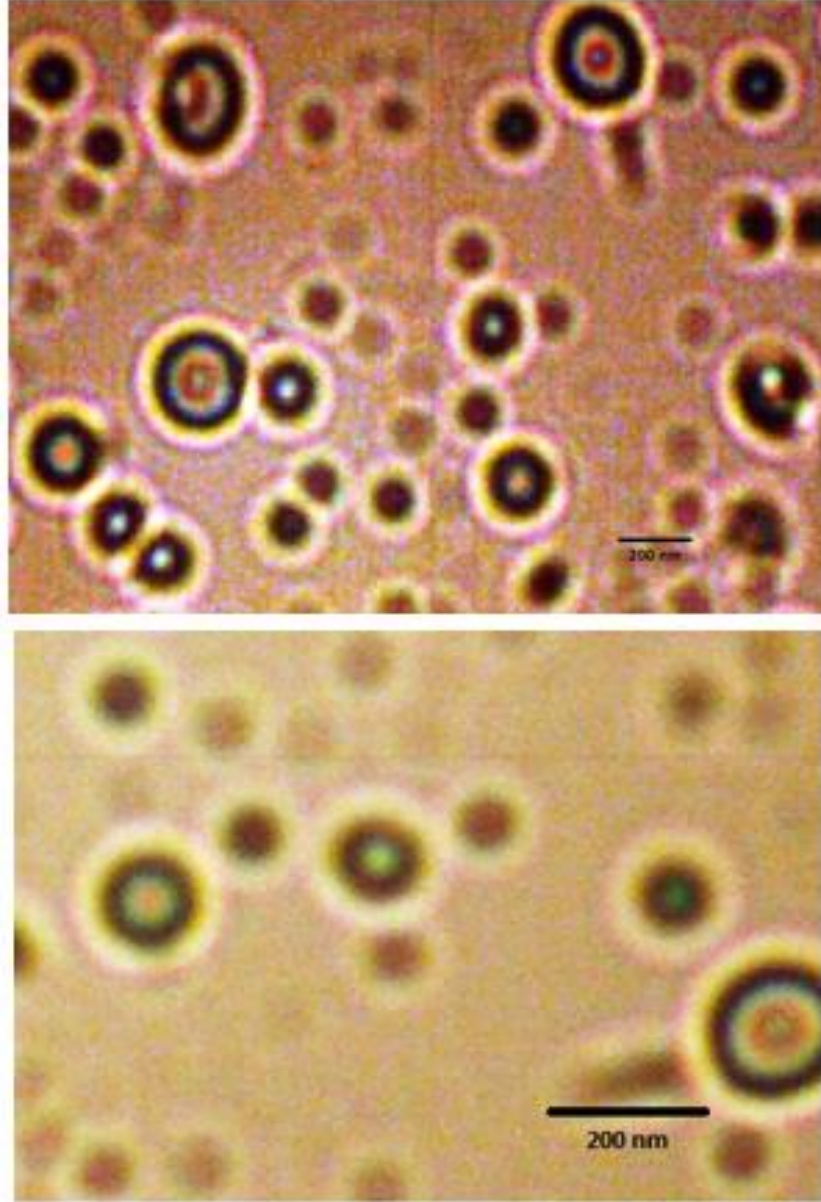


Şekil 4.12. L1-L4 formülasyonlarının RSV enkapsülasyon etkinlikleri (%)

Özellikle L2 ve L4 formülasyonlarının, L1 ve L3'e göre partikül büyüklükleri, büyüklük dağılımları, zeta potansiyelleri, RSV Enkapsülasyonu açısından Tablo 4.12'de belirtildiği parametreler bütünüyle karşılaştırıldığında L2 ve L4 formülasyonlarıyla optimizasyon çalışmalarına gidilmesinin uygun olduğu belirlenmiştir.

4.4.3. L2 Lipozom Formülasyonuna Ait PLM Görüntüleri

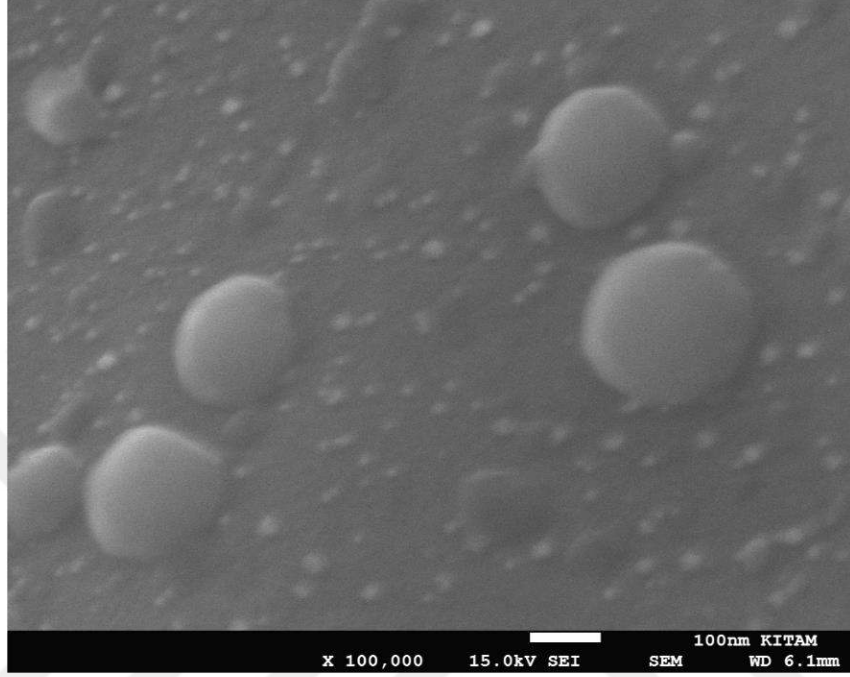
L2 formülasyonunun vezikül tabakalarını gösteren polarize mikroskop ile çekilmiş fotoğraflar Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.13. L2 formülasyonuna ait PLM görüntüleri

4.4.4. L2 Lipozom Formülasyonuna Ait SEM Görüntüleri

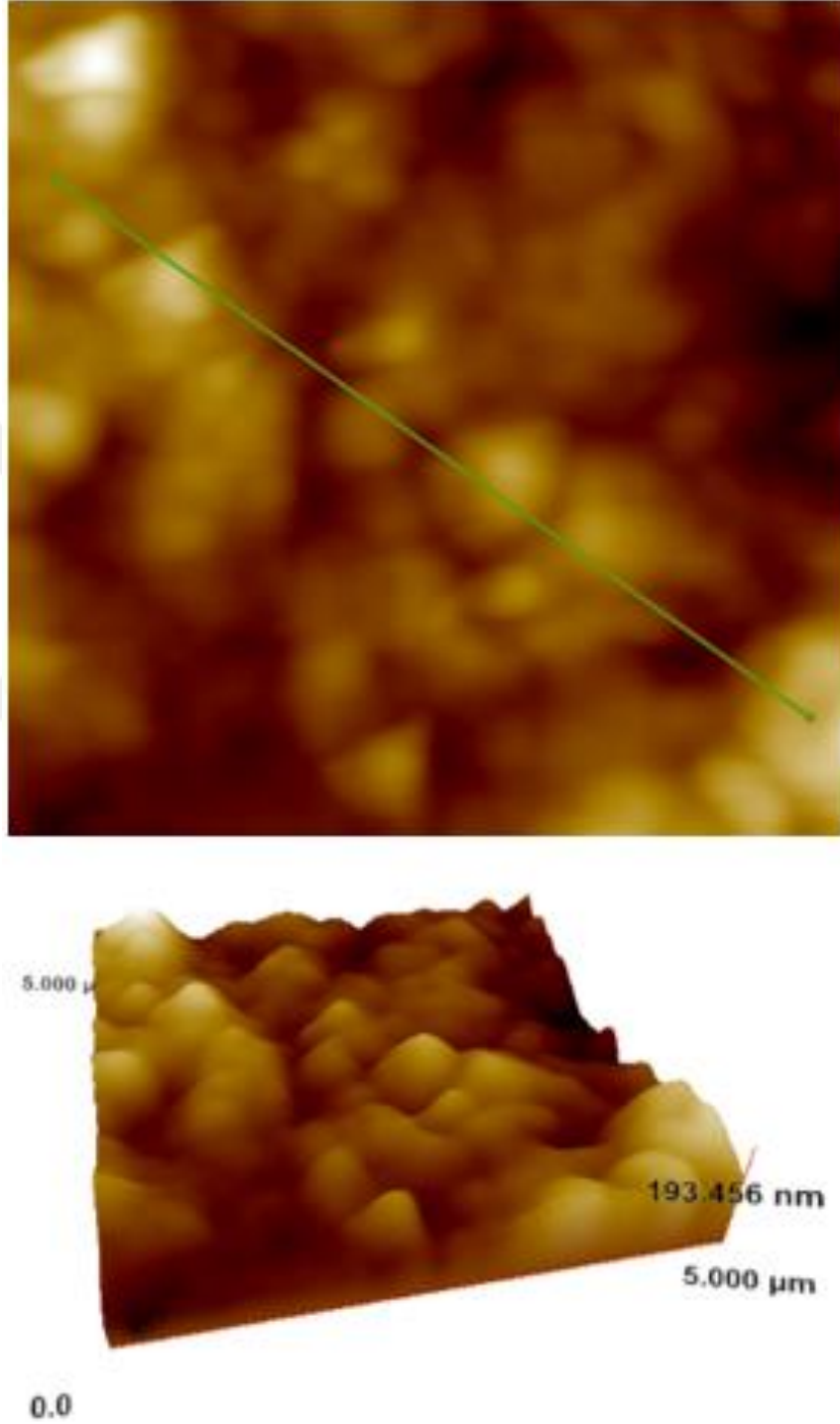
L2 lipozom formülasyonunun Taramalı Elektron Mikroskobu ile çekilmiş görüntüsü Şekil 4.14’de verilmiştir.



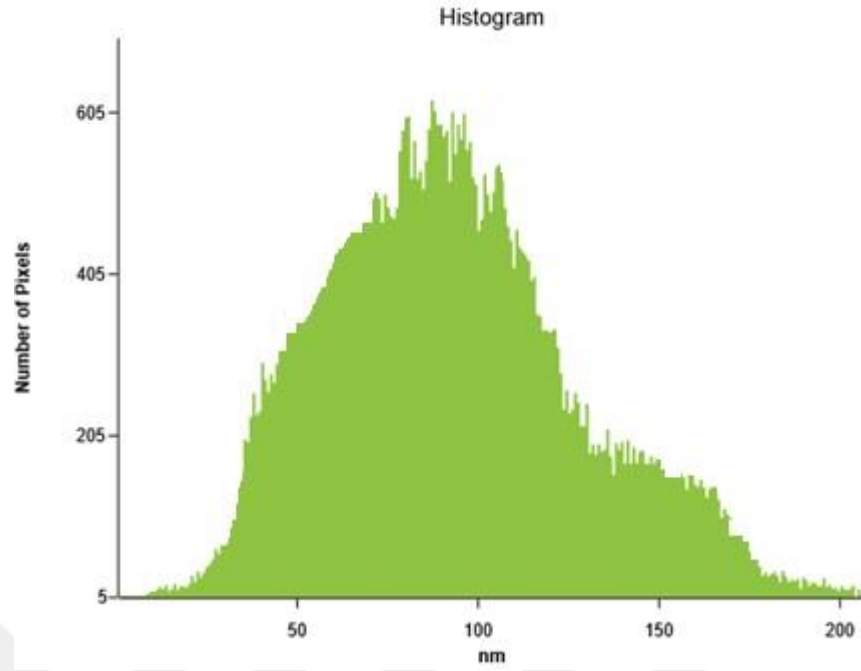
Şekil 4.14. L2 formülasyonuna ait SEM fotoğrafı (x100.000)

4.4.5. L2 Lipozom Formülasyonuna Ait AFM Görüntüleri

L2 lipozom formülasyonunun Atomik Kuvvet Mikroskobu ile çekilmiş görüntüsü ve histogramı Şekil 4.15' ve 4,16'da verilmiştir.



Şekil 4.15. L2 formülasyonuna ait AFM görüntüleri



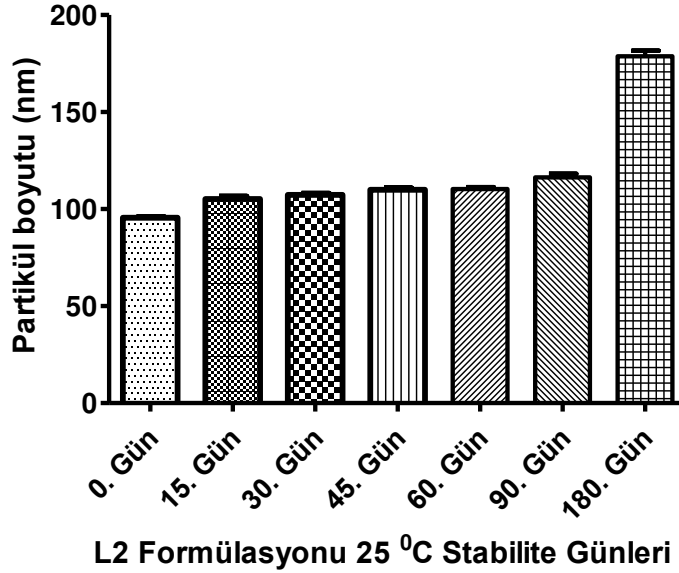
Şekil 4.16. L2 formülasyonuna ait AFM histogramı

4.4.6. Lipozom Formülasyonlarının Stabilitelerinin İncelenmesi

L2 ve L4 formülasyonları ile gerçekleştirilen stabilite çalışmalarında, +4⁰C ve 25⁰C (%60 bağıl nem) ortamlarında 180 gün bekletilen lipozom formülasyonlarının zamana bağlı olarak partikül büyüklükleri, büyüklük dağılımları, zeta potansiyelleri ve etken madde enkapsülasyon kapasitelerindeki değişiklikler incelenmiştir.

Tablo 4.13. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)

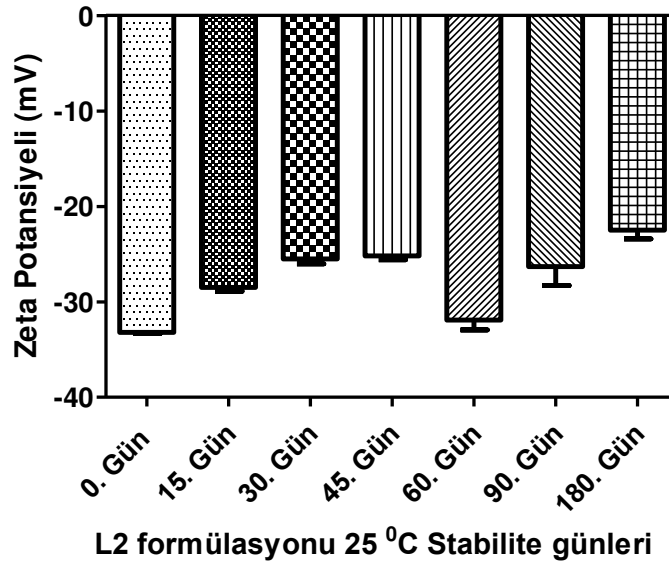
Kod	Zaman	25 °C ± 2, % 60 RH	
L2	Gün	Partikül Büyüklüğü (nm ± SS)	PDI ± SS
	0.Gün	95,5 ± 0,4	0,160 ± 0,001
	15. Gün	105,2 ± 1,3	0,133 ± 0,003
	30. Gün	107,3 ± 0,7	0,137 ± 0,002
	45. Gün	109,9 ± 0,8	0,140 ± 0,002
	60. Gün	110,3 ± 1,0	0,219 ± 0,002
	90. Gün	116,4 ± 1,8	0,188 ± 0,004
	180. Gün	178,8 ± 2,8	0,204 ± 0,005



Şekil 4.17. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler

Tablo 4.14. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3)

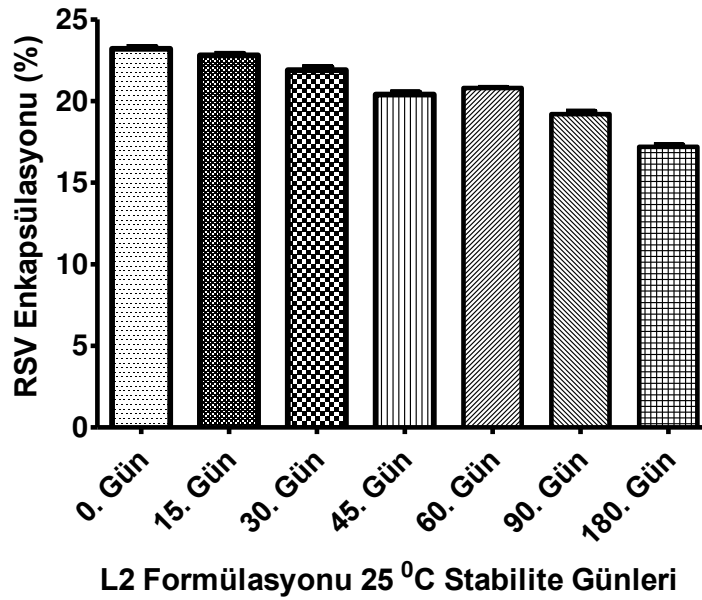
Kod	Zaman	25 °C ± 2, % 60 RH
L2	Gün	Zeta Potansiyeli (mV ± SS)
	0.Gün	-33,2 ± 0,1
	15. Gün	-28,5 ± 0,4
	30. Gün	-25,5 ± 0,5
	45. Gün	-25,2 ± 0,4
	60. Gün	-31,9 ± 1,0
	90. Gün	-26,3 ± 2,0
	180. Gün	-22,5 ± 0,9



Şekil 4.18. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler

Tablo 4.15. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)

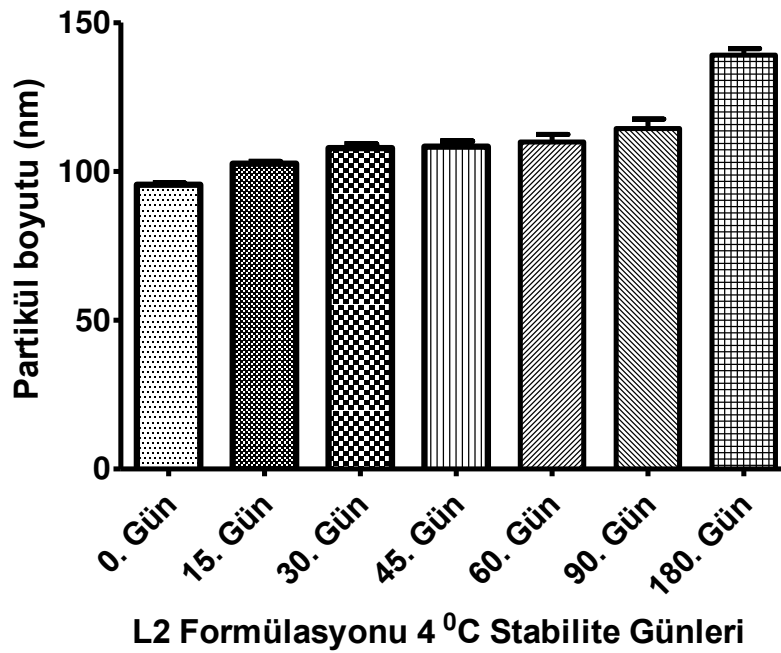
Kod	Zaman	25 °C ± 2, % 60 RH
L2	Gün	RSV Enkapsülasyon Etkinliği (% ± SS)
	0.Gün	23,2 ± 0,1
	15. Gün	22,8 ± 0,1
	30. Gün	21,9 ± 0,2
	45. Gün	20,4 ± 0,1
	60. Gün	20,8 ± 0,1
	90. Gün	19,2 ± 0,2
	180. Gün	17,2 ± 0,1



Şekil 4.19. 25 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda (%) görülen değişimler

Tablo 4.16. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)

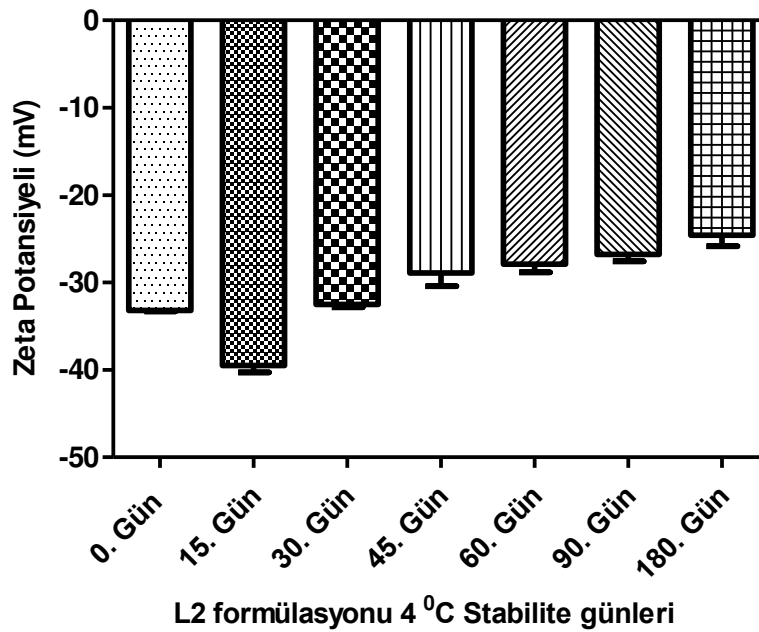
Kod	Zaman	4 °C	
L2	Gün	Partikül Büyüklüğü (nm ± SS)	PDI ± SS
	0.Gün	95,5 ± 0,4	0,160 ± 0,001
	15. Gün	102,6 ± 0,6	0,195 ± 0,002
	30. Gün	107,3 ± 0,7	0,187 ± 0,002
	45. Gün	108,3 ± 1,8	0,164 ± 0,002
	60. Gün	109,9 ± 2,6	0,210 ± 0,005
	90. Gün	114,4 ± 3,2	0,192 ± 0,008
	180. Gün	139,1 ± 2,1	0,208 ± 0,007



Şekil 4.20. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler

Tablo 4.17. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3)

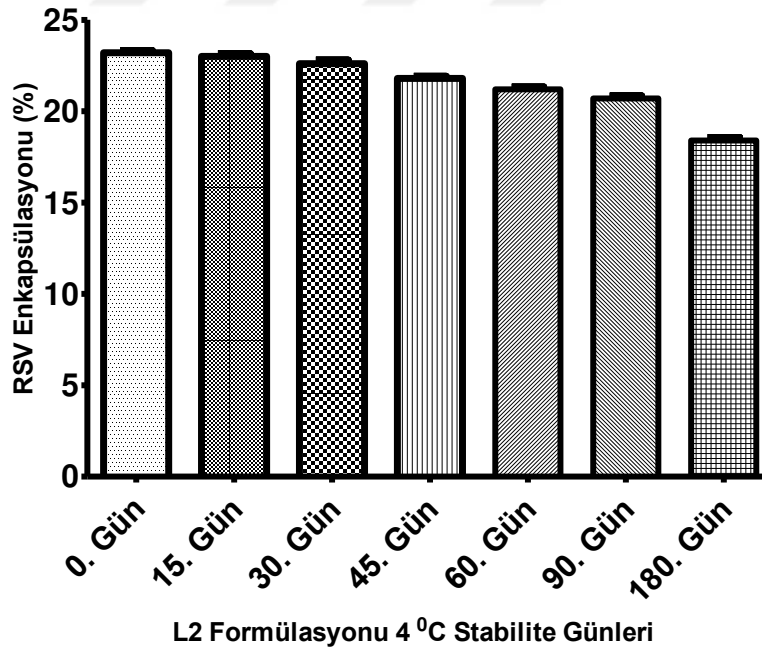
Kod	Zaman	4 °C
L2	Gün	Zeta Potansiyeli (mV ± SS)
	0.Gün	-33,2 ± 0,1
	15. Gün	-39,5 ± 0,8
	30. Gün	-32,5 ± 0,3
	45. Gün	-28,9 ± 1,5
	60. Gün	-27,9 ± 0,9
	90. Gün	-26,8 ± 0,8
	180. Gün	-24,6 ± 1,3



Şekil 4.21. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler

Tablo 4.18. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)

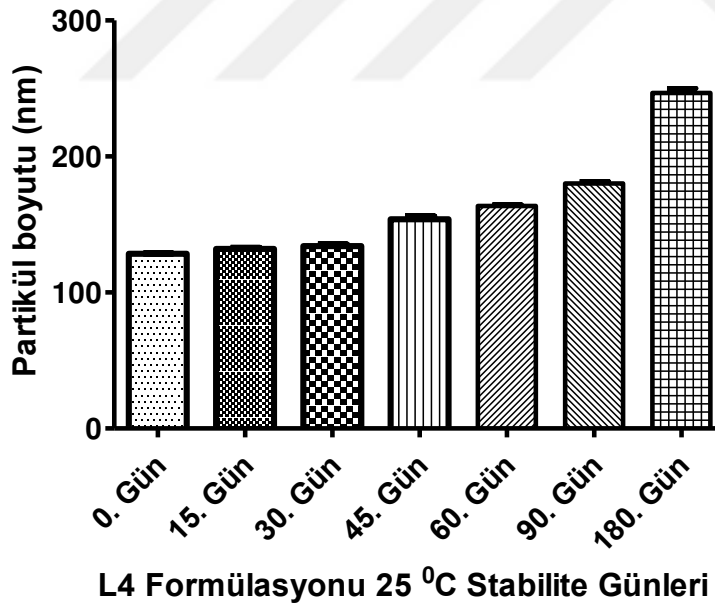
Kod	Zaman	4 °C
L2	Gün	RSV Enkapsülasyon Etkinliği (%± SS)
	0.Gün	23,2 ± 0,1
	15. Gün	23,0 ± 0,2
	30. Gün	22,6 ± 0,2
	45. Gün	21,8 ± 0,1
	60. Gün	21,2 ± 0,2
	90. Gün	20,7 ± 0,2
	180. Gün	18,4 ± 0,2



Şekil 4.22. 4 °C de bekletilen L2 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda görülen değişimler

Tablo 4.19. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)

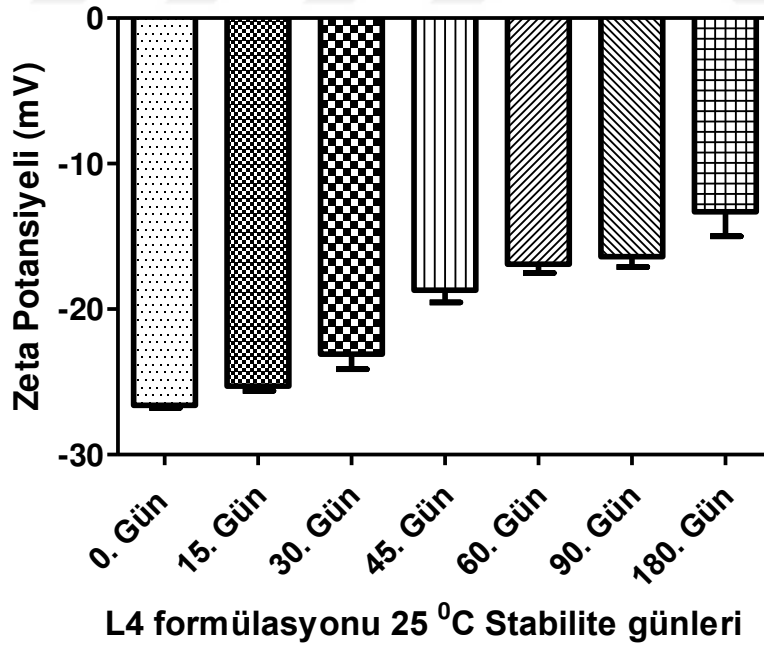
Kod	Zaman	25 °C± 2, % 60 RH	
L4	Gün	Partikül Büyüklüğü (nm ± SS)	PDI ± SS
	0.Gün	128,4 ± 0,2	0,091 ± 0,001
	15. Gün	132,1± 0,6	0,132 ± 0,001
	30. Gün	134,1 ± 1,2	0,125 ± 0,002
	45. Gün	153,8 ± 2,1	0,193 ± 0,003
	60. Gün	163,7 ± 0,9	0,241 ± 0,002
	90. Gün	180,2 ± 1,4	0,208 ± 0,008
	180. Gün	246,8 ± 3,3	0,253 ± 0,012



Şekil 4.23. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler

Tablo 4.20. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3)

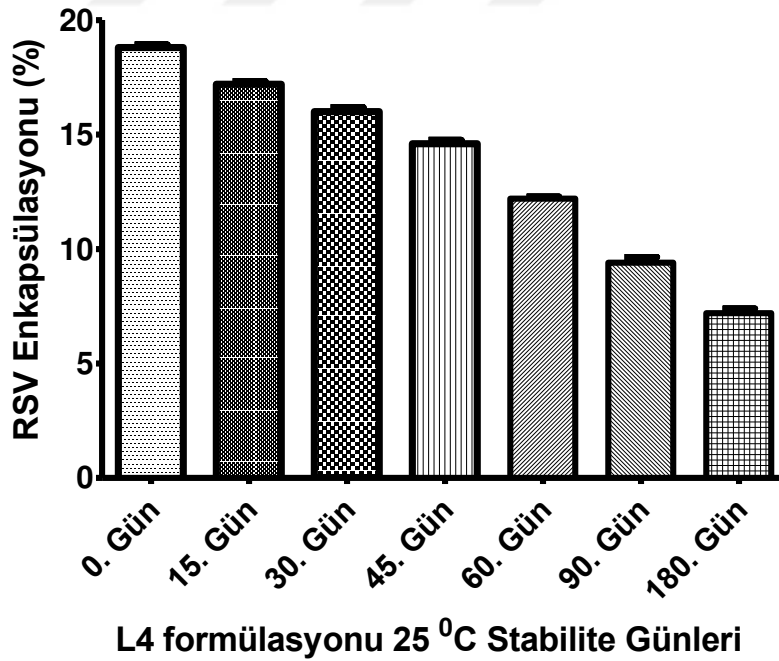
Kod	Zaman	25 °C ± 2, % 60 RH
L4	Gün	Zeta Potansiyeli (mV ± SS)
	0.Gün	-26,6 ± 0,2
	15. Gün	-25,3 ± 0,3
	30. Gün	-23,1 ± 1,0
	45. Gün	-18,7 ± 0,8
	60. Gün	-16,9 ± 0,6
	90. Gün	-16,4 ± 0,7
	180. Gün	-13,3 ± 1,7



Şekil 4.24. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler

Tablo 4.21. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)

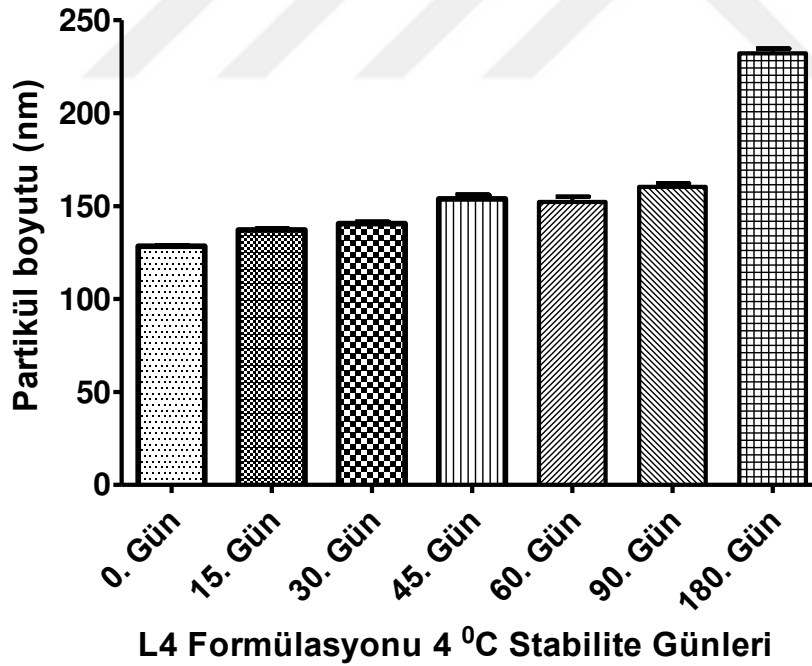
Kod	Zaman	25 °C ± 2, %60 RH
L4	Gün	RSV Enkapsülasyonu (% ± SS)
	0. Gün	18,8 ± 0,1
	15. Gün	17,2 ± 0,1
	30. Gün	16,0 ± 0,2
	45. Gün	14,6 ± 0,2
	60. Gün	12,2 ± 0,1
	90. Gün	9,4 ± 0,5
	180. Gün	7,2 ± 0,2



Şekil 4.25. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda görülen değişimler

Tablo 4.22. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=3)

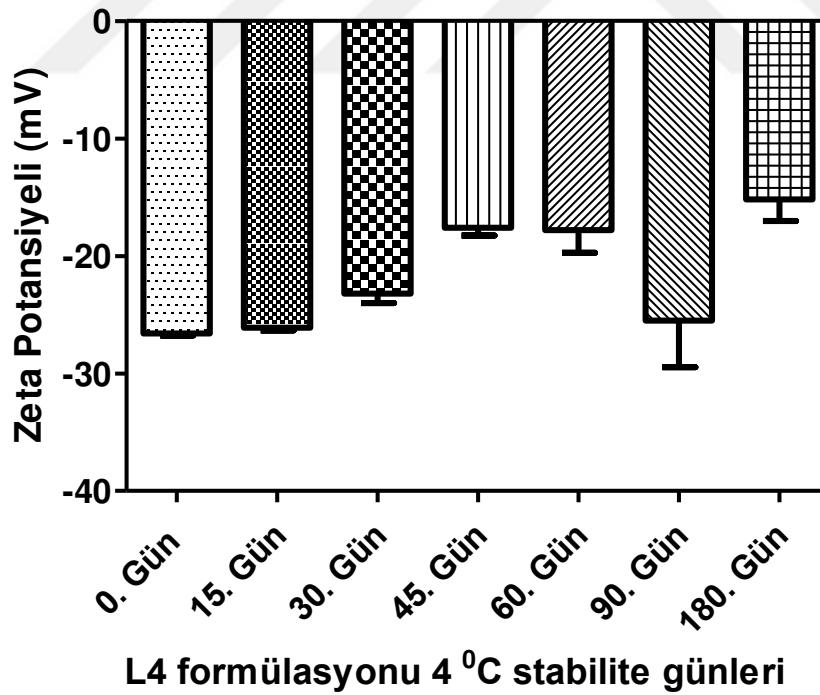
Kod	Zaman	4 °C	
L4	Gün	Partikül Büyüklüğü (nm ± SS)	PDI ± SS
	0.Gün	128,4 ± 0,2	0,091 ± 0,001
	15. Gün	137,2 ± 0,3	0,162 ± 0,001
	30. Gün	140,6 ± 0,6	0,157 ± 0,003
	45. Gün	153,9 ± 1,9	0,229 ± 0,003
	60. Gün	152,2 ± 2,9	0,226 ± 0,002
	90. Gün	160,3 ± 3,2	0,255 ± 0,005
	180. Gün	232,2 ± 2,6	0,302 ± 0,008



Şekil 4.26. 4°C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince partikül büyüklüğünde görülen değişimler

Tablo 4.23. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun zeta potansiyeli sonuçları (n=3)

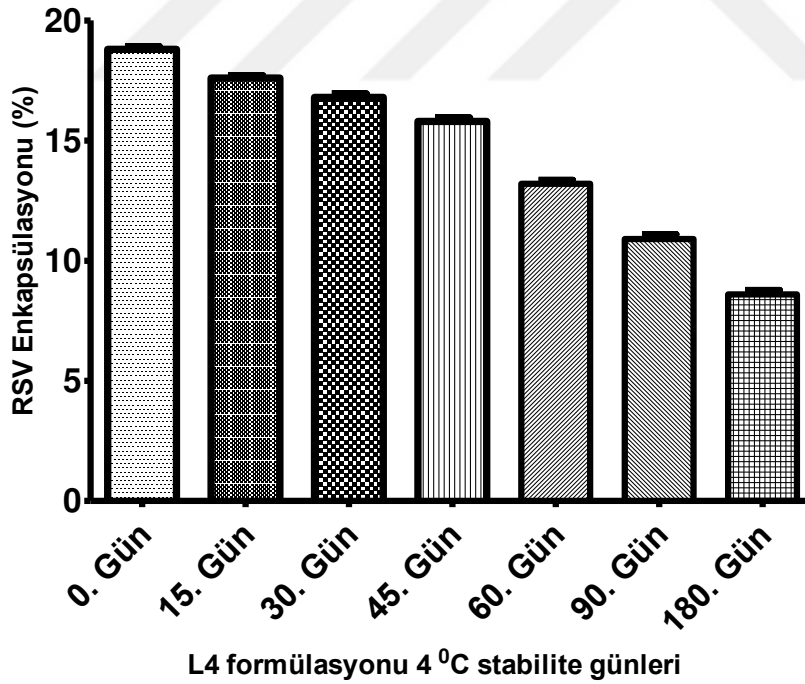
Kod	Zaman	4 °C
L4	Gün	Zeta Potansiyeli (mV ± SS)
	0.Gün	-26,6 ± 0,18
	15. Gün	-26,1 ± 0,24
	30. Gün	-23,2 ± 0,82
	45. Gün	-17,6 ± 0,66
	60. Gün	-17,8 ± 1,92
	90. Gün	-25,5 ± 3,96
	180. Gün	-15,2 ± 1,83



Şekil 4.27. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince zeta potansiyelinde görülen değişimler

Tablo 4.24. 4 °C de bekletilen L4 formülasyonunun enkapsülasyon etkinliği sonuçları (n=3)

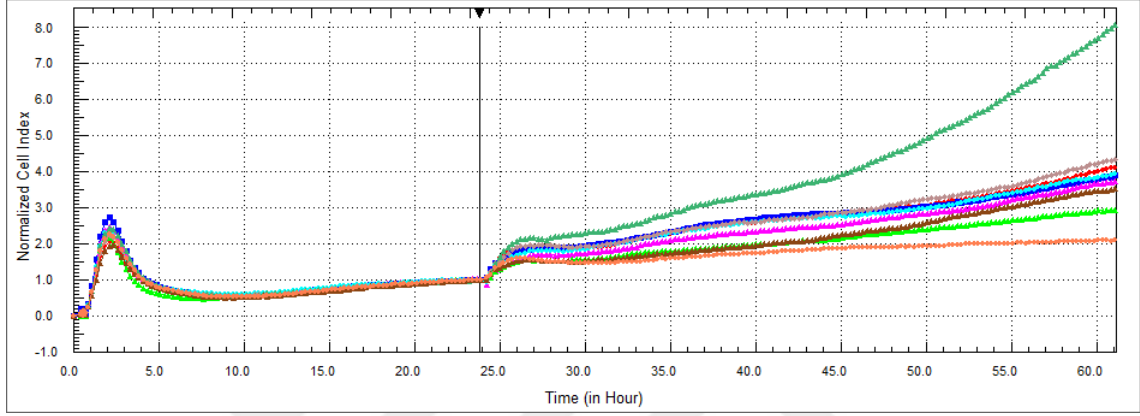
Kod	Zaman	4 °C
L4	Gün	RSV Enkapsülasyon Etkinliği (% $\pm$ SS)
	0.Gün	18,8 $\pm$ 0,1
	15. Gün	17,6 $\pm$ 0,1
	30. Gün	16,8 $\pm$ 0,1
	45. Gün	15,8 $\pm$ 0,1
	60. Gün	13,2 $\pm$ 0,2
	90. Gün	10,4 $\pm$ 0,3
	180. Gün	8,6 $\pm$ 0,2



Şekil 4.28. 25 °C de bekletilen L4 formülasyonunun 180 gün süresince RSV enkapsülasyonunda görülen değişimler

Yukarıda Tablolarda görüldüğü üzere; karşılaştırmalı olarak yapılan stabilite sonuçlarına göre L2 formülasyonu, partikül büyüklüğü, büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli ve etken madde enkapsülasyon etkinliği açısından L4 formülasyonundan daha başarılı olduğu için, ilaç hedeflendirme çalışmalarında bu formülasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

4.4.7. Lipozomların *in vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

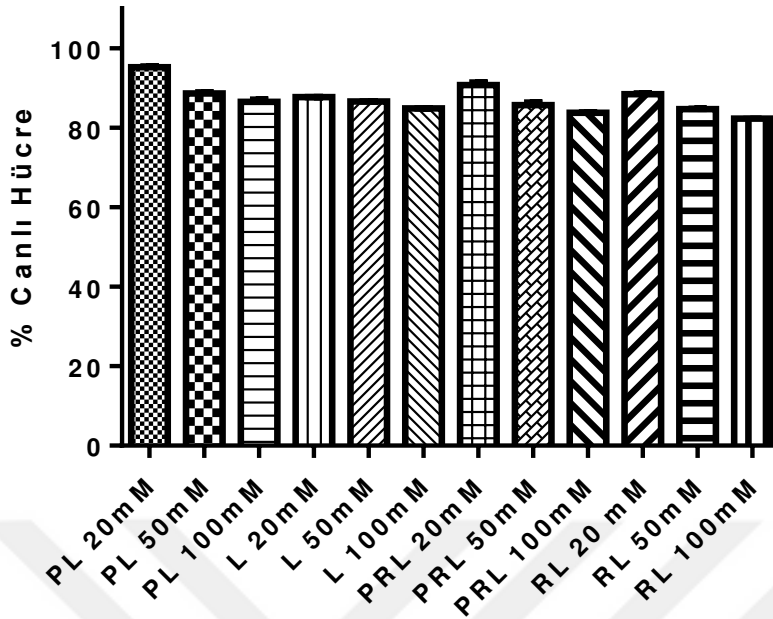


..... Kontrol 1:20/DOPE 1:20/DOPA 1:20/PEG-DSPE
 1:5/DOPE 1:5/DOPA 1:5/PEG-DSPE
 1:20/RSV 1:5/RSV

Tüm seyreltmeler pH:7.4 fosfat tamponu ile yapılmıştır.

Şekil 4.29. DOPE, DOPA, RSV ve mPEG₂₀₀₀DSPE nin farklı konsantrasyonlarda U 87 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisinin gerçek zamanlı analizine ait grafik

Sitotoksosite çalışmalarında L2 formülasyonundaki bileşenlerinin (Kontrol, DOPE, DOPA, RSV, mPEG₂₀₀₀DSPE) uygulama dozlarında ve yüksek dozlarda glioblastoma hücrelerindeki toksikolojik etkilerinin sınırlı seviyede olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla beyine hedeflendirilecek formülasyondaki kombinasyonlarının beyin hücrelerine sitotoksik bir etkisinin olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

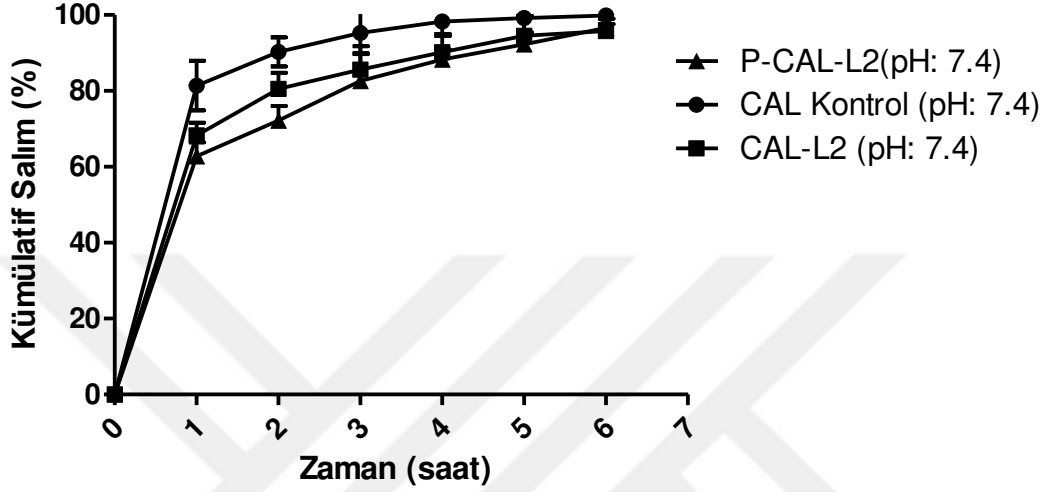


Şekil 4.29. RSV yüklenmemiş peptid bağlı olan ve peptid olmayan (PL ve L), RSV yüklenmiş peptid bağlı olan ve peptid bağlı olmayan (PRL ve RL) lipozomal dispersiyonların farklı konsantrasyonlarda (20,50,100 mM) U 87 hücrelerinin yaşayabilirliğine etkisinin MTT analizine ait grafik

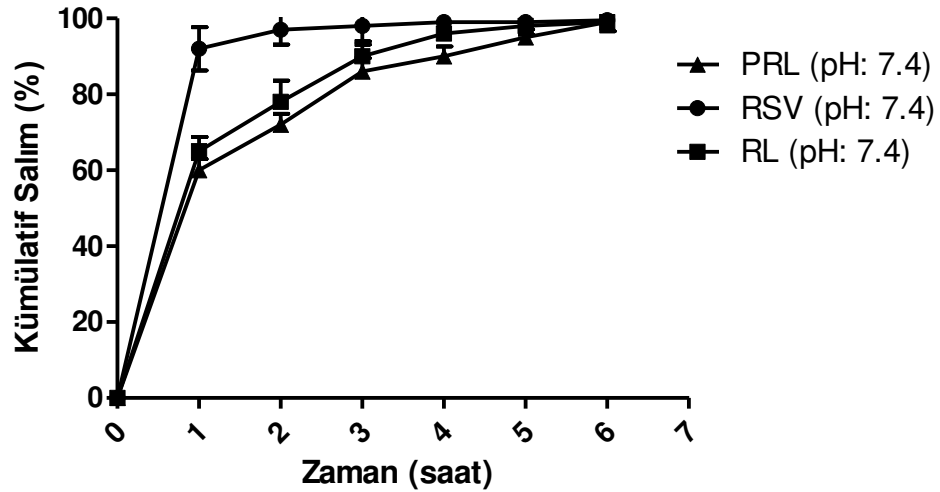
MTT çalışması, *in vivo* deneylerde etkin madde olarak kullanılan RSV'nın ve lipozom taşıyıcı sistemi içeriklerinin hücresel düzeydeki toksisitelerini belirlemek için ayrıca gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki (20, 50 ve 100mM) RSV yüklenmemiş peptid bağlı olan ve peptid olmayan (PL ve L); RSV yüklenmiş peptid bağlı olan ve peptid bağlı olmayan (PRL ve RL) lipozomal dispersiyonların A172 insan glioblastoma hatlarına toksisitesi incelenmiştir. Yapılan MTT deneyinde elde edilen sonuçlar incelendiğinde, toksisitesinin çok düşük olmasıyla birlikte lipozomal dispersiyonların konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olduğu gözlemlenmektedir. PL'ye ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantrasyonları için sırasıyla 95,22, 88,60 ve 86,49; L'ye ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantrasyonları için sırasıyla 87,65, 85,56 ve 84,81 olarak bulunmuştur. PRL'ye ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantrasyonları için sırasıyla 90,69, 85,63 ve 83,77 bulunmuşken, PRL'e ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantrasyonları için sırasıyla 88,42, 84,62 ve 82,31 olarak

bulunmuştur. Bütün sonuçlar incelendiğinde, sitotoksitenin sınırlı olduğu ve lipozomal formülasyonların güvenli olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4.8. *In vitro* Salım Çalışmaları



Şekil 4.30. CAL-Kontrol, CAL-L2 ve P-CAL-L2'ye ait *in vitro* salım sonuçları (pH:7.4)



Şekil 4.31. RSV, RL, PRL'ye ait *in vitro* salım sonuçları (pH:7.4)

Her iki *in vitro* salım çalışmaları incelendiğinde 1. saatten itibaren etken madde salımının çoğu gerçekleşmiş ve 6. saatin sonunda formülasyonlardaki etken maddelerin tamamı salınmıştır.

4.4.9. Kinetik Model Çalışmaları

Tablo 4.25. 3 gruba ait 4 farklı kinetik model sonuç tablosu

Kinetik Model		RSV*	RL**	PRL***
(Sıfırıncı) Zero Order	Slope	0.565	0.327	0.178
	Intercept	7.895	16.785	21.890
	R	0.956	0.973	0.991
	r ²	0.914	0.947	0.982
(Birinci) First Order	Slope	0.120	0.089	0.046
	Intercept	0.30	0.290	1.410
	R	0.859	0.767	0.819
	r ²	0.738	0.588	0.670
Higuchi	Slope	0.050	0.040	0.070
	Intercept	3.142	2.984	4.765
	R	0.968	0.923	0.979
	r ²	0.937	0.852	0.958
Hixson-Crowell	Slope	0.010	0.010	0.010
	Intercept	7.987	8.851	9.311
	R	0.938	0.839	0.948
	r ²	0.880	0.788	0.898

*RSV: Rosuvastatinin izotonik fosfat tamponu içerisindeki % 2 lik çözeltisi

**RL: Rosuvastatin yüklü lipozom formülasyonu

***PRL: Rosuvastatin yüklü hedeflendirilmiş lipozom formülasyonu

4.4.10. In vivo Çalışmalar

4.4.10.1. Beyin Floresan Yoğunluğu

Sakrifikasyon sonrası 4 farklı gruptaki (Kontrol, CAL Kontrol, CAL-L2, P-CAL-L2) fare beyinleri -20 °C’de dondurulmuş, kriyostat cihazı ile 18 mm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler floresans mikroskopunda incelenmiş ve floresans ışıma yoğunlukları Tablo 4.26 ve 4.27’de verilmiştir.

Tablo 4.26. Kalsein içeren formülasyonların beyin hasarlı bölgede oluşturduğu ışıma yoğunlukları ile tüm gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Formülasyon	Medyan	Min.	Maks.	Ki-Kare	p
Kontrol	8,01	1,93	14,98	29,091	<0,001*
CAL-Kontrol	544,97	485,34	609,10		
CAL-L2	3051,69	3001,90	3234,70		
P-CAL-L2	4564,80	4421,50	4698,52		
Toplam	1805,50	1,93	4698,52		

*p<0,05

CAL içeren formülasyonların in vivo uygulanmasından sonra fare beyinlerinde oluşan ışıma değerleri Kruskal-Wallis H testi ile karşılaştırılmış ve %95 güven aralığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu (p<0,001) tespit edilmiştir (Tablo 4.26). Farklılığın hangi formülasyonlardan kaynaklandığını tespit etmek için, formülasyonlar Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış ve sonuçları Tablo 4.27’de verilmiştir.

Tablo 4.27. Kalsein içeren formülasyonların ışıma yoğunluklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

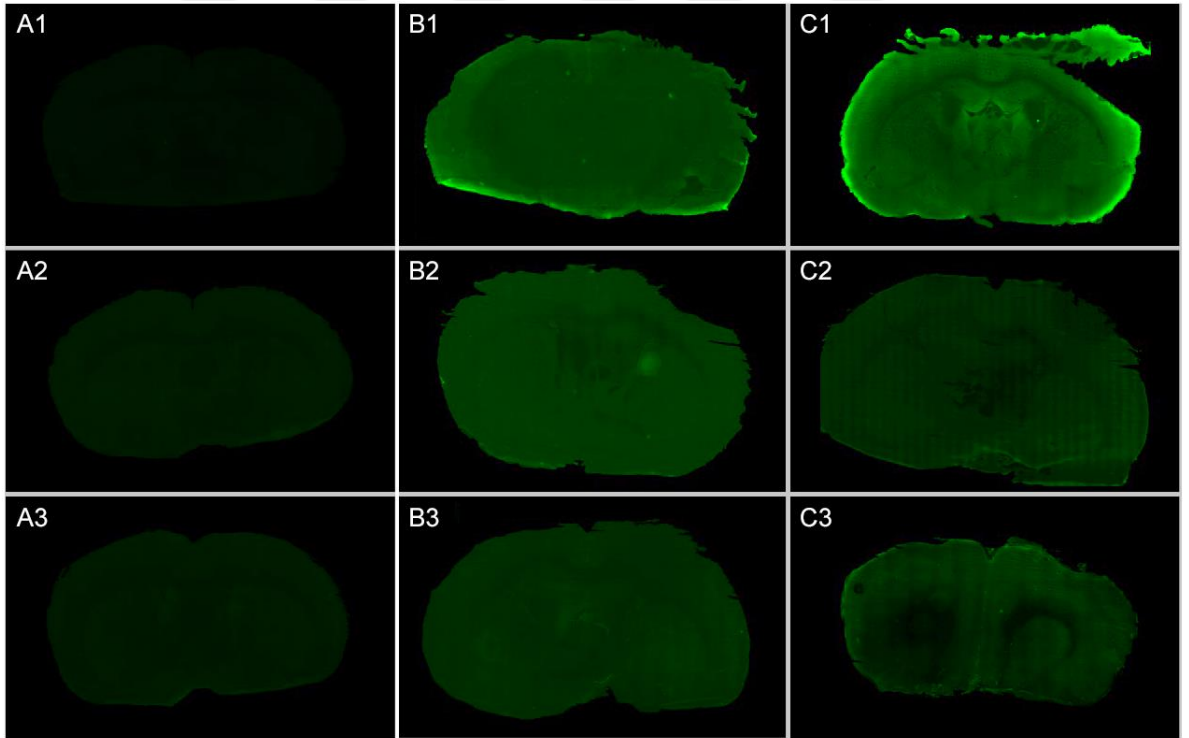
Formülasyon	Kontrol	Calcein	Calcein+L2	Calcein+PL2
Kontrol	-	0,001*	<0,001*	0,001*
CAL-Kontrol	0,001*	-	0,001*	0,001*
CAL-L2	<0,001*	0,001*	-	<0,001*
P-CAL-L2	0,001*	0,001*	<0,001*	-

*p<0,05

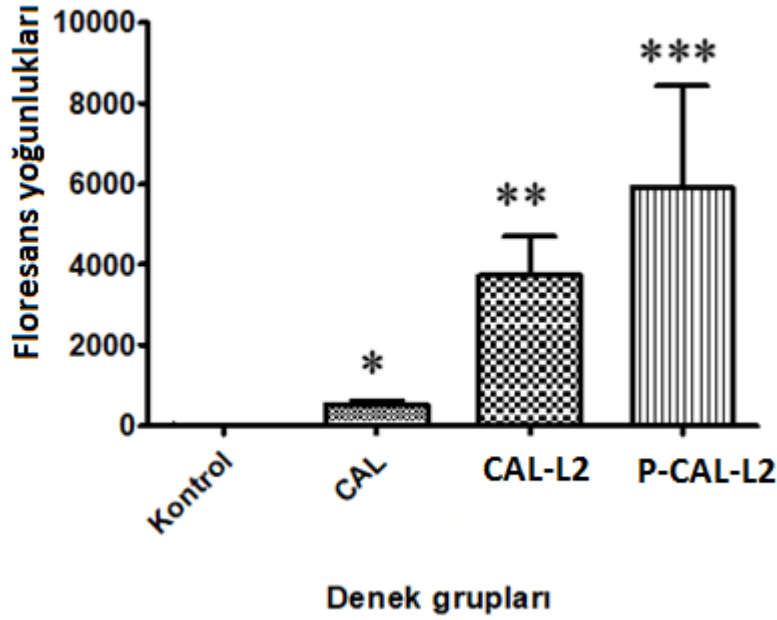
Formülasyonların ışıma yoğunlukları Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış;

- Kontrol grubu ile CAL-Kontrol grubu arasında ($p=0,001$), CAL-L2 grubu arasında ($p<0,001$) ve P-CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu,
- CAL-Kontrol grubu ile CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) ve P-CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu,
- CAL-L2 grubu ile P-CAL-L2 grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir.

CAL Formülasyonlarında ışıma yoğunluğu bakımından en düşük grubun kontrol grubu olduğu, CAL-Kontrol kontrol grubundan daha yüksek olduğu, CAL-L2 grubunun calcein grubundan yüksek olduğu ve P-CAL-L2 grubunun en yüksek ışıma yoğunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.27).



Şekil 4.32. CAL-Kontrol (A1,A2,A3), CAL-L2 (B1,B2,B3), P-CAL-L2 (C1,C2,C3) gruplarına ait floresans yoğunluk görüntüleri



* Kontrol grubu ile CAL grubu arasında ($p=0,001$), CAL-L2 grubu arasında ($p<0,001$) ve P-CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık vardır.

** CAL grubu ile CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) ve P-CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık vardır.

*** CAL-L2 grubu ile P-CAL-L2 grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık vardır.

Şekil 4.33. CAL içeren formülasyonların uygulandığı grupların floresans yoğunlukları

4.4.10.2.Beyin Hasar Alanları

Tablo 4.28. RSV içeren formülasyonların uygulandığı hayvanlarda beyin hasar alanlarının ve tüm gruplar arasındaki 24 saat sonundaki farklılıkların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Formülasyon	Medyan	Min.	Maks.	Ki-Kare	p
Kontrol	2,1145	1,96	2,22	27,323	<0,001*
RSV	1,7585	1,50	1,92		
RL	1,4330	1,21	1,85		
PRL	0,7245	0,64	0,91		
Toplam	1,5535	0,64	2,22		

* $p<0,05$

RSV içeren formülasyonların in vivo uygulanmasından sonra fare beyinlerinde oluşan hasar alanları Kruskal-Wallis H testi ile karşılaştırılmış ve %95 güven aralığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($p<0,001$) tespit edilmiştir (Tablo 4.28). Farklılığın hangi formülasyonlardan kaynaklandığını tespit etmek için, formülasyonlar Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış ve sonuçları Tablo 4.29’de verilmiştir.

Tablo 4.29. RSV içeren formülasyonların hasar alanlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

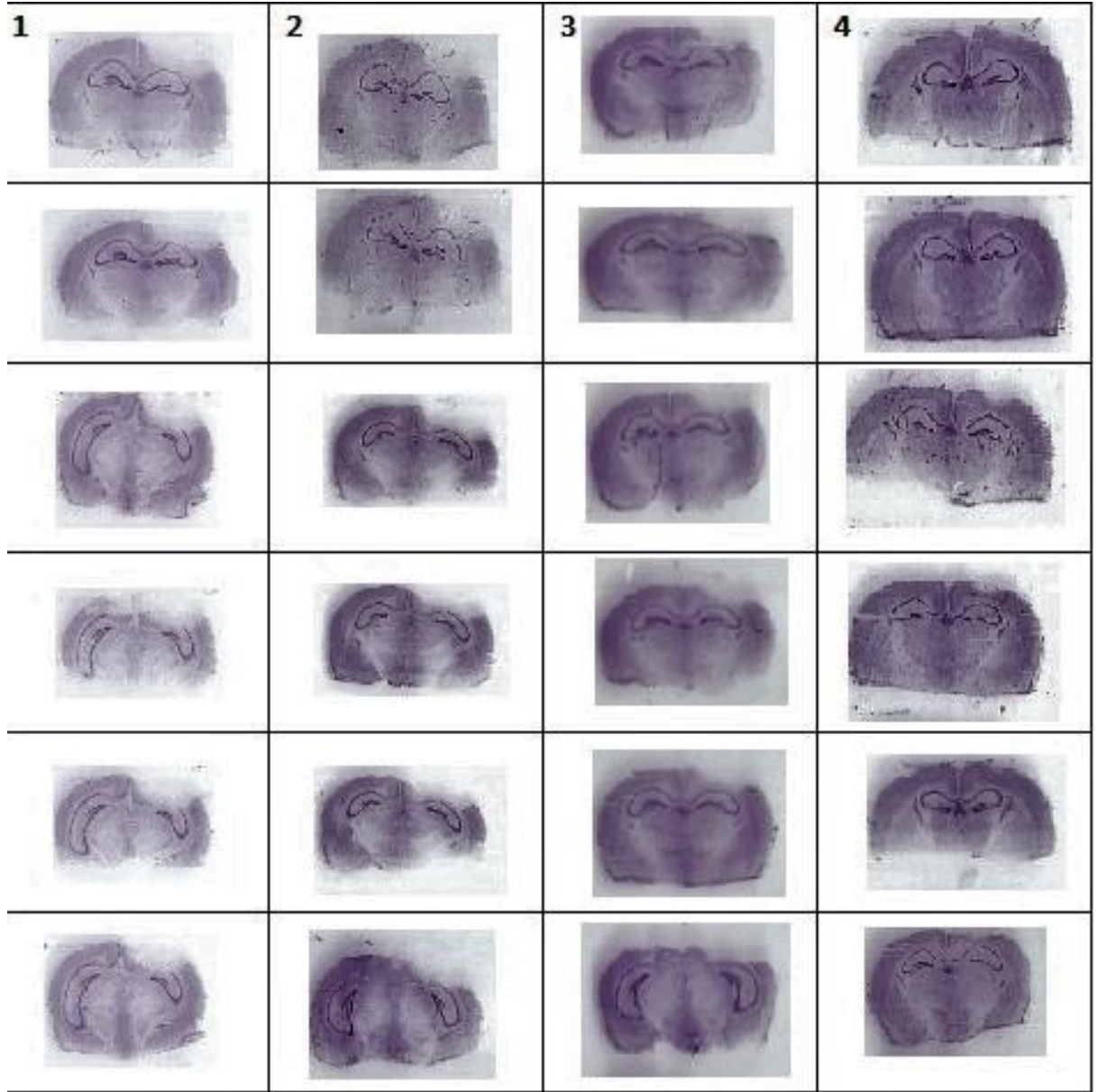
Formülasyon	Kontrol	RSV	RL	PRL
Kontrol	-	<0,001*	0,001*	<0,001*
RSV	<0,001*	-	0,001*	0,001*
RL	0,001*	0,001*	-	0,001*
PRL	<0,001*	0,001*	0,001*	-

* $p<0,05$

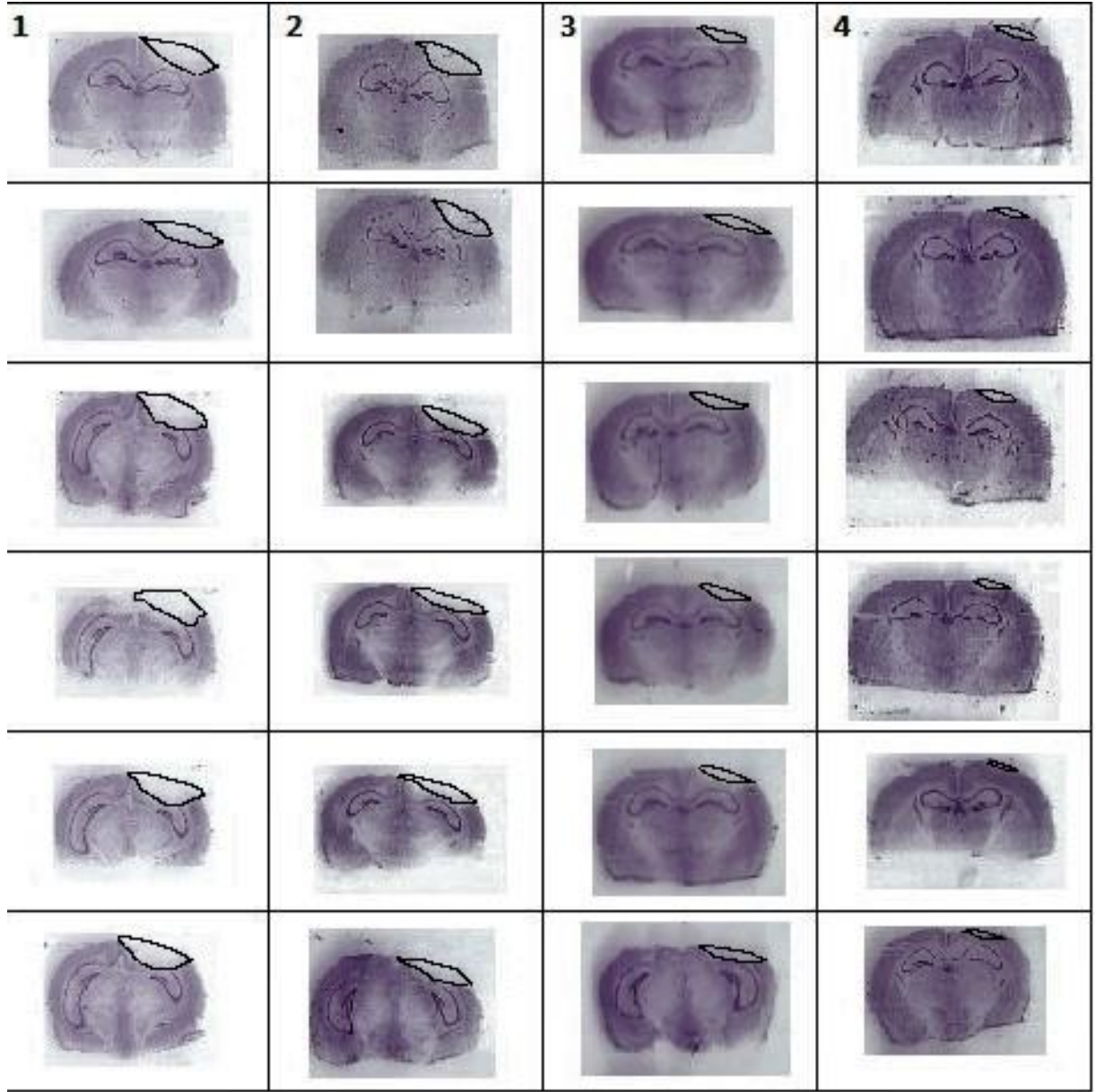
RSV Formülasyonları hasar alanları bakımından Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış ve formülasyonlarda:

- Kontrol grubu ile RSV grubu arasında ($p<0,001$), RL grubu arasında ($p=0,001$) ve PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu,
- RSV grubu ile RL grubu arasında ($p=0,001$) ve PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu,
- RL grubu ile PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir.

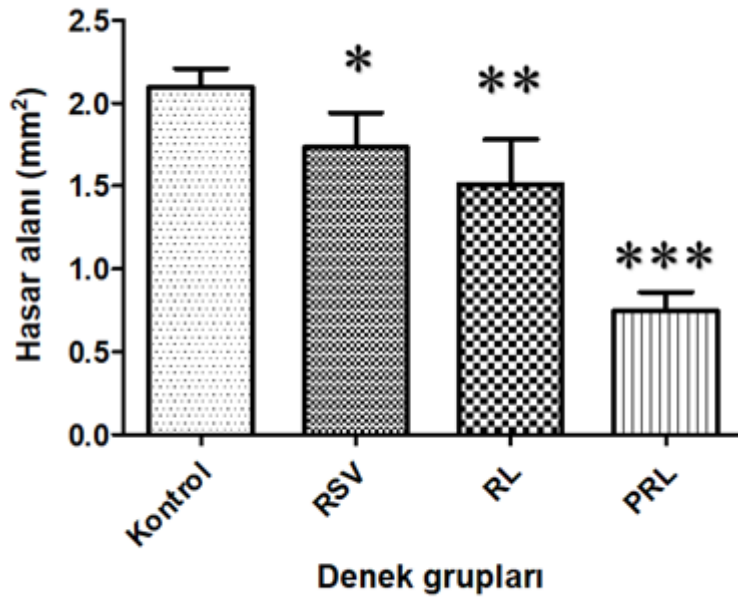
RSV Formülasyonlarında hasar alanları bakımından en yüksek grubun kontrol grubu olduğu, RSV grubunun kontrol grubundan daha düşük olduğu, RL grubunun RSV grubundan düşük olduğu ve PRL grubunun en düşük hasar alanlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.29).



Şekil 4.34. 1)Kontrol 2) RSV 3) RL 4)PRL gruplarına ait beyin kesitleri



Şekil 4.35. 1)Kontrol 2) RSV 3) RL 4)PRL gruplarına ait beyin kesitleri hasar alanları



* Kontrol grubu ile RSV grubu arasında ($p<0,001$), RL grubu arasında ($p=0,001$) ve PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık vardır.

**RSV grubu ile RL grubu arasında ($p=0,001$) ve PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık vardır.

**RL grubu ile PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık vardır.

Şekil 4.36. RSV içeren formülasyonların uygulandığı grupların uygulamadan 24 saat sonra oluşan hasar alanları

4.4.10.3.Beyin Ödem Skorları

Tablo 4.30. RSV içeren formülasyonların uygulandığı hayvanlarda beyin ödem skorlarının ve tüm gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak karşılaştırılması

Formülasyon	Medyan	Min.	Maks.	Ki-Kare	p
Kontrol	2,077	1,96	2,29	28,102	<0,001*
RSV	1,815	1,6	1,93		
RL	1,1605	0,72	1,77		
PRL	0,2285	0,1	0,64		
Toplam	1,6895	0,1	2,29		

* $p<0,05$

RSV içeren formülasyonların *in vivo* uygulanmasından sonra fare beyinlerinde oluşan ödem skorları Kruskal-Wallis H testi ile karşılaştırılmış ve %95 güven aralığında gruplar

arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu ($p<0,001$) tespit edilmiştir (Tablo 4.30). Farklılığın hangi formülasyonlardan kaynaklandığını tespit etmek için, formülasyonlar Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış ve sonuçları Tablo 4.31’de verilmiştir.

Tablo 4.31. RSV içeren formülasyonlarına ait ödem skorlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması

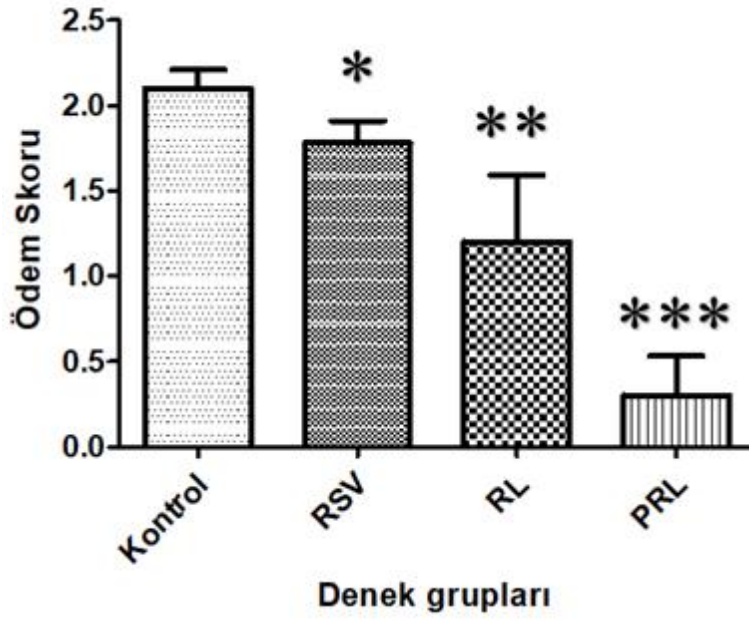
Formülasyon	Kontrol	RSV	RL	PRL
Kontrol	-	<0,001*	<0,001*	<0,001*
RSV	<0,001*	-	0,005*	0,001*
RL	<0,001*	0,005*	-	<0,001*
PRL	<0,001*	<0,001*	0,001*	-

* $p<0,05$

RSV Formülasyonları ödem skorları bakımından Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış ve formülasyonlarda:

- Kontrol grubu ile RSV grubu arasında ($p<0,001$), RL grubu arasında ($p<0,001$) ve PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu,
- RSV grubu ile RL grubu arasında ($p=0,005$) ve PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu,
- RL grubu ile PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir.

RSV Formülasyonlarında ödem skorları bakımından en yüksek grubun kontrol grubu olduğu, RSV grubunun kontrol grubundan daha düşük olduğu, RL grubunun RSV grubundan düşük olduğu ve PRL grubunun en düşük hasar alanlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 31).



* Kontrol grubu ile RSV grubu arasında ($p<0,001$), RL grubu arasında ($p<0,001$) ve PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık vardır.

** RSV grubu ile RL grubu arasında ($p=0,005$) ve PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık vardır.

*** RL grubu ile PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık vardır.

Şekil 4.37. RSV içeren formülasyonların uygulandığı grupların uygulamadan 24 saat sonraki ödem skorları

Yukarıda Tablo ve Şekillerde belirlenen ve gözlemlenen sonuçlara PRL (peptid içeren RSV lipozomların), RL (peptid içermeyen RSV lipozomlara) ve kontrol RSV gruplarına kıyaslandığında ödem skorlarını ve hasar alanlarını belirgin şekilde azalttığı ve bu sayede daha başarılı olduğu ve akümüasyonların daha fazla olduğu belirlenmiştir.

5.TARTIŞMA

RSV, kolesterol yüksekliği, lipidemik bozukluklar dâhil değişik lipit rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmak üzere 2003 tarihinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış statin grubu bir ilaçtır. Oral yoldan 5-40 mg/gün dozlarda kullanılır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, kolesterol düşürücü etkisinin yanısıra beyin felci sonrası nöroprotektif etkiye sahip olduğu da bildirilmiştir. Ancak konvansiyonel yolla kullanılan RSV'nin ödem veya serebral kan akışı üzerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (164). Beyin elektrik aktiviteleri ile ilgili yapılan çalışmalarda HMG-CoA redüktazı olan RSV epileptik semptomları düzenlediği ve antiepileptik ilaçlara alternatif olabileceği rapor edilmiştir (165). Parkinson tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalarda SH-SY5Y hücrelerinde, rotenonun indüklediği nörotoksisiteye karşı, aynı zamanda α -sinüklein ekspresyonunun modülasyonuna karşı RSV'nin nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Statinlerin rotenonun indüklediği dopaminerjik nörotoksisite üzerindeki nöro-koruyucu etkisi, otofajinin modülasyonu yoluyla parkinson tedavisine yönelik yeni bir tedavi stratejisi olarak düşünülmüştür (166).

İnme veya geçici iskemik atak hastalarında intrakranial arteriyel aterosklerotik stenoz çalışması ile tedavide RSV'nin serebral kan akımı üzerine etkilerinin değerlendirmesi çalışmasında, intrakranial arteriyel aterosklerotik stenozlu hastalarda perfüzyon durumunda RSV tedavisi ile yapılan denemelerde RSV'nin güvenli ve etkili olup olmadığını değerlendirmiştir. İntrakranial arteriyel aterosklerotik stenozlu serebral hemodinamik durumu iyileştirmede güvenilir verilere ulaşılmış ve hastalarda RSV tedavisi ile perfüzyon artışı arasında ilişkili olduğu tespit edilmiştir (167).

Serebral iskemi reperfüzyon hasarının iyileşmesi ile ilgili çalışmasında RSV'nin inflamatuvar yanıt ile apoptoza etkileri araştırılmıştır. Çalışma, inflamatuvar sitokinlerin, apoptoz yollarını ortaya çıktığını ortaya koydu ve oksidatif stres aracılı, bilateral tarafından indüklenen global serebral iskemide yer aldığı görülmüştür. RSV'nin anti-inflamatuvar, anti-apoptoz ve anti-oksidan etkileri ile serebral iskemi reperfüzyon yarananmasında olumlu etkileri değerlendirilmiştir (168).

Deneysel beyin travması RSV ile kortikal kılcal dolaşımın artışı nitrik oksit üretimi ile ilişkilendiği çalışmada travmatik beyin hasarında RSV tedavisi sonra mikrodolaşımının perfüze kapillerlerin sayısının arttığı ve bu etkinin artmış nitrik oksit ve azalmış prostasiklin ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (169).

RSV'nin, sıçanlarda nükleer faktör-Kappa B aktivasyonu ve süperoksit oluşumunu baskılama yoluyla anevrizmal subaraknoid hemoraj sonrası erken beyin hasarını iyileştirmesi üzerine yapılan çalışmalarda antioksidan, antienflamatuar özelliklerinden ve sonuçlardan dolayı umut vadeci olmuştur (170).

RSV'nin iskemik beyin hasarı ve mekanizması üzerindeki koruyucu etkisi üzerine yapılan çalışmada RSV'nin iskemik beyin hasarı üzerindeki nöral korumasının mekanizmaları, endotelyal nitrik oksit sentezi ekspresyonunu arttırmak, indüklenebilir nitrik oksit sentezi ve aktive edilmiş kaspaz-3'ün ekspresyonunu inhibe etmesi olarak değerlendirilmiştir (171).

RSV'nin zayıf çözünürlüğü ve geçirgenliği, düşük mutlak biyoyararlanım problemiyle karşı karşıya kalma ve emilimi oranı sınırlayıcı faktörlerdir. RSV'nin kan beyin bariyeri geçirgenliğinin az olduğu düşünüldüğünde, uygun partikül boyutuna getirilmiş ve yüzeyi modifiye edilmiş liposomal taşıyıcı sistemlerin, RSV'nin etkinliğini ve hedef dokuya ulaşımını arttıracakları öngörülerek çalışmalar planlanmıştır.

Tüm bu sınırlamalardan dolayı RSV içeren lipozomların yüzeyi hidrofilik PEG ve VCAM-1 spesifik ligand ile modifiye edilerek beyine hedeflendirilmeye uygun hale getirilmiş ve damariçi yolla uygulandıktan sonra lipozomların etkinliği, beyin travması oluşturulmuş farelerde klasik tedavi uygulamaları ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Çalışmalar sonucunda Şekil 4.36 ve Şekil 4.37'de açıkça görüldüğü üzere RSV içeren lipozomlardaki beyin hasarı üzerindeki ödem skorundaki ve hasar alanlarındaki azalma, beyine ilaç hedeflendirme mekanizmasının çalıştığını desteklemektedir.

Yüzeyi hidrofilik hale getirilerek retiküloendotelyal sistem tarafından eliminasyonu azaltılan ve kan dolaşımında uzun süre kalabilen uygun partikül boyutu ve dağılımına sahip lipozomlar, pasif yolla kan beyin bariyerini geçebilmektedir. Ayrıca beyindeki hasarlı bölgede yüksek miktarda eksprese edilen VCAM-1 gibi yüzey adezyon bileşiklerine bağlanma özelliğine sahip liganların lipozom yüzeyine bağlanması ile, formülasyonun beyin hasarlı bölgeye hedeflendirilmesi yapılabilmekte ve ilacın sadece etki bölgesinde

salımı sağlanarak etkililiği arttırılmakta ve yan etki profili azaltılmaktadır. Kan dolaşımında uzun süre kalabilen lipozom formülasyonları, mPEG₂₀₀₀DSPE-DOPE-DOPA kombinasyonu ile hazırlanmıştır.

Lipozomal RSV formülasyonunun optimizasyonu için, bazı ilgili faktörlerin incelenmesi gerekmektedir. Tez kapsamında öncelikle RSV içeren lipozomal formülasyonları geliştirme çalışmaları yürütülmüş, lipozomların RSV yükleme kapasiteleri, partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları, zeta potansiyelleri, stabiliteleri incelenerek mPEG₂₀₀₀DSPE:DOPE:DOPA (5:60:35 mol/mol) içeren L2 ve mPEG₂₀₀₀DSPE:DOPE:DOPA (5:45:50 mol/mol) içeren L4 formülasyonları ile çalışmalara devam etme kararı alınmıştır.

Optimizasyon çalışmaları, 4 farklı içerik kombinasyonu ve bunların 2 farklı içerik oranları olmak üzere toplam 2 lipozom formülasyonu ile yürütülmüştür. Hidrofilik bir ilaç olan RSV, en fazla mPEG₂₀₀₀DSPE:DOPE:DOPA (5:60:35 mol/mol) kombinasyonundan oluşan L2 formülasyonuna yüklenebilmiştir (% 23,2±0,1 a/a). Etken madde enkapsülasyon etkinliği açısından L2 formülasyonu ile diğer formülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p> 0.05). Lipozomların yüzeyine hedeflendirme peptidi bağlamak için, 10:1 fosfolipid karışımına karşılık gelecek şekilde peptit içeren dispersiyona 150 mg EDC ilave edildi ve 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırılıp bağlanmaya hazır hale getirilmiştir. Daha sonra peptit çözeltisine, lipozom:VCAM-1 spesifik peptit mol oranı 10:1 olacak şekilde, lipozom formülasyonları ilave edildi ve ışıktan uzakta oda sıcaklığında 2 saat boyunca 100 rpm'e ayarlanmış manyetik karıştırıcıda peptit bağlama işlemi yapılmıştır. Serbest peptitleri ve EDC'i uzaklaştırmak için 12 saat boyunca fosfat tamponu içerisinde karşı diyaliz işlemi uygulanmıştır. EDC ve serbest peptidleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla, peptit bağlanmış lipozom dispersiyonları 15000 rpm'de santrifüjlenerek 2 kez fosfat tamponu içinde tekrar dağıtılarak santrifüj işlemi tekrarlanmış ve bağlama işlemi tamamlanmıştır.

Lipozomlar ve yüksek lipid içeriğine bağlı olarak veziküller olarak, etrafındaki sulu polar baş kısımlar ile suda çözünür molekülleri hapsedmede verimlilik için uygun taşıyıcılardır. Ayrıca, hidrofilik ilaçların kan beyin bariyerini geçişi ve beyne ilaçların ulaştırılabilmesi çok güç olduğu düşünüldüğünde lipozom enkapsülasyonu, hidrofilik ilaçlar için beyne hedeflendirmede çok anlamlı olduğu gerçeğini ortaya çıkarmaktadır.

Ön formülasyon çalışmalarında, farklı oranlarda fosfolipid, stabilite ajanları yardımcı bileşenler farklı molar oranlarında kullanılmıştır. Bu molar kompozisyonlar, literatür çalışmaları ve öncül formülasyonlardaki fiziksel görünümlere bağlı olarak deneylerde dikkate alınmış ve formülasyonların optimizasyonları sağlanmıştır. Bunlar arasında (5:60:35) oran, literatüre eş yönlü olarak RSV'nin (hidrofilik ilaç) tutulması için en iyi kompozisyon olarak seçilmiştir. Optimum lipozom formülasyonu (5:60:35) molar oranında (L2) (mPEG2000DSPE:DOPE:DOPA) kullanılarak hazırlanmıştır. 20 ön formülasyon arasında seçilen 4 lipozom formülasyonlarında tutulan RSV'nin yüzdesi, % 13-23 arasında olmuştur ve diğer elimine edilmiş formülasyonlara göre 4 tanesi değerlendirilmiştir.

Etkili bir lipozomal taşıyıcı sistem, yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve düşük ilaç sızıntısı gerektirmektedir. RSV hidrofilik bir ilaç olduğundan dolayı, tutulan RSV miktarının yüzdesi, L 2 için yaklaşık % 23.20 olarak tayin edilmiştir. Lipozomların mikroskopik gözlemleri farklı görüntüleme teknikleriyle görüntülenmiştir. SEM görüntülerine göre, L2 formülasyonunda ait iki boyutlu görüntüsünde küresel ve düzgün yüzeyli lipozomlar açıkça görülmüştür. Ayrıca, SEM görüntüleri ortalama partikül boyutu dağılımı sonuçlarıyla iyi bir uyum içindedir.

Lipozomların tipi PLM ile belirlenmiştir. PLM sonuçlarına göre SUV küçük unilamalar veziküller esas olarak optimum formülasyon olan L2'de gözlenmiştir. Optimum formülasyon (L 2) ayrıca AFM tarafından da görüntülenmiştir. Son olarak, görüntülerde homojen ve sağlam küresel yapı göstermiştir ve bu da AFM tarafından doğrulanmıştır. Görüntüler arasında önemli bir fark yoktur. En iyi formülasyon seçiminde birkaç önemli karakterizasyon parametresine (ortalama parçacık büyüklüğü, hapsedme yüzdesi ve stabilite gibi) göre kararlaştırılmıştır. Bu nedenle, (5:60:35) molar oranı, yüksek stabilitesi nedeniyle en iyi lipozom formülasyon olarak L2 belirlenmiştir.

RSV içeren ve içermeyen tüm lipozom formülasyonlarının ortalama parçacık büyüklüğü, 95-155 nm aralığında olmuştur (Tablo 4.12). En iyi formülasyonun (L 2), yüksek fiziksel stabilite sergileyen lipozomlar ve nispeten yüksek ilaç hapsedme yüzdesi olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, boş lipozomların ortalama partikül büyüklüğü dağılımı, bunların hapsedme kapasitesi nedeniyle RSV lipozomlarından daha küçüktü. Bu nedenle, en iyi formülasyon (L 2) ortalama partikül büyüklüğü dağılımı

analizine, kapsülleme yüzdesine, PDI değerlerine ve zeta potansiyel parametrelerine göre seçilmiştir.

Lipozomların tipi; hazırlama yöntemi, ortalama partikül boyutu ve polarize mikroskop tekniği ile belirlenmiş ve SUV olarak belirlenmiştir. Şekil 4.13'te gösterilen sarı ve mavi sıvı kristaller ve halkalar için tipik özelliklerdir ve PLM ile görülebilir. Ayrıca görülen çift katman sayısı veziküllerin SUV tipinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca lipozomların zeta potansiyel değerleri değerlendirildi. Zeta potansiyeli, bir partikülün yüzey yükünü gösteren ikincil parametre fonksiyonudur ve boyuttaki değişiklikler, agregasyonu veya füzyonu yansıtarak zeta potansiyelin 0'a yaklaşmasına sebep olurlar (210). En stabil lipozomlar yaklaşık ± 25 mV ve bu değerin dışında kalan zeta potansiyel değerleridir (211). Bu çalışmada optimum lipozom formülasyonu (L2) için zeta potansiyeli $-33.2 \text{ mV} \pm 0.12$ olarak bulunmuştur (Tablo 4.12). Maksimum stabilite ve minimum agregasyon, bu zeta potansiyel değerinde (± 25 mV) meydana gelir, böylece DLVO teorisinden beklenir. Zeta potansiyeli kritik değerin (± 25 mV) altına düştüğünde ve sıfıra yaklaştığında, çekici kuvvetler itici güçlerin yerini alır ve kümelenme gerçekleşir. Bu gevşek şekilde paketlenmiş parçacıklar veya oluşumlar, büyük boyutlarından dolayı çözünmemiş parçacıklardan daha hızlı yerleşirler (210,211).

Sonuçlar PDI açısından değerlendirildiğinde, RSV yüklü L2 lipozomlar diğer lipozomlardan daha küçük partikül boyutuna sahiptir (Tablo 4.12). L 2 için $95,5 \text{ nm} \pm 0.44$ olarak belirlendi. Ayrıca homojen ve stabil lipozom dispersiyonlarının düşük PDI değerine sahip olduğu literatürde mevcuttur (212). Bu çalışmada optimum formülasyon olan L 2 için PDI değeri $0,160 \pm 0,001$ olarak bulunmuştur.

Lipozomların bütünlüğü için fiziksel stabilite çok önemli yer tutmaktadır. Lipozomların homojen olarak dağıldığı ve yapılarının korunduğu parenteral uygulama için stabil bir formülasyon sağlamak amacıyla, lipozomlar 40°C ve 25°C 'de 6 ay boyunca tutulmuştur (Bağıl nem % 60). Bu hızlandırılmış stabilite deneyleri sırasında, farklı parametreler (parçacık büyüklüğü, zeta potansiyeli, PDI ve yakalama kapasitesi) izlenmiş ve lipozomların bütünlüğündeki değişiklikler izlenmiştir. 6 aylık sürede lipozomların parçacık boyutunda anlamlı değişiklikler gözlenmiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4.16). Tabloya göre, buzdolabı koşulu lipozomlar için oda sıcaklığından (25°C) daha iyi olduğu görülmüştür. Bu çalışmadaki elde edilen bulgular literatürle uyumlu bulunmuştur (212). Önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında, buzdolabı koşullarında 4 haftalık bir sürede ilk

hapsetme kapasitesinin % 5'inden daha az olan ilaç sızıntısı literatüre uygun bulunmuştur (211).

Analitik yöntem validasyonunda; doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, teşhis limiti ve miktar tayini alt limiti çalışmaları yapılmıştır. Yapılan doğrusallık deneyinin sonucunda değerler grafik haline getirildikten sonra elde edilen doğruya ait r^2 değeri 1'e yakın ve standart sapma ile relatif standart sapma değerlerinin düşük oluşu elde edilen verilerin güvenilirliğine işaret etmektedir. Miktar tayininin doğruluğunu belirlemek amacıyla yapılan deney neticesinde elde edilen verilerde geri kazanımın herbir konsantrasyon için %98 üzerinde olduğu ve % relatif standart sapma değerleri %2'den küçük bulunmuştur. Bu bağlamda miktar tayini için belirlenen yöntemin doğru bulgular verdiğini göstermiştir. Kesinlik çalışması tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik olmak üzere iki şekilde yapılmıştır. Ortaya çıkan verilerin, % relatif standart sapmalarının %2'den küçük olduğu, çalışmanın tekrarlanabilirliği ve ara kesinliği ispatlamıştır.

Stabilite sonuçlarına göre, L2 formülasyonundaki RSV sızıntısı, buzdolabı koşullarında ve 25 °C'lik oda sıcaklığında 4 haftalık bir sürede ilk hapsetme kapasitesinin % 5'inden daha az olarak tespit edilmiştir. Böylece, veziküller enjeksiyonluk uygulamalar için yeterince kararlı bulunmuştur. Sonuçlarda görüldüğü gibi, 180 günlük stabilite sırasında lipozomların partikül büyüklüğündeki değişimler gözlenmiştir. Lipozom, yerçekimine bağlı olarak veziküllerin sedimantasyonu sırasında oluşan agregasyon nedeniyle başlangıç boyutlarından daha büyük hale gelmiştir (12). Ancak L2 ve L4 formülasyonları arasındaki stabilite çalışmalarında L 2 formülasyonunun daha kararlı olduğu tespit edilmiştir.

Sitotoksosite amaçlı yapılan MTT çalışması, *in vivo* deneylerde etken madde olarak kullanılan RSV'nin ve lipozomal taşıyıcı bileşenlerinin toksikolojik profillerini belirlemek için gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki (20, 50 ve 100mM) ilaç yüklenmemiş peptid bağlı olan ve olmayan (PL ve L); RSV yüklenmiş peptid bağlı olan ve olmayan (PRL ve RL) lipozomal dispersiyonların A172 insan glioblastoma hatlarına toksisitesi incelenmiştir. Yapılan MTT deneyinde elde edilen sonuçlar incelendiğinde, toksisitesinin çok düşük olmasıyla birlikte lipozomal dispersiyonların konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olduğu gözlemlenmektedir. PL'ye ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantrasyonları için sırasıyla 95,22, 88,60 ve 86,49; L'ye ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantrasyonları için sırasıyla 87,65, 85,56 ve 84,81 olarak bulunmuştur.

PRL'ye ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantasyonları için sırasıyla 90,69, 85,63 ve 83,77 bulunmuşken, PRL'e ait % canlı hücre oranı 20, 50 ve 100mM konsantasyonları için sırasıyla 88,42, 84,62 ve 82,31 olarak bulunmuştur. Bütün sonuçlar incelendiğinde, sitotoksitenin sınırlı olduğu ve lipozomal formülasyonların güvenli olduğu sonucuna varılmıştır.

Sitotoksiste çalışmalarında optimum formül olarak seçilen L2 formülasyonunun ve bileşenlerinin uygulama dozlarında ve üzerinde ayrıca yapılan çalışmada, glioblastoma hücrelerine herhangi bir toksik zararının olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla beyine hedeflendirilecek bu ilaç kombinasyonlarının beyin hücrelerine sitotoksik bir etkisinin olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

Miktar tayini için seçilen spektrofotometrik yönteminin CAL molekülüne spesifik olup olmadığının belirlenmesi için, formülasyonun içinde bulunan her bir bileşenin formülasyondaki konsantrasyonlarında ve CAL molekülü içermeyecek şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti ve boş lipozomal formülasyonlarının spektrofotometrik yöntem kullanılarak 200-1000 nm dalga boyu aralığında absorbans değerleri incelenmiştir. Fosfolipid çözelti ve boş lipozom formülasyonlarının hiçbirisi kalsein molekülünün maksimum absorbans gösterdiği 493 nm dalga boyunda pik vermemiştir. Bu sonuç, yapılan miktar tayini yönteminin CAL molekülüne spesifik olduğunu göstermektedir.

CAL içeren CAL-L2 ve P-CL-LC formülasyonlarının in vitro salım çalışmaları pH 7.4 PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. pH 7.4 ortamının tercih edilme nedeni formülasyonlarımızdaki fosfolipid içeriklerinin pH 7.4'de stabil olması ve lipozomları hazırlama ortamımızın pH 7.4 olmasıdır.

RSV, peptidsiz L2 formülasyonu (RL) ve peptidli L2 formülasyonun (PRL) ait *in vitro* salım bulgularına göre etken madde salımları incelendiğinde 6 saati sonunda tamamen salımın gerçekleştiği görülmüştür. PRL formülünün RL'ye RSV'ye göre daha yavaş salım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.30.).

In vitro salım bulguları 4 farklı kinetik modelleri ile kıyaslandığında sıfırıncı derece salım kinetiği ile en uyumlu olarak belirlenmiştir (Tablo 4.25). Bulgular, formülasyonların kontrollü salım yaptığı konusunda sıfırıncı dereceden salım kinetiğini desteklemiştir. Dolayısıyla etken maddenin ideal ve uygun salımı sıfırıncı derece kinetiğe uymaktadır.

In vivo çalışmalarda CAL Formülasyonları kruskall-wallis h testi ile karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak %95 güven düzeyinde anlamlı farklılık olduğu ($p<0,001$) tespit edilmiştir (Tablo 4.26). Ayrıca CAL Formülasyonları ışıma yoğunlukları bakımından Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış ve formülasyonlarda kontrol grubu ile CAL grubu arasında ($p=0,001$), CAL-L2 grubu arasında ($p<0,001$) ve P-CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu, CAL grubu ile CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) ve P-CAL-L2 grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu, CAL-L2 grubu ile P-CAL-L2 grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir.

CAL Formülasyonlarında ışıma yoğunluğu bakımından en düşük grubun kontrol grubu olduğu, CAL grubunun kontrol grubundan daha yüksek olduğu, CAL-L2 grubunun calcein grubundan yüksek olduğu ve P-CAL-L2 grubunun en yüksek ışıma yoğunluğuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.27).

RSV Formülasyonları hasar alanları bakımından kruskall-wallis h testi ile karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak %95 güven düzeyinde anlamlı farklılık olduğu ($p<0,001$) tespit edilmiştir (Tablo 4.28). Farklılığın hangi RSV formülasyonundan ya da RSV formülasyonlarından kaynaklandığını tespit edebilmek için RSV formülasyonları ikişerli olarak karşılaştırılmış ve sonuçları Tablo 4.29’da sunulmuştur.

Ayrıca RSV Formülasyonları hasar alanları bakımından Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırılmış ve formülasyonlarda kontrol grubu ile RSV grubu arasında ($p<0,001$), RL grubu arasında ($p=0,001$) ve PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu, RSV grubu ile RL grubu arasında ($p=0,001$) ve PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu, RL grubu ile PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir.

RSV Formülasyonlarında hasar alanları bakımından en yüksek grubun kontrol grubu olduğu, RSV grubunun kontrol grubundan daha düşük olduğu, RL grubunun RSV grubundan düşük olduğu ve PRL grubunun en düşük hasar alanlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.29).

RSV formülasyonları ödem skorları bakımından kruskall-wallis h testi ile karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak %95 güven düzeyinde anlamlı farklılık olduğu ($p<0,001$) tespit edilmiştir (Tablo 4.30). Farklılığın hangi RSV

formülasyonundan ya da RSV formülasyonlarından kaynaklandığını tespit edebilmek için RSV formülasyonları ikiyeşerli olarak karşılaştırılmış ve sonuçları Tablo 4.31’de sunulmuştur. Ayrıca RSV formülasyonları ödem skorları bakımından Mann-Whitney U testi ile ikiyeşerli olarak karşılaştırılmış ve formülasyonlarda kontrol grubu ile RSV grubu arasında ($p<0,001$), RL grubu arasında ($p<0,001$) ve PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu, RSV grubu ile RL grubu arasında ($p=0,005$) ve PRL grubu arasında ($p=0,001$) anlamlı farklılık olduğu, RL grubu ile PRL grubu arasında ($p<0,001$) anlamlı farklılık olduğu tespit edilmiştir.

RSV Formülasyonlarında ödem skorları bakımından en yüksek grubun kontrol grubu olduğu, RSV grubunun kontrol grubundan daha düşük olduğu, RL grubunun RSV grubundan düşük olduğu ve PRL grubunun en düşük hasar alanlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.31).

Tablo ve şekillerde belirlenen sonuçlara göre L2 lipozom formülasyonu ile hazırlanan PRL (peptid içeren RSV lipozomların), RL (peptid içermeyen RSV lipozomlara) ve kontrol RSV gruplarına kıyaslandığında daha başarılı olduğu ve akümüasyonların daha fazla olduğu, hasar alanlarını, ödem skorunu daha çok düşürdüğü görülmüştür. Beyine hedeflendirilmiş rosuvastatin içeren özellikle L2 formülasyonuna sahip lipozomal taşıyıcı sistemlerin, konvansiyonel formülasyonlarla kıyaslandığında, farelerde oluşturulan beyin hasarının tedavisini anlamlı şekilde desteklediği görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Gregoriadis, G. and A.T. Florence, Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs*, 1993. 45(1): p. 15-28.
2. Allen, T.M. and P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013. 65(1): p. 36-48.
3. Keller, B.C., Liposomes in nutrition. *Trends in Food Sci & Tech*, 2001. 12(1): p. 25-31.
4. Maherani, B., et al., Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanosci*, 2011. 7(3): p. 436-452.
5. Akbarzadeh, A., et al., Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*, 2013. 8(1): p. 102.
6. Jesorka, A. and O. Orwar, Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu Rev Anal Chem*, 2008. 1: p. 801-832.
7. Sharma, A. and U.S. Sharma, Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int J of Pharm*, 1997. 154(2): p. 123-140.
8. Laouini, A., et al., Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J of Coll Sci and Biotech*, 2012. 1(2): p. 147-168.
9. Petersen, A.L., et al., Liposome imaging agents in personalized medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012. 64(13): p. 1417-35.
10. Torchilin, V., Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009. 71(3): p. 431-44.
11. Huang, Z., et al., Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian J of Pharm Sci*, 2014. 9(4): p. 176-182.
12. Torchilin, V.P. and V. Weissig, Liposomes: a practical approach. Vol. Second Edition. 2003, New York, USA: Oxford University Press.
13. Jahn, A., et al., Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. *J Am Chem Soc*, 2004. 126(9): p. 2674-5.

14. Jahn, A., et al., Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. *ACS Nano*, 2010. 4(4): p. 2077-87.
15. van Swaay, D. and A. deMello, Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab Chip*, 2013. 13(5): p. 752-67.
16. Jaafar-Maalej, C., C. Charcosset, and H. Fessi, A new method for liposome preparation using a membrane contactor. *J Liposome Res*, 2011. 21(3): p. 213-20.
17. Pham, T.T., et al., Liposome and niosome preparation using a membrane contactor for scale-up. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012. 94: p. 15-21.
18. Otake, K., et al., Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide. *Langmuir*, 2001. 17(13): p. 3898-3901.
19. Santo, I.E., et al., Characteristics of lipid micro- and nanoparticles based on supercritical formation for potential pharmaceutical application. *Nanoscale Res Lett*, 2013. 8(1): p. 386.
20. Otake, K., et al., Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method. *Langmuir*, 2006. 22(6): p. 2543-2550.
21. Lesoin, L., et al., Preparation of liposomes using the supercritical anti-solvent (SAS) process and comparison with a conventional method. *The J of Supercritical Fluids*, 2011. 57(2): p. 162-174.
22. Karn, P.R., et al., Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. *Int J Nanomedicine*, 2013. 8: p. 365-77.
23. Crommelin, D.J. and G. Storm, Liposomes: from the bench to the bed. *J Liposome Res*, 2003. 13(1): p. 33-6.
24. Franzen, U. and J. Ostergaard, Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance-liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A*, 2012. 1267: p. 32-44.
25. Barenholz, Y., Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*, 2012. 160(2): p. 117-34.

26. Bechara, C. and S. Sagan, Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett*, 2013. 587(12): p. 1693-702.
27. Nagayasu, A., K. Uchiyama, and H. Kiwada, The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv Drug Del Rev*, 1999. 40(1-2): p. 75-87.
28. Klibanov, A.L., et al., Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett*, 1990. 268(1): p. 235-7.
29. Papisov, M.I., Theoretical considerations of RES-avoiding liposomes: Molecular mechanics and chemistry of liposome interactions. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998. 32(1-2): p. 119-138.
30. Torchilin, V., Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011. 63(3): p. 131-5.
31. Crielgaard, B.J., et al., Drug targeting systems for inflammatory disease: one for all, all for one. *J Control Release*, 2012. 161(2): p. 225-34.
32. Ranganathan, R., et al., Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *Int J Nanomedicine*, 2012. 7: p. 1043-60.
33. Al-Jamal, K.T., Active drug targeting: lessons learned and new things to consider. *Int J Pharm*, 2013. 454(1): p. 525-6.
34. Wang, X., et al., The development of site-specific drug delivery nanocarriers based on receptor mediation. *J Control Release*, 2014. 193: p. 139-53.
35. Bummer PM, Physical chemical considerations of lipid based oral drug delivery, solid lipid nanoparticles, Critical Review, *Therapeutic Drug Carrier System*, 2004; 21(2): 1-20.
36. Mehdipour AR, Hamidi M. Brain drug targeting: a computational approach for overcoming blood-brain barrier, *Drug Discovery Today*, 2009. 14: 1030-1036.
37. Wei, X., Chen, X., Ying, M., & Lu, W. (2014). Brain tumor-targeted drug delivery strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(3), 193-201.

38. Pardridge, W. M. (2007). Drug targeting to the brain. *Pharm res*, 24(9), 1733-1744.
39. Yıldırım M. Temel Nöroanatomi. 1. Baskı. İstanbul. *Nobel Tıp Kitabevleri*, 2000.
40. <http://www.bilimgenc.tubitak.gov.tr/makale/insan-beyninin-bolumleri-ne-tur-islevler-ustlenir>
41. Villines, Z. (2017, June 29). "Frontal lobe: Functions, structure, and damage." Medical News Today. Retrieved from <https://www.medicalnewstoday.com/articles/318139>
42. Chayer, C., & Freedman, M. (2001). Frontal lobe functions. *Current neurology and neuroscience reports*, 1(6), 547-552.
43. Collins, A., & Koechlin, E. (2012). Reasoning, learning, and creativity: frontal lobe function and human decision-making. *PLoS biology*, 10(3), e1001293.
44. Flinker, A., Korzeniewska, A., Shestyuk, A. Y., Franaszczuk, P. J., Dronkers, N. F., Knight, R. T., & Crone, N. E. (2015). Redefining the role of Broca's area in speech. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(9), 2871-2875.
45. Kayser, A. S., Allen, D. C., Navarro-Cebrian, A., Mitchell, J. M., & Fields, H. L. (2012). Dopamine, corticostriatal connectivity, and intertemporal choice. *J of Neurosci*, 32(27), 9402-9409.
46. Panagiotaropoulos, T. I., Deco, G., Kapoor, V., & Logothetis, N. K. (2012). Neuronal discharges and gamma oscillations explicitly reflect visual consciousness in the lateral prefrontal cortex. *Neuron*, 74(5), 924-935.
47. Zelikowsky, M., Bissiere, S., Hast, T. A., Bennett, R. Z., Abdipranoto, A., Vissel, B., & Fanselow, M. S. (2013). Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9938-9943.
48. Cappelletti, M., Lee, H. L., Freeman, E. D., & Price, C. J. (2010). The role of right and left parietal lobes in the conceptual processing of numbers. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 22(2), 331-346.
49. Posner, M. I., Walker, J. A., Friedrich, F. A., & Rafal, R. D. (1987). How do the parietal lobes direct covert attention?. *Neuropsychologia*, 25(1), 135-145.

50. Naccache, L., & Dehaene, S. (2001). The priming method: imaging unconscious repetition priming reveals an abstract representation of number in the parietal lobes. *Cerebral cortex*, 11(10), 966-974.
51. Kadosh, R. C., & Walsh, V. (2009). Numerical representation in the parietal lobes: Abstract or not abstract?. *Behavioral and brain sciences*, 32(3-4), 313-328.
52. Simons, J. S., & Spiers, H. J. (2003). Prefrontal and medial temporal lobe interactions in long-term memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(8), 637.
53. Squire, L. R., Stark, C. E., & Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annu. Rev. Neurosci.*, 27, 279-306.
54. Eichenbaum, H., Yonelinas, A. P., & Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 123-152.
55. Scott, S. K., Blank, C. C., Rosen, S., & Wise, R. J. (2000). Identification of a pathway for intelligible speech in the left temporal lobe. *Brain*, 123(12), 2400-2406.
56. Middelkoop, H. A. M., van Der Flier, W. M., Burton, E. J., Lloyd, A. J., Paling, S., Barber, R., O'brien, J. (2001). Dementia with Lewy bodies and AD are not associated with occipital lobe atrophy on MRI. *Neurology*, 57(11), 2117-2120.
57. Gülgönen, S., Demirbilek, V., Korkmaz, B., Dervent, A., & Townes, B. D. (2000). Neuropsychological functions in idiopathic occipital lobe epilepsy. *Epilepsia*, 41(4), 405-411.
58. Tam, E. W., Widjaja, E., Blaser, S. I., MacGregor, D. L., Satodia, P., & Moore, A. M. (2008). Occipital lobe injury and cortical visual outcomes after neonatal hypoglycemia. *Pediatrics*, 122(3), 507-512.
59. Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178-201.
60. Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), 13-25.

61. Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, 16(1), 1-13.
62. Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., & Johansson, B. R. (2010). Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature*, 468(7323), 557.
63. Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41.
64. Neuwelt, E. A., (2004). Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery*, 54(1), 131-142.
65. Gao, K., & Jiang, X. (2006). Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int J of Pharm*, 310(1-2), 213-219.
66. Schmid-Schönbein, G. W., (2006). Analysis of inflammation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 8, 93-151.
67. Jones, A. R., & Shusta, E. V., (2007). Blood–brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res*, 24(9), 1759-1771.
68. Jefferies, W. A., Brandon, M. R., Hunt, S. V., Williams, A. F., Gatter, K. C., & Mason, D. Y. (1984). Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*, 312(5990), 162.
69. Pardridge, W. M., Eisenberg, J., & Yang, J. (1987). Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism*, 36(9), 892-895.
70. T. Moos and E. H. Morgan. Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell Mol. Neurobiol.* 20:77–95 (2000).
71. Z. M. Qian, H. Y. Li, H. Z. Sun, and K. Ho. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* 54:561–587 (2002).
72. E. M. Taylor and E. H. Morgan. Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 55:35–42 (1990).

73. E. H. Morgan and T. Moos. Mechanism and developmental changes in iron transport across the blood–brain barrier. *Dev. Neurosci.* 24:106–113 (2002).
74. Coloma, M. J., Lee, H. J., Kurihara, A., Landaw, E. M., Boado, R. J., Morrison, S. L., & Pardridge, W. M. (2000). Transport across the primate blood-brain barrier of a genetically engineered chimeric monoclonal antibody to the human insulin receptor. *Pharm Res*, 17(3), 266-274.
75. Lee, H. J., Engelhardt, B., Lesley, J., Bickel, U., & Pardridge, W. M. (2000). Targeting rat anti-mouse transferrin receptor monoclonal antibodies through blood-brain barrier in mouse. *J of Pharm and Exp Therap*, 292(3), 1048-1052.
76. Deane, R., Du Yan, S., Submamaryan, R. K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., ... & Zhu, H. (2003). RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nature medicine*, 9(7), 907.
77. Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Range, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., & Alyautdin, R. (2002). Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *Journal of drug targeting*, 10(4), 317-325.
78. Kuo, C. H., Leon, L., Chung, E. J., Huang, R. T., Sontag, T. J., Reardon, C. A., & Fang, Y. (2014). Inhibition of atherosclerosis-promoting microRNAs via targeted polyelectrolyte complex micelles. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(46), 8142-8153.
79. Pardridge, W.M. “Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development” *Molecular Interventions*, 3, 90-105 (2003).
80. Misra, A., Ganesh, S., Shahiwala, A., Shah, S.P. “Drug delivery to the central nervous system: a review” *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 6, 252-273 (2003).
81. Wolka, A.M., Huber, J.D., Davis, T.P. “Pain and the blood-brain barrier: obstacles to drug delivery” *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55(8), 987-1006 (2003).
82. Pardridge, W.M., Yang, J., Eisenberg, J., Mietus, L.J. “Antibodies to blood-brain barrier bind selectively to brain capillary endothelial lateral membranes and to a 46K protein” *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 6, 203-211 (1986).
83. Pardridge, W.M. “New approaches to drug delivery through the blood brain barrier” *Trends Biotechnol.*, 12, 239-245 (1994).

84. Girod, J., Fenart, L., Regina, A., Dehouck, M.-P., Hong, G., Scherrmann, J.-M., Cecchelli, R., Roux, F. "Transport of cationized anti-tetanus Fab'2 fragments across an in vitro blood-brain barrier model: Involvement of the transcytosis pathway" *J. Neurochem.*, 73, 2002-2008 (1999).
85. Kang, Y. S., Pardridge, W.M. "Brain delivery of biotin bound to a conjugate of neutral avidin and cationized human albumin" *Pharm. Res.*, 11, 1257-1264 (1994).
86. De Wolf, F.A., Brett, G.M. "Ligand-binding proteins: Their potential for application in systems for controlled delivery and uptake of ligands" *Pharmacol. Rev.*, 52,207-236 (2000).
87. Kumagai, A. K., Eisenberg, J. B., & Pardridge, W. M. (1987). Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *Journal of Biological Chemistry*, 262(31), 15214-15219.
88. Bergmann, P., Kacenenbogen, R., & Vizet, A. (1984). Plasma clearance, tissue distribution and catabolism of cationized albumins with increasing isoelectric points in the rat. *Clinical Science*, 67(1), 35-43.
89. Gauthier, V.J., Mannik, M., Striker, G.E. "Effect of cationized antibodies in performed immune complexes on deposition and persistence in renal glomeruli" *J. Exp. Med.*, 156, 766- 777 (1982).
90. Triguero, D., Buciak, J. B., Yang, J., & Pardridge, W. M. (1989). Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: enhanced delivery compared to native protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(12), 4761-4765.
91. Triguero, D. O. M. I. N. G. O., Buciak, J. L., & Pardridge, W. M. (1991). Cationization of immunoglobulin G results in enhanced organ uptake of the protein after intravenous administration in rats and primate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 258(1), 186-192.
92. Bies, C., Lehr, C. M., & Woodley, J. F. (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced drug delivery reviews*, 56(4), 425-435.

93. Fischer, D., Kissel, T. "Histochemical characterization of primary capillary endothelial cells from porcine brains using monoclonal antibodies and fluorescein isothiocyanate-labelled lectins: implications for drug delivery" *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 1–11 (2001).
94. Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S., & Kakkar, V. (2008). Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. *Journal of Controlled Release*, 127(2), 97-109.
95. Olivier, J. C. (2005). Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx*, 2(1), 108-119.
96. Kreuter, J. (2001). Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 47(1), 65-81.
97. Kreuter, J. (2004). Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 4(5), 484-488.
98. Joseph, E., & Saha, R. N. (2013). Advances in brain targeted drug delivery: nanoparticulate systems. *J PharmaSciTech*, 3, 1-8.
99. Bellavance, M. A., Poirier, M. B., & Fortin, D. (2010). Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells. *International journal of pharmaceutics*, 395(1-2), 251-259.
100. Ramos-Cabrera, P., Agulla, J., Argibay, B., Pérez-Mato, M., & Castillo, J. (2011). Serial MRI study of the enhanced therapeutic effects of liposome-encapsulated citicoline in cerebral ischemia. *International journal of pharmaceutics*, 405(1-2), 228-233.
101. Yoo, J. W., Chambers, E., & Mitragotri, S. (2010). Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects. *Current pharmaceutical design*, 16(21), 2298-2307.
102. Van Weperen, W., & Gaillard, P. (2010). Enhanced blood to brain drug delivery. *Innovations in Pharm Tech*, 35, 55-57.
103. Umezawa, F. A. E. Y., & Eto, Y. (1988). Liposome targeting to mouse brain: mannose as a recognition marker. *Biochemical and Biophysical Res Com*, 153(3), 1038-1044.

104. Sakamoto, A., & Ido, T. (1993). Liposome targeting to rat brain: effect of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Brain Res*, 629(1), 171-175.
105. Shaw, T. K., Mandal, D., Dey, G., Pal, M. M., Paul, P., Chakraborty, S., ... & Mandal, M. (2017). Successful delivery of docetaxel to rat brain using experimentally developed nanoliposome: a treatment strategy for brain tumor. *Drug delivery*, 24(1), 346-357.
106. Laham, A., Claperon, N., Durussel, J. J., Fattal, E., Delattre, J., Puisieux, F., ... & Rossignol, P. (1988). Liposomally entrapped adenosine triphosphate: improved efficiency against experimental brain ischaemia in the rat. *J of Chrom A*, 440, 455-458.
107. Geisert Jr, E. E., Del Mar, N. A., Owens, J. L., & Holmberg, E. G. (1995). Transfecting neurons and glia in the rat using pH-sensitive immunoliposomes. *Neurosci Let*, 184(1), 40-43.
108. Barenholz, Y. (2001). Liposome application: problems and prospects. *Curr Op in Coll& Int Sci*, 6(1), 66-77.
109. Imaizumi, S., Woolworth, V., Fishman, R. A., & Chan, P. H. (1990). Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 21(9), 1312-1317.
110. Wu, J., Liu, Q., & Lee, R. J. (2006). A folate receptor-targeted liposomal formulation for paclitaxel. *Int J of Pharm*, 316(1-2), 148-153.
111. Fricker, G., & Miller, D. S. (2004). Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. *Pharmacology*, 70(4), 169-176.
112. Gennuso, R., Spigelman, M. K., Chinol, M., Zappulla, R. A., Nieves, J., Vallabhajosula, S., ... & Holland, J. F. (1993). Effect of blood-brain barrier and blood-tumor barrier modification on central nervous system liposomal uptake. *Cancer Invest*, 11(2), 118-128.
113. Gupta, B., Levchenko, T. S., Mongayt, D. A., & Torchilin, V. P. (2005). Monoclonal antibody 2C5-mediated binding of liposomes to brain tumor cells in vitro and in subcutaneous tumor model in vivo. *J of Drug Targ*, 13(6), 337-343.

114. Huwyler, J., Yang, J., & Pardridge, W. M. (1997). Receptor mediated delivery of daunomycin using immunoliposomes: pharmacokinetics and tissue distribution in the rat. *J of Pharm and Exp Ther*, 282(3), 1541-1546.
115. Cerletti, A., Drewe, J., Fricker, G., Eberle, A., & Huwyler, J. (2000). Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system. *J of Drug Targ*, 8(6), 435-446.
116. Schnyder, A., & Huwyler, J. (2005). Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRx*, 2(1), 99-107.
117. Afergan, E., Epstein, H., Dahan, R., Koroukhov, N., Rohekar, K., Danenberg, H. D., & Golomb, G. (2008). Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes. *J of Contr Rel*, 132(2), 84-90.
118. Qin, Y., Chen, H., Zhang, Q., Wang, X., Yuan, W., Kuai, R., ... & Liu, J. (2011). Liposome formulated with TAT-modified cholesterol for improving brain delivery and therapeutic efficacy on brain glioma in animals. *Int J of Pharm*, 420(2), 304-312.
119. Ko, Y. T., Bhattacharya, R., & Bickel, U. (2009). Liposome encapsulated polyethylenimine/ODN polyplexes for brain targeting. *J of Contr Rel*, 133(3), 230-237.
120. Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev Drug Disc*, 4(2), 145.
121. Ghajar, J. (2000). Traumatic brain injury. *The Lancet*, 356(9233), 923-929.
122. Bigler, E. D., Weiner, M., & Lipton, A. (2009). Traumatic brain injury. *Textbook of Alzh Dise and other Dementias*, 229-246.
123. Risdall, J. E., & Menon, D. K. (2011). Traumatic brain injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 366(1562), 241-250.
124. Williams, A. L. (2018). Traumatic brain injury. *Physical Management for Neurological Conditions E-Book*, 153.
125. Parikh, S., Koch, M., & Narayan, R. K. (2007). Traumatic brain injury. *Int Anesth Clinics*, 45(3), 119-135.

126. Alexander, M. P. (2003). Traumatic brain injury. *In Office Practice of Neurology (Second Edition)* (pp. 167-173).
127. Dutton, R. P., & McCunn, M. (2003). Traumatic brain injury. *Current opinion in critical care*, 9(6), 503-509.
128. Langlois, J. A., Rutland-Brown, W., & Wald, M. M. (2006). The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of head trauma rehabilitation*, 21(5), 375-378.
129. Kumar, A., & Loane, D. J. (2012). Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain, behavior, and immunity*, 26(8), 1191-1201.
130. Finnie, J. W., & Blumbergs, P. C. (2002). Traumatic brain injury. *Veterinary pathology*, 39(6), 679-689.
131. Hermann, D. M., Kilic, E., Kügler, S., Isenmann, S., & Bähr, M. (2001). Adenovirus-mediated glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression protects against subsequent cortical cold injury in rats. *Neurobiology of disease*, 8(6), 964-973.
132. Kilic, U., Kilic, E., Dietz, G. P., & Bähr, M. (2003). Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 34(5), 1304-1310.
133. Kilic, Ü., Kilic, E., Dietz, G. P., & Bähr, M. (2004). The TAT protein transduction domain enhances the neuroprotective effect of glial-cell-line-derived neurotrophic factor after optic nerve transection. *Neurodegenerative diseases*, 1(1), 44-49.
134. Kilic, E., Kilic, Ü., & Hermann, D. M. (2005). TAT-GDNF in Neurodegeneration and Ischemic Stroke. *CNS drug reviews*, 11(4), 369-378.
135. Kilic, E., Kilic, U., & Hermann, D. M. (2006). TAT fusion proteins against ischemic stroke: current status and future perspectives. *Front Biosci*, 11, 1716-1721.
136. Kilic, E., ÖUzdemir, Y. G., Bolay, H., Keleştimur, H., & Dalkara, T. (1999). Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 19(5), 511-516.

137. Reiter, R. J., Tan, D. X., Leon, J., Kilic, Ü., & Kilic, E. (2005). When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke. *Experimental Biology and Medicine*, 230(2), 104-117.
138. Kilic, Ü., Kilic, E., Reiter, R. J., Bassetti, C. L., & Hermann, D. M. (2005). Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice. *J of Pineal Research*, 38(1), 67-71.
139. Kelestemur, T., Yulug, B., Caglayan, A. B., Beker, M. C., Kilic, U., Caglayan, B., ... & Kilic, E. (2016). Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. *Neuroscience Letters*, 612, 92-97.
140. Münch, E., Horn, P., Schürer, L., Piepgras, A., Paul, T., & Schmiedek, P. (2000). Management of severe traumatic brain injury by decompressive craniectomy. *Neurosurgery*, 47(2), 315-323.
141. Shlosberg, D., Benifla, M., Kaufer, D., & Friedman, A. (2010). Blood–brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 6(7), 393.
142. Masel, B. E., & DeWitt, D. S. (2010). Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *Journal of neurotrauma*, 27(8), 1529-1540.
143. Werner, C., & Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 99(1), 4-9.
144. Chodobski, A., Zink, B. J., & Szmydynger-Chodobska, J. (2011). Blood–brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Translational Stroke Research*, 2(4), 492-516.
145. Clausen, F., Lorant, T., Lewén, A., & Hillered, L. (2007). T lymphocyte trafficking: a novel target for neuroprotection in traumatic brain injury. *J of neurotrauma*, 24(8), 1295-1307.
146. Morita-Fujimura, Y., Fujimura, M., Gasche, Y., Copin, J. C., & Chan, P. H. (2000). Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 20(1), 130-138.

147. Chan, P. H., Yang, G. Y., Chen, S. F., Carlson, E., & Epstein, C. J. (1991). Cold-induced brain edema and infarction are reduced in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Annals of Neurology: Official J of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 29(5), 482-486.
148. Israelsson, C., Bengtsson, H., Kylberg, A., Kullander, K., Lewén, A., Hillered, L., & Ebendal, T. (2008). Distinct cellular patterns of upregulated chemokine expression supporting a prominent inflammatory role in traumatic brain injury. *J of Neurotrauma*, 25(8), 959-974.
149. Ziebell, J. M., & Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Involvement of pro-and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 22-30.
150. Gyoneva, S., & Ransohoff, R. M. (2015). Inflammatory reaction after traumatic brain injury: therapeutic potential of targeting cell–cell communication by chemokines. *Trends in pharmacological sciences*, 36(7), 471-480.
151. Murakami, K., Kondo, T., Yang, G., Chen, S. F., Morita-Fujimura, Y., & Chan, P. H. (1999). Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis. *Progress in neurobiology*, 57(3), 289-299.
152. Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B., & Kiening, K. L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience*, 129(4), 1019-1027.
153. McTaggart, F. (2003). Comparative pharmacology of Rosuvastatin. *Atherosclerosis Supplements*, 4(1), 9-14.
154. Istvan, E. S., & Deisenhofer, J. (2001). Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 292(5519), 1160-1164.
155. White, C. M. (2002). A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of Rosuvastatin. *The J of Clinical Pharmacology*, 42(9), 963-970.
156. Olsson, A. G., McTaggart, F., & Raza, A. (2002). Rosuvastatin: a highly effective new HMG-CoA reductase inhibitor. *Cardiovascular drug reviews*, 20(4), 303-328.
157. Davidson, M. H. (2004). Rosuvastatin safety: lessons from the FDA review and post-approval surveillance. *Expert Opinion on Drug Safety*, 3(6), 547-557.

158. Brown, C. D. A., Windass, A., Bleasby, K., & Lauffart, B. (2001). Rosuvastatin is a high affinity substrate of hepatic organic anion transporter OATP-C. *Atherosclerosis Supplements*, 2(2), 90.
159. Bailey, K. M., Romaine, S. P., Jackson, B. M., Farrin, A. J., Efthymiou, M., Barth, J. H., ... & Samani, N. J. (2010). Hepatic metabolism and transporter gene variants enhance response to Rosuvastatin in patients with acute myocardial infarction: the GEOSTAT-1 Study. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, 3(3), 276-285.
160. Schuster, H. (2003). Rosuvastatin –a highly effective new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor: review of clinical trial data at 10–40 mg doses in dyslipidemic patients. *Cardiology*, 99(3), 126-139.
161. Baker, W. L., Talati, R., White, C. M., & Coleman, C. I. (2010). Differing effect of statins on insulin sensitivity in non-diabetics: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 87(1), 98-107.
162. Preiss, D., & Sattar, N. (2011). Statins and the risk of new-onset diabetes: a review of recent evidence. *Current Opinion in Lipidology*, 22(6), 460-466.
163. Weng, T. C., Yang, Y. H. K., Lin, S. J., & Tai, S. H. (2010). A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. *J of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 35(2), 139-151.
164. Jungner, M., Lundblad, C., & Bentzer, P. (2013). RSV in experimental brain trauma: improved capillary patency but no effect on edema or cerebral blood flow. *Microvascular Research*, 88, 48-55.
165. Seker, F. B., Kilic, U., Caglayan, B., Ethemoglu, M. S., Caglayan, A. B., Ekimci, N., ... & Yilmaz, B. (2015). HMG-CoA reductase inhibitor Rosuvastatin improves abnormal brain electrical activity via mechanisms involving eNOS. *Neuroscience*, 284, 349-359.
166. Kang, S. Y., Lee, S. B., Kim, H. J., Kim, H. T., Yang, H. O., & Jang, W. (2017). Autophagic modulation by Rosuvastatin prevents rotenone-induced neurotoxicity in an in vitro model of Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 642, 20-26.

167. Zhang, X., Zhou, Y., Zhang, S., Ding, W., & Lou, M. (2017). Cerebral blood flow evaluation of intensive Rosuvastatin therapy in stroke/transient ischemic attack patients with intracranial arterial atherosclerotic stenosis study: Rationale and design. *Brain and behavior*, 7(6), e00689.
168. Hadi, N. R., Raheem, H. T., Kareem, K. J., Kadhim, K. A., & Taher, A. (2015). Amelioration of Cerebral Ischemia reperfusion injury by Rosuvastatin via interference with inflammatory response and apoptosis. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* Jan-Mar, 5(1).
169. Bentzer, P., & Jungner, M. (2012). Cortical capillary recruitment by Rosuvastatin in experimental brain trauma is associated with increased NO production. *Critical Care*, 16(1), P314.
170. Uekawa, K., Hasegawa, Y., Ma, M., Nakagawa, T., Katayama, T., Sueta, D., ... & Kuratsu, J. I. (2014). Rosuvastatin ameliorates early brain injury after subarachnoid hemorrhage via suppression of superoxide formation and nuclear factor-kappa B activation in rats. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 23(6), 1429-1439.
171. Xing, H., Sun, S., Mei, Y., & Dirk, H. (2006). The protective effect of Rosuvastatin on ischemic brain injury and its mechanism. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 26(6), 667-669.
172. Li, W., Li, Y., Zhu, S., Ji, Q., Shu, Y., Zhang, L., & Liu, J. (2015). Rosuvastatin attenuated the existing morphine tolerance in rats with L5 spinal nerve transection through inhibiting activation of astrocytes and phosphorylation of ERK42/44. *Neuroscience Letters*, 584, 314-319.
173. Whalen, L. D., Khot, S. P., & Standage, S. W. (2014). High-dose Rosuvastatin treatment for multifocal stroke in trauma-induced cerebral fat embolism syndrome: a case report. *Pediatric Neurology*, 51(3), 410-413.
174. Kahveci, R., Gökçe, E. C., Gürer, B., Gökçe, A., Kisa, U., Cemil, D. B., ... & Erdoğan, B. (2014). Neuroprotective effects of Rosuvastatin against traumatic spinal cord injury in rats. *European Journal of Pharmacology*, 741, 45-54.
175. Herbet, M., Izdebska, M., Piątkowska-Chmiel, I., Poleszak, E., & Jagiełło-Wójtowicz, E. (2016). Estimation of oxidative stress parameters in rats after simultaneous

administration of Rosuvastatin with antidepressants. *Pharmacological Reports*, 68(1), 172-176.

176. Ma, M., Uekawa, K., Hasegawa, Y., Nakagawa, T., Katayama, T., Sueta, D., ... & Kim-Mitsuyama, S. (2013). Pretreatment with Rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through attenuation of oxidative stress and inflammation. *Brain Research*, 1519, 87-94.

177. Erdös, B., Snipes, J. A., Tulbert, C. D., Katakam, P., Miller, A. W., & Busija, D. W. (2006). Rosuvastatin improves cerebrovascular function in Zucker obese rats by inhibiting NAD (P) H oxidase-dependent superoxide production. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(3), H1264-H1270.

178. Sánchez-Aguilar, M., Tapia-Pérez, J. H., Sánchez-Rodríguez, J. J., Viñas-Ríos, J. M., Martínez-Pérez, P., de la Cruz-Mendoza, E., ... & Gordillo-Moscote, A. (2013). Effect of Rosuvastatin on cytokines after traumatic head injury. *Journal of Neurosurgery*, 118(3), 669-675.

179. Famer, D., & Crisby, M. (2004). Rosuvastatin reduces caspase-3 activity and up-regulates α -secretase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to A β . *Neuroscience Letters*, 371(2-3), 209-214.

180. Famer, D., Wahlund, L. O., & Crisby, M. (2010). Rosuvastatin reduces microglia in the brain of wild type and ApoE knockout mice on a high cholesterol diet; implications for prevention of stroke and AD. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 402(2), 367-372.

181. Crestini, A., Piscopo, P., Iazeolla, M., Albani, D., Rivabene, R., Forloni, G., & Confaloni, A. (2011). Rosuvastatin and thapsigargin modulate γ -Secretase gene expression and APP processing in a human neuroglioma model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 43(3), 461-469.

182. Savoia, C., Sisalli, M. J., Di Renzo, G., Annunziato, L., & Scorziello, A. (2011). Rosuvastatin -induced neuroprotection in cortical neurons exposed to OGD/reoxygenation is due to nitric oxide inhibition and ERK1/2 pathway activation. *International Journal of Physiology, Pathophysiology And Pharmacology*, 3(1), 57.

183. Die, J., Wang, K., Fan, L., Jiang, Y., & Shi, Z. (2010). Rosuvastatin preconditioning provides neuroprotection against spinal cord ischemia in rats through modulating nitric oxide synthase expressions. *Brain Research*, 1346, 251-261.
184. Salih, O. S., Samein, L. H., & Ali, W. K. (2013). Formulation and in vitro evaluation of Rosuvastatin calcium niosomes. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5(4), 525-535.
185. Lichtenfels, R., Biddison, W. E., Schulz, H., Vogt, A. B., & Martin, R. (1994). CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. *Journal of Immunological Methods*, 172(2), 227-239.
186. Roden, M. M., Lee, K. H., Panelli, M. C., & Marincola, F. M. (1999). A novel cytolysis assay using fluorescent labeling and quantitative fluorescent scanning technology. *Journal of Immunological Methods*, 226(1-2), 29-41.
187. Peisajovich, S. G., & Shai, Y. (2003). Liposomes in identification and characterization of viral fusogenic peptides. *Methods in enzymology* (Vol. 372, pp. 361-373). Academic Press.
188. Slepishkin, V., Simões, S., de Lima, M. C., & Düzgüneş, N. (2004). Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. *Methods in Enzymology*, 387, 134.
189. Kono, K., & Takagishi, T. (2004). Temperature-sensitive liposomes. *Methods in Enzymology*, 387, 73-82.
190. Monette, R., Small, D. L., Mealing, G., & Morley, P. (1998). A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Research Protocols*, 2(2), 99-108.
191. Hashimoto, Y., Kurita, M., Aiso, S., Nishimoto, I., & Matsuoka, M. (2009). Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor α /WSX-1/gp130. *Molecular Biology of the Cell*, 20(12), 2864-2873.
192. Petronilli, V., Miotto, G., Canton, M., Brini, M., Colonna, R., Bernardi, P., & Di Lisa, F. (1999). Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability

transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophysical Journal*, 76(2), 725-734.

193. Gillessen, T., Grasshoff, C., & Szinicz, L. (2002). Mitochondrial permeability transition can be directly monitored in living neurons. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(4), 186-193.

194. Gautier, C. A., Giaime, E., Caballero, E., Núñez, L., Song, Z., Chan, D., ... & Shen, J. (2012). Regulation of mitochondrial permeability transition pore by PINK1. *Molecular Neurodegeneration*, 7(1), 22.

195. Nakajima, K. I., & Marunaka, Y. (2016). Intracellular chloride ion concentration in differentiating neuronal cell and its role in growing neurite. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(2), 338-342.

196. Manzini, I., Schweer, T. S., & Schild, D. (2008). Improved fluorescent (calcium indicator) dye uptake in brain slices by blocking multidrug resistance transporters. *Journal of Neuroscience Methods*, 167(2), 140-147.

197. Bickler, P. E., & Hansen, B. M. (1998). Hypoxia-tolerant neonatal CA1 neurons: relationship of survival to evoked glutamate release and glutamate receptor-mediated calcium changes in hippocampal slices. *Developmental Brain Research*, 106(1-2), 57-69.

198. Jarvis, C. R., Lilge, L., Vipond, G. J., & Andrew, R. D. (1999). Interpretation of intrinsic optical signals and calcein fluorescence during acute excitotoxic insult in the hippocampal slice. *NeuroImage*, 10(4), 357-372.

199. Dravid, S. M., & Murray, T. F. (2003). Fluorescent detection of Ca²⁺-permeable AMPA/kainate receptor activation in murine neocortical neurons. *Neuroscience Letters*, 351(3), 145-148.

200. Bangham, A. D., Hill, M. W., & Miller, N. G. A. (1974). Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Methods in Membrane Biology* (pp. 1-68). Springer, Boston, MA.

201. Gumulec, J., Fojtu, M., Raudenska, M., Sztalmachova, M., Skotakova, A., Vlachova, J., ... & Adam, V. (2014). Modulation of induced cytotoxicity of doxorubicin by

using apoferritin and liposomal cages. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22960-22977.

202. Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-23.

203. Singhvi, G., & Singh, M. (2011). In-vitro drug release characterization models. *Int J Pharm Stud Res*, 2(1), 77-84.

204. Devrim, B., & Bozkır, A. (2013). Preparation and evaluation of double-walled microparticles prepared with a modified water-in-oil-in-oil-in-water (w1/o/o/w3) method. *Journal of Microencapsulation*, 30(8), 741-754.

205. Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2003). Evaluation of mathematical models describing drug release from estradiol transdermal systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(1), 89-97.

206. Keskin, I., Gunal, M. Y., Ayturk, N., Kilic, U., Ozansoy, M., & Kilic, E. (2017). Dose-dependent neuroprotective effect of enoxaparin on cold-induced traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research*, 12(5), 761.

207. Guideline, I. H. T. (2005, November). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). *International Conference on Harmonization*, Geneva, Switzerland (pp. 11-12).

208. Swartz, M. E., & Krull, I. S. (1997). Analytical method development and validation. *CRC Press*.

209. Ermer, J., & Miller, J. H. M. (Eds.). (2006). Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice. *John Wiley & Sons*.

210. Awad, D., Tabod, I., Lutz, S., Wessolowski, H., & Gabel, D. (2005). Interaction of Na₂B₁₂H₁₁SH with liposomes: Influence on zeta potential and particle size. *Journal of Organometallic Chemistry*, 690(11), 2732-2735.

211. Kumar, R., Singh, B., Bakshi, G., & Katare, O. P. (2007). Development of liposomal systems of finasteride for topical applications: design, characterization, and in vitro evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12(6), 591-601.

212. Duman, G., Aslan, İ., Yekta Özer, A., İnanç, İ., & Taralp, A. (2014). Liposome, gel and lipogelosome formulations containing sodium hyaluronate. *Journal of Liposome Research*, 24(4), 259-269.



BEYİNE HEDEFLENDİRİLMİŞ ROSUVASTATİN İÇEREN LİPOZOMAL TAŞIYICI SİSTEMLERİN FARELERDE OLUŞTURULAN BEYİN HASARININ TEDAVİSİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ_2_2

ORIJINALLIK RAPORU

% 6	% 1	% 1	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 6
2	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
3	www.sporbilimleri.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1

Alıntıları çıkart

üzerinde

Eşleşmeleri çıkar

< 5 words

Bibliyografyayı Çıkart

üzerinde