T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL VERİLMESİ AMACIYLA NANO TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

GAMZE RÜZGAR ÖZEMRE

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2021


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL VERİLMESİ AMACIYLA NANO TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Gamze RÜZGAR ÖZEMRE

DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAZİRAN 2021

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gamze RÜZGAR ÖZEMRE

16.06.2021

DÜŞÜK MOLEKÜL AĞIRLIKLI HEPARİNİN ORAL VERİLMESİ AMACIYLA NANO TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Gamze RÜZGAR ÖZEMRE

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2021

ÖZET

Bu tezin amacı; enoksaparinin (düşük molekül ağırlıklı heparin) oral biyoyararlanımını arttırmak amacıyla nanosistemlerinin geliştirilmesi ve etkinliğinin değerlendirilmesidir. Bu hedef doğrultusunda ara tabakasında enoksaparin içeren üç tabakalı nanolifler (NF), enoksaparin yüklü nanopartiküller (NP), hazırlanan nanopartiküllerin yüklendiği üç tabakalı nanolifler (NP/NF ikili sistemi) hazırlanmıştır. Nanoliflerin hazırlanmasında, elektro-çekim işlemi için kritik parametreler (polimer çözeltisinin viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi) ölçülmüştür ve işlem koşulları (akış hızı, voltaj vb.) optimize edilmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır, formülasyon içeriğinin (polimer konsantrasyonu, polimer:etkin madde a/a oranı vb.) ve işlem parametrelerinin (karıştırma hızı, süresi, vb) belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Nanoliflerin alt ve üst tabakasında pH'ya bağımlı çözünen Eudragit S100 kullanılmıştır. Nanoliflerin üç tabakasının da alınan SEM görüntüleri sonucunda liflerin yüzeyleri pürüzsüz ve lif çapları 300-500 nm arasında bulunmuştur. Nanoliflerin, temas açıları 100º'den yüksek, poroziteleri ise %50'den yüksek bulunmuştur. Enoksaparin miktarı liflerde 390-400 μg/cm^2 arasındadır. İn vitro salım çalışması sonucunda lif formülasyonları, nanopartikül formülasyonuna göre etkin madde salımını geciktirmiştir, ancak tavşan barsak dokusundan geçiş çalışması sonucunda permeasyon özellikleri benzer bulunmuştur ($p>0,05$). MTT çalışmaları sonucunda 75 μg/ml enoksaparin dozunun Caco-2 çalışmaları için güvenle kullanılabileceği belirlenmiştir. Caco-2 geçiş çalışmaları sonucunda formülasyonların permeasyonları benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Stabilite çalışmalarında 12 aylık süre sonucunda bütün koşullarda (4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem) lif çaplarında önemli bir değişim olmazken, etkin madde salımında ve etkin madde miktarında değişim gözlenmiştir. İn vivo çalışmalar sonucunda en yüksek pıhtılaşma sürelerine oral uygulanan NP ve NP/NF formülasyonları ile (52,7 ve 42,8 sn) ulaşılmıştır. Parenteral yoldan kullanılan enoksaparinin alternatif olarak hasta uyuncu ve uygulama kolaylığı açısından oral yoldan verilebilmesi için umut vaat eden sonuçlara ulaşılmıştır.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : Nanolif, elektro-çekim, enoksaparin, oral ilaç verilişi, kitozan
Sayfa Adedi : 191
Danışman : Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF ACTIVITY OF NANO-DELIVERY SYSTEMS CONTAINING LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARIN FOR ORAL ADMINISTRATION

(Ph. D. Thesis)

Gamze RÜZGAR ÖZEMRE

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

June 2021

ABSTRACT

The purpose of this thesis was the development and evaluation of nanodelivery systems to increase the oral bioavailability of enoxaparin (low molecular weight heparin). In line with this goal, three nanosystems were prepared such as, three-layered nanofibers (NF), enoxaparin loaded nanoparticles (NP), three-layered nanofibers prepared by loading nanoparticles (NP/NF). In the preparation of nanofibers, the critical parameters (viscosity, conductivity and surface tension of the polymer solution) for the electrospinning process, were measured and the process parameters (flow rate, voltage, etc.) were optimized. Nanoparticles were prepared by ionic gelation method, to determine the formulation content (polymer concentration, polymer: active substance w/w ratio etc.) and process parameters (mixing speed, duration, etc.), studies were carried out. Eudragit S100 was used in the lower and upper layers of the nanofibers which is a pH dependent polymer. As a result of the SEM images of nanofibers, the surfaces of the fibers were found to be smooth and the fiber diameters were between 300-500 nm. The contact angles of nanofibers were found to be higher than 100º and their porosity higher than 50%. The amount of enoxaparin was between 390-400 μg/cm^2 in the fibers. As a result of the in vitro release study, nanofibers delayed the drug release compared to the nanoparticles, but similar permeation properties was found as a result of the permeation study through the rabbit intestinal tissue ($p > 0,05$). As a result of MTT studies, the safest dose that can be used for Caco-2 permeability studies was 75 μg/mL. A a result of Caco-2 studies no significant difference was found between the permeations of the formulations ($p > 0,05$). In the stability studies, at the end of 12-month period, there was no significant change in fiber diameters in all conditions (4ºC/ambient humidity, 25ºC / 60% relative humidity and 40ºC / 75% relative humidity), while the drug release and the amount of drug did change. As a result of in vivo studies, the highest coagulation times were reached with oral administered NP and NP/NF formulations (52,7 and 42,8 seconds). Promising results have been achieved for oral administration of enoxaparin as an alternative route to parenteral in terms of patient compliance and ease of administration.

Science Code : 1020
Key Words : Nanofiber, electrospinning, enoxaparin, oral drug delivery, chitosan
Page Number : 191
Supervisor : Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK

TEŞEKKÜR

Doktora ders ve tez dönemimde bilgisini ve desteğini esirgemeyen, yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK'e, doktora ders döneminde bilgi ve tecrübeleriyle tez döneminde ise ilgi ve destekleriyle yanımda olan hocalarım Sayın Prof. Dr. Nevin ÇELEBİ'ye, Sayın Prof. Dr. Sevgi TAKKA'ya, Sayın Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ'a, Sayın Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e Sayın Prof. Dr. İmran VURAL'a 'Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' ve Sayın Doç. Dr. Fatma Nur TUĞCU DEMİRÖZ'e, Doç. Dr. Tuba İNCEÇAYIR'a, Sayın Doç. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Başaran MUTLU AĞARDAN'a özellikle doktora çalışmalarım boyunca her daim gerek bilgi gerekse tecrübe anlamında destek olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Serdar TORT'a, meslek ve akademik hayatımdaki şansım, her anımda yanımda olan Dr. Ecz. Hazal Ezgi GÜLTEKİN'e, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen canım arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Nur OKTAY'a, çalışma hayatım boyunca yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Sıla GÜLBAĞ PINAR'a, Dr. Ecz. Tahir Emre YALÇIN'a, Arş. Gör. Duygu YILMAZ USTA'ya, Arş. Gör. Sinem SAAR'a, Ecz. Esra KODAN AKÇA'ya, Ecz. Ayşegül YILDIZ'a, Ecz. Seval OLGAÇ'a ayrıca, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Ecz. Altuğ KARA'ya ve Arş. Gör. Esra PEZİK'e 'Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' ve tüm bölüm arkadaşlarıma, bölüm sekreterimiz Fatma ÇELİK'e, in vivo çalışmalarımda emeği büyük olan Sayın Doç. Dr. Ayşe DEMİREL'e, doktora tezimi '117S206' nolu 1001 projesi kapsamında destekleyerek gerçekleşmesini sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Son olarak beni bugünlere getiren maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım babam Erdal RÜZGAR'a, fedakar annem Ecz. Menekşe RÜZGAR'a, biricik abim Ecz. Hasan Erkan RÜZGAR'a ve bana güvenen, hep destek olan ikinci ailem babam Süleymen ÖZEMRE ve annem Hürriyet ÖZEMRE'ye ve bütün zor süreçlerimde bana en büyük desteği veren, hayat arkadaşım, enerji kaynağım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Özgür ÖZEMRE'ye ve hayatımızın mucizesi oğlumuz Deniz ÖZEMRE'ye en büyük teşekkürümü sunarım.

İÇINDEKİLER

Sayfa

ÖZET ix

ABSTRACT x

TEŞEKKÜR xi

İÇINDEKİLER xii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xvi

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xix

RESİMLERİN LİSTESİ xxi

SİMGELER VE KISALTMALAR xxv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Heparin ve Antikoagülan Tedavi 3

2.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin (DMAH) 5

2.3. Heparin/DMAH'in Oral Verilişi ile İlgili Çalışmalar 6

2.4. Nanolifler 14

2.4.1. Tanımı ve özellikleri 14

2.4.2. Nanoliflerin kullanım alanları 14

2.4.3. Nanoliflerin karakterizasyonu 15

2.4.4. Nanoliflerin hazırlanmasında kullanılan bileşenler 17

2.4.5. Eczacılık alanında kullanılan nanolifler 19

2.4.6. Nanolif üretiminde kullanılan yöntemler 21

2.5. Heparin ve Türevlerinin Nanolif Çalışmaları 35

2.6. Nanopartiküllerin Genel Özellikleri 36

2.7. Sonuç formülasyonların hazırlanmasında kullanılan polimerler ve özellikleri .. 38

3. GEREÇ VE YÖNTEM 41

Sayfa

3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler 41
3.1.1. Kullanılan Cihazlar 41
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler 41
3.1.3. İn vitro deneylerde kullanılan tampon çözeltiler 42
3.2. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları 43
3.2.1. Diferansiyel taramalı kolorimetre (DSC) ölçümleri 43
3.2.2. FT-IR ölçümleri 43
3.2.3. Etkin maddenin miktar tayini için standart doğrunun hazırlanması 43
3.3. Nanosistemlerin Hazırlanması 45
3.4. Önformülasyon Çalışmaları 47
3.4.1. Nanoliflerin hazırlanması 47
3.4.2. Elektro-çekim yönteminde kullanılan çözeltilerin karakterizasyon çalışmaları 57
3.4.3. Nanopartiküllerin hazırlanması 59
3.5. Nanosistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları 60
3.5.1. Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları 61
3.5.2. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları 63
3.5.3. Nanoliflerde ve nanopartiküllerde ortak olan karakterizasyon çalışmaları 63
3.5.4. İn-vivo deneyler 72
3.6. İstatistiksel Değerlendirme 77
4. BULGULAR 79
4.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları 79
4.1.1. Diferansiyel taramalı kolorimetre (DSC) ölçümleri 79
4.1.2. FT-IR ölçümleri 81
4.1.3. Etkin maddenin miktar tayini için standart doğrunun hazırlanması 83
4.2. Nanosistemlerin Hazırlanması 88

Sayfa

4.2.1. Nanoliflerin hazırlanması 88
4.2.2. Nanopartiküllerin hazırlanması 92
4.3. Nanosistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları 95
4.3.1. Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları 96
4.3.2. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları 102
4.3.3. Nanoliflerde ve Nanopartiküllerde Ortak Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları 103
4.3.4. İn-vivo deneyler 122
5. TARTIŞMA 139
5.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları 139
5.1.1. Diferansiyel taramalı kolorimetre (DSC) ölçümleri 139
5.1.2. FT-IR ölçümleri 140
5.1.3. Etkin maddenin miktar tayini için standart doğrunun hazırlanması 141
5.2. Nanosistemlerin Hazırlanması 142
5.2.1. Nanoliflerin hazırlanması 142
5.2.2. Nanopartiküllerin hazırlanması 148
5.3. Nanosistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları 149
5.3.1. Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları 149
5.3.2. Nanosistemlerde etkin madde yükleme etkinliği 152
5.3.3. Nanosistemlerden enoksaparinin salım hızı tayini 152
5.3.4. Tavşanların intestinal dokusundan enoksaparin'in geçiş oranının tespiti 153
5.3.5. Hücre kültürü çalışmaları 155
5.3.6. Nanosistemlerin stabilite çalışmaları 157
5.3.7. İn vivo deneyler 160
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 167
KAYNAKLAR 169

Sayfa

EKLER..... 187

EK-1. Etik Kurul Onayı..... 188

ÖZGEÇMİŞ..... 190

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 2.1.	Elektro-çekim yönteminde yaygın olarak kullanılan çözücüler	18
Çizelge 2.2.	Oral kullanım için farklı etkin madde ve polimerlerle hazırlanan nanolif çalışmaları örnekleri	21
Çizelge 2.3.	Elektro-çekim işleminde yaygın olarak kullanılan çözücüler ve buharlaşma noktaları	31
Çizelge 3.1.	Sonuç formülasyonların belirlenmesinde tasarımla kalite yaklaşımında işlem basamakları	47
Çizelge 3.2.	Kollicoat MAE 100-55 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları	49
Çizelge 3.3.	Eudragit S100 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları	50
Çizelge 3.4.	İn-vivo çalışmalarda formülasyonların uygulandığı tavşan grupları	74
Çizelge 3.5.	Floresan mikroskopunda görüntülenmek üzere formülasyonların uygulandığı tavşan grupları	77
Çizelge 4.1.	Enoksaparine ait standart doğrunun hazırlanması için kullanılan miktarlar ve absorbansları (n=3, ortalama±SS)	85
Çizelge 4.2.	Miktar tayini yönteminin doğruluk bulguları	86
Çizelge 4.3.	Miktar tayini yönteminin gün içi kesinlik bulguları	87
Çizelge 4.4.	Miktar tayini yönteminin günler arası kesinlik bulguları	87
Çizelge 4.5.	Nanolif hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümü sonuçları (n=3, ortalama±SS)	91
Çizelge 4.6.	Farklı etil alkol: DMF oranları ile hazırlanan Eudragit S100 çözeltisinin iletkenlik ölçüm sonuçları (n=3, ortalama±SS) ve hazırlanan lifin durumu	91
Çizelge 4.7.	Farklı konsantrasyondaki kitozan ve enoksaparin çözeltileriyle hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3,ortalama±SS)	92
Çizelge 4.8.	Ağırlık/ağırlık olarak farklı kitozan/enoksaparin oranlarıyla hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm (n=3, ortalama ±SS)	93

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.9. Enoksaparin çözeltisinin farklı ekleme sürelerinde kitozan çözeltisine ilave edilmesiyle hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3,ortalama ±SS)..... 93

Çizelge 4.10. Farklı karıştırma sürelerinde hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3,ortalama ±SS).... 94

Çizelge 4.11. Farklı karıştırma hızlarında hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI sonuçları (n=3, ortalama ±SS) 94

Çizelge 4.12. Sonuç NP formülasyonunun işlem parametreleri, zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3, ortalama ±SS) 94

Çizelge 4.13. Nanolif formülasyonlarının tabakalarının lif çapı (n=50, ortalama ± SS) 100

Çizelge 4.14. Nanoliflerin porozite değerleri (n=3, ortalama±SS)..... 101

Çizelge 4.15. Nanoliflerin spesifik yüzey alan ölçüm sonuçları (n=3, ortalama)..... 101

Çizelge 4.16. Nanoliflerin temas açısı ölçümleri (n=3, ortalama ± SS) 101

Çizelge 4.17. Nanoliflerin mukoadhezyon testi sonuçları (n=3, ortalama± SS) 102

Çizelge 4.18. NP/NF hazırlanması için hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3, ortalama ±SS) 102

Çizelge 4.19. Nanosistemlerin miktar tayini ve yükleme etkinlikleri (n=3, ortalama± SS) 103

Çizelge 4.20. Nanolif ve nanopartikül formülasyonlara ait in vitro salım sonuçları (n=3, ortalama±SS) 103

Çizelge 4.21. Nanosistemlerin tavşan intestinal dokusundan geçişleri sonucu hesaplanan akı değerleri ve permeabilite katsayıları (n=3, ortalama±SS, p>0,05) 105

Çizelge 4.22. Nanosistemlerin MTT analizi sonuçları (n=3, ortalama ± SH) 107

Çizelge 4.23. Nanolif formülasyonlarının göreceli enoksaparin permeabilitesi (n=3, ortalama ± SS)..... 109

Çizelge 4.24. NF formülasyonunun stabilite çalışmaları sonunda hesaplanan lif çapları (n=50, ortalama±SS, p>0,05) 121

Çizelge 4.25. NP/ NF formülasyonunun stabilte çalışmaları sonunda lif çapı (n=50, ortalama±SS, p>0,05)..... 121

Çizelge 4.26. A1 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS) 122

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.27. A2 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS) 123

Çizelge 4.28. A3 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS) 123

Çizelge 4.29. A4 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS) 124

Çizelge 4.30. A5 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS) 124

Çizelge 4.31. A6 tavşan grubu tavşanların plazmalarındaki aPTT ve antiXa değerleri (n=6, ortalama±SS) 125

Çizelge 4.32. İn vivo çalışmalarda kullanılan tavşan gruplarında aPTTmaks, AUC_{0-t} (aPTT üzerinden) ve bağıl biyoyararlanım değerleri 127

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Heparinin pıhtılaşma şeması 4

Şekil 3.1. Hazırlanan nanosistemlerin şematik görüntüsü..... 55

Şekil 3.2. Tavşan kanlarında aPTT ve anti-Xa tayini için uygulanan işlem basamakları..... 74

Şekil 4.1. Enoksaparine ait erime noktası piki 79

Şekil 4.2. NF formülasyonunda kullanılan polimerlerlerin enoksaparin ile fiziksel karışımlarının gösterdiği DSC pikleri 80

Şekil 4.3. NP/NF formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan polimerlerlerin enoksaparin ile fiziksel karışımlarının gösterdiği DSC pikleri 80

Şekil 4.4. NF ve NP/NF formülasyonlarının DSC pikleri..... 81

Şekil 4.5. Enoksaparine ait IR spektrumu 81

Şekil 4.6. Nanoliflerin tabakalarında yer alan polimerlerin IR spektrumu 82

Şekil 4.7. NF ve NP/NF nanoliflerinin IR spektrumu..... 83

Şekil 4.8. Toluidin mavisi çözeltisinin tek başına verdiği spektrum, 631 nm'de maksimum absorbans göstermiştir..... 83

Şekil 4.9. Boya çözeltisine enoksaparin eklenmesiyle absorbansın düştüğü gösteren spekturum..... 84

Şekil 4.10. Enoksaparinin metakromatik yöntemle çizilen kalibrasyon doğrusu..... 85

Şekil 4.11. Nanolif formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin enoksaparin olmaksızın alınan spektrumlarları 88

Şekil 4.12. İyonik jelasyon yönteminin işlem basamakları 95

Şekil 4.13. NF, NP ve NP/NF formülasyonlarının in vitro salım profilleri (n=3, ortalama±SH) 104

Şekil 4.14. NF, NP ve NP/NF formülasyonlarının intestinal dokusundan geçiş profilleri (n=3, ortalama±SS, p>0,05)..... 105

Şekil 4.15. Tavşan intestinal dokusundan penetrasyon çalışmalarından sonra TEER ölçümleri (n=3, ortalama ±SH, *:p>0,05)..... 106

Şekil 4.16. 4 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı sonuçları (MTT-1) (n=3, ortalama ± SH, *:p>0,05)..... 107

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.17. 2 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı sonuçları (MTT-2) (n=3, ortalama ± SH, *:p>0,05) 108

Şekil 4.18. Etkin madde ve formülasyonların permeabilite katsayıları (n=3, ortalama ± SH, *:p>0,05) 109

Şekil 4.19. 4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen NF formülasyonlarında yapılan miktar tayini sonuçları (n=3, ortalama ± SH, *: p>0,05) 111

Şekil 4.20. 4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen NP/NF formülasyonlarında yapılan miktar tayini sonuçları (n=3, ortalama ± SH, *: p>0,05) 112

Şekil 4.21. 4ºC/ortam nemde bekletilen NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS) 113

Şekil 4.22. 25ºC/%60 bağıl nemde bekletilen NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS) 113

Şekil 4.23. 40ºC/%75 bağıl nemde bekletilen NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS) 114

Şekil 4.24. 4ºC/ortam neminde bekletilen NP/NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS) 114

Şekil 4.25. 25ºC/%60 bağıl nemde bekletilen NP/NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS) 115

Şekil 4.26. 40ºC/%75 bağıl nemde bekletilen NP/NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS) 115

Şekil 4.27. İn vivo çalışmalar sonunda tavşan gruplarına ait aPTT sonuçları (n=6, ortalama ±SH) 125

Şekil 4.28. İn vivo çalışmalar sonunda tavşan gruplarına ait anti-Xa sonuçları (n=6, ortalama ±SH) 126

Şekil 4.29. Floresan madde yüklü formülasyonların tavşanlara oral yoldan uygulanmasından 2 saat sonra ince barsaklardan alınan görüntülerden hesaplanan floresan boya yoğunlukları 137

Şekil 4.30. Floresan madde yüklü formülasyonların tavşanlara oral yoldan uygulanmasından 4 saat sonra ince barsaklardan alınan görüntülerden hesaplanan floresan boya yoğunlukları 138

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim		Sayfa
Resim 2.1.	Heparinin kimyasal yapısı (Akhtar ve diğerleri, 2018)	4
Resim 2.2.	Elektro-çekim işleminin şematik gösterimi (Akhgari ve diğerleri, 2017)	23
Resim 2.3.	Elektrik alanının kritik voltaj seviyesine kadar arttırılmasıyla başlık ucunda Taylor konisinin oluşması (Akhgari ve diğerleri, 2017)	25
Resim 2.4.	Elektro-çekim işleminde nanoliflerin oluşması (Pillay ve diğerleri, 2013)	25
Resim 2.5.	Ko-aksiyal elektro çekim yönteminin şematik gösterimi (Moghe ve Gupta, 2008)	27
Resim 2.6.	Çözelti viskozitesinin artışına bağlı olarak hazırlanan liflerin SEM görüntüleri ve lif çaplarındaki değişim (13-1250 cp) (Haider ve diğerleri, 2018)	29
Resim 2.7.	Farklı elektrik alanlarda hazırlanan liflerin görüntüleri, (A) 20 kV; (B) 25 kV ve (C) 30 kV (Zong ve diğerleri, 2002).	32
Resim 2.8.	Farklı akış hızı kullanılarak hazırlanan liflerin yapıları (A) 20 ml/dak; (B) 75 ml/dak (Zong ve diğerleri, 2002).	33
Resim 2.9.	Farklı mesafeler kullanılarak hazırlanan nanolfilerin çaplarında önemli değişiklik görülmemiştir (a) 8cm; (b) 10cm; (c) 12cm; (d) 15cm (Zhang ve diğerleri, 2005)	34
Resim 2.10.	Naylon nanoliflerin hazırlanmasında farklı mesafelerle hazırlanmış liflerin yapısı a) 2 cm, (b) 0.5 cm (Lu ve diğerleri, 2016)	34
Resim 3.1.	Kullanılan elektro-çekim cihazı (A:tekli başlık B:ko-aksiyel başlık)	48
Resim 3.2.	Viskozite ölçüm cihazı	57
Resim 3.3.	İletkenlik ölçüm cihazı	58
Resim 3.4.	Yüzey gerilimi ölçüm cihazı	59
Resim 3.5.	Kullanılan Franz difüzyon hücresi	64
Resim 3.6.	İn vitro salım çalışmasının yapıldığı su banyosu ve kullanılan Franz difüzyon hücreleri	65
Resim 3.7.	MTT çalışması için nanosistemlerin standartlarının hazırlanışı	67
Resim 3.8.	MTT çalışması sonrası çözünen formazan kristallerinin görüntüsü	68

Resim **Sayfa**

Resim 3.9. Caco-2 Permeabilite çalışmaları sırasında formülasyonların uygulandığı plaka görüntüsü 69

Resim 3.10. Caco-2 çalışmaları sırasında hücrelerin inkübasyon ortamları..... 70

Resim 3.11. Stabilite çalışmaları için hazırlanan tabakalı nanolifler (NF)..... 71

Resim 3.12. Stabilite çalışmaları için hazırlanan nanopartiküller (NP)..... 71

Resim 3.13. Stabilite çalışmaları için hazırlanan nanopartikül yüklü tabakalı nanolifler (NP/NF) 72

Resim 3.14. İn vivo çalışmalarda kullanılan tavşanlar 72

Resim 3.15. İn vivo çalışmalarda kullanılan tavşanların bulundukları ortam 73

Resim 3.16. Hazırlanan nanosistemlerin tavşanlara oral yoldan uygulanması..... 75

Resim 3.17. Tavşanların kulak venlerinden kan örneklerinin alınması..... 76

Resim 3.18. Kullanılan Floresan mikroskopu..... 77

Resim 4.1. Nanoliflerin alt tabakası olan Eudragit S100 tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000) 97

Resim 4.2. Nanoliflerin üst tabakası olan Eudragit S100 tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000)..... 98

Resim 4.3. NF formülasyonunun ara tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000) 99

Resim 4.4. NP/NF formülasyonunun ara tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000)..... 100

Resim 4.5. Nanopartikül süspansiyonunundan alınan TEM incelemesi sonuçları 102

Resim 4.6. 4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen NP formülasyonunun 3. ay sonundaki görünüşü.. 110

Resim 4.7. NF formülasyonuna ait 4°C /ortam neminde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay) 116

Resim 4.8. NF formülasyonuna ait 25°C'de yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay) 117

Resim 4.9. NF formülasyonuna ait 40ºC/%75 bağıl nem'de yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay) 118

Resim **Sayfa**

Resim 4.10. NP/NF formülasyonuna ait 4°C /ortam neminde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay)..... 119

Resim 4.11. NP/NF formülasyonuna ait 25ºC/%60 bağıl nemde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay)..... 120

Resim 4.12. NP/NF formülasyonuna ait 40ºC/%75 bağıl nemde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay) 121

Resim 4.13. FI-NF'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 128

Resim 4.14. FI-NF'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 128

Resim 4.15. FI-NP'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 129

Resim 4.16. FI-NP uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum).... 129

Resim 4.17. FI-NP/NF uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 130

Resim 4.18. FI-NP/NF'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 131

Resim 4.19. Oral FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 132

Resim 4.20. Oral FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 133

Resim 4.21. SC FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 134

Resim 4.22. SC FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 135

Resim **Sayfa**

Resim 4.23. Oral SF'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 136

Resim 4.24. Oral SF uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum) 137

Resim 4.25. FI-NP formülasyonununTEM incelemesi sonucu alınan görüntüleri..... 138

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
λ max	Maksimum absorbans dalga boyu
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µS	Mikrosiemens
a/a	Ağırlık/ağırlık
a/h	Ağırlık/hacim
$aPTT_{maks}$	Maksimum pıhtılaşma süresi
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
C_{maks}	Maksimum plazma derişimi
cPs	Centipoise
dak	Dakika
g	Gram
kV	Kilovolt
mg	Miligram
ml	Mililitre
mPa	Mili paskal
nm	Nanometre
Pa.s	Pascal-saniye
rpm	1 dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş/devir sayısı
s	Saat
sn	Saniye
t_{maks}	Maksimum plazma derişimine ulaşma süresi

Kısaltmalar	Açıklamalar
AA	Asetik Asit
AFH	Anfraksiyone heparin
aPTT	Aktive edilmiş parsiyel tromboplastin zamanı
anti-Xa	Antifaktör Xa
AUC	Area under curve (Eğri altında kalan alan)
DCM	Diklorometan
DMA	Düşük molekül ağırlıklı
DMAc	Dimetil asetamid
DMAH	Düşük molekül ağırlıklı heparin
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle besiyeri
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
İv	İntravenöz
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2yl]-2,5-difenil tetrazolyum bromid
PEO	Polietilen oksit
PDI	Polidispersite indeksi
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
SC	Subkütan
SH	Standart hata
SS	Standart sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEER	Transepitel elektrik direnci
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH), etkinin hızlı ortaya çıkması, tedavinin kesilmesiyle etkinin hızla ortadan kalkması ve plasentadan geçişinin olmaması gibi avantajları nedeniyle derin ven trombozunun, stabil olmayan anginopektorisin, miyokard enfarktüsünün, bypass veya anjiyoplasti sonrası görülen tıkanmaların ve pulmoner embolinin önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan antikoagülanlardır. Bu kullanımlarının yanı sıra, antikoagülan tedavinin, tümör yayılmasını, büyümesini ve metastazı azalttığı son yıllarda gösterilmiştir. Heparin ve DMAH sadece parenteral yolla kullanılmakla beraber alternatif veriliş yolları uzun yıllardır araştırılmaktadır. (R. Paliwal, S. Paliwal, Agrawal, ve Vyas, 2011a; Kurmi, Tekchandani, R. Paliwal ve S. Paliwal, 2015; Yıldız-Peköz ve Özsoy, 2017)

Oral yolla ilaç alınması hastalar için kolay ve en kabul edilen yoldur. Ayrıca parenteral uygulamalar cerrahi müdahaleye neden olur ve hastanın tek başına uygulama yapması daha zordur. Heparin türevlerinin de oral yolla kullanılmasına yönelik çalışmalar oldukça fazladır. Oral verilişine yönelik olarak; emilim arttırıcı ve kompleks yapıcı ajanlarla beraber, vesiküler sistemleri, konjugatları, nanopartikülleri gibi nanotaşıyıcı sistemler hazırlanmıştır (Lee, Nam, Shin, ve Byun, 2001; Hoffart ve diğerleri, 2003; Nallaguntla, Muzib, Aukunuru ve Balekari, 2016). Daha önce hazırlanmış bu sistemlerden farklı olarak tez kapsamında DMAH yüklü nanolifler hazırlanmış ve DMAH türevi olan enoksaparinin oral etkinliğinin arttırılması amaçlanmıştır. Ayrıca nanoliflerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasının kazandıracağı avantajların yanında nanolif ve nanopartikül yapılarının ikili sistem olarak birleştirilmesinin yeni bir yaklaşım olacağı düşünülmüştür. Nanosistemler ile enoksaparinin midenin asit pH'sından korunarak degradasyonun engellenmesi, nanoboyuttaki bu sistemlerin mukus tabakasını aşarak ince barsaktan emiliminin sağlanması, yükünün katyonik hale getirilmesi ve böylece oral biyoyararlanımının artırılması hedeflenmiştir.

Bu tezin amacı, enoksaparinin oral biyoyararlanımını arttırmak amacıyla üç farklı nanosistem geliştirilmesi ve etkinliğinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir. Bu hedef doğrultusunda üç ayrı nanosistem hazırlanmış, karakterizasyon ve karşılaştırılmalı etki değerlendirme çalışmaları yapılmıştır. Hazırlananan nanosistemler:

1. Ara tabakada enoksaparin içeren üç tabakalı nanolifler (NF)
2. Enoksaparin yüklü nanopartiküller (NP)
3. Hazırlanan nanopartiküllerin, ara tabakada yer almasıyla hazırlanan üç tabakalı nanolifler (NP/NF)

Üç tabakalı nanolifler elektro-çekim yöntemi ile üretilmiştir.

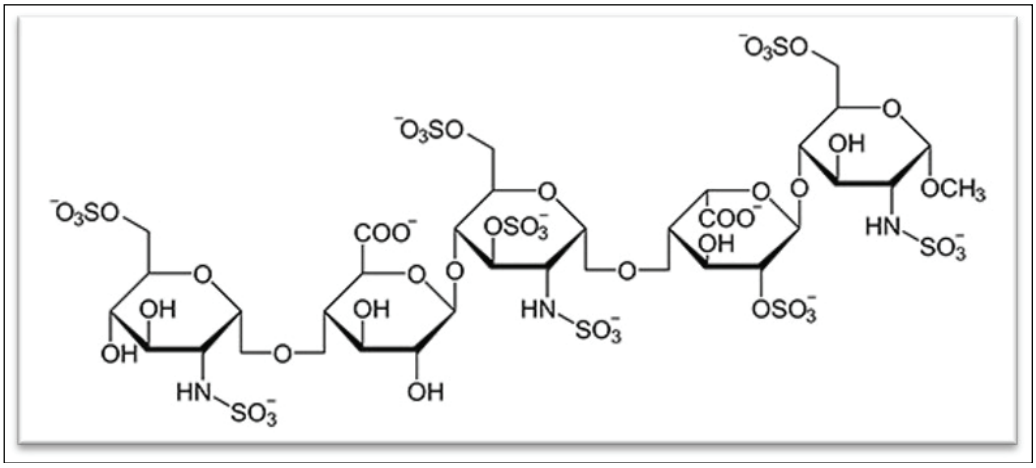
Hazırlanan nanopartiküllerin partikül çapı, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği gibi karakterizasyon çalışmaları yapılarak sonuç nanopartikül formülasyonu (NP) belirlenmiştir. Daha sonra tabakalı nanoliflerin (NF ve NP/NF; lif çapı, spesifik yüzey alanı, porozite, temas açısı, mukoadhezyon ölçümü, tavşan intestinal dokusundan geçiş ve stabilite çalışması gibi) karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca üç sistemin karşılaştırmalı olarak; hücre kültürü ve in vivo çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Heparin ve Antikoagülan Tedavi

Kardiyovasküler morbidite ve mortaliteden sorumlu en önemli nedenlerden biri tromboz oluşumudur. Bu olay; trombositlerin aktivite edilmesine, pıhtılaşma faktörlerinin ve plazmada bulunan özel proteinlerin ve pıhtılaşma faktörlerinin etkileşmesine bağlı olarak yürüyen karmaşık bir zincirdir. Trombositlerin aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerini tetikler ve pıhtı oluşumu sırasında devam eder. Pıhtılaşma faktörlerinin önemli bir bölümü (faktör II, VII, IX, X, XI, XII ve prekalikrein) pıhtılaşma dışında inaktiftirler.

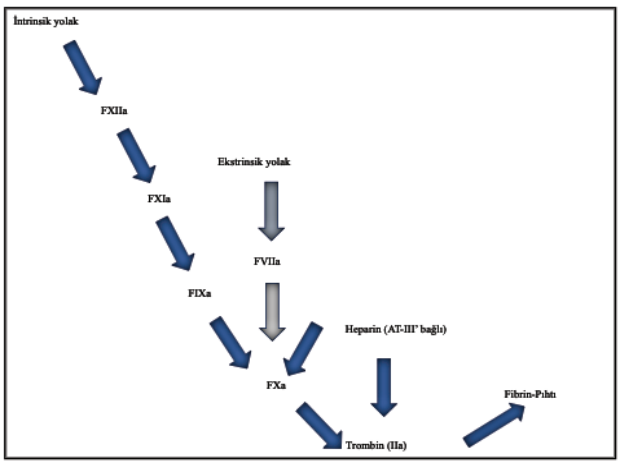
Antikoagülan mekanizmalar, damar endotelinden kaynaklanan antikoagülan maddelere ve plazmada bulunan karaciğer kaynaklı antikoagülan faktörlere (proteinlere) bağlıdır ve bu faktörlerin bazılarının aktive olmasına engel olurlar. Damarların çeperinde ve içinden kan dolaşan yüzeylerde pıhtı oluşmasını ve gelişmesini engelleyen ilaçlara antikoagülan ilaçlar denir (Kayaalp, 1992; O'Reilly, 1995; Komsuoğlu, Tuncer ve Kulan, 2000). Heparin antikoagülan tedavilerde yaygın olarak kullanılan bir makromoleküldür. Molekül ağırlığı 3000-30000 Dalton aralığındadır. Beyaz, renksiz, kokusuz bir tozdur ve suda yüksek oranda çözünür (Hirsh, Anand, Halperin ve Fuster, 2001). 1916 yılında karaciğerden izole edilmiştir ve 1937'den beri derin ven trombozunun ve pulmoner embolinin önlenmesinde ve akut iskemik sendromların tedavisinde kullanılan bir antikoagülandır. Karaciğerde lokalize olması nedeniyle 'heparin' olarak adlandırılmıştır. Kimyasal olarak sülfatlanmış glikozaminoglukanlardan oluşur; sülfat ve karboksil gruplarının varlığı nedeniyle negatif yüklü doğal moleküldür (Neves, Correia-da-silva, Sousa ve Pinto, 2016). Antikoagülan etkisinin yanında, antienflamatuar ve antikanser gibi farklı terapötik etkileri vardır (Akhtar ve diğerleri, 2018) (Resim 2.1). Ticari olarak kullanılan heparin türevleri, farklı molekül ağırlığında molekül grupları içerdiğinden heparin konsantrasyonu ve etkinliği biyolojik ünite ile verilir.



Resim 2.1. Heparinin kimyasal yapısı (Akhtar ve diğerleri, 2018)

Heparin; tromboembolik komplikasyonların profilaksisinde ve tedavisinde, anjina ve myokard enfarktüsünün tedavisinde, hemodiyaliz sırasında pıhtı oluşmasının önlenmesinde kullanılmaktadır (Hirsh ve diğerleri, 2001; Yıldız, Okyar, Baktır, Araman ve Özsoy, 2005).

Heparin, antikoagülan etkisini antitrombin (AT) III aracılığı ile gösterir. Bu etki, AT III'ü aktif duruma getirerek, enzimatik pıhtılaşma faktörlerini (trombin, FXIII, FXI, FIX, FXa, plazmin ve kallikrein) bloke etmesine dayanır. Çeşitli serin proteazlar arasında moleküler bir kompleksin oluşmasını hızlandırır. İnhibisyon reaksiyonu geliştikten sonra heparin, antitrombin III kompleksinden ayrılır ve tekrar kullanılabilir (Kayaalp, 1992; Baughman ve diğerleri, 1998; Hirsh ve diğerleri, 2001). Heparinin pıhtılaşma şeması Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Anfraksiyone heparin (AFH) ve düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH) olmak üzere farklı molekül ağırlığına ait türevleri vardır.



Şekil 2.1. Heparinin pıhtılaşma şeması

2.2. Düşük Molekül Ağırlıklı Heparin (DMAH)

Heparinin farklı tipleri vardır. Ticari preperatlarda kullanılan tipleri; düşük molekül ağırlıklı heparin (DMAH), heparin sodyum, heparin kalsiyumdur (Kayaalp, 1992). DMAH'ler standart heparinlerin bazı dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla standart heparinlerin fraksiyonlanması veya depolimerizasyonu ile elde edilirler ve klinik bakımdan üstünlükleri vardır. DMAH'nin ortalama molekül ağırlığı 5000-8000 Dalton'dur (Kim ve diğerleri, 2015; Neves ve diğerleri, 2016). Bütün DMAH'ler farklı depolimerizasyon yöntemi ile hazırlandığından farmakokinetik özellikleri ve antikoagülan etkinlikleri de değişkenlik gösterir. DMAH'lerin standart heparinden farkı, FXa'yı 1000 kat daha fazla inhibe edebilmeleridir.

AFH ile karşılaştırıldığında, subkütan verilişte DMAH'lerin biyoyararlanımları daha yüksek, yarılanma süreleri ise daha uzundur. Plazma proteinlerine bağlanma oranları ise daha düşüktür. Ayrıca; DMAH'lerin kanama riskinin daha düşük olması olmasından dolayı tercih edilmeye başlanmıştır (Kayaalp, 1992; Thanou, Verhoef, Nihot, Verheijden ve Junginger, 2001a). Ülkemizde bulunan DMAH türevleri; Enoksoparin, Dalteparin, Nadroparin, Tinzaparin ve Parnaparin' dir. Türkiye ilaç piyasasında sübkütan yolla kullanılan enoksaparin içeren preparatların farklı dozları mevcuttur (2000 IU/mL-0,2 mL, 4000 IU/mL-0,4 mL, 6000 IU/mL-0,6 mL, 8000 IU/ mL-0,8 mL, 10000 IU/mL-1 mL).

Genel olarak DMAH'lerin üstünlükleri şöyledir:

- ✓ Yüksek biyoyararlanım ve farmakokinetik etkiye sahip olması,
- ✓ Yarı ömrünün daha uzun olması (5-6 saat),
- ✓ Kanama riskinin az olması nedeniyle hastalara kullanım kolaylığı sağlaması,
- ✓ aPTT'yi (aktive parsiyel tromboplastin zamanı) izleme ve doz ayarlama gereğinin olmaması,
- ✓ Heparine bağlı trombositopeninin daha az görülmesi,
- ✓ Osteoporoz yapıcı etkisinin daha az olması,
- ✓ Tedavinin ayaktan uygulanabilmesi,
- ✓ Bazı ülkelerde hastaneye yatış aranmaksızın da uygulanabildiğinden pahalı olmalarına karşın maliyet açısından daha uygun olmasıdır (İskenderoğlu, 2007; Turaç ve Ünsal, 2020).

Ancak; bütün bu avantajlarına rağmen oral verilişleri sınırlıdır, parenteral yolla kullanılmaktadır (Hallan, Nidhi, Kaur, Jain ve Mishra, 2017). Heparin ve DMAH'lerin oral verilişlerine yönelik çalışmalar oldukça fazladır. Farklı formülasyonlar hazırlanarak oral biyoyararlanımın arttırılması için çalışmalar yapılmıştır.

Tez çalışmamızda DMAH türevlerinden biri olan enoksaparin kullanılmıştır. Enoksaparin, FDA tarafından onay almıştır. Molekül ağırlığı 2000-6000 Dalton arasındadır (O'Reilly, 1995). Enoksaparin miktarı internasyonel ünite (IU) ile belirtilir, buna göre 1mg enoksaparin yaklaşık olarak 100 IU'dur (Hemeda, Kalz, Walenda, Lohmann ve Wagner, 2013).

2.3. Heparin/DMAH'in Oral Verilişi ile İlgili Çalışmalar

Heparin türevlerinin oral biyoyararlanımları sınırlıdır ve asit pH'da, mide ortamında degredasyona uğrarlar. Ayrıca; anyonik özellikte olmaları ve molekül yapıların büyük olmasından dolayı ince bağırsakdan emilimleri sınırlıdır. Ticari olarak heparin içeren preparatlar parenteral kullanılmaktadır. Heparinin oral kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar uzun yıllardır yapılmaktadır. Bu çalışmaların en yaygın olanları:

- ✓ Heparin komplekslerinin hazırlanması, (D. Lee, J. Lee, S. Lee, Kim ve Byun, 2007)
- ✓ Emilim arttırıcı ajanlarla çözeltilerinin hazırlanması (Mousa ve diğerleri, 2007; Salartash ve diğerleri, 1999)
- ✓ Emülsiyonlarının hazırlanması
- ✓ Lipozomal sistemlerin hazırlanması (Nallaguntla ve diğerleri, 2016)
- ✓ Mikro/nano partiküler sistemlerinin hazırlanması (Hales ve diğerleri, 2015; Lavanya Muzib, Jithan, ve Umamahesh, 2017) şeklindedir.

Bu sistemlerde heparinin degredasyonu tam olarak engellenememiş olsa da nanotaşıyıcı sistemlerin kullanılmasıyla pH ve enzimatik degredasyona karşı heparin korunmuş ve ilk geçiş metabolizmasından kaçınabilmiştir. Etkili bir emilimin ve düşük toksisitenin sağlanabilmesi en önemli amaç olduğu için bu stratejilerin modifiye edilmesine devam edilmektedir (Neves ve diğerleri, 2016). Nanoteknolojinin önem kazanmasıyla birlikte heparinin oral verilişinde nanopartiküler sistemlerin kullanılması yaygınlaşmıştır.

Kompleks ve tuzları ile çözelti hazırlanması

Heparinin çeşitli maddelerle komplekslerinin ve tuzlarının hazırlanması ile fiziksel/kimyasal özellikleri değiştirilerek gastrointestinal kanaldan geçişlerinin artırılması amaçlanmıştır. Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) tuzları ile birlikte hazırlanan heparin komplekslerinin oral uygulanmasına yönelik yapılan bir çalışmada, sıçanlara ve köpeklere belirlenen dozlarda verilen komplekslerin pıhtılaşma sürelerini (clotting time) uzattığı görülmüştür. Sıçanlarda, 13,3 dakika, köpeklerde ise 44 dakikanın üzerinde pıhtılaşma süresi elde edilmiştir (Windsor ve Cronheim, 1961).

Başka bir yaklaşımda, açillenmiş non a-aminoasit yapısında olan bileşiklerin heparin ile kompleksleri hazırlanmıştır. Sıçan ve maymunlara oral yoldan verilen bu formülasyonların plazma heparin düzeyini arttırdığı, aPTT ve anti-Xa ölçümleriyle belirlenmiştir. Sonuç olarak heparinin oral verilişinde emiliminin arttığını aPTT sürelerinin yükselmesiyle göstermiştir ve $aPTT_{maks}$ =160 sn bulunmuştur. Bu sonucun heparin ve açillenmiş non-a-aminoasit arasında nonkovalan bir etkileşmeye bağlı olduğu düşünülmüştür (Leone-Bay ve diğerleri, 1998).

Fraksiyonlanmamış heparinin emilimini artırmak amacıyla kolesterol, palmitik asit, laurik asit ve deoksikolik asit (DOCA) ile farklı molar oranlarında konjugatları hazırlanmıştır. DOCA ile hazırlanan konjugatlar, farelerin aPTT değerini diğer konjugatlara göre daha fazla artırmıştır ve etkili pıhtılaşma süresine (aPTT>40 sn) ulaşmıştır. Ayrıca DOCA konsantrasyonunun artışı pıhtılaşma süresini 120-160 sn arasına kadar yükseltmiştir. Araştırmacılar emilimin bu mekanizmayla artmış olmasını ise, pasif transselüler difüzyonun, DOCA-heparin konjugatının hidrofobisitesinin artmasına bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Lee, Kim ve Byun, 2000)

DMAH'nin DOCA ile konjugasyonunun yapıldığı başka bir çalışmada ise, 10mg/kg dozlarda maymunlara kontrol grubu ile birlikte uygulanmıştır. DMAH'nin tek başına verildiği kontrol grubuna göre konjugatının verilmesiyle oral biyoyararlanım %3,5 arttırılmıştır. Bu artışın bir sebebi olarak oluşturan DMAH-DOCA kompleksin ince barsak mukozasınında emiliminde safra asidi taşıyıcılarıyla etkileşmesi gösterilmiştir (Kim ve diğerleri, 2007).

DMAH'nin iki farklı molekül ağırlığına sahip formları (3000 ve 6000 Dalton olmak üzere) ve fraksiyonlanmamış heparin kullanılarak DOCA ile konjugatları hazırlanmış ve sıçanlara oral yoldan verilerek biyoyararlanımın arttırılması amaçlanmıştır. 6000 Dalton molekül ağırlığında olan DMAH-DOCA formülasyonları ile en yüksek antikoagülan etki görülerek %7,8 oral biyoyararlanım elde edilmiştir (Lee, Nam, Shin ve Byun, 2001).

Başka bir çalışmada ise amino kopolimerler ve heparin arasındaki elektriksel etkileşmelerden; küçük, monodispers, stabil kompleksler oluşturarak oral yolla verilebilecek formülasyonlar hazırlanmıştır. Hidrofobisitenin artırılmasının yanında iyonik gücü de artırılarak mideden emilimini sağlayacak kompleksler oluşturulmuştur. Heparin kompleksin içerdiği katyonik blok sayesinde anyonik intesinal mukoza ve mukusdan geçebilmesi sağlanmıştır (Dufresne ve Leroux, 2004).

DMAH, DOCA ile birlikte konjuge edilerek mikroemülsiyon sistemi halinde sıçanlara oral verilmiş ve ven trombozu ile pulmoner emboliye olan etkisi incelenmiştir. Trikaprilin ve surfaktan karışımı (Tween 80 ve Span 20) ile DMAH-DOCA konjugatının sulu çözeltisi kullanılarak mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Bu şekilde konjugasyon yapıldığında, DMAH nin tek başına uygulandığı hayvan gruplarına göre $AUC_{0\text{-}t}$ ve C_{maks} gibi farmakokinetik parametreleri belirgin olarak değişmemiş ancak, barsak lümeninde mukus ile konjugatın etkileşimi sonucu oral biyoyararlanım %1,5 oranında artmıştır (Sang ve diğerleri, 2005).

Safra asidi türevlerinden olan katyonik deoksikoliketilamin (DCEA) kullanılarak DMAH ile komplekslerin hazırlandığı bir çalışmada ise, değişen oranlarda DCEA/DMAH ile hazırlanan formülasyonların oral verilişi sonrasındaki intestinal emilimleri ve biyoyararlanımları incelenmiştir. DCEA'nın lipofilisiteyi artırarak gastrointestinal kanaldan emilimi sağladığı ve bu sayede en yüksek %3,23 oral biyoyararlanıma ulaşıldığı görülmüştür Ayrıca DCEA/DMAH oranının artışı $AUC_{0\text{-}t}$ ve C_{maks} değerlerini değiştirmiştir (Lee ve diğerleri, 2007).

Son yıllarda heparinin anti-anjiyogenez etkisine bağlı olarak kanser tedavisinde kullanımına yönelik yapılan çalışmalar artmıştır. DMAH'nin oral verilmesinin amaçlandığı bir çalışmada safra tuzlarının absorbsiyon artırıcı etkisinden yararlanarak taurokolat ve DOCA ile DMAH konjugatları hazırlanmış ve tümör büyümesine etkileri araştırılmıştır. DOCA ve taurokolat

sayesinde, konjugatın hidrofobisitesi ve ince barsakdan absorbsiyonunun artması, tümör büyümesinin 14 gün boyunca küçülmesi ile açıklanmıştır. Hazırlanan formülasyonlarla kemoterapide uzun süreli ve güvenli tedavinin sağlanabileceği düşünülmüştür (Alam ve diğerleri, 2014).

Heparinin tümör büyümesine etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada ise, taurokolik asit-heparin konjugatlarına dosetaksel bağlanmıştır. Kompleks yapının oral absorbsiyon çalışmaları için Caco-2 hücreleri kullanılmıştır. GI sistemden ilacın geçişi sırasında safra tuzlarının absorbsiyon artırıcı mekanizması sayesinde intestinal mukozadan emilimin gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. İn vivo çalışmalar barsağın ileum kısmında daha çok emilme olayının olduğunu göstermiştir. Heparin ve dosetaksel'in sinerjik etkisiyle beraber bu şekilde formüle edildiğinde antikanser etki gösterebileceği ve oral verilişinin mümkün olacağı sonucu çıkarılmıştır (Khatun ve diğerleri, 2014).

Partiküler sistemlerin hazırlanması

Bu amaçla; lipozom, mikroküre, nanopartikül gibi ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Heparinin lipozom formülasyonlarının hazırlandığı bir çalışmada, DMAH türevlerinden enoksaparin kullanılarak film hidrasyon yöntemiyle lipozomlar hazırlanmıştır. İn vivo hayvan deneyleri sonucunda, negatif yüklü Eudragit polimeri ile lipozomlar kaplandığında oral heparin çözeltisine göre pıhtılaşma süresini 3,22 kat arttırmıştır (Nallaguntla ve diğerleri, 2016).

Diğer bir çalışmada, biyoparçalanan bir polimer olan PCL ve PLGA ile, biyoparçalanmayan pozitif yüklü Eudragit RS ve RL polimerleri tek başlarına ve kombinasyonları halinde kullanılarak heparin içeren nanopartiküller hazırlanmıştır. Heparinin tek başına ve polimerik sistem içerisinde hazırlanıp oral verişinden sonra in vitro ve in vivo olarak tayinler yapılmıştır. Tavşanlara oral uygulanan nanopartiküllerin RS-RL ve PLGA polimerlerini içerenlerin verildiği tavşan gruplarında en yüksek anti-Xa (0,16 IU/ml) değerine ulaşıldığı görülmüştür (Jiao ve diğerleri, 2002).

DMAH'nin oral verilişi amacıyla nanopartikül ve mikropartikül formülasyonlarının hazırlandığı bir çalışmada, nanopartiküller, S/Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmış ve polimer olarak biyoparçalanan polimerlerden PCL

ve PLGA; biyoparçalanmayan polimerlerden Eudragit RS ve RL ayrı ayrı ve kombinasyonları olarak kullanılmıştır. Eudragit pozitif yüklü olduğu için ilaç yükleme oranı diğer polimerlere göre daha yüksek bulunmuş ve DMAH'nin salımı tüm polimerlerle artmıştır ve PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerde %40-50 aralığında en yüksek etkin madde salımı gözlenmiştir (Hoffart ve diğerleri, 2002). Bir diğer çalışmada ise, yine aynı polimerler kullanılarak DMAH'nin mikroenkapsülasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada da enkapsülasyon etkinliği polimerin pozitif yüküyle ilgili bulunmuştur. Bunun sebebi pozitif yüklü polimerle negatif yüklü heparinin etkileşmesi olduğu sonucuna ulaşılmıştır En fazla ilaç salımı ise yine PLGA ile hazırlanan formülasyonda olmuştur (Hoffart ve diğerleri, 2003).

DMAH'nin farklı polimerler kullanılarak nanopartiküllere yüklendiği bir çalışmada Eudragit RS ve PCL kullanılmıştır. DMAH, 200 ve 600 anti-Xa IU/kg dozda tavşanlara oral yoldan uygulanmıştır ve antikoagülan etkinin süresi sekiz saate kadar uzatılmıştır ayrıca en yüksek anti-Xa değeri olarak 1,8 IU/mL'ye ulaşılmıştır (Hoffart ve diğerleri, 2006).

Heparin ve DMAH'nin aljinat/kitozan/PEG mikroküreleri hazırlandıktan sonra enterik kaplama yapılarak, oral veriliş için GIS'de korunması ve biyoyararlanımın arttırılması amaçlanmıştır. Kaplama materyali olarak kitozan ve selüloz asetat ftalat kullanılmıştır (CAP). Asit ortamda mikroküre lerden heparin salımı düşük bulunurken, pH 7,4 fosfat tamponunda yaklaşık %70 oranında salım gözlenmiştir. Hazırlanan enterik kaplı formülasyonlardan heparin salımının pH'ya bağlı olduğu ve uzun süreli antikoagülasyon etkinin sağlanabileceği ileri sürülmüştür (Chandy, Rao, Wilson ve Das, 2002).

DMAH'nin oral verilişi için denenmiş başka bir yol da aljinat jel boncukların hazırlanmasıdır. Formülasyon içerikleri DMAH/aljinat 1:2 olacak şekilde seçilmiş ve 0.5M kalsiyum klorürde 15 dakika bekletilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği, şişme oranları ve partikül çapı ölçümleri de yapılıp SEM kullanılarak yüzey morfolojileri incelenmiştir. Tavşanlara oral yoldan verilen DMAH içeren aljinat boncuklar, oral yoldan verilen DMAH çözeltisi ve iv verilen çözeltisi ile in vivo etkinliği karşılaştırılmıştır. 5000 IU/kg dozda tavşanlara oral verilen aljinat boncukların C_{maks} değeri 0,3 IU/mL bulunmuş ve iv uygulamaya göre bağıl biyoyararlanımı %69,3 bulunmuştur. Çözelti halinde hazırlanan DMAH'nin ise oral yoldan verildiğinde antikoagülan etkisi görülmemiştir (Iskenderoğlu, Erdoğan, Acartürk ve Bardakçı, 2013).

Jelatinin 2 farklı türüyle DMAH içeren mikropartiküller, kompleks koaservasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. DMAH olarak seçilen tinzaparin yüksek enkapsülasyonla biyolojik aktivite kaybı olmadan mikropartiküllere yüklenebilmiştir. İn vivo deneylerle ilaç salımının pH'ya bağımlı olarak gerçekleştiği ve bağıl biyoyararlanımın %4,2 olduğu sonucuna varılmıştır (Lamprecht, Ubrich ve Maincent, 2007).

Aljinat-hidroksipropilselüloz kombine polimerleri ile hazırlanan mikroboncuklar da heparinin kontrollü salımı için kullanılmıştır. Farklı sıcaklıklardaki etkin madde salım profilleri çıkarılmıştır. Bunun sonucunda, heparinin enkapsülasyon etkinliği yüksek bulunmuş ve sıcaklığa bağlı olarak heparinin salımı kontrol altına alınarak uzun süreli antikoagülan etki elde edilmiştir (Karewicz ve diğerleri, 2010).

Bir başka çalışmada DMAH'nin önce lipit konjugatları ve daha sonra katı lipid nanopartiküler (KLN) sistemleri hazırlanarak oral biyoyarlanımınının arttırılması hedeflenmiştir. DMAH farklı zincir uzunluğuna sahip doymuş lipitlerle (stearik asit, palmitik asit, miristik asit) konjuge edilmiştir. Heparin konjugatları da çözücü difüzyon yöntemi ile KLN'lere yüklenmiştir. Farklı lipitler kullanılmasına rağmen bütün konjugatların hidrofobisiteleri ve KLN halinde oral verilmeleri sonucunda en yüksek aPTT süresine 40 sn'nin üzerinde, anti-Xa değerine ise 0,5'in üzerine ulaşılarak %3,6 bağıl biyoyararlanım elde edilmiştir. Lipitlerin non toksik, biyouyumlu olmalarından dolayı GIS'de herhangi bir iritasyon görülmemiştir (R. Paliwal, S. Paliwal, Agrawal, ve Vyas 2011b).

Enoksaparin ile yapılan bir çalışmada, aljinat/kitozan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Önce enoksaparin içeren kitozan nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanmış daha sonra aljinat ile kaplanarak çekirdek-kabuk formülasyonlar hazırlanmıştır. Kitozanın katyonik yüklü olması ve mukoadhezif özellikte olmasından dolayı heparinin intestinal bariyerleri geçebilmesi amaçlanmıştır. Kaplama sayesinde GIS'de korunan nanopartiküllerin biyoyararlanımları artarak 0,37 IU/mL anti-Xa değerine ulaşılmıştır (Bagre, K. Jain ve N. Jain, 2013).

Enoksaparinin kitozan türevi olan trimetilkarboksi kitozan ile nanopartiküllerinin hazırlandığı çalışmada, enoksaparin konsantrasyonunun, partiküllerin karakteristik özelliklerine olan etkisi incelenmiştir. Caco-2 hücreleri ile yapılan permeabilite çalışmaları

sonucunda enoksaparin yüklü nanopartiküllerin geçişinin %16'ya yükselmesi nedeniyle, nanopartiküllerin oral yoldan verildiğinde paraselüler geçişinin artacağı sonucu çıkarılmıştır (Mahjub ve diğerleri, 2016).

Mukoadhezif polimer kullanılarak formülasyonların hazırlanması

FDA onaylı bir poliakrilat türevi olan Carbopol 934P, DMAH'nin intestinal absorbsiyonunu artırmak için kullanılmıştır. DMAH'nin tek başına verildiğinde anti-Xa seviyesi sıçanlarda terapötik seviyenin altında bulunurken, Carbopol 934P ile beraber çözelti halinde verildiğinde sıkı bağlantı noktalarının (tight junction) açılması sonucunda heparinin permeabilitesinde artış gözlenerek anti-Xa değeri 0,3 IU/mL değerine yükselmiştir (Thanou, ve diğerleri, 2001a).

Diğer bir çalışmada ise DMAH'nin, kitozan türevi olan mono-N-karboksimetil kitozan'ın (MKK) düşük ve yüksek viskoziteli iki formu ile verilerek intestinal emiliminin artırılması amaçlanmıştır. Caco-2 hücreleri ile yapılan permeasyon çalışmaları sonucunda düşük viskoziteli MKK ile hazırlanan formülasyonlardan DMAH'nin permeabilitesinin daha fazla olduğu görülmüştür ayrıca bu sayede anti-Xa değeri 0,4 IU/mL'e ulaşmıştır (Thanou, Nihot, Jansen, Verhoef ve Junginger, 2001b).

Mukoadhezif tiyollenmiş polimerler kullanılarak heparinin non-invaziv olarak mideye hedeflendirilmesinde biyoyararlanım artışı başarılı olmuştur. Molekül ağırlıkları 3000 ve 6000 Dalton olan DMAH'ler kullanılarak mini tabletler hazırlanmıştır. Sıçanlarda yapılan in vivo deneylerde, tiyollenmiş polikarbofil ile hidroksietilselüloz taşıyıcı matriks olarak kullanılmış ve karşılaştırılmıştır. Tiyollenmiş polikarbofil ile hazırlanan formülasyonlarda 3000 Dalton molekül ağırlığına sahip DMAH ile hazırlanan sistemlerde en yüksek bağıl biyoyararlanıma (%10,7) ve C_{maks} (0,9 IU/mL) değerine ulaşılmıştır. gösterdiği farmakokinetik çalışmalarla kanıtlanmıştır (Schmitz, Leitner ve Bernkop-Schnürch, 2005)

Mukoadhezif polimer olan kitozan ve N-trimetil kitozan (TMC) kullanılarak DMAH'nin oral biyoyararanımını artırmaya yönelik yapılan bir çalışmada iki formülasyonun da oral verilişinde bozunmadan etki gösterdiği ve TMC ile hazırlanan nanopartiküllerin simüle gastrik sıvı ve simüle barsak sıvısında stabil kaldığı ve C_{maks}=0,36 IU/mL bulunmuştur (R. Paliwal, S. Paliwal, Agrawal ve Vyas, 2012).

Bir başka çalışmada pH'ya duyarlı ve mukoadhezif özellik gösteren nanopartiküler sistemlerle DMAH'nin oral verilmesi amaçlanmıştır. Tiyoglikolik asit (TGA) ile kitozan kovalan bağlanmıştır. Nanopartiküller tiyollenmiş kitozan ve pH duyarlı olan HPMC-ftalat kullanılarak iyonik çapraz bağlanma yöntemi ile elde edilmişlerdir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu yapıldıktan sonra, DMAH'nin salımının pH ile kontrol edildiği ve in vitro testler sonucunda nanopartiküllerin asidik mide ortamında stabil kaldığı bulunmuştur. Tiyol grubunun bağlanması intestinal mukozadan geçişi de artırmıştır. Mukoadhezif özellik kazandırılan oral verilen DMAH nanopartikülleri ile $aPTT_{maks}$ =75,3 sn elde edilmiştir (Fan, Xing, Zheng, Sun ve Liang, 2016).

Emilim arttırıcı ajanların kullanılması

Oral heparin uygulanmasında emilimi arttırmak amaçlı yapılan çalışmalarda N-[8-(2-hidroksibenzoil) amino] kaprilat (SNAC) (asetilenmiş bir aminoasit) (Gonze ve diğerleri, 2000; Malkov, Wang, Dinh, ve Gomez-Orellana, 2002; Rivera, Leone-Bay, Paton, Leipold, ve Baughman, 1997; Salartash ve diğerleri, 1999), N-[10-(2-hidroksibenzoil) amino] dekanooat (SNAD) (Gonze ve diğerleri, 1998), Labrasol (Prasad ve diğerleri, 2004), L-arjinin (Motlekar, Srivenugopal, Wachtel ve Youan, 2006), polikarbofil-sistein (Kast, Guggi, Langoth ve Bernkop-Schnürch, 2003), Phytolacca americana'dan elde edilen saponinler (Cho ve diğerleri, 2003) ve sodyum kapratın (Motlekar, Srivenugopal, Wachtel ve Youan, 2005) kullanıldığı görülmüştür. Heparinin SNAC ile birlikte hazırlanmış oral sıvı dozaj şekli, Emisphere firması tarafından geliştirilmiş olmakla birlikte henüz ticari bir ürüne dönüşmemiştir.

İkili matris sistemlerin hazırlanması

Aspirin ve heparin, kitozan/polietilen vinil asetat ko-matris sistemine uzatılmış etki sağlamak amacıyla yüklenmiştir. Aspirinin heparinle sinerjik etki göstermesi ve bu sayede antikoagülan etkinin artması amaçlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar spesifik biyolojik aktivitelerinden dolayı antikoagülan özellik göstermişlerdir (Vasudev, Chandy ve Sharma, 1997). Aynı ekibin yaptığı diğer çalışmada, heparin ve aspirinin sinerjik etkisinden yararlanmak amacıyla kitozan/polietilen vinilaktat ko-matris sistemleri hazırlanıp, uzun süreli etki sağlayarak perikardial kalsifikasyonu önlemedeki etkisi incelenmiştir. Heparinin

antitrombotik etkisinin yanında, bu şekilde kullanımının da olabileceği sonucu çıkarılmıştır Vasudev, Chandy, Sharma, Mohanty ve Umasankar, 2000).

2.4. Nanolifler

2.4.1. Tanımı ve özellikleri

Nanolif, çapı 1 μm'den az olan lifler için kullanılan bir terimdir. Son yıllarda nanoteknolojinin gelişmesiyle daha çok gündeme gelmiştir. İnsan saç teli ile kalınlık açısından karşılaştırıldığında yaklaşık onbin kat daha incedir. Bu küçük boyutlarından ve özel polimerik yapılarından dolayı yüzey alanları geniş ve yüksek gözenekli bir yapıya sahiptirler.

Nanoliflerin hazırlanmasıyla çeşitli etkin madde grupları, peptid/protein yapılı etkin maddeler, antikorlar ve küçük moleküllerin nanoliflerinin hazırlanması mümkün olmuştur (Yu ve diğerleri, 2009; Malik, Garg, Goyal ve Rath, 2015). Nanoliflerin en önemli avantajları; nano boyutta olmalarından dolayı yüzey alanlarının geniş olması, yüksek poroziteye sahip olmaları, ilaç salım şeklinin ayarlanabilmesi, çoğu etkin madde için uygun olması ve hedeflendirme çalışmalarında kullanılabilmesidir. Nanolifler oral, intravenöz, subkütan, transdermal, implante sistemler gibi hazırlanarak farklı veriliş yollarıyla kullanılabilirler. Ayrıca; antibiyotikler, antikanser ajanlar, antiinflamatuvar etkin maddeler, proteinler ve DNA gibi kompleks moleküllerin nanolifler halinde hazırlanmaları mümkün olmuştur (Pillay ve diğerleri, 2013).

2.4.2. Nanoliflerin kullanım alanları

- ✓ Elektronik ve optik alanlarında sensör ve elektrot hazırlanmasında
- ✓ Kendini temizleyen materyallerin hazırlanmasında kullanılmaktadır
- ✓ Koruyucu kıyafetlerin ve filtrasyon ürünlerinin yapılmasında
- ✓ Lif destekli kompozit ürünlerin hazırlanmasında
- ✓ Doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak
- ✓ İlaç taşıyıcı sistem olarak
- ✓ Hedeflendirme çalışmalarında (Moghe ve Gupta, 2008; Pillay ve diğerleri, 2013; Lu ve diğerleri, 2016).

Nanoliflerin hazırlanması sayesinde, birden fazla etkin maddenin tek bir dozaj formu içerisinde verilmesi, çözünürlük sorunu olan etkin maddelerin çözünürlüklerininin arttırılması ve yüksek yükleme etkinliği sağlanabilir (Akhgari, Shakip ve Sanati, 2017).

Nanolifler, sentetik ve doğal polimerler kullanılarak çeşitli yöntemlerle hazırlanırlar. (Chronakis, 2010). Sentetik polimerlerden; polistiren, polikaprolakton, polietilen oksit, poli (metil metakrilat), naylon 6, polivinil klorür, polikarbonat, polivinil alkol, polivinil pirolidon vb. kullanılırken; doğal polimerlerden selüloz türevleri, aljinat, jelatin, ipek, kitozan, dekstran en çok kullanılan polimerlerdir (Akhgari ve diğerleri, 2017; Schiffman ve Schauer, 2008).

2.4.3. Nanoliflerin karakterizasyonu

Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları, görünüşlerinin incelenmesi, mekanik özelliklerinin incelenmesi, etkin maddenin veriliş yoluna göre seçilen karakterizasyon çalışmalarını kapsar.

Nanoliflerin görünüşlerinin incelenmesi

Nanoliflerin mikroskobik olarak görünüşlerinin incelenmesi için en çok SEM ve TEM cihazı kullanılmaktadır bu cihazların yanında optik (ışık) mikroskopu ve atomik kuvvet mikroskobu da (ATM) kullanılmaktadır. Bu ölçümler genel olarak; lif çapı, por çapı ve dağılımı ve spesifik yüzey alanı gibi özelliklerin belirlenmesinde kullanılır. Bu cihazlara ek olarak; spesifik yüzey alanı, temas açısı ölçüm cihazları ve civa porozimetresi kullanılır.

Taramalı elektron mikroskopu (SEM)

Nanoliflerin lif çapı hesaplanması ve çap dağılımı SEM görüntüleri alınarak paralel yapılmaktadır. Nanoliflerin görüntüleri yüksek büyütme oranlarında net bir şekilde alınabilirken lif çapı ölçümleri de farklı programlar kullanılarak ölçülebilmektedir. Ayrıca lif çap dağılımı için 100 lifin çapı ölçülerek histogramlar çıkarılabilir. Elektronların itici reaksiyonunu engellemek için numune yüzeyi altınla kaplanır. SEM kullanırken vakum kullanıldığı için numunenin zarar görebilmesi dezavantajdır. Yüksek netlik derinliği sayesinde farklı mesafeler arasında bile görüntü verdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır (Sirc ve diğerleri, 2012).

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM)

Nanoliflerin TEM görüntülerinin alınması numunenin hazırlanması yönünden SEM cihazından farklıdır. TEM ölçümleri, çok az miktarda, ince lifin özel ızgaralar üzerinde alınmasıyla yapılır. Genellikle çekirdek-kabuk yapılı liflerin, iki farklı tabakasını görüntülemek ve lif kalınlıklarını belirlemek için kullanılır (He ve diğerleri, 2006).

Optik (Işık) mikroskopu

Kullanımı kolay, basit ve ulaşması kolay bir cihaz olması açısından nanoliflerin görünüşlerinin incelenmesinde yaygın olarak optik mikroskop kullanılmaktadır. Çok küçük nanoliflerin görüntülenmesine imkan vermemesine rağmen hazırlanan liflerin ön incelenmesi için kullanılmaktadır. Numune hazırlanması kolaydır ve numunlerin kuru olması zorunlu değildir (Reneker, Kataphinana, Theronb, Zussmanb ve Yarin, 2002; Sirc ve diğerleri, 2012).

Atomik kuvvet mikroskobu (ATM)

Çözünürlük özelliği çok yüksek olan bir mikroskop çeşididir. Diğer yöntemlerden farklı olarak; ıslak nanoliflerin görüntüleri alınarak, vakum ya da çözme işlemi yapmadan incelenebilmektedir (Sirc ve diğerleri, 2012).

Spesifik yüzey alanı ölçüm cihazı

BET yüzey alanı ölçümü olarak da literatür de geçer. Ölçüm cihazını bulan araştırmacılarının baş harflerinden bu ismi almıştır (Brunauer, Emmett ve Teller, 1938). Ölçümün prensibi, numune yüzeyine gaz adsorbsiyonu olmasıdır. Adsorbe olan gaz miktarıyla ölçümler sayısal değerlere dönüştürülür. Nanoliflerin por çapı ve por çapı dağılımı ölçümleri için ve liflerin spesifik yüzey alan ölçümleri için kullanılmaktadır.

Temas açısı ölçümü

Nanoliflerin yüzeyinin hidrofilik ve hidrofobik oluşunun belirlenmesi için temas açısı ölçümleri yapılmaktadır. Yüzeyin ıslanabilirliği nanolifin çözünebilmesi için önemliyken, hidrofobik özellikte olması da parçalanmadan uzun süre kalması açısından önemlidir. Temas

açısının 90°'den düşük olması yüzeyin hidrofilik, 90°'den büyük olması ise hidrofobik olduğunu gösterir (Ahmed, 2017). Temas açısı ölçümün lifin farklı bölümlerinden yapılarak ortalama bir değere ulaşılmalıdır. Homojen dağılımlı olmayan liflerde ölçümler daha fazla tekrarla yapılmalıdır.

Nanoliflerin mekanik özelliklerinin incelenmesi

Nanoliflerin kullanım amacına göre optimum mekanik özellikleri değişebilir. Haricen kullanılan nanolifler için mekanik özelliklerin belirlenmesi daha önemlidir. Bu özellikler, nanoliflerin uzama-gerilme özelliklerini, çekme-kopma dirençlerini ve yapışma özelliklerini kapsar (Lee, H. Kim, Ryu, K. Kim ve Choi, 2003).

2.4.4. Nanoliflerin hazırlanmasında kullanılan bileşenler

Polimerler

Nanoliflerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler ayrı ayrı veya karışımları olarak kullanılmaktadır. Kullanılan polimerler biyouyumlu, biyoparçalanır olmalı ve sitotoksik olmamalıdır. Ayrıca mekanik özellikleri elektro-çekim işlemi için uygun olmalıdır (Pelipenko, Kocbek ve Kristl, 2015).

Doğal polimler

Doğal polimerler biyolojik özelliklerinin uygun ve biyoparçalanır olmalarından dolayı yaygın olarak kullanılır. Kitozan, selüloz, hyalüronik asit, aljinat gibi polisakkaritler; kollajen, jelatin, fibrinojen gibi protein yapılı doğal polimerler yaygın olarak kullanılmaktadır (Kulkarni, Bambole ve Mahambar, 2010; Cui, Chang ve Dalton, 2011; Pelipenko ve diğerleri, 2015).

Sentetik polimerler

Mekanik ve degredasyon özelliklerinin geliştirilmesi yönünden avantajları olan sentetik polimerler de elektro-çekim işleminde kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerden en yaygın kullanılanlar, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PLGA), polikarbonatlar, poli-kaprolakton (PCL), poliüretan (PU), polivinil pirolidon (PVP) ve polivinil alkol (PVA)

örnek olarak verilebilir (Zagho ve Elzatahry, 2016; Kamble, Sadarani, Majumdar ve Bhullar, 2017).

Çözücüler

Elektro-çekim yönteminde kullanılacak polimer, besleme ünitesine uygun çözücü içinde çözündükten sonra konulmaktadır. Bu yüzden elektro-çekim işlemlerinde kullanılan çözücü özellikleri, lif yapısı ve işlem parametreleri açısından önemlidir. Tek çözücü ya da çözücü karışımları kullanılmaktadır. Çizelge 2.1'de, çalışmalarda kullanılan polimerler ve çözücülerin örnekleri verilmiştir (Pillay ve diğerleri, 2013; Mishra ve diğerleri, 2019).

Çizelge 2.1. Elektro-çekim yönteminde yaygın olarak kullanılan çözücüler

Polimer	Çözücü
Selüloz asetat	Aseton/Dimetilasetamid
Polikaproloktan	Diklorometan/metanol Kloroform/metanol
Polivinilpirolidon	Distile su/ etil alkol
Polivinilfenol	Tetrahidrofuran
Polivinil alkol	Distile su
Polietilen ko-vinil asetat	Kloroform
Poliamid	Dimetilasetamid
Kitozan	Asetik asit Dimetilaset amid
Polilaktik asit	Kloroform/dikloroetan
Jelatin	Trifluoroetanol
Poliakrilik asit	Distile su/etil alkol
Polikarbonat	Dimetilformamid/tetrahidrofuran
Polistren	Tetrahidrofuran Toluen

Diğer yardımcı maddeler

Elekto-çekim işlemini stabil hale getirmek ve nanoliflerin yapısını geliştirmek amacıyla yardımcı maddeler polimer çözeltilerine eklenebilir. Sürfaktanlar ve tuzlar bu amaçla kullanılırlar. Sodyum klorür, tetrametil amonyum klorür kullanılan tuzlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Triton X-15, anyonik sodyum dodesilsülfat ve katyonik dodesiltrimetilamonyum bromür bu amaçla kullanılan sürfaktanlardır (Zheng ve diğerleri, 2014; Esentürk, Erdal ve Güngör, 2016).

2.4.5. Eczacılık alanında kullanılan nanolifler

Dermal ve transdermal uygulamalar

Birçok farklı polimer ve etkin madde grubu kullanılarak transdermal ürünler nanolif yapısında hazırlanabilmektedir. Uygulanacak bölgeyle uyumlu hazırlanabilmesi, yüzey alanının geniş olması ve gözenekli yapısı sayesinde transdermal uygulamalar için uygun yapıları vardır. Yara tedavi edici ürünlerin hazırlanmasında da yaygın olarak nanolifler kullanılmaktadır. Özellikle nanoliflerin esnek yapıları ve poröz yapıları bu kullanım için avantaj sağlamaktadır. Ayrıca geniş yüzey alanları sayesinde ekstraselüler matrisi taklit edebilirler (Tort ve Acartürk, 2015; Mohammadian ve Eatemadi, 2017).

Doku mühendisliği ve biyomedikal uygulamalarda

Nanolifler, doğal dokuların yerine kullanılabilecek yapay geçici doku destekleri olarak yaklaşık 30 yıldır kullanılmaktadırlar (kıkırdak, kemik, atardamar, kalp ve sinir dokuları gibi) (Süpüren Mengüç ve diğerleri, 2007). Doğal hücre dışı matris (ECM), glikozaminoglikan zincirinin iç içe geçmiş liflerinden ve çeşitli protein fibrillerden oluşmaktadır. Doku iskeleleri, ağları destekler ve ECM'nin yapısı gibi gözenekli bir yapıya sahip olmaları gerekir. Ayrıca, biyouyumlu ve biyoparçalanır olup, uygun mekanik özellikleri taşımaları gerekir (Can ve Ersoy, 2014). Nanoliflerin taşıdığı avantajlar doku mühendisliğinde kullanımlarını sağlamıştır. Doğal/sentetik polimerler ile hazırlanarak hem mekanik olarak hem de biyolojik olarak uyumlu lifler elde edilebilmektedir (Sill ve Von Recum, 2008).

Ko-aksiyel elektro çekim yöntemiyle çekirdekte termoplastik poliüretanın (TPU), kabuk kısmında ise kolajenin olduğu nanolifler hazırlanarak biyomedikal implant olarak kullanımı amaçlanmıştır. Nanoliflerin enzim degredasyonunu azaltması ve hücrelerin nanoliflerin bulunduğu ortamda çoğalması amaçlanmıştır (Chen ve diğerleri, 2010).

2015 yılında yapılan bir çalışmada ise pamuk selülozdan mekanik olarak sağlam nanoliflerin hazırlanması amaçlanarak doku mühendisliğinde kullanımı değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları sonucunda iskelet sisteminde bu liflerin kullanımının uygun olduğu görülmüştür (He ve diğerleri, 2015).

İlaç taşıyıcı sistemler

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanolifler, etkin maddeyi yüzeylerinde adsorbe ederek veya bir ya da daha fazla etkin maddeyi taşıyacak şekilde kullanılabilirler. Yirmi yıla yakın süredir nanolifler farmasötik teknoloji alanında ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır (Kenawy ve diğerleri, 2002).

- ✓ Kontrollü salım sistemlerinde,
- ✓ Kolona özgü sistemlerin hazırlanmasında,
- ✓ Protein ve DNA taşınmasında,
- ✓ Antibiyotiklerin ve antikanserler ilaçların aşınmasında,
- ✓ İmplant hazırlanmasında,
- ✓ Enzim enkapsülasyonu için,
- ✓ Çekirdek-kabuk yapısıyla etkin maddenin korunması,
- ✓ Çok katlı yapıların hazırlanması,
- ✓ Oral ilaç verilişi için kullanılmaktadır.

Nanoliflerin en önemli avantajları ilacın çözünürlük/çözünme hızında artış sağlaması, lokal ve sistemik uygulanabilmesi ve kullanılan polimerler ile salım hızının ayarlanabilmesidir (Taepaiboon, Rungsardthong, Supaphol, 2006; Tungprapa, Jangchud ve Supaphol, 2007; Sharma ve diğerleri, 2014). Daha önce yapılan bir çalışmada ibuprofenin polivinil pirolidon (PVP) nanoliflere yüklenmesiyle amorf yapıya dönüşmesinin çözünürlüğünü artırdığı ve lifin sekiz saniyede parçalandığı gösterilmiştir (Yu ve diğerleri, 2009). Benzer bir çalışmada ketoprofenin çözünürlüğünü arttırmak için nanolifleri hazırlanmıştır ve 30 saniye içinde suda bekletilen liflerden madde salımı gerçekleşmiştir (Yu, Bradford-White, Shen, Zhang ve Zhu, 2010). Özellikle oral verişi için daha birçok çalışmada etkin maddelerin çözünürlük özelliklerinin değiştirilmesi amacıyla nanolifler hazırlanmıştır (Goonoo, Bhaw-Luximon ve Jhurry, 2014). Nanoliflerin oral kullanımları için yapılmış çalışma örnekleri, etkin madde ve polimeri ile birlikte Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Oral kullanım için farklı etkin madde ve polimerlerle hazırlanan nanolif çalışmaları örnekleri

Polimer	Etkin madde	Kaynak
Polivilin pirolidon	parasetemol	(Illangakoon ve diğerleri, 2014a)
Polivilin pirolidon	aseklofenak	(Sipos, Kósa, Kazsoki, Szabó ve Zelkó, 2019)
Polivilin pirolidon/etil selüloz	ketoprofen	(Yu, Branford-White, Shen, Zhangve Zhu, 2010)
Polivilin pirolidon/zein	ketoprofen	(Jiang, Mo ve Yu, 2012)
Polivinil alkol	nebivolol	(Sipos ve diğerleri, 2016)
Polivinil alkol	kafein	(Li ve diğerleri, 2013)
Polikaprolakton	deksametazon	(Hsu ve diğerleri, 2016)
Polikaprolakton	ampisilin	(Sultanova, Kaleli, Kabay ve Mutlu, 2016)
Eudragit L	mebeverine	(Illangakoon, Nazir, Williams ve Chatterton, 2014b)
Eudragit S	5-fluorourasil	Illangakoon, Yu, Ahmad, Chatterton ve Williams, 2015)
Eudragit S	budesonid	(Bruni ve diğerleri, 2015)
Eudragit S/Eudragit RS	indometazin	(Akhgari, Heshmati ve Makhmalzadeh, 2013)

2.4.6. Nanolif üretiminde kullanılan yöntemler

Nanolif hazırlanmasında kullanılan yöntemler; çekme, faz ayırımı, kendiliğinden oluşma, şablon sentezi ve elektro-çekim yöntemleridir (Schiffman ve Schauer, 2008; Akhgari ve diğerleri, 2017).

Çekme (drawing) yöntemi

Polimer çözeltisi hazırlandıktan sonra özel yapılı bir mikropipet (µm boyutunda) daldırılır ve belirli bir hızda geri çekilir. Bu sırada liflerin toplanması sağlanır. Liflerin oluşması sırasında çözücü yüksek yüzey alanı/hacim oranından dolayı buharlaşır. Basit bir işlem olmasına rağmen çoklu üretim zordur (Xing, Wang ve Li, 2008).

Kendiliğinden oluşma (self assembly) yöntemi

Küçük çaplı liflerin eldesinin mümkün olduğu bu yöntem ucuz ve uygulanması kolaydır. Bir cihaza ihtiyaç duyulmadan, kimyasal madde çözeltileri hazırlanır ve aralarındaki etkileşmeden dolayı lifler oluşur. Her madde için uygun değildir (Liu, Xiao, Guo, 1996).

Faz ayırımı (phase seperation) yöntemi

Polimer uygun çözücüde çözüldükten sonra jelleşmesi sağlanır, daha sonra çözücü uzaklaştırılır. Kalan jel alınarak dondurma işlemi yapılır. Bu işlemden sonra kurutma yapılarak lifler elde edilir (Nayak, Padhye, Kyratzis, Truong ve Arnold, 2012)

Şablon sentez (template synthesis) yöntemi

Üzerinde silindirik porların bulunduğu özel nanoporöz membranlar kullanılarak lifler elde edilir. Polimer çözeltisi bu membrandan geçerken, membranın yüzeyinde elektrokimyasal etkileşmeler oluşur. Bu sayede lifler oluşturulur. Kullanılan şablonun gözenek boyutuna göre lif çapı belirlenir (Nayak ve diğerleri, 2012).

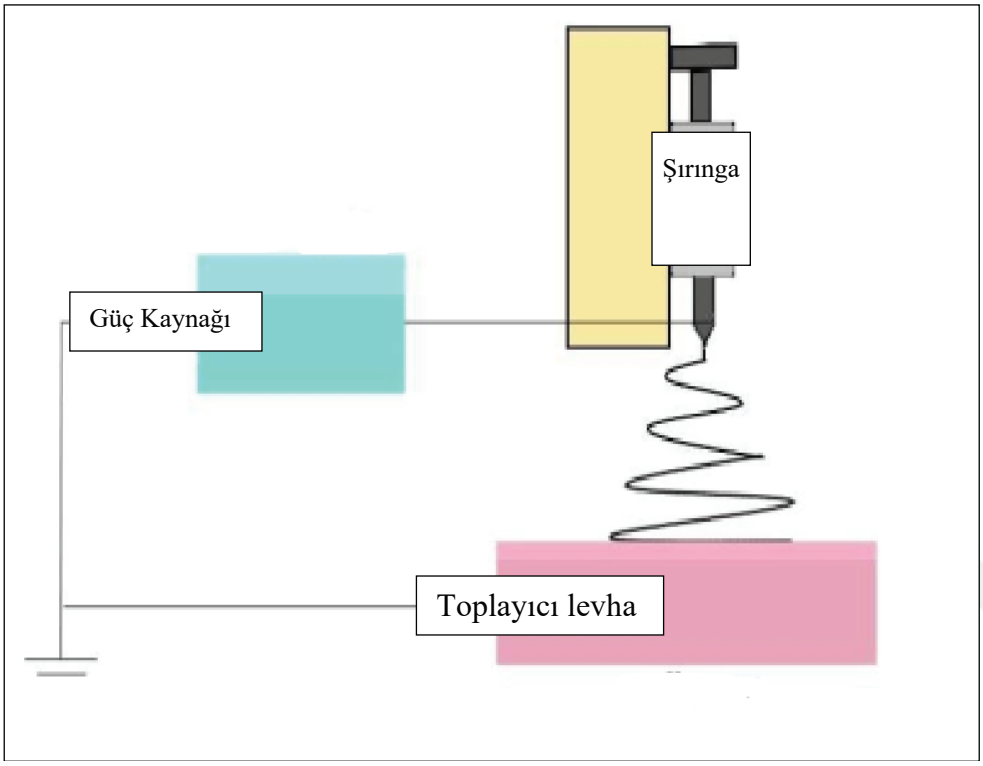
Eriyik üfleme (meltblown) yöntemi

Erimiş haldeki polimer başlık ucundan püskürtülürken sıcak havaya maruz kalması sonucu lif oluşumu gerçekleşir. Çözücü gerektirmeyen bir yöntemdir. Düzensiz dağılımlı lifler oluşur. Her polimerin eriyebilme özelliği olmadığı için kullanılacak maddeler sınırlıdır (Ellison, Phatak, Giles, Macosko ve Bates, 2007).

Elektro-çekim yöntemi

Bu yöntemde mekanik kuvvetler yerine elektriksel alan kuvvetlerinden yararlanılır ve elde edilen liflerin çapları 100 nm-1µm arasında değişir. Elektro çekim ile elde edilen lifler; geniş yüzey alanı ve yüksek gözenekliğe sahip, ayarlanabilir por çapı ve yüzey özellikleri sayesinde yüksek permeabilite ve elektriksel yükleri tutma özellikleri gösterir. Ayrıca, elektro çekim, tek basamakta üretim yapılabilmesi ve ekonomik bir yöntem olmasından dolayı uygulanması kolaydır (Chronakis, 2010).

Uygulanan yüksek voltaj ile besleme ünitesi ve toplayıcı levha arasında elektriksel alan yaratılır ve besleme ünitesinden polimer damlacıkları levhaya doğru püskürtülür. Bu şekilde toplayıcı levhaya giden damlacıkların çapı giderek azalır ve çözücünün de buharlaşmasıyla nanometre boyutundaki lifler oluşur (Resim 2.2) (Huang, Zhang, Kotaki ve Mamakrishna, 2003; Hu ve diğerleri, 2014; Akhgari ve diğerleri, 2017).



Resim 2.2. Elektro-çekim işleminin şematik gösterimi (Akhgari ve diğerleri, 2017)

Nanoliflerin oluşumu çok hızlı bir şekilde gerçekleşir ve nanoliflerin çapları ile yüzey alanları arasında ters orantı vardır (Sharma ve diğerleri, 2013; Goonoo ve diğerleri, 2014). Elektro-çekim yöntemi ilk olarak 1897 de Rayleigh'in çalışmalarında görülmüş ve ilk nanolif üretimi ise 1934 yılında Formhals tarafından gerçekleştirilerek patent alınmıştır (Bhardwaj ve Kundu, 2010; Pillay ve diğerleri, 2013).

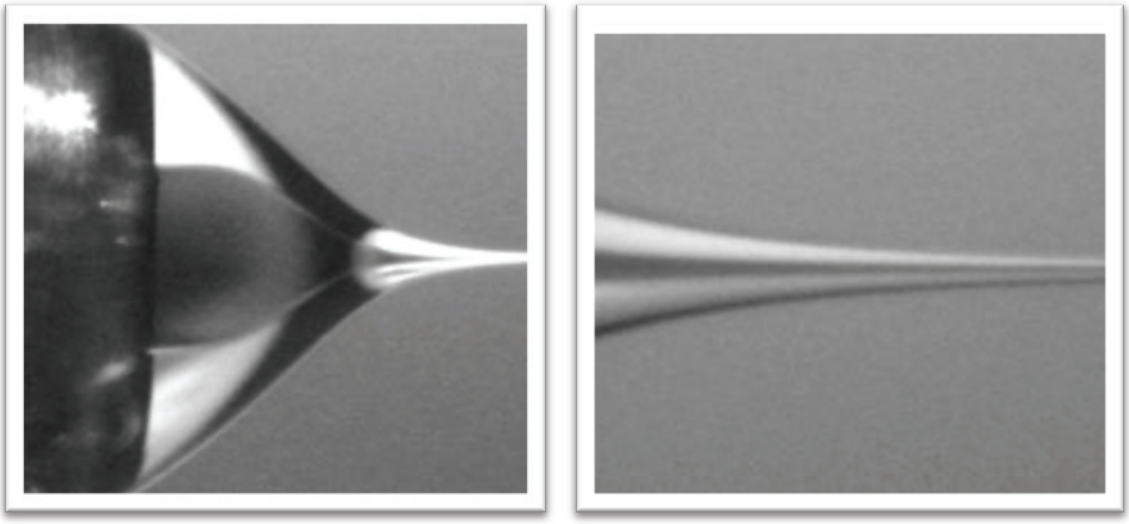
Polimer çözeltisi özellikleri (molekül ağırlığı, viskozitesi, iletkenliği, dielektrik sabiti, yüzey gerilimi), işlem koşulları (uygulanan voltaj, toplayıcı levha ile polimer çözeltisi arasındaki mesafe, çözeltinin püskürtülme hızı, polimerin geçtiği tüpün ucunun genişliği, toplayıcı levha hareketi gibi), ortam koşulları (bağıl nem, sıcaklık, hava akımı, basınç) gibi faktörler nanoliflerin morfolojisini etkiler (Sharma ve diğerleri, 2014).

Elektro-çekim düzeneği genel olarak 4 kısımdan oluşur

1. Yüksek voltaj güç kaynağı
2. Nanolif haline getirilecek çözeltiyi içeren şırınga ve pompa sistemi
3. Şırınga ucundaki metalik başlık
4. Nanolifin toplanacağı kısım (levha)

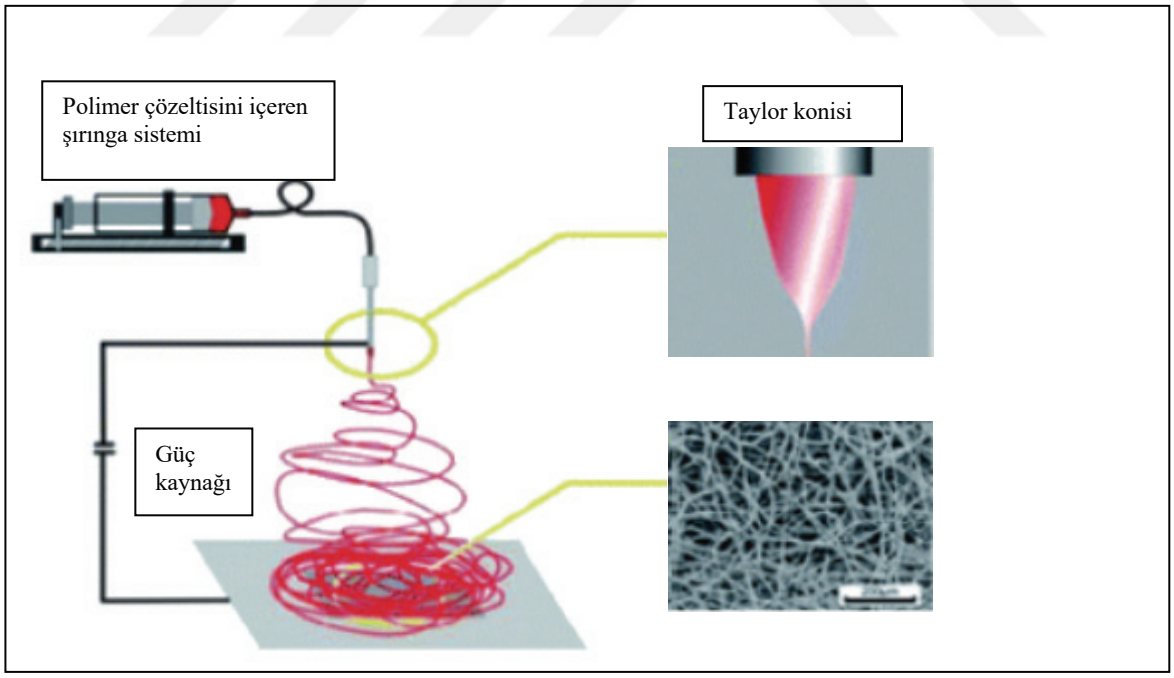
Elektro-çekim yönteminde, polimer veya polimer/etkin madde karışımı uygun çözücüde çözülerek şırıngaya alınır. Pompa sistemiyle şırınganın ucundan püskürtülen çözeltiye elektrik alan uygulanarak lif çekimi sağlanır.

Elektro-çekim cihazı kapalı bir sistem olarak düşünüldüğünde, bu sistemde; şırıngada bulunan çözelti ve toplayıcı levha olmak üzere iki ayrı elektrot vardır. Elektro-çekim işleminde, pompanın itmesiyle şırıngada devamlı bir basınç oluşarak çözeltiyi başlık ucuna doğru iter, elektrik alan uygulanmasıyla püsküren çözeltinin yüzeyinde bir elektrik alan oluşur. Çözeltinin üzerinde oluşan karşıt yükler bir gerilim oluşturur, bu gerilim yüzey geriliminin üzerinde ise çözelti elektrik alan yönünde akmaya başlar. Elektrik alan yeterli yüksekliğe (kritik voltaj seviyesi) ulaştığı anda, başlık ucundaki küresel damlacığı Taylor konisi (Taylor Cone) haline getirir. Bu voltaj değeri kullanılan çözelti içeriğine göre değişkenlik gösterir. Taylor konisinin oluşması lif çekiminin stabil olarak gerçekleşmesi ve devamlı olabilmesi açısından önemlidir. Taylor konisi oluştuktan sonra voltajdaki artışla elektrik yüklenmiş jetler, toplayıcı kısma doğru hareket eder. Şırınga ucundan ayrılan jet hızlanır çözücünün buharlaşması ile toplayıcı üzerine nanoliflerin kuru şekilde oluşması sağlanır. Elektriksel alanın, kritik seviyeye kadar arttırılması çözelti jetinin üzerindeki yüklerin birbirini itmesini sağladığı için nanoliflerin boyutunun küçülmesini sağlar. Kritik voltaj seviyesinin üzerinde elektrik alan uygulandığında ise Taylor konisi küçülür, polimer jeti akışkan hale gelir, lif çapı büyümeye başlar ve liflerin üzerinde damlacıklar oluşur (Resim 2.3) (Deitzel, Kleinmeyer, Harris ve Beck Tan, 2001; Loscertales ve diğerleri, 2002; Reneker ve Yarin, 2008; Akhgari ve diğerleri, 2017; A. Haider, S. Haider ve Kang, 2018)



Resim 2.3. Elektrik alanının kritik voltaj seviyesine kadar arttırılmasıyla başlık ucunda Taylor konisinin oluşması (Akhgari ve diğerleri, 2017)

Elektriksel alan kullanılan çözeltinin yüzey geriliminin üstüne çıktığı anda yüklenmiş olan çözelti jeti hızlı bir şekilde yönlenir ve aynı yüke sahip partiküllerin birbirini itmesi ilkesinden, oluşan jet lif şeklini alarak toplayıcı levhada birikir (Resim 2.4).



Resim 2.4. Elektro-çekim işleminde nanoliflerin oluşması (Pillay ve diğerleri, 2013)

Liflerin toplandığı levha sabit ya da hareketli/dönen bir düzleme sahip olabilir. Sabit levha üzerinde rastgele yerleşimli lifler oluşurken, hareketli levha kullanılarak yönlendirilmiş lifler hazırlanabilir. Bu şekilde farklı özelikteki toplayıcı levhaların kullanımı nanoliflerin bazı

özelliklerini etkilese de iki levha tipi de yaygın olarak kullanılmaktadır (Doğan ve Başal, 2009; Cui ve diğerleri, 2011).

Elektro-çekim yöntemi ile nanolifler hazırlanırken, oluşan liflerin özellikleri (çap, en, uzunluk gibi) işlem parametreleri, ortam şartları, kullanılan maddelerin özelliklerinin değiştirilmesi ile kontrol edilebilir. Nanoliflerin por genişliği ve dağılımı, hidrofobik özellikleri ve yüzey alanı gibi özellikleri lif çapı ve morfolojisi ile değişmektedir (Ray, Chen, Li, N. Nguyen ve H. Nguyen, 2016). Nanoliflerin çapları azaldıkça yüzey alanları artmaktadır. Elektro-çekim yöntemiyle hazırlanan nanoliflerin yüzey alanları, diğer yöntemlerle hazırlanan nanoliflerin yüzey alanlarından genellikle büyüktür (Ko, 2004).

Elektro-çekim yöntemi, klasik elektro çekim (single- tek başlıklı) ve ko-aksiyel (iki başlıklı) elektro-çekim yöntemi olarak ikiye ayrılır.

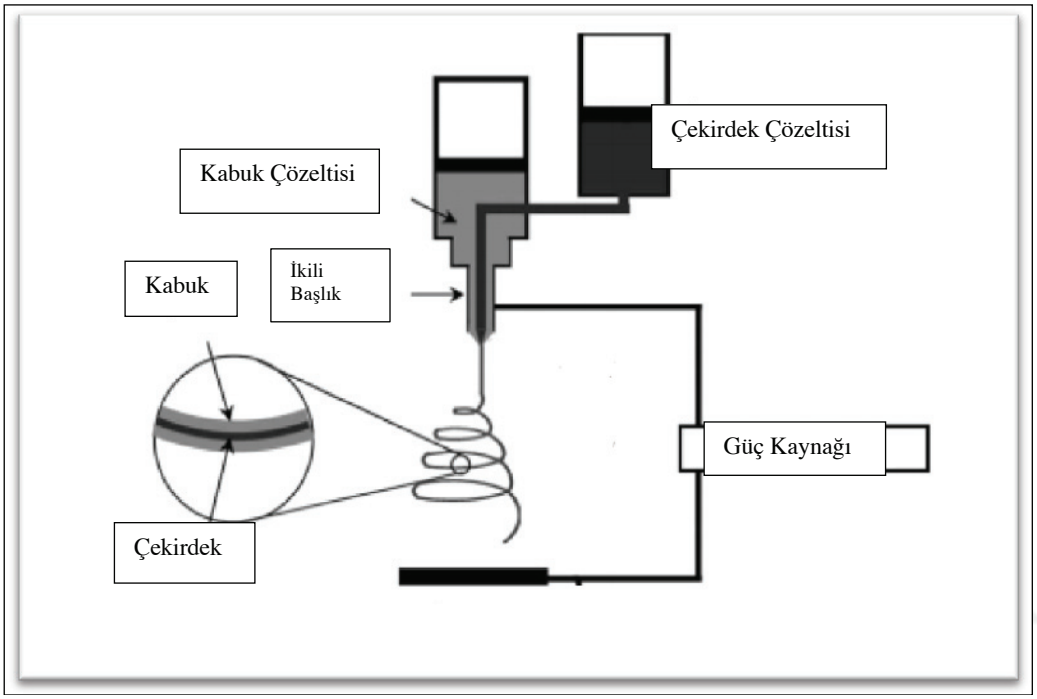
Klasik (tek başlık) elektro-çekim yöntemi

Klasik elektro-çekim düzeneği, yüksek voltaj sağlayan bir güç kaynağına bağlı başlık, toplayıcı levha ve çözeltiyi püskürten şırıngadan oluşur. Şırınganın çözeltiyi püskürtmesiyle elektrik alanda oluşan jetler lif halinde toplanır (Niu ve diğerleri, 2019). Klasik elektro-çekim yönteminin en önemli özelliği tek başlık bulunması ve bir polimer çözeltisi kullanılarak elektrik alan altında liflerin hazırlanmasıdır (Zhang, Yuan, Wu, Han ve Sheng, 2005; Sill ve Von Recum, 2008). Bu tekli başlık tek bir enjektör kullanılarak besleme ünitesine bağlıdır, bu sayede lif çekim işlemi gerçekleşir. Doku mühendisliğinde, yapay damarların hazırlanmasında, ağızda dağılan lif formlarının hazırlanmasında yaygın olarak klasik elektro-çekim yöntemi kullanılmaktadır (Sill ve Von Recum, 2008).

Ko-aksiyal elektro-çekim yöntemi

Klasik elektro-çekim yönteminden farklı olarak iki farklı besleme ünitesi ve özel bir ko-aksiyal başlık kullanılır böylece iki çözeltinin aynı anda püskürtülmesi sağlanır (Lu ve diğerleri, 2016). Ko-aksiyal elektro-çekim işlemi de elektrik alan altında ve kapalı bir sistem halinde gerçekleştiği için klasik elektro-çekim yöntemini etkileyen bütün parametreler ko-aksiyal elektro-çekim yöntemini de etkiler. İki farklı polimer çözeltisi kullanıldığı için, çekirdek-kabuk yapısındaki nanolilflerin hazırlanması mümkün olur. Tek basamakta

gerçekleşen bu işlemde aynı anda çözeltiler püskürtülür ve aynı klasik yöntemde olduğu gibi başlık ucuna elektrik alanın uygulanmasıyla iki çözeltiyi de içeren Taylor konisi oluşur. Elektrik alan kritik voltaj seviyesine ulaştığı anda ise dış kısmını kabuk çözeltisi, iç kısmını çekirdek çözeltisini oluşturacak şekilde nanolifler elde edilir (Resim 2.5) (Moghe ve Gupta, 2008).



Resim 2.5. Ko-aksiyal elektro çekim yönteminin şematik gösterimi (Moghe ve Gupta, 2008)

Ko-aksiyal elektro-çekim yönteminin kullanılmasının en önemli nedenleri; çekirdek yapısında bulunan etkin madde/maddeleri kabukta bulunan polimerle korumak ve iki farklı etkin madde ile lif çekebilmektir. Çekirdek ve kabuk çözeltisinin akış hızlarının ayarlanması klasik elektro-çekim yöntemine göre daha zordur, bu yüzden çözeltilerin reolojik özelliklerinin benzer olması gerekmektedir.

Ko-aksiyal elektro-çekim yöntemi; doku mühendisliğinde yamaların hazırlanmasında, uzatılmış/kontrollü salım yapan liflerin hazırlanmasında, mide pH'sına duyarlı etkin maddelerin kolona hedeflendirilmesinde kullanılmaktadır (Elahi, Lu, Guoping ve Khan 2013; Li, Yang, Wang ve Yu, 2017).

Elektro-çekim işlemine etki eden faktörler

Elektro-çekim işlemine etki eden faktörlerin optimize edilmesi poröz, pürüzsüz ve kuru liflerin elde edilmesi açısından önemlidir (Akhgari ve diğerleri, 2017). Genel olarak elektro-çekim işlemine etki eden faktörler 3 ana başlık altında toplanmaktadır.

- Çözelti özellikleri,
- İşlem parametreleri,
- Ortam şartları.

Çözelti özellikleri; çözeltinin viskozitesini, polimerin molekül ağırlığını- konsantrasyonunu, elektrik iletkenliğini (kondüktivite), yüzey gerilimini kapsarken, işlem parametreleri ise, uygulanan elektrik alan, toplayıcı levha ve enjektör başlığı arasındaki mesafe ve pompanın besleme hızını kapsamaktadır. Ayrıca ortam sıcaklığı ve nemi de nanolif morfolojisini ve özellikleri etkileyen önemli parametrelerdir (Bhardwaj ve Kundu, 2010; Akhgari ve diğerleri, 2017; Haider ve diğerleri, 2018).

Çözelti özellikleri

Çözelti özellikleri; polimer konsantrasyonu, çözücü tipi, çözelti iletkenliği, çözücü özellikleri (buhar basıncı, buharlaşma noktası, yüzey gerilimi vb.) dahil olmak üzere pek çok faktörü kapsar.

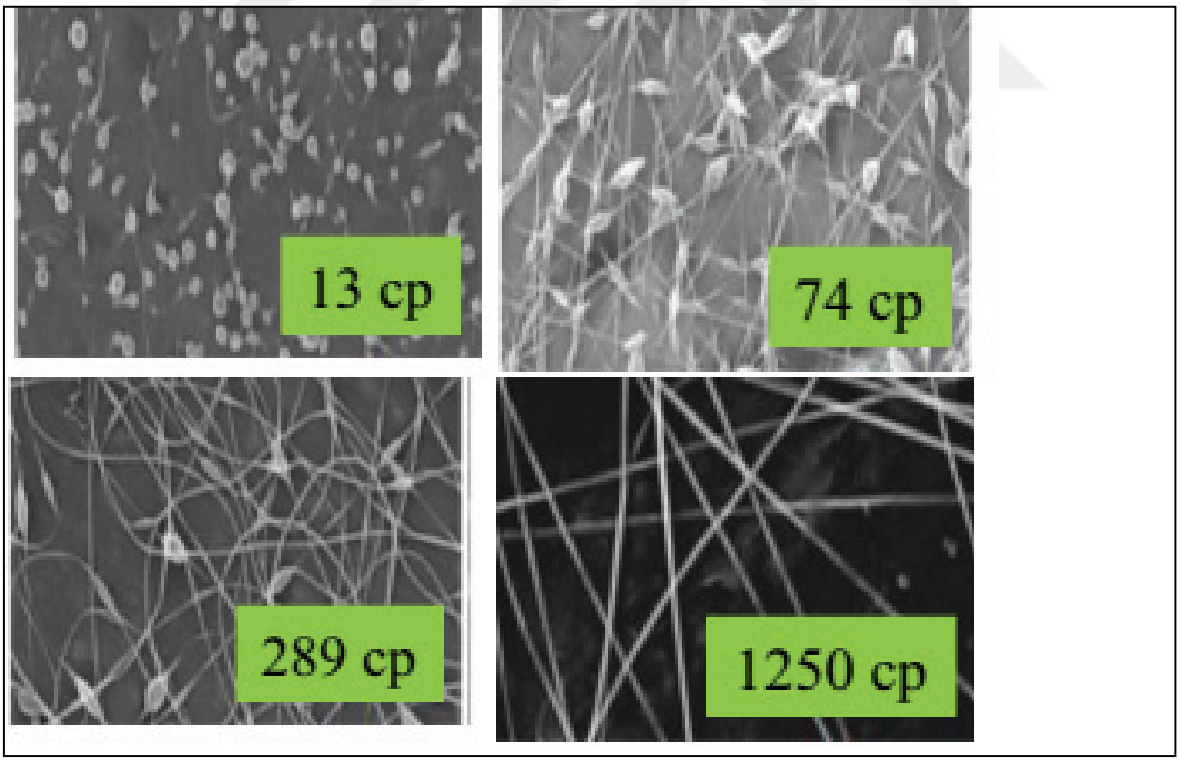
Elektro-çekim işleminde kullanılacak polimer/polimerlerin tamamen çözündükleri bir çözücüde hazırlanması gerekir. Doğal, yarı-sentetik veya sentetik polimerler kullanılarak nanolifler hazırlanmaktadır. Sentetik polimerler doğal polimerlere göre daha esnek yapılara ve modifikasyonlara sahiptir. Buna karşın doğal polimerler; biyouyumlu ve daha güvenlidir.

Doğal polimerlere örnek olarak; kitozan, jelatin, selüloz, ipek fibroin, kollajen; sentetik polimerlere örnek olarak ise; poliglikolid (PGA), polilaktid-ko-glikolid (PLGA), polikaprolakton (PCL), poli-L-laktid (PLLA), poliüretan (PU), polietilenoksit (PEO), polivinilpirolidon (PVP), polivinil alkol (PVA), hidroksipropil metilselüloz (HPMC), metakrilik asit kopolimerleri (Eudragit), örnek olarak verilebilir. Kullanılan polimer ve uygun çözücü seçimi elektro-çekim işlemi ve nanolif özellikleri açısından önemlidir

(Akhgari ve diğerleri, 2017; Bhardwaj ve Kundu, 2010; Hu ve diğerleri, 2014; Thakkar ve Misra, 2017).

Kullanılan polimerin molekül ağırlığı çözeltinin viskozitesini ve konsantrasyonunu etkiler; viskozitenin ve konsantrasyonun çok yüksek olması elektro-çekim işlemini engellerken, çok düşük viskoziteli çözeltilerin lifi elde edilemeyebilir. Uygun viskozitenin sağlanması nanoliflerin boyutları ve şekilleri için çok önemlidir. Genel olarak konsantrasyonun artması lif çapını arttırır (Chronakis, 2010).

Farklı polimer konsantrasyonları kullanılarak hazırlanmış liflerin çaplarının kıyaslandığı pek çok çalışma vardır. Bu çalışmalarda polimer konsantrasyonunun artışı lif çapını arttırmıştır. Konsantrasyonun artışı, viskoziteyi arttırarak lifi oluşturacak çözelti jetini etkiler ve çapın artmasına neden olur (Huang ve diğerleri, 2006; Van der Schueren, Steyaert, Schoenmaker ve Clerck, 2012). Resim 2.6'da polietilen oksit konsatrasyonunun artışının lif çapına olan etkisi gösterilmiştir (Haider ve diğerleri, 2018).



Resim 2.6. Çözelti viskozitesinin artışına bağlı olarak hazırlanan liflerin SEM görüntüleri ve lif çaplarındaki değişim (13-1250 cp) (Haider ve diğerleri, 2018)

Çözeltinin yüzey gerilimi, lif yapısının oluşmasına yetecek elektriksel alan uygulandığında Taylor konisinin oluşmasında ve stabl şekilde liflerin oluşumunda etkilidir. Yüksek yüzey

gerilimi lif yapısının oluşmasını engellerken, düşük yüzey gerilimi ise liflerin ıslanmasına neden olabilir. Her durumda yüzey gerilimi liflerde damla oluşturmayabilir, düşük voltaj kullanılarak liflerin oluşması sağlanabilir (Bhardwaj ve Kundu, 2010; Hohman, Shin, Rutledge ve Brenner, 2001).

Elektro-çekim işleminde elektrik alan uygulandığı için kullanılan çözeltinin iletkenliği çok önemlidir. Polimerlerin çoğu elektriği iletir ancak kullanılan çözücünün iletkenliği düşük olabilir. İletkenliğin yüksek olması elektro-çekim işlemini kolaylaştırır. Bu amaçla çeşitli iyonlar ve farklı çözücüler kullanılmaktadır (Bhardwaj ve Kundu, 2010). İletkenlik sadece Taylor konisi oluşumunu etkilemez, lif çapını da etkilemektedir. Eğer iletkenlik düşük olursa, Taylor konisi oluşması için yeterli yük birikimi zorlaşır ve lif oluşumu gerçekleşmeyebilir. İletkenliğin arttırılmasıyla stabil jetler lif oluşturmaya başlar ve lif çapı da azalır (Haider ve diğerleri, 2018; Sun ve diğerleri, 2014; Zhang ve diğerleri, 2005). İletkenliği arttırmak için polimer çözeltisine çeşitli iyonlar ve tuzlar eklenebilmektedir. Farklı tuzların polimer çözeltisine eklenmesiyle hazırlanan liflerin çaplarının azaldığı ve pürüzsüz yüzeyler elde edildiği görülmüştür (Zong ve diğerleri, 2002).

Polimer çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan çözücü seçimi de elektro-çekim işlemi için çok kritik bir parametredir. Bu seçimde iki önemli nokta vardır: a) polimerin çözücüdeki çözünürlüğü b) çözücünün buharlaşma noktası.

Çözücünün buhar basıncı, uçuculuğu, buharlaşma noktası ve yüzey gerilimi gibi özellikleri lif oluşumunu doğrudan etkiler. Lif çekimi sırasında lif oluşabilmesi için, başlık ucunda Taylor konisi oluştuktan sonra, elektriksel voltajın artışıyla birlikte çözücünün tamamen buharlaşması ve lif yapısını ıslatmaması beklenir. Genellikle buharlaşma noktası düşük olan çözücüler kolay uçtukları için kuru liflerin oluşmasını kolaylaştırırlar. Ancak bazen de hızlı buharlaşma sonucu şırınga ucunda polimerin birikmesiyle tıkanıklıklar gözlenebilir. Buharlaşma noktası yüksek çözücüler kullanıldığında ise liflerin ıslanma sorunları görülebilir (Haider ve diğerleri, 2018) Farklı çözücü ve çözücü karışımlarının kullanılmasıyla hazırlanan liflerin yapılarının incelendiği birçok çalışma vardır (Son Youk, Lee ve Park, 2004; Yang ve diğerleri, 2004; Kanani ve Bahrami, 2011). Elektro-çekim işleminde yaygın olarak kullanılan çözücüler ve buharlaşma noktaları Çizelge 2.3'de gösterilmiştir (Pillay ve diğerleri, 2013).

Çizelge 2.3. Elektro-çekim işleminde yaygın olarak kullanılan çözücüler ve buharlaşma noktaları

Çözücü	Buharlaşma Noktası (ºC)
Asetik asit	118
Aseton	56,3
Asetonitril	81,6
Benzen	80,1
Dikloroetan	83,5
Diklorometan	39,8
Dimetilformamid	153
Dimetilsülfoksit	189
Etil alkol	78,3
Etil asetat	77,1
Formik asit	118,1
Hekzan	68,7
Hekzafloro izopropil alkol	58,2
Kloroform	61,2
Metanol	64,7
Su	100
Tetrahidrofuran	66
Trifluoro asetik asit	78,3

Nanolif çalışmalarının çoğunda çözücü karışımları kullanılır. Bunun en önemli nedeni buharlaşma noktasını optimum değere getirmek ve polimerin çözünmesini sağlamaktır (Jarusuwannapoom ve diğerleri, 2005).

İşlem parametreleri

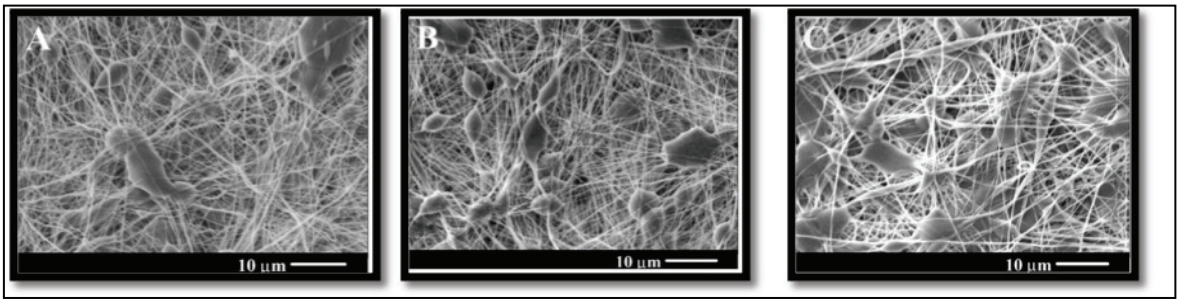
Uygulanan voltaj elektro-çekim işleminin en önemli parametresidir. Kritik voltaj seviyesine ulaşıldığında lif oluşumu başlar (Bhardwaj ve Kundu, 2010).

Uygulanan voltaj

Elektro-çekim işleminde lif oluşumunun başlayabilmesi için eşik voltaj değerine ulaşılması gerekir. Oluşturulan elektrik alanla çözelti üzerinde yük yoğunluğu oluşur bu yüklenme sonucu Taylor konisi oluşarak lif oluşmaya başlar (Bhardwaj ve Kundu, 2010). Ayrıca elektrik alan şiddeti lif çapını etkilemektedir (Huang ve diğerleri, 2003).

Yapılan çalışmalarda elektrik alan artışının lif çapını arttırdığı (Zhang ve diğerleri, 2005), azalttığı ya da etkilemediği görülmüştür (Haider ve diğerleri, 2018). Ayrıca yüksek voltajın

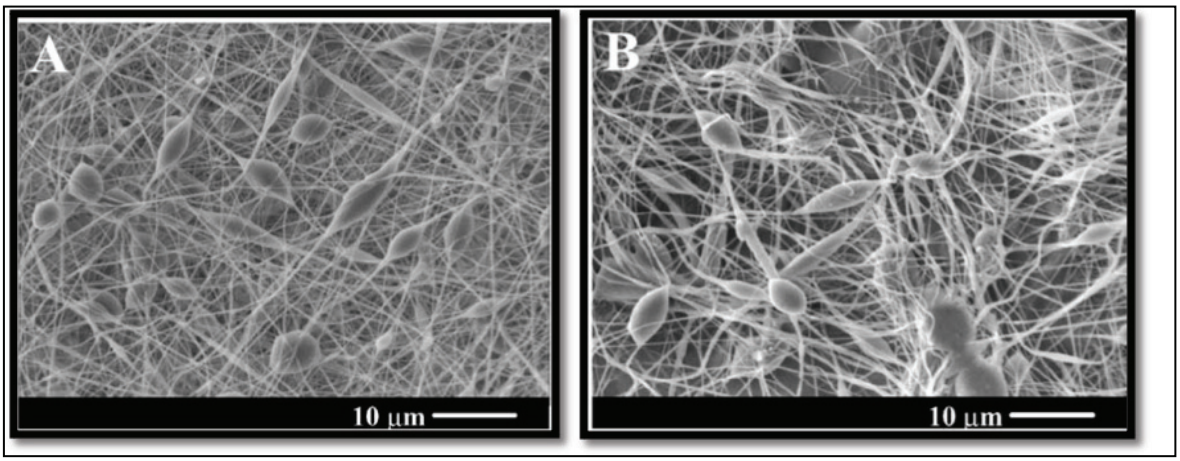
lifin üzerinde damla oluşumuna neden olduğu görülmüştür (Resim 2.7) (Zong ve diğerleri, 2002).



Resim 2.7. Farklı elektrik alanlarda hazırlanan liflerin görüntüleri, (A) 20 kV; (B) 25 kV ve (C) 30 kV (Zong ve diğerleri, 2002).

Çözeltinin akış hızı

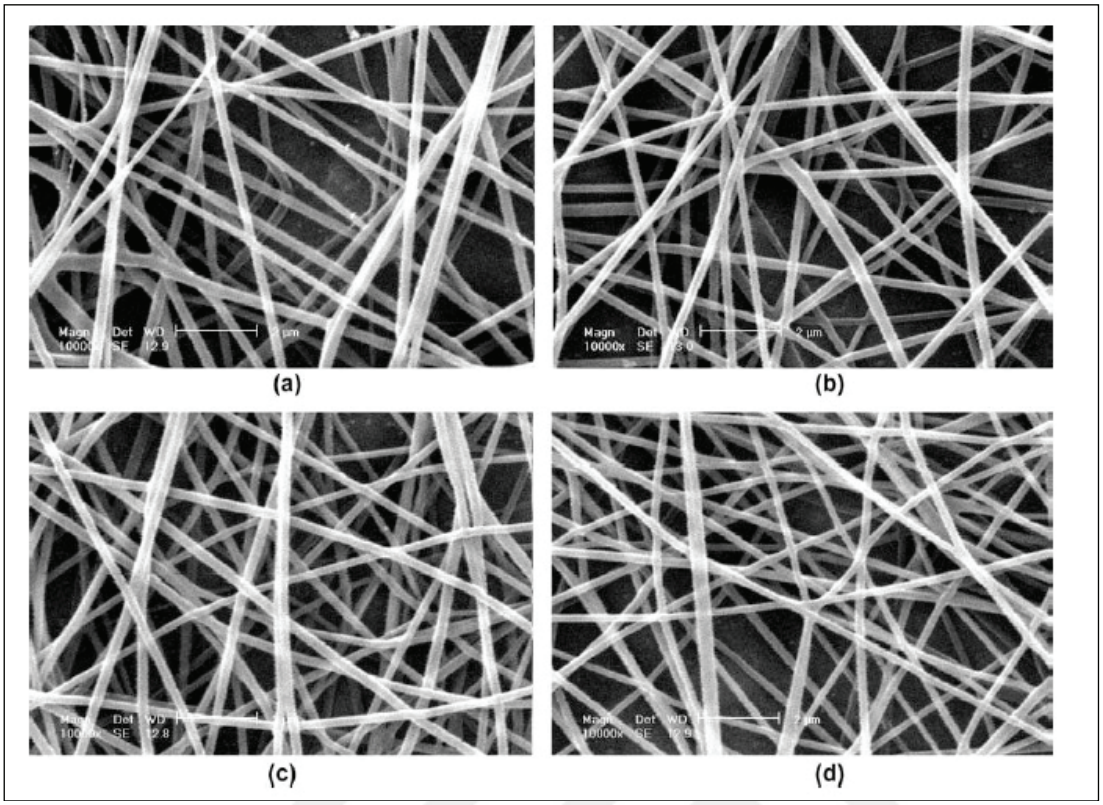
Elektro-çekim işleminde kullanılan çözeltinin akış hızı nanoliflerin özelliklerini etkilemektedir. Homojen dağılımlı, kuru ve damla oluşmayan liflerin hazırlanması için uygun bir akış hızı seçilmelidir. Genel olarak akış hızının artışı lif çapını arttırmaktadır (Thakkar ve Misra, 2017). Akış hızı arttığında çözeltinin içinde bulunan çözücünün buharlaşması da yavaşlar böylece liflerin üzerinde damlalar oluşabilecek ve aynı zamanda lif çapı da artacaktır (Sill ve Von Recum, 2008). Yapılan bir çalışmada, akış hızının polistiren ve çözücü olarak tetrahidrofuran ile hazırlanan nanoliflerin yapısı üzerine olan etkisi incelenmiştir (Megelski, Stephens, Chase ve Rabolt, 2002). Hem lif çapı hem por genişliği akış hızının artmasına bağlı olarak artmıştır. Ayrıca yüksek akış hızında nanoliflerin üzerinde damlalar görülmüştür. Akış hızının değişimi lif yapısını ve çapını etkilemesi nedeniyle çalışmalarda genellikle lif oluşmasını sağlayan en düşük akış hızı kullanılmaktadır (Haider ve diğerleri, 2018). Böylece stabl bir akış ve jet oluşumu sağlanır. Yeterli akış sağlanmazsa Taylor konisi oluşmadığı için lif oluşmayabilir. Akışın optimize edilmediği durumlarda lif yapısında şekil bozuklukları da gözlenebilir (Resim 2.8) (Zong ve diğerleri, 2002).



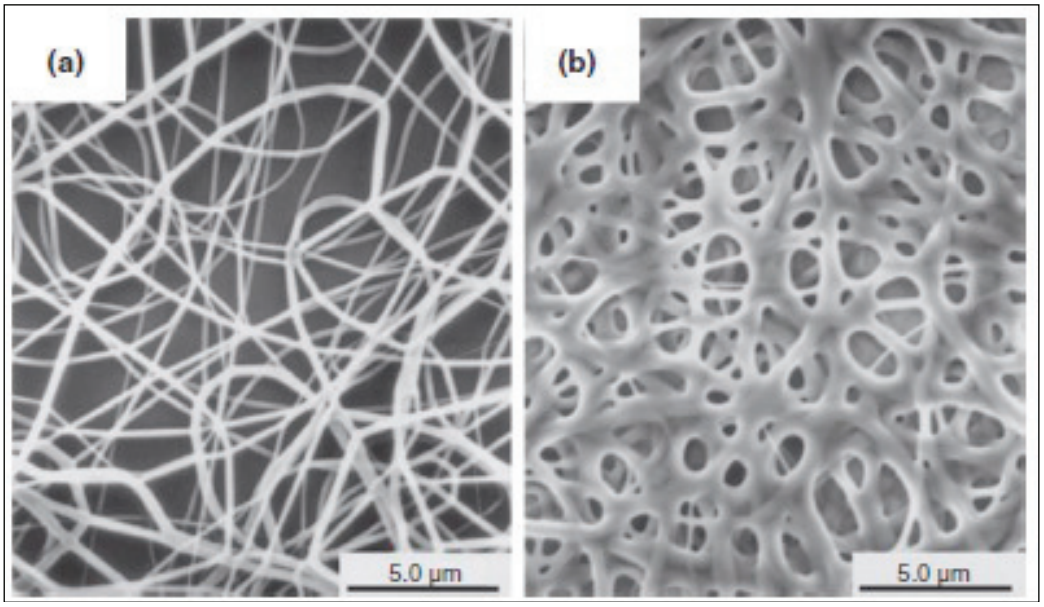
Resim 2.8. Farklı akış hızı kullanılarak hazırlanan liflerin yapıları (A) 20 ml/dak; (B) 75 ml/dak (Zong ve diğerleri, 2002).

Toplayıcı levha ve şırınga arası mesafe

Toplayıcı levha ile şırınga arasındaki mesafe nanoliflerin yapısını ve oluşmasını etkilemektedir. Mesafe çok kısa olursa, liflerin kuruması için yeterli süre olmaz ve bu da nanoliflerin üzerinde damla oluşmasına neden olur (Lu ve diğerleri, 2016). Pürüzsüz yapılı ve homojen dağılımlı liflerin oluşmasında uygun mesafenin ayarlanması gerekir (Haider ve diğerleri, 2018). Farklı çalışmalarda toplayıcı levhanın mesafesi değiştirilerek lif yapıları incelenmiştir. Bu çalışmaların bir kısmında; nanolif yapısını mesafenin etkilemediği bulunurken (Zhang ve diğerleri, 2005) (Resim 2.9), diğerlerinde mesafenin kısa olması nanoliflerin çapını arttırmıştır (Li, Kanjwal, Lin ve Chronakis, 2013). Naylon nanoliflerin hazırlanmasında farklı mesafelerin kullanılmasıyla lif çapının arttığı görülmüştür (Resim 2.10) (Li ve Wang, 2013; Lu ve diğerleri, 2016). Nanoliflerin çapının mesafe arttıkça azalmasının nedeni de Taylor konisinin oluşma şeklidir (Doshi ve Reneker, 1995; Yuan, Zhang, Dong, ve Sheng, 2004).



Resim 2.9. Farklı mesafeler kullanılarak hazırlanan nanolfilerin çaplarında önemli değişiklik görülmemiştir (a) 8cm; (b) 10cm; (c) 12cm; (d) 15cm (Zhang ve diğerleri, 2005)



Resim 2.10. Naylon nanoliflerin hazırlanmasında farklı mesafelerle hazırlanmış liflerin yapısı a) 2 cm, (b) 0.5 cm (Lu ve diğerleri, 2016)

Ortam koşulları

Elektro-çekim işlemine etki eden ortam koşullarının başında sıcaklık ve nem bulunur (Chronakis, 2010). Sıcaklık polimer çözeltisinin viskozitesine etki edebileceğinden oluşan liflerin morfolojisi ve çapları da değişebilecektir.

Sıcaklık

Sıcaklık değişimi, çözücü buharlaşmasını ve çözelti viskozitesini etkilediği için çok önemli bir parametredir, nanolif yapısını etkilemektedir (Akhgari ve diğerleri, 2017). Sıcaklık yüksek olursa çözücü daha hızlı buharlaşır; başlık ucunda tıkanmalar ve lif yapısında bozulmalar görülebilir (De Vrieze ve diğerleri, 2009).

Nem

Ortam nemi hazırlanan liflerin por büyüklüklerini ve lif çaplarını etkileyebilmektedir. Belli bir eşik nem değerinin üzerinde porlar çok büyüdüğü için lif çapı da çok artmış olur (Chronakis, 2010). Ortam neminin değiştirilmesiyle hazırlanan lif çaplarının farklı bulunduğu çalışmalar vardır (Pelipenko, Kristl, Jankovic, Baumgartner, ve Kocbek, 2013). Nem miktarının artışı nanolif çaplarında azalmaya neden olmuştur.

2.5. Heparin ve Türevlerinin Nanolif Çalışmaları

Hem klasik elektro-çekim yöntemiyle hem de ko-aksiyel elektro-çekim yöntemi kullanılarak heparin yüklü nanolifler hazırlanmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucunda heparinlerin oral verilişlerine yönelik nanolif formülasyonlarına rastlanmamasına rağmen farklı veriliş yolları için çalışmalar mevcuttur. Özellikle organ veya doku nakli sonrasında uygulama bölgesinde hücre çoğalmasını kontrol etmek amacıyla heparin yüklü nanolifler kullanılmıştır

Poli(L-laktid-ko-kaprolakton) ve heparinin birlikte kullanılmasıyla düz kas proliferasyonunun engellenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda çekirdek-kabuk lifleri hazırlanmıştır ve kabukta poli(L-laktid-ko-kaprolakton), çekirdek karışımında ise heparin: jelatin karışımı kullanılmıştır. Çözeltilerin akış hızının lif yapıları üzerinde etkileri incelenmiş ve MTT çalışması ile liflerin hücre canlılılığı üzerinde olumsuz etki göstermediği kanıtlanmıştır (Chen ve diğerleri, 2010.). Başka araştırmacıların aynı polimerle yaptıkları

diğer bir çalışmada ise çekirdek karışımında bulunan heparinin miktarının artışının lif çapını azalttığı gösterilmiştir (Su ve diğerleri, 2011).

Heparinin yine benzer kullanımı için, yani damar nakilleri sonrasında, damar tıkanmasını engellemek ve vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasınıın engellemek amacıyla nanolifleri hazırlanmıştır. Polikaprolakton ve heparin, diklorometan ve metanol karışımında çözülerek elektro-çekim çözeltisi hazırlanmıştır. En yüksek 5,8 µg/mg (lif) madde yüklemesine ulaşılarak 550-810 nm arasında nanolifler elde edilmiştir. Ayrıca çözeltideki heparin konsantrasyonu arttıkça lif çapındaki azalma vurgulanmıştır. Bunun nedeni polimer jetin yüzeyindeki yük yoğunluğunun değişmesi olduğu yorumu yapılmıştır (Luong-Van ve diğerleri, 2006).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü ve heparinin birlikte stent kaplanmasında kullanılması amacıyla nanolif formülasyonları hazırlanmıştır. Klasik elektro-çekim yöntemi ile nanolifler hazırlanmıştır. Heparin ve polimerin emülsiyonu hazırlandıktan sonra lif çekimi yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları ile hücre canlılığını olumsuz etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır (Wang ve diğerleri, 2015). Benzer bir çalışmada ise poli-l-kaprolakton ile heparin ile büyüme faktörünü içeren nanolifler elektro-çekim yöntemi ile, polimer emülsiyonundan hazırlanmıştır (Chen ve diğerleri, 2015).

2018 yılında yapılmış bir çalışmada, çekirdek kısmında heparin, kabuk kısmında poli-L-laktik asit ve poliamid bulunan çekirdek kabuk yapılı nanolifler hazırlanarak aşil tendon kopması üzerindeki tedavi edici etkisi incelenmiştir. İn vivo deneyler sonucunda sıçanların aşil tendonlarının iyileşmesinde heparin konsantrasyonunun etkili olduğu ve endojen büyüme faktörlerini indüklendiği sonucuna ulaşılmıştır (Ye, Zhou, Jing, Liu ve Yin, 2018).

2.6. Nanopartiküllerin Genel Özellikleri

Nanopartiküller, çapları 10-100 nm arasında değişen katı kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir, sentetik, doğal veya yarı sentetik polimerlerden oluşur. Yüzey alanlarının yüksek olması, adsorblama özelliklerinin fazla olması, farklı bileşenleri taşıması gibi önemli özellikleri ve eşsiz yapıları sayesinde kullanımları ve çalışmaları artmıştır (De Jong ve Borm, 2008; Nagpal, Singh ve Mishra, 2010; Son, Y. Kim, W. Kim, Jeong ve Yoo, 2015)

Ayrıca; suda çözünürlüğü düşük maddelerin çözünürlüğünün arttırılmasında, etkin maddelerin salımının modifiye edilmesinde ve pasif/aktif hedeflendirme çalışmalarında kullanımları giderek artmıştır. Nanopartiküllerin oral verilişi de etkin maddenin mide ortamından korunmasında, biyoyararlanımının ve stabilitesinin arttırılmasında tercih edilmektedir. Heparin ve türevlerinin özellikle DMAH türevlerinin oral verilmesi amacıyla nanopartiküler taşıyıcı sistemler kullanılmıştır (Jiao ve diğerleri, 2002; Hoffart ve diğerleri, 2006; Paliwal ve diğerleri, 2012).

İyonik jelasyon yöntemi; kitozan türevleriyle nanopartikül hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin esası sulu çözeltideki katyonik polimerle, uygun ortamda anyonik etkin maddenin elektrostatik etkileşmeler doğrultusunda jel yapısı oluşturmasına dayanır. Bu jel yapısı sulu süspansiyon şeklinde görülür (Calvo, Remuñán-López, Vila-Jato ve Alonso, 1997; Zambito, 2013). Heparin türevlerinin özellikle DMAH'lerin nanopartiküllerinin hazırlanmasında kitozanın yaygın olarak kullanılmasının nedeni, katyonik yüklü kitozan ile anyonik yüklü heparinlerin arasında kendiliğinde oluşan iyonik etkileşim sayesinde başka bir yardımcı bağlayıcıya gerek duyulmadan nanopartiküllerin hazırlanmasıdır.

Tez çalışması kapsamında, enoksaparin yüklü nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla düşük molekül ağırlıklı (DMA) kitozan kullanılmıştır. İyonotropik jelleşme yönteminde; işlem süresi, karıştırma hızı, çözeltilerin eklenme hızı gibi işlem parametrelerinin yanında; polimer/etkin madde çözeltilerinin konsantrasyonları, ağırlık/ağırlık oranları gibi nanopartikül içeriklerinin belirlenmesi için ön formülasyon çalışmaları yapılarak sonuç formülasyona ulaşılmıştır.

Hazırlanan nanopartiküller daha sonra nanoliflerin üzerine yükleneceği için, nanopartiküllerin hazırlanmasındaki hedef formülasyonda; en yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip ve partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel açısından uygun olan seçilmiştir.

2.7. Sonuç formülasyonların hazırlanmasında kullanılan polimerler ve özellikleri

Nanoliflerin hazırlanmasında hidrofilik ve/veya hidrofobik polimerler kullanılmaktadır. Elektro-çekim işleminde tek polimer kullanılabileceği gibi polimer karışımları da kullanılabilir. Polimer seçimi nanolifin kullanım amacına göre ve etkin madde özelliklerine göre yapılır. Tez kapsamında ön formülasyon çalışmalarında çok sayıda polimer ve polimer karışımları kullanılmıştır. Sonuç formülasyonda kullanılan polimerler ile bilgi aşağıda verilmiştir.

Tez çalışmasının amacına yönelik olarak, enoksaparin'in mide pH'sından korunması ve ince bağırsaktan emiliminin arttırılması için nanosistemlerin hazırlanmasında, pH'ya bağımlı çözünen polimerlerin kullanılması düşünülmüştür.

Nanoliflerin hazırlanmasında enterik polimer olarak metakrilik asit kopolimeri olan Eudragit® tipleri kullanılmış ve hidrofilik polimerler ile nanoliflerin yapısının optimum düzeye ulaştırılması sağlanmıştır. İki farklı nanolif formülasyonunun dış tabakalarında aynı enterik polimer kullanılmıştır. Ancak, nanolif formülasyonlarının ara tabaka içerikleri farklı hazırlanmıştır.

NF formülasyonunda ara tabakada, enoksaparin ve hidrofilik özellik taşıyan Kollidon K90 ve glikol kitozan polimerleri kullanılmıştır. Bu polimerlerin ortak çözücüsü olan distile su ise etil alkol ile karışım olarak kullanılmıştır.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında ise katyonik özellik taşıyan kitozan kullanılmıştır. Enoksaparin anyonik özellikte bir moleküldür. Bu yüzden nanopartiküllerin hazırlanmasında bağlayıcıya gerek duyulmadan iyonik jelasyon yöntemiyle nanopartiküller hazırlanabilmiştir.

NP/NF formülasyonunun ara tabakasında, hazırlanan nanopartiküllerin yanında yine NF formülasyonunda olduğu gibi Kollidon K90 kullanılarak liflerin yapısının geliştirilmesi sağlanmıştır.

Eudragit®S100: Eudragit türevleri 1933 yılından beri kullanılan akrilik polimerlerdir. Daha sonraki yıllarda geliştirilen Eudragit®S100 ise enterik kaplama amaçlı kullanılan, pH'ya

bağlı çözünen anyonik metakrilik asit ve metil metakrilat kopolimeridir. Hidrofobiktir ve alkol, DMF, DMAc gibi çözücülerde çözünür (Patra ve diğerleri, 2017). Kolona hedeflendirme amacıyla, geciktirilmiş ilaç salımı için hazırlanan nanoliflerin içeriklerinde yaygın olarak kullanılır ve pH 7'nin üzerinde çözünmektedir (Illangakoon ve diğerleri, 2015; Jia, Gao ve Willliams, 2017).

Kollicoat MAE 100-55: pH 5,5 üzerinde çözünen metakrilik asit kopolimeridir. Nanolif çalışmalarında kullanılmaktadır. Hidrofobik özelliktedir, suda çözünmez.

Kollidon® K90: Polivinilpirolidonun yüksek molekül ağırlıktaki formudur (MW: 1250000) (Asawahame ve diğerleri, 2015). Hidrofilik özellik gösterir. Nanoliflerin lif yapısının sağlamlığı ve kalınlaşması amacıyla kullanılmıştır.

Kitozan: Katyonik yapıda mukoadhezif bir polisakkarittir. Biyouyumlu ve non-toksik olması gibi önemli özelliklere sahiptir (Calvo ve diğerleri, 1997; Trapani, Garcia-Fuentes ve Alonso 2008).

Glikol kitozan: Hidrofilik özellik gösteren kitozan türevidir ve katyonik özellik gösterir (Trapani ve diğerleri, 2013). Nanoliflerin ara tabakasına eklenmesinin amacı, nanoliflere katyonik özellik kazandırarak ince barsaktan emiliminin artmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Toplayıcı kısmı döner silindir ve koaksiyal nanolif üretimine uygun elektro-çekim cihazı (NE-300, İnovenso, Türkiye)
- Diferansiyal taramalı kalorimetri cihazı (DSC 60, Shimadzu, Japonya)
- Fourier transform infrared spektrofotometri cihazı (Spectrum 400, Perkin Elmer, ABD)
- İletkenlik ölçüm cihazı (HI-9033, Hanna Instruments, ABD)
- Microvisc viskometre (Rheosense, ABD)
- Yüzey gerilimi ve temas açısı ölçüm cihazı (Theta Lite optical tensiometer, Biolin Scienctific, Attension, Finlandiya)
- Taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 400, Fei, ABD)
- Transmisyon elektron mikroskopu (TEM, Tecnai G2 Spirit BioTwin, Fei, ABD)
- Tekstür analiz (Texture Analyzer) cihazı (TA-XT Plus, Texture Analyser, İngiltere)
- UV spektrofotometre cihazı (Agilent Technologies, ABD)
- UV lambalı (253 nm) laminar hava akışlı test kabini (Euroflow Class IIA, Clean Air Techniek, Hollanda)
- Floresan mikroskop (Olympus, Japonya)
- Stabilite test kabinleri (TK-252, Nüve, Türkiye)
- pH Metre (Ohaus, ABD)
- Santrifüj
- Vorteks
- Anti-Xa ölçüm kiti (Stago Liquid Anti-Xa)
- aPTT ölçüm kiti (Stago CK-Prest aPTT)
- Evom epitel voltmetre (World Precision Instrument, Sarasta, USA)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Enoksaparin sodyum, DMAH (Atabay Chemicals, Turkey)
- Düşük molekül ağırlıklı (DMA) kitozan (Sigma Aldrich, ABD)

- Glikol kitozan (Sigma Aldrich, ABD)
- Eudragit S 100 (Evonik, Germany)
- Kollicoat MAE 100-55 (BASF, Germany)
- Polietilen oksit /Polyox (Colorcon, İngiltere)
- Polivinil pirolidon/ Kolidon (BASF, Almanya)
- Polivinil alkol (Sigma Aldrich, ABD)
- Propilen glikol (Sigma Aldrich, ABD)
- Polietilen glikol (Sigma Aldrich, ABD)
- Glasiyal asetik asit (%100, Sigma Aldrich, ABD)
- Dimetilformamid (Sigma Aldrich, ABD)
- Etil alkol (Sigma Aldrich, ABD)
- Toluidin mavisi (Sigma Aldrich, ABD)
- Diyaliz membran, cuf off: 14 000 Dalton (Sigma Aldrich, ABD)
- Floresin izosiyanat (Sigma Aldrich, ABD)
- Fetal bovin serum (FBS) (Euroclone, İtalya)
- Dimetil sülfoksit (DMSO), cell culture grade (Merck, Almanya)
- Tripsin-EDTA çözeltisi (Euroclone, İtalya)
- L-glutamin (Euroclone, İtalya)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, ABD)
- Penisilin-Streptomisin (Euroclone, İtalya)
- HBSS (Hank'sBalanced Salt Solution) (Euroclone, İtalya)
- DMEM (Dulbecco's ModifiedEagleMedium) (Euroclone, İtalya)
- Dimetil sülfoksit (Merck, Almanya)
- Caco-2 (insan kolon karsinoma) hücresi (ATCC, ABD)
- Hücre kültürü insertleri, transparan, 1 µm – ThinCert® 12 well (Sarstedt, Almanya)

3.1.3. İn vitro deneylerde kullanılan tampon çözeltiler

pH 1,2 tampon çözelti

Sodyum klorür……2 g
Seyreltik hidroklorik asit çözeltisi……...7 mL
Distile su……..……...ym 1 L

pH 7,4 tamponu

Disodyum fosfat……..20,208 g

Monosodyum fosfat…….3,394 g

Distile su……ym 1 L

3.2. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Diferansiyel taramalı kolorimetre (DSC) ölçümleri

Etkin maddenin erime noktası tayin edilmiştir ve önformülasyon çalışmalarında DSC termogramlarının incelenmesiyle etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki geçimlilik yorumlanmıştır. Ayrıca hazırlanan nanoliflerin termogramları alınarak piklerde değişiklik olup olmadığı incelenmiştir. DSC analizlerinde önce enoksaparin ve polimerlerin ayrı ayrı, azot gazı altında 10°C/dak ısıtma hızında, 25-300°C arasında termogramları alınmıştır. Bunun için yaklaşık 2 mg madde tartıldıktan sonra alüminyum örnek kabına alınarak sıkıştırılmıştır. Nanoliflerin ve polimer karışımların termogramları alınarak etkin madde-yardımcı madde geçimsizliği kontrol edilmiştir.

3.2.2. FT-IR ölçümleri

FT-IR (Fourier Transform Infrared) cihazı kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında enoksaparin, polimerler ve nanolif formülasyonlarının analizleri yapılmıştır.

3.2.3. Etkin maddenin miktar tayini için standart doğrunun hazırlanması

Enoksaparinin UV spektrofotometrede ölçümü için toluidin mavisi ile metakromatik esasa dayalı spektrofotometrik yöntem seçilmiştir. Metakromazi, tayin edilecek madde ile boyanın (metakromatik madde) kompleks oluşturması sonucu boyanın absorbansının değişmesidir. Bu yöntemde, heparin, toluidin mavisi ile metakromazi göstermektedir ve kompleks oluşumu sonucu boyanın rengi açılmaktadır (Smith, Mallia ve Hermanson, 1980). Heparin miktarı arttıkça boyanın gösterdiği absorbans azalmaktadır. Kalibrasyon denklemi heparin miktarına (µg) karşı boyanın absorbansına göre oluşturulmuştur. Metakromatik analiz yaparak enoksaparinin spekturumunu almak için farklı çözeltiler hazırlanmıştır.

- Stok çözeltisi: %0,025 enoksaparin içeren sulu çözelti
- Kör çözeltisi: %0,2 NaCl içeren çözelti,
- Toluidin mavisi çözeltisi: %0,005 konsantrasyonda toluidin mavisi, %0,2 NaCl içeren 0,01 N HCl çözeltisinde hazırlanmıştır.

Öncelikle hazırlanan boya çözeltisinden tüplere 2,5 ml alınarak üzerine farklı miktarda (10-70 µg aralığında olacak şekilde) enoksaparin eklenmiştir. Bu karışım 5 ml olacak şekilde kör çözeltisiyle tamamlanarak 30 sn vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 5 ml hekzan eklenip tekrar 30 sn vorteks ile karıştırılmış ve 3 kat seyreltilerek UV spektrofotometrede okunmuştur. Aynı işlem etkin madde eklenmeden yapılarak boya çözeltisinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu bulunmuştur. Tüm deneyler üçer kez tekrarlanmış ve elde edilen verilerden kalibrasyon denklemi ve regresyon katsayısı hesaplanmıştır.

Miktar tayini yönteminin validasyonu

Enoksaparinin miktar tayini yönteminin validasyonu için, doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision) ve seçicilik (specifity) çalışması yapılmıştır. Analitik yöntem validasyonu ICH Q2 (R1)'e uygun yapılmıştır.

Doğrusallık

Farklı miktarlarda (10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg ve 70 µg) hazırlanan enoksaparin çözeltilerindeki etkin madde miktarı ve ölçülen absorbans değerleri arasında doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir. Üç farklı stok çözelti hazırlandıktan sonra aynı miktarlarda enoksaparin içeren örneklerdeki miktarlar ve absorbansları ölçülerek kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir.

Doğruluk

Doğruluk çalışmalarında, bilinen üç farklı miktarda enoksaparin içeren çözeltiler (20 µg, 40 µg, 60 µg) stok çözeltisinden hareketle hazırlanarak, absorbansları metakromatik analiz ile 631 nm'de 3 kez ölçülmüştür. Bu absorbanslar, hesaplanan kalibrasyon denkleminde yerine konularak enoksaparin miktarları, yüzde geri elde ve standart sapmalar hesaplanmıştır.

Kesinlik

Belirli miktarda (60 µg) enoksaparin içeren örnek aynı gün içinde ve farklı üç gün içinde hazırlanan stok çözeltilerden alınarak absorbansları ölçülmüştür. Gün içi kesinlik çalışması için; aynı gün içinde 60 µg enoksaparin içerecek şekilde alınan örnekden yapılan bir seri okuma sonucu elde edilen absorbanslar yorumlanarak analitik yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır. Günler arası kesinlik çalışması için; üç ayrı günde hazırlanan stok çözeltilerinden 60 µg enoksaparin içerecek şekilde alınan örneklerden yapılan bir seri okuma sonucu elde edilen absorbanslar yorumlanarak analitik yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır.

Seçicilik

Yöntemin sadece etkin maddeye özgü olduğunu göstermek amacıyla seçicilik çalışmaları yapılmıştır. Enoksaparinin toludin mavisi ile gösterdiği spesifik etkileşmenin kullanılan yardımcı maddeler varlığında değişmemesi gerekir. Bunun için enoksaparin içermeyen karışımlar hazırlanarak kör çözeltisine karşı spektrumları taranmıştır ve boyanın tek başına verdiği absorbans değerinin değişmediği gösterilmiştir.

Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı

Enoksaparinin UV spektrofotometrede yapılan miktar tayini yönteminin güvenilir şekilde analiz edebildiği en küçük miktarı belirlemek için duyarlılık sınırı ve saptama sınırı hesaplanmıştır. Bu amaçla aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır.

Duyarlılık sınırı (LOD)= (3,3xσ) / S (Eş. 3.1)

Saptama sınırı (LOQ)= (10xσ) / S (Eş. 3.2)

σ: Kalibrasyon aralığındaki en küçük miktarın standart sapması

S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.3. Nanosistemlerin Hazırlanması

Tezin amacı, DMAH tipi olan enoksaparinin içeren nanosistemlerin hazırlanması ve enoksaparinin oral biyoyararlanımının arttırılmasıdır. Daha önce bahsedildiği gibi bu amaç doğrultusunda üç ayrı nanosistem hazırlanmıştır. Bu nanosistemler şu şekilde özetlenmiştir:

1. Ara tabakada enoksaparin içeren elektro-çekim teknolojisi ile üretilen üç tabakalı nanolifler (NF)
2. Enoksaparin yüklü nanopartiküller (NP)
3. Hazırlanan nanopartiküllerin, ara tabakada yer almasıyla hazırlanan üç tabakalı nanolifler (NP/NF ikili sistemi)

Nanosistemlerin sonuç formülasyonlarının belirlenmesinde, hedef ürün profilleri belirlenerek, kritik kalite özellikleri ve yapılan değişiklikleri içeren QBD (Quality by Design- Tasarımla kalite yaklaşımı) tablosu oluşturulmuştur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Sonuç formülasyonların belirlenmesinde tasarımla kalite yaklaşımında işlem basamakları

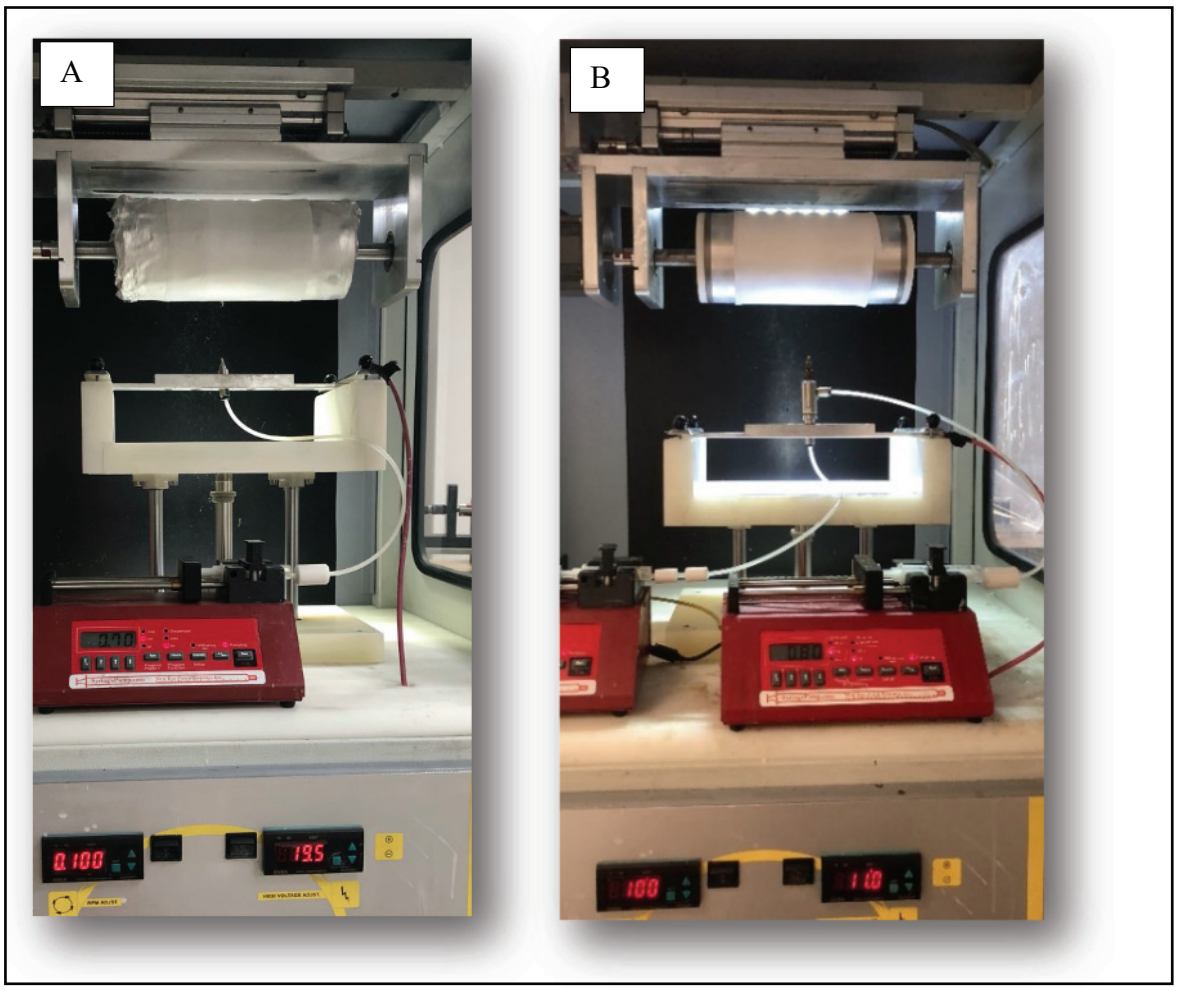
	NF	NP/NF	NP
Hedef ürün profili	Ara tabakasında enoksaparin yüklü, Eudragit kaplı tabakalı nanoliflerin hazırlanması	Ara tabakasında enoksaparin yüklü nanopartiküller olan Eudragit kaplı tabakalı nanoliflerin hazırlanması	Kitozanla enoksaparin yüklü nanopartiküllerin hazırlanması
Kritik kalite özellikleri	Lif çapının <1µ olması %50'den fazla porozite göstermesi Temas açısının 90º'den yüksek olması Etkin maddenin liflere yüklenmesi Lifleri kaplamak için kullanılan enterik polimerin etkin madde salımını geciktirmesi	Lif çapının <1µ olması %50'den fazla porozite göstermesi Temas açısının 90º'den yüksek olması Nanopartiküllerin liflere yüklenmesi Lifleri kaplamak için kullanılan enterik polimerin etkin madde salımını geciktirmesi	Yüksek yükleme etkinliği Partikül çapının <1µ ve dar aralıkta olması -30 mv-+30 mv zeta potansiyel PDI'nın 1'den düşük olması
İşlem geliştirilmesi (formülasyonların hazırlanmasında yapılan değişiklikler)	Elektroçekim çözeltisinin içeriğinin değiştirilmesi (reolojik özellikleri; Viskozite, yüzey gerilimi, iletkenlik) Nanoliflerin ıslanmadan hazırlanması Kullanılan çözücü özellikleri	Elektroçekim çözeltisinin içeriğinin değiştirilmesi (reolojik özellikleri; viskozite, yüzey gerilimi, iletkenlik) Nanopartiküllerin liflere yüklenenebilmesi için uygun şekilde dağıtılması (santrifüjlendikten sonra uygun çözücü karışımının seçilmesi ve etk)	Kitozan konsantrasyonu Kitozan:enoksaparin a/a oranı Çözeltileri ekleme süresi
Kritik proses parametreleri	Elektro çekim işlem parametreleri Çözeltilerin akış hızı (0,1-2 ml/dak) Uygulanan voltaj (9-22 kV) Mesafe (8-15 cm)	Elektro çekim işlem parametreleri Çözeltilerin akış hızı (0,1-2 ml/dak) Uygulanan voltaj (9-22 kV) Mesafe (8-15 cm) Nanopartiküllerin hazırlanmasındaki işlem parametreleri (Karıştırma hızı, karıştırma süresi, çözeltilerin ilave edilme süreleri)	Karıştırma hızı, Karıştırma süresi, Çözeltilerin ilave edilme süreleri
Yapılan değişikliklerin amacı	İşlem devamlılığı Yüksek etkin madde yüklemesi Yüzeyleri düzgün homojen liflerin oluşturulması Damla oluşmayan kuru liflerin elde edilmesi Etkin madde dağılımının homojen olması	İşlem devamlılığı Yüksek etkin madde yüklemesi Yüzeyleri düzgün homojen liflerin oluşturulması Damla oluşmayan kuru liflerin elde edilmesi Etkin madde dağılımının homojen olması	Partikül çapının <1µ olması, Etkin madde yükleme kapasitesinin arttırılması

3.4. Önformülasyon Çalışmaları

3.4.1. Nanoliflerin hazırlanması

Nanoliflerin hazırlanmasında amaç, enoksaparinin polimerik lif yapısıyla korunarak oral biyoyararlanımının ve emiliminin arttırılmasıdır. Bu amaca yönelik olarak formülasyon

çalışmaları öncelikle çekirdek-kabuk nanolifleri oluşturmak amacıyla ko-aksiyel başlık kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan elektro-çekim cihazı ve ko-aksiyel başlık Resim 3.1'de gösterilmiştir.



Resim 3.1. Kullanılan elektro-çekim cihazı (A:tekli başlık B:ko-aksiyel başlık)

Ko-aksiyel elektro çekim yöntemi ile yapılan çalışmalar

Bu çalışmalarda kabuk çözeltisini hazırlamak için pH duyarlı polimerler denenmiştir. Çekirdek çözeltisi için de enoksaparin içeren ve lif çekimi için gerekli özelliklere sahip bir çözelti hazırlanması amaçlanarak lif çekimi yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar kabuk çözeltisinde kullanılan polimerlere göre iki ana başlıkta incelenmiştir:

Kollicoat Mae 100-55 ile yapılan ko-aksiyel elektro-çekim çalışmaları

pH 5,5'in üstünde çözünen sentetik, biyoparçalanır polimerler olan Kollicoat türevleri, suda çözünmez ancak; çoğu organik çözücüde çözünür. Temin edilmesinin kolay olması, toksisitesinin diğer solvanlardan düşük olması ve elektro-çekimde sıklıkla kullanıldığı düşünülerek ilk çalışmalara etil alkol ile başlanmıştır. Polimer konsantrasyonu, yapılan çalışmalarla başlangıç olarak %10 seçilmiştir. Etkin maddenin konsantrasyonu ise %1 olarak seçilmiştir. Öncelikle çekirdek çözeltisi ve kabuk çözeltisinin akış hızlarında değişiklik yapılarak lif yapıları incelenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kollicoat MAE 100-55 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları

	Çekirdek		Kabuk		Parametreler			
Formülasyon kodu	Etkin madde	Çözücü	Polimer	Çözücü	Akış hızı (Çekirdek, kabuk sırasıyla) ml/h	Mesafe (cm)	Voltaj (kV)	Durum
K1	100 mg enoksaparin	10 ml distile su	1 g Kollicoat MAE 100-55	10 ml alkol	0,2;2	11	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
K2	100 mg enoksaparin	10 ml distile su	1 g Kollicoat MAE 100-55	10 ml alkol	0,5;2	11	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı..
K3	100 mg enoksaparin	10 ml distile su	1 g Kollicoat MAE 100-55	10 ml alkol	0,2;2	10,3	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı..
K4	100 mg enoksaparin	10 ml distile su	1 g Kollicoat MAE 100-55	10 ml alkol	0,3;2	10,5	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
K5	100 mg enoksaparin	10 ml distile su	1 g Kollicoat MAE 100-55	10 ml alkol	0,4;2	11	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
K6	100 mg enoksaparin	10 ml distile su	1 g Kollicoat MAE 100-55	10 ml alkol	0,2;2	10,3	15	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.

Eudragit S 100 ile yapılan ko-aksiyel elektro-çekim çalışmaları

Eudragit S 100, pH 7'nin üzerinde çözünen, hidrofobik bir polimerdir. Kabuk çözeltisinde kullanılmak üzere farklı konsantrasyonlarda ve farklı çözücülerde hazırlanması düşünülmüştür. Kabuk çözücüsü olarak etil alkol yine en iyi alternatif olmuştur. Çekirdek çözeltisiyle uyumlu olması açısından kabuk çözeltisine su eklenmesi ya da çekirdek çözeltisine alkol eklenmesi gibi değişiklikler yapılmış ve Eudragit S 100 ile yapılan çalışmalarda kullanılan çekirdek ve kabuk çözeltileri, elektro-çekim işlem parametreleri ve liflerin durumu Çizelge 3.3'te gösterilmiştir. Çekirdek çözelti karışımına lif yapısını oluşturabilmek ve enoksaparin ile birlikte homojen bir çözelti oluşmasını sağlayacak polimerler denenmiştir. Bu polimerler; polietilen oksit türevleri (Polyox), polivinil pirolidon türevleri (Kollidon) ve polivinil alkol gibi hidrofilik polimelerlerdir. Ayrıca polietilen glikol, propilen glikol gibi yardımcı çözücüler kullanılmıştır. Kabuk çözeltisi için de Eudragit S100 için çözücü olarak alkol ve DMF kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Eudragit S100 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları

	Çekirdek		Kabuk		Parametreler			
Formülasyon kodu	Etkin madde	Çözücü	Polimer	Çözücü	Akış hızı (Çekirdek; kabuk sırasıyla) ml/h	Mesafe (cm)	Voltaj (kV)	Durum
E1	200 mg enoksaparin	20 ml Distile su	2 g S100	20 ml alkol	0,3; 0,5	10	12	Lif oluşmadı.
E2	100 mg enoksaparin	2 ml Distile su+ 8ml alkol	2 g S100	20 ml alkol	0,2; 0,6	10	12	Lif oluşmadı.
E3	100 mg enoksaparin	5 ml Distile su+ 5ml alkol	2 g S100	20 ml alkol	0,4; 0,8	13,5	12	Lif oluşmadı.
E4	100 mg enoksaparin	2 ml Distile su+ 3 ml polietilen glikol (PEG)	1 g S100	8 ml alkol+ 2ml su	0,3; 1	13	16	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E5	100 mg enoksaparin	2 ml Distile su+ 3 ml polietilen glikol	2,5 g S100	20 ml alkol	0,3; 2	14	12	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E6	100 mg enoksaparin	2 ml Distile su+ 3 ml polietilen glikol	1,5 g S100	6 ml alkol+4 ml DMF	1; 2	13	12	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.

Çizelge 3.3. (devam) Eudragit S100 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları

E7	500 mg enoksaparin	2,5 ml Distile su+ 2.5 ml propilen glikol	1,5 g S100	6 ml alkol+4 ml DMF	0,25; 1	14	12	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E8	500 mg enoksaparin	2,5 ml Distile su+ 250 mg Polyox WSR N80	1,5 g S100	6 ml alkol+4 ml DMF	0,5; 1	14	12	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E9	500 mg enoksaparin	2,5 ml Distile su+ 250 mg Polyox WSR N10	1,5 g S100	6 ml alkol+4 ml DMF	0,5; 1	14	12	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E10	200 mg enoksaparin	10 ml su+ 10 ml alkol	2000 mg Eudragit S 100	20 ml alkol	0,2; 0,5	10	12	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E11	100 mg enoksaparin	2 ml su+8ml alkol	2000 mg Eudragit S 100	20 ml alkol	0,2; 1	12	13	Lif oluşmadı.
E12	100 mg enoksaparin	2 ml su+8 ml alkol	1500 mg Eudragit S 100	10 ml alkol	0,5; 2	12	14	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E13	100 mg enoksaparin	5 ml su+5 ml alkol	2000 mg Eudragit S 100	20 ml alkol	0,2; 0,8	12	13.5	Lif oluşmadı.
E14	100 mg enoksaparin	5 ml su+5 ml alkol	3000 mg Eudragit S100	20 ml alkol	0,2; 0,8	15	13.5	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E15	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Polietilen glikol	1000 mg Eudragit S 100	2 ml su+8 ml alkol	0,3; 1	23	13	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E16	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Polietilen glikol	2500 mg Eudragit S 100	20 ml alkol	0,5; 1,5	19	13	Lif oluşmadı.
E17	100 mg enoksaparin	2ml su+3 ml Propilen glikol	2500 mg Eudragit S 100	20 ml alkol	0,3; 1,5	23	13.5	Lif oluşmadı
E18	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Propilen glikol	1000mg Eudragit S 100	10 ml DMF	0,5;2	19	14	Lif oluşmadı.
E19	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Polietilen glikol	1000 mg Eudragit S100	8 ml DMF+2 ml alkol	0,5; 2	19	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E20	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Propilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	7 ml DMF+ 3ml alkol	0,5; 1,5	19	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E21	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Polietilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	5 ml DMF+5 ml alkol	0,5; 1,5	19	15	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E22	100 mg enoksaparin	2ml su+3 ml Propilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	1; 1,5	19	14	Lif çekildi

Çizelge 3.3. (devam) Eudragit S100 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları

E23	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Polietilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	3 ml DMF+7 ml alkol	1; 1,5	19	14.5	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E24	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Propilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	3 ml DMF+ 7ml alkol	1; 1,5	19	14	Lif oluşmadı.
E25	100 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml Propilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	3 ml DMF+7 ml alkol	0,3; 1	19	12-14	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E26	500 mg enoksaparin	2.5 ml su+2.5 ml Propilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	Lif çekildi.
E27	500 mg enoksaparin	2.5 ml su+2.5 ml Propilen glikol	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	1; 1,5	19	14	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E28	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox WSR N80	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1,5	19	14	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E29	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox WSR N10	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1,5	19	14	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E30	500 mg enoksaparin	2.5 ml su+2. 5ml Polietilen glikol 400	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1,5	19	14	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E31	500 mg enoksaparin	5 ml su+500 mg Polyox WSR N10	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	Lif oluşmadı.
E32	500 mg enoksaparin	5 ml su+125 mg Polyox WSR N10	1500 mg Eudragit S100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E33	500 mg enoksaparin	5 ml su+125 mg Kollidon K30	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	
E34	500 mg enoksaparin	5ml su+250 mg Kollidon K30	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	
E35	500 mg enoksaparin	5 ml su+500 mg Kollidon K30	1500 mg Eudragit S100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E36	500 mg enoksaparin	5 ml su+125 mg PVA	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.

Çizelge 3.3. (devam) Eudragit S100 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları

E37	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg PVA	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E38	500 mg enoksaparin	5 ml su+500 mg PVA	1500mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 1	19	14	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E39	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N10+50 mg GK	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 0,8	19	12	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E40	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N10+50 mg GK	1000 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,5; 0,8	19	12	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E41	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N10+50 mg GK	2000 mg Eudragit S100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 0,8	17	12	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E42	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N 10+25 mg GK	1000 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 0,8	17	12	Lif oluşmadı.
E43	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N10+25mg GK	2000 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,3; 0,8	16	10	Lif oluşmadı.
E44	500 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N10+25mg GK	2000mg Eudragit S100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 1	15	10.5	
E45	1000 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N10+50mg GK	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 1	17	11	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.
E46	1000 mg enoksaparin	5 ml su+250 mg Polyox N10+25mg GK	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,3; 1	16	11	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E47	500 mg enoksaparin	5 ml su+500 mg Polyox WSR N10	1000 mg Eudragit RS-PO	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 1	15	10.5	Lif oluşmadı.
E48	500 mg enoksaparin	5ml 40h/h alkol	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 1	15	10.5	Lif oluşmadı.
E49	500 mg enoksaparin	5ml 40h/h alkol+500 mg N10	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,4; 0,8	20	14	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E50	500 mg enoksaparin	5 ml 40h/h alkol+250 mg N80	1500 mg Eudragit S 100	3 ml DMF+7 ml alkol	0,3; 0,8	15	12.5	Lif toplayıcı levhadan alınamadı.
E51	500 mg enoksaparin	3 g su+2 g alkol+200 mg Polyox WSR N205	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 0,8	15	14	Lif oluşmadı.
E52	500 mg enoksaparin	3 g su+2 g alkol+100 mg Polyox WSR N205	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 1	15	14	Lif oluşmadı.
E53	500 mg enoksaparin	3 g su+2g alkol+150 mg Polyox WSR N205	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 1	15	14	

Çizelge 3.3. (devam) Eudragit S100 kullanılarak yapılmış ko-aksiyel elektro-çekim ön formülasyon çalışmaları

E54	500 mg enoksaparin	3 ml su+2 ml alkol+125 mg Polyox WSR N205	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 0,8	15	14	
E55	500 mg enoksaparin	2 ml su+3 ml alkol+150mg Polyox WSR N205	1500 mg Eudragit S 100	4 ml DMF+6 ml alkol	0,2; 0,8	15	14	Lif oluşmadı.
E56	500 mg enoksaparin	3 ml su+2 ml alkol+125 mg Polyox WSR N205	1500 mg Eudragit S 100	3 ml DMF+7 ml alkol	0,2; 0,8	15	14	Lif çekildi.
E57	500 mg enoksaparin	3 ml su+2 ml alkol+125 mg Polyox WSR N205	1500 mg Eudragit S 100	10 ml alkol	0,3; 1	21	15	Lif çekildi ancak işlem devamlı değil.

Ko-aksiyel elektroçekim yöntemiyle yapılan formülasyonlar sonucunda bazı sorunlar giderilememiştir. Bu sorunlar genel olarak şunlardır:

- ✓ Ko-aksiyal elektro-çekim işleminde görülen en büyük sorun, ko-aksiyal başlığın ucunda çekirdek-kabuk çözeltilerinin birleşerek katılaşmasıdır. Ayrıca çekirdek çözeltisinin sulu, kabuk çözeltisinin ise organik yapıda olması iki çözeltinin yüzeylerarası gerilimini arttırmış, bu da Taylor konisi oluşmasını engellemiştir. Bu sebeple koaksiyal elektro-çekim yönteminde görülen tıkanmalar ve lif yapısının bozuk olmasına ve işlemin durmasına neden olmuştur.
- ✓ Çekirdek ve kabuk karışımında kullanılan çözücülerin buharlaşma noktaları, yüzey gerilimi gibi özellikleri farklıdır. Bu yüzden uygulanan voltaj, ko-aksiyal lifi oluşturacak optimum değere ayarlanamamaktadır. Kısaca; sulu çözeltinin yüzey gerilimi, kabuk karışımından daha yüksek olacağı için çekirdek karışımından lif elde etmek için gereken voltaj, kabuk karışımından lif elde etmek için gerekli olandan farklıdır. Bu sebeple ortak bir voltaj ayarlanamamıştır.
- ✓ Ayrıca; suyun uçuculuğu ile alkol bazlı kabuk karışımının uçuculuğu farklıdır. Çekirdek çözücüsüne göre daha hızlı buharlaşan polimer çözücüsü başlık ucunda tıkanmalara sebep olmaktadır.
- ✓ Çekirdek ve kabuk karışımları aynı çözücülerden oluşursa sorunun çözülebileceği düşünülmüştür. Ancak; enoksaparinin suda çözünüyor olması ve enterik polimerlerin organik solvanlarda çözünmesi nedeniyle ortak bir çözücü bulunamamıştır.
- ✓ Çekirdek-kabuk çözeltisinin akış hızları ve işlem süresi yeteri kadar arttırılamamıştır ve liflere yüklenen enoksaparin miktarı bu yüzden düşük bulunmuştur. Tabakalı lifler

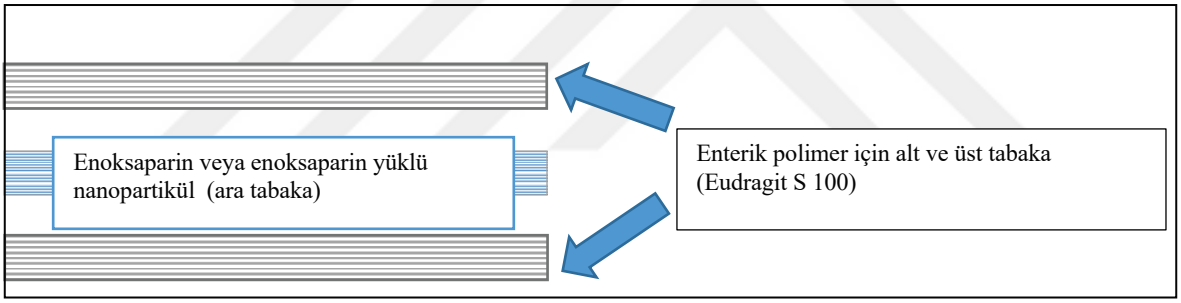
yapılarak enterik polimerle kaplı enoksaparin yüklü nanoliflerin daha yüksek yükleme etkinliği ile elde edilmesi amaçlanmıştır.

Klasik elektro-çekim yöntemiyle yapılan çalışmalar (Tabakalı liflerin hazırlanması):

Tez kapsamında nanoliflerin hazırlanmasında tek başlık kullanılarak yapılan elektro-çekim yöntemi kullanılmıştır. İki farklı nanolif formülasyonu vardır:

- enoksaparin yüklü nanolifler (NF)
- enoksaparin nanopartikülleri içeren nanolifler (NP/NF)

Hazırlanan nanolifler üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 3.1). Bu katmanlardan 1 ve 3. tabaka Eudragit S100 enterik polimerinden oluşmaktadır. Ara tabaka (2. tabaka) enoksaparin veya enoksaparin yüklü nanopartiküllerden oluşmaktadır.



Şekil 3.1. Hazırlanan nanosistemlerin şematik görüntüsü

Tabakalı lifler hazırlanırken enterik polimerden elektro-çekim cihazının tekli başlığı kullanılarak lif elde edildikten sonra üzerine yine tekli başlık ile enokaparin içeren ara lif tabakası çekilmiş, en son tabaka olarak da enterik polimerin lifi ile kaplanmış ve 'sandwich' model oluşturulmuştur. Böylece klasik yöntemle elde edilen lifler, enoksaparin ara tabakada, enterik polimer ise dış tabakalarda olacak şekilde hazırlanmıştır.

Nanoliflerin hazırlanmasında tasarlanan üç tabakalı lif yapısını oluşturmak için ilk önce enterik polimer tabakası hazırlanmıştır. Ara tabaka içeriğinin belirlenmesinde çeşitli formülasyonlar hazırlanmıştır. Nanolif üretim çalışmalarında işlem parametreleri her formülasyon için ayrı olarak yapılan çalışmalarla bulunmuş ve optimize edilmiştir.

Nanoliflerin hazırlanmasında kullanılacak çözeltilerin özellikleri lif üretim çalışmaları sırasında ve ön çalışmalar boyunca incelenmiştir. Bu amaçla; viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümleri yapılmıştır.

NF formülasyonunda; ara tabakada, 40º alkolde %8 enoksaparin çözüldükten sonra %4 Kollidon K90 ilave edilerek hazırlanan çözelti kullanılmıştır**.**

NP/NF formülasyonunda ise ara tabakada, nanopartiküllerin hazırlandıktan sonra santrifüj edilmesinden sonra elde edilen çökelek distile suda dağıtılmış ve uygun oranda alkol ile seyreltilip %7,5 Kollidon K90 eklenerek hazırlanan çözelti kullanılmıştır.

Nanoliflerin yapısı incelendiğinde, enoksaparinin asit pH'da korunması ve emiliminin arttırılması amacıyla enterik polimerler seçilmiştir.

Eudragit S100: pH 7 üzerinde çözünen biyoparçalanır hidrofobik bir polimerdir. Bu sebeple 3 katlı nanolif yapısının alt ve üst tabakasında yer alan bu polimerin kullanılması ile ara tabakada bulunan etkin maddenin/nanopartikül içindeki etkin maddenin mide asitinden korunması hedeflenmiştir.

Daha önce yapılan ko-aksiyel nanolif üretim çalışmaları sırasında Eudragit S100 sıklıkla kullanılmıştır. Bu ön formülasyon çalışmaları sonucunda polimer konsantrasyonuna ve çözücülere karar verilmiştir. Hem çözücünün iletkenlik özellikleri hem de lif yapısının özellikleri değerlendirilerek alt ve üst tabakayı oluşturacak liflerin çözelti içeriği böylece belirlenmiştir. Nanoliflerin hazırlanması sırasında Eudragit S100, etil alkol:DMF (6:4 v/v) karışımında % 15 konsantrasyonda hazırlanmıştır ve tabakalı nanoliflerin hazırlanması için alt ve üst tabaka belirlenmiştir. Hazırlanan sonuç formülasyonlar ve içerikleri:

Ara tabakada enoksaparin içeren elektro-çekim teknolojisi ile üretilen üç tabakalı nanolifler (NF)

1. tabaka : Eudragit S 100 (%15) Etil alkol:DMF 6:4
2. ara tabaka : % 8 Enoksaparin, % 4 Kollidon K90, % 0.25 glikol kitozan 40º alkol
3. tabaka : Eudragit S 100 (%15) (Etil alkol:DMF 6:4)

Nanopartiküllerin, ara tabakada yer almasıyla hazırlanan üç tabakalı nanolifler (NP/NF ikili sistemi)

1. tabaka : Eudragit S 100 (%15) (Etil alkol:DMF 6:4)
2. ara tabaka : NP+ %7,5 Kollidon K90 (Etil alkol: su 2:1)
3. tabaka : Eudragit S 100 (%15) (Etil alkol:DMF 6:4)

3.4.2. Elektro-çekim yönteminde kullanılan çözeltilerin karakterizasyon çalışmaları

Viskozite ölçümleri

Nanoliflerin hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin viskozite ölçümlerinin yapılması önformülasyon çalışmaları açısından önemlidir. Viskozitesi çok düşük çözeltilerle çalışıldığında elektro-çekim işlemi sırasında lifin yapısında bozulmalar görülebilir ve işlem devamlılığı sağlanamayabilir. Eğer viskozitesi çok yüksek çözeltiler kullanılırsa da elektrik alan lif oluşumu için yeterli gelmeyebilir ve elektro-çekim işlemi durabilir. Bu yüzden çalışmalarımızda kullanılan çözeltilerin viskozite ölçümleri yapılarak lif çekimi çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalarımızda viskozite ölçümleri Rhesonse firmasına ait Microvisc cihazıyla yapılmıştır (Resim 3.2). 0,5-1 ml arasında çözelti cihazın özel enjektörüyle alınarak bölmesine yerleştirilmiştir ve viskozite ölçümü oda sıcaklığında yapılmıştır.



Resim 3.2. Viskozite ölçüm cihazı

İletkenlik ölçümleri

Elektro-çekim işlemi elektrik alan altında yürüyen bir lif üretim yöntemidir. Bundan dolayı kullanılan çözeltilerin elektrik iletkenlikleri lif yapısının oluşması ve işlemin devamlı olması açısından önemlidir. Yeterli iletkenliğe sahip olmayan çözeltiler kullanıldığında lif yapısının oluşmasını sağlayan Taylor konisini oluşturmayabilir, lif çekimi gerçekleşmeyebilir.

Hazırlanan çözeltilerin iletkenliklerini ölçmek için; 7-8 ml çözelti kondüktivite cihazının probunun sığabileceği büyüklükte cam bir tüpe alınmıştır. Daha sonra kondüktivimetre cihazının probu tüpün içine batırılmıştır. Cihaz kullanılarak µS/cm cinsinden kondüktivite değerleri ölçülmüştür (Resim 3.3). Deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

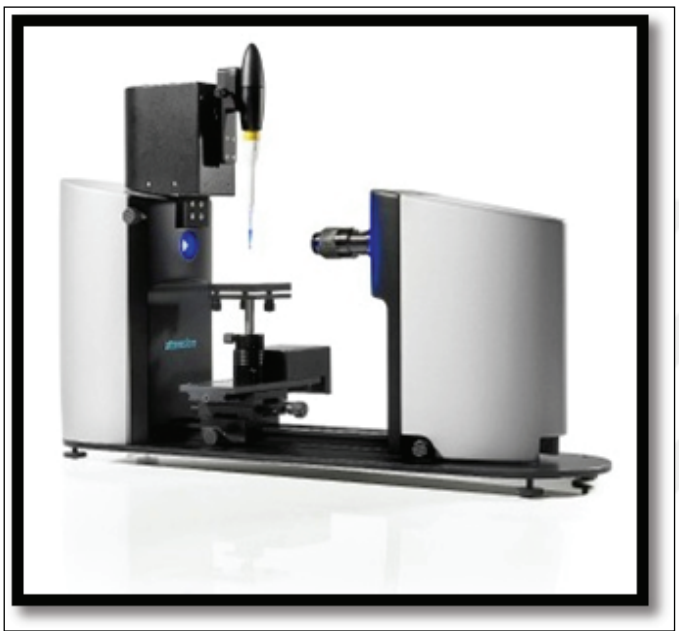


Resim 3.3. İletkenlik ölçüm cihazı

Yüzey gerilimi ölçümleri

Elekto-çekim işleminde stabil bir Taylor konisinin oluşması için kullanılan çözeltinin yüzey geriliminin düşük olması beklenmektedir. Yüksek yüzey gerilimine sahip çözeltilerin lif çekimleri sırasında yüksek elektrik alan gerekir bunun yanında başlık ucunda oluşan damla lif haline geçmeden kalabilir. Bu nedenle çalışmalarda kullanılacak polimer çözeltilerinin yüzey gerilim ölçümleri yapılmıştır. Yüzey geriliminin birimi mN/cm ya da dyn/cm'dir.

Tez çalışmalarında yüzey gerilimi ölçümleri asılı damla (pendant drop) metodu kullanılarak yapılmıştır (Attension-Theta Lite. Biolin Scientific. Finland, Resim 3.4). Öncelikle polimer çözeltisi cihazın enjektörüne alınarak, enjektörün ucu aşağıda olacak şekilde dikey biçimde yerleştirilmiştir. Ardından enjektör ucunda damla oluşturulmuştur. Bu damlanın en büyük olduğu noktada yapılan ölçümler damlanın şekliyle birlikte kayıt yapılırken ölçümler yapılmıştır.



Resim 3.4. Yüzey gerilimi ölçüm cihazı

Karışımlarının yüzey gerilimi, cihazın yazılımında, Young Laplace (Żarska, Dzida ve Apelblat, 2017) eşitliği kullanılarak damlanın geometrik ölçülerine göre cihazın yazılımı tarafından hesaplanır. Deneyler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Sonuç nanolif formülasyonlarının (NF ve NP/NF) hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bunun yanında ko-aksiyel nanolif hazırlama çalışmalarında kullanılan ve lif çekimi gerçekleşen çözeltilerin de viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümleri de yapılmıştır.

3.4.3. Nanopartiküllerin hazırlanması

Nanopartiküllerin hazırlanması için iyonik jelasyon yöntemi kullanılmıştır (Calvo ve diğerleri 1997). DMA kitozan çözeltisi hazırlanırken kullanılan kitozan konsantrasyonunun

1,75 katı konsantrasyonda seyreltik asetik asit çözeltisi kullanılmıştır ve enoksaparin farklı konsantrasyonlarda, farklı a/a oranlarında karıştırılarak iyonik jelasyon yapılmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında, optimum formülasyonun bulunmasında ortalama partikül çapı, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli ve yükleme etkinlikleri incelenmiştir. Formülasyon parametreleri ve işlem parametreleri adım adım belirlenerek uygun içerik belirlenmiştir. Sonuç nanopartikül formülasyonuna ulaşmak için aşağıdaki sıralanan çalışmalar yapılmıştır.

- ✓ Kitozan konsantrasyonunun belirlenmesi
- ✓ Kitozan/enoksaparin a/a oranının belirlenmesi
- ✓ Çözeltilerin ilave edilme süresinin seçilmesi
- ✓ Karıştırma hızı ve
- ✓ Karıştırma süresinin belirlenmesi

İlk olarak kitozan çözeltisinin konsantrasyonu belirlenmiştir. İyonik jelasyon yönteminde kullanılan kitozan çözeltisinin konsantrasyonu nanopartiküllerin özelliklerini etkilemektedir (Z. Liu, Jiao, F. Liu, ve Zhang, 2007; Lin ve diğerleri, 2009; Shahbazi ve Hamidi, 2013). Kitozan çözeltisinin konsantrasyonu belirlendikten sonra kitozan/enoksaparin a/a oranı seçilmiştir. Bu seçimler yapılırken partikül çapı, PDI değeri ve zeta potansiyeli önemli kriterler olmuştur. Formülasyon içeriği belirlendikten sonra enoksaparin çözeltisinin ilave edilme süresi, karıştırma hızı ve süresi gibi işlem parametreleri belirlenmiştir.

3.5. Nanosistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan üç ayrı nanosistem (nanolifler, nanopartiküller ve nanopartikül yüklü nanolif sistemi) için önformülasyon çalışmaları sonucunda optimum formülasyonlar belirlenmiştir. Bu formülasyonlar üzerinde karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bazı çalışmalar nanoliflere ve nanopartiküllere spesifik olarak yapılmıştır. Bu çalışmaların yanında; etkin madde yükleme etkinliği, in vitro salım çalışması, hücre kültürü çalışmaları gibi ortak karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır.

Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları

- ✓ Yüzey morfolojisi, nanoliflerin lif çapı ve lif çapı dağılımının incelenmesi
- ✓ Porozite, por çapı dağılımı, spesifik yüzey alanı ölçümleri
- ✓ Temas açılarının ölçülmesi
- ✓ Mukoadhezyon özelliklerinin incelenmesi

Nanopartiküllerde yapılan karakterizasyon çalışmaları

- ✓ Ortalama partikül büyüklüğü, dağılımı ve zeta potansiyel ölçümleri

Nanoliflerde ve nanopartiküllerde yapılan ortak karakterizasyon çalışmaları

- ✓ Nanosistemlerde etkin madde yükleme etkinliği
- ✓ Nanosistemlerden enoksaparinin salım hızı tayini
- ✓ Tavşan barsağından permeabilite çalışması
- ✓ MTT analizi ve Caco-2 permeabilite çalışması
- ✓ Stabilite çalışmaları

İn vivo çalışmalar

- ✓ Formülasyonların tavşanlara uygulanmasından sonra anti-Xa ve aPTT tespitinin yapılması
- ✓ Floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışmaları

3.5.1. Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları

Yüzey morfolojisi, nanoliflerin lif Çapı ve Lif çapı dağılımının incelenmesi

Hazırlanan nanoliflerin yüzey morfolojileri ODTÜ Merkez Laboratuarında SEM (Scanning Electron Microscopy) görüntüleri alınarak incelenmiştir. SEM görüntüleri incelenerek nanolif yapısının oluşup oluşmadığı belirlenmiştir. Bu görüntüler Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, version 2.0) adı verilen program kullanılarak açıldıktan sonra ortalama lif çapı ölçümleri yapılmıştır. Programda görüntüler açıldıktan

sonra yakın görüntüleri alınabilmektedir ve programda skalaya göre lif çapı değerleri ölçülmektedir. Analizi yapılan görüntülerden 50 tane nanolif çap ölçümü yapılarak ortalama lif çapları belirlenmiştir. Ayrıca nanoliflerin lif çapları hesaplandıktan sonra Origin programı kullanılarak (7.5 software, Origin Lab, USA) lif çap dağılım histogramları elde edilmiştir.

Nanoliflerin porozite, por çapı dağılımı ve spesifik yüzey alanı ölçümleri

Hazırlanan nanoliflerin poroziteleri SEM görüntülerinden hareketle ImageJ programı kullanılarak hesaplanmıştır. ImageJ ile porozite hesabında; önce programda nanoliflerin orijinal görüntüsü siyah/beyaz olarak tekrar renklendirilir. Nanolifler siyah, boşluk kısmı ise beyaz olarak renklendirildikten sonra iki farklı rengin kendi alanları hesaplanır. Beyaz kısımların alanı lifin toplam alanına bölünür ve 100 ile çarpıldıktan sonra bu oran % porozite olarak kabul edilir. Nanoliflerin spesifik yüzey alan ölçümleri ise ODTÜ Merlab'da yüzey alanı ölçüm cihazında (BET analizi) hizmet alımı ile gerçekleştirimiştir.

Nanoliflerin temas açılarının ölçülmesi

Temas açısı ölçümleri nanolif formülasyonlarında yapılmış ve optik temas açısı ölçüm cihazı kullanılmıştır. Ölçüm, bir materyalin üzerine bir damla sıvı bırakılarak çeşitli optik sistemlerin yardımıyla belli bir süre sonra damlanın boyutuna göre değerlendirilmektedir. Temas açısının küçük olması (0-90°) ıslanabilirliğin iyi, büyük olması (90-180°) ise yetersiz olduğunun göstergesidir. Sıvının viskozitesi, sıvının katıyı ıslatma hızı, sıvının sıcaklığı ve yüzey gerilimi gibi faktörler temas açısını etkilemektedir. Hazırlanan nanolif formülasyonlarında da enoksaparinin salımı, yüzeyin ıslanabilirliği ile ilişkilidir.

Ölçümlerde nanolif yüzeyine 5 µl distile su damlatılarak temas açılarının değişimi gözlendi. Nanoliflerin kamerada düzgün şekil alabilmesi için "convex sample holder" kullanıldı. Bu aparat sayesinde nanolif yüzeyi gerdirilerek pürüzsüz ve düzgün bir şekil alması sağlanmaktadır. Nanolif yüzeyinde farklı noktalarda ölçüm yapılarak ortalama temas açısı değerleri bulunmuştur.

Nanoliflerin mukoadhezyon özelliklerinin incelenmesi

Texture Analyzer TA-XT cihazında incelenmiştir. Bunun için üretilen nanolifler cihazın üst probuna yapıştırılarak, alt kısımda simüle GIS sıvısı ile ıslatılan tavşan barsağının kesiti (0,6 cm prop yarı çapına uygun şekilde) yerleştirilmiştir. Deneylerde daha önceden valide edilmiş mukoadhezyon test koşulları kullanılmıştır (Kaplan, Tuğcu-Demiröz, Vural ve Çelebi, 2018). Buna göre,

- ✓ Prob hızı 1,0 mm/sn,
- ✓ Probun uyguladığı kuvvet 0,2 N,
- ✓ Mukoza ile örneğin temas süresi 150 sn olarak belirlenmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda mukoadhezyon işi aşağıdaki eşitlik ile hesaplanarak mukoadhezif özellikler değerlendirilmiştir.

Mukoadhezyon işi (mJ/cm^2)= AUC (Uygulanan kuvvet-mesafe grafiğinde eğri altında kalan alan, N.mm)/πr^2 (nanosistemlerle temas eden barsak yüzey alanı=1,13 cm^2) (Eş. 3.3)

3.5.2. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları

Nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, dağılımı, TEM görüntülerinin incelenmesi ve zeta potansiyel ölçümü

Ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümleri nanopartiküllerin etkinliği ve fiziksel stabilitesi açısından önemlidir. Bu amaçla, Malvern ZetaSizer Nano ZS aleti kullanılmıştır. Nanopartiküllerin mikroskop görüntüleri ODTÜ Merkez Lab'da hizmet alımı ile gerçekleştirerek, Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak incelenmiştir.

3.5.3. Nanoliflerde ve nanopartiküllerde ortak olan karakterizasyon çalışmaları

Nanosistemlerde etkin madde yükleme etkinliği

Nanopartiküllerde yükleme etkinliği indirekt metod ile hesaplanmıştır. Bu metotta nanopartiküllere yüklenmeyen enoksaparin miktarından hareketle hesap yapılmaktadır.

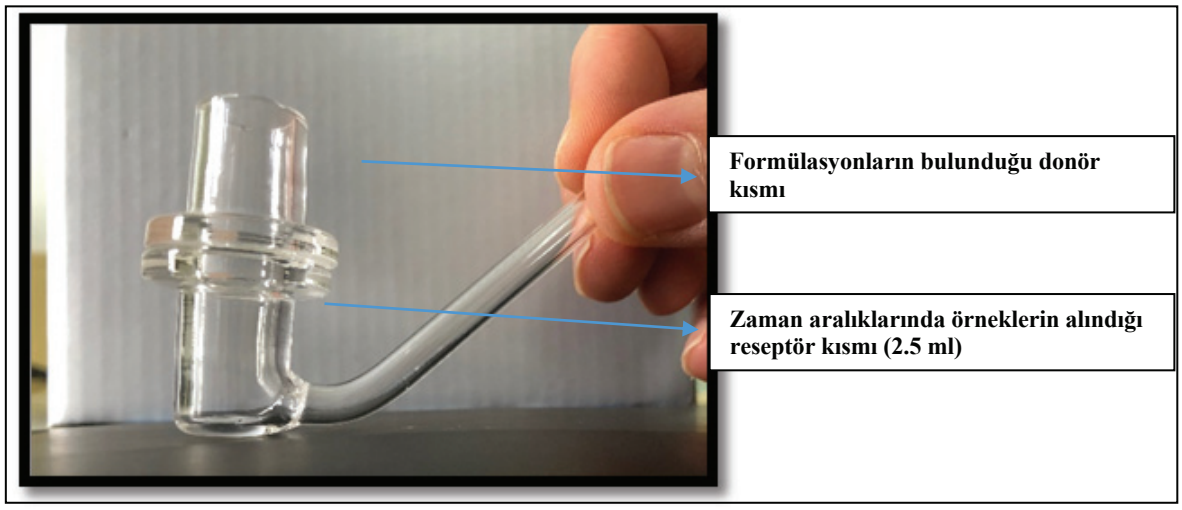
Nanopartiküller hazırlandıktan sonra 15000 rpm de 30 dak santrifüj edilmiş ve tüpün üst kısmından (supernatant) örnek alınarak membran filtreden süzüldükten sonra UV spektrofotometrede analiz yapılmıştır. Nanopartiküllere yüklenmeyen enoksaparin miktarının ölçülmesinden sonra Eşitlik 3.4 kullanılarak yükleme etkinliği hesaplanmıştır.

Yükleme etkinliği (%) = (Kullanılan enoksaparin miktarı-yüklenmeyen enoksaparin miktarı /Kullanılan enoksaparin miktarı) *100 (Eş. 3.4)

Nanoliflerin yükleme etkinliği hesaplanırken lifin orta bölgesinden 1*1 ölçülerinde 3 eşit parça alınarak pH 7,4'de tamamen çözündükten sonra enoksaparinin miktar tayini yapılmıştır.

Nanosistemlerden enoksaparinin salım hızı tayini

Çalışmalar Franz difüzyon hücresinde yapılmıştır (yüzey alanı 0,785 cm^2, Resim 3.5). Reseptör ve donör olmak üzere iki kısımdan oluşan Franz hücrelerinin arasına diyaliz membran (cut off: 14 000 Dalton) yerleştirilmiştir. Donör kısmına konulan nanoliflerden (1*1 kesitinde) ve nanopartikül (1 mL) formülasyonlarından açığa çıkan heparin miktarı hesaplanmıştır.



Resim 3.5. Kullanılan Franz difüzyon hücresi

Deney; 37 ºC'de, pH 1,2 tamponunda 2 saat sürdürüldükten sonra pH 7,4 ortamında 24 saat devam etmiştir. 30., 60., 90., 120., 180., 240., 360., 480., 720., 1440. dakikalarda 2,5 mL örnek, Franz hücresinin reseptör kısmından alınarak, aynı sıcaklıktaki yeni tampon ilave

edilmiştir. Alınan örnekler metakromatik yöntem ile UV spektrofotometrede analiz edilmiştir. Açığa çıkan enoksaparin miktarı zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Resim 3.6'da in vitro salım çalışması için hazırlanan deney ortamı gösterilmiştir.



Resim 3.6. İn vitro salım çalışmasının yapıldığı su banyosu ve kullanılan Franz difüzyon hücreleri

Tavşanların intestinal dokusundan enoksaparin'in geçiş oranının tespiti

Tavşan ince barsaklarından Franz difüzyon hücresinin yüzey alanı olan 0,785 cm^2 büyüklüğünde kesitler alınarak permeasyon çalışmalarının yapılacağı difüzyon hücresine yerleştirilmiştir. Franz difüzyon hücresinin donör fazına enoksaparin yüklü formülasyonlar (in vitro salım çalışmasındaki miktarlarda) eklenmiş ve reseptör faza geçen enoksaparin miktarı tespit edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (30., 60., 90., 120., 180., 240., 360., 480., 720. 1440. dak) örnekler alınarak metakromatik yöntemle absorbans okunarak, enoksaparin miktarları hesaplanmıştır. Zamana karşı tavşan intestinal dokusundan geçen enoksaparin miktarları grafiklerinde, doğrusallık gösteren (r^2 değeri 1'e en yakın olan) noktalardan geçen doğrunun eğimi akıyı (J_{flux}) verir. Her formülasyon için bulunan akı değerlerinden permeasyon katsayısı hesabı ise Eşitlik 3.5'e göre yapılmıştır.

$$Log_{kp}=J_{flux}/C_{donör} \qquad \text{(Eş. 3.5)}$$

Kp=permeasyon katsayısı

J_{flux}= akı değeri

$C_{donör}$=Başlangıçta bulunan enoksaparin miktarı

Permeabilite çalışmasında kullanılan dokunun bütünlüğünün tespiti elektriksel direncin ölçümü ile yapılmıştır. TEER (transepithelial/transendothelial electrical resistance) ölçümlerinde Evom Voltmeter direnç ölçüm aleti kullanılmıştır. Cihazın iki elektrodundan bir tanesi Franz difüzyon hücresinin donör kısmına, diğer elektrot reseptör kısmına daldırılarak değerler ölçülmüştür. TEER ölçümleri deney başlangıcında ve 24. saat sonunda yapılmıştır ve başlangıç değerine göre % azalma hesaplanmıştır. Tavşanlardan alınan ince barsak örneklerinin TEER ölçümü ile membrandaki elektriksel direnç değişiminden, membranın bütünlüğü hakkında yorum yapılmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları

Formülasyonların hücre kültürü çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Nanosistemlerde MTT analizi

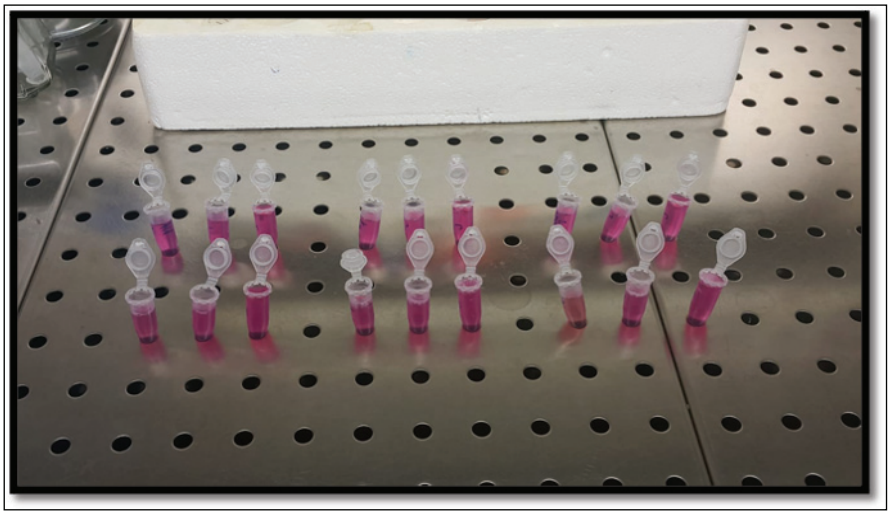
Hazırlanan formülasyonların sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Yaşayan hücrelerin mitokondrial dehidrogenaz aktivitesinin analizi için kolorimetrik MTT analizi kullanılmıştır.

MTT testi in vitro koşullarda hücrelerin canlılığına dayanan ve sitotoksisiteyi ölçmek için uygulanan kantitatif kolorimetrik bir testtir. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanmanın sonucunda suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkte kristaller (formazan kristalleri) oluşmaktadır. Kristaller, çeşitli organik çözücülerde çözünmektedir. Çözünmüş olan bu kristal, konsantrasyona bağlı olarak görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbans vermektedir. MTT-1 ve MTT-2 olarak iki ayrı MTT çalışması yapılmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucunda enoksaparinin MTT ve Caco-2 geçiş çalışmaları için kullanılmış dozlardan hareketle MTT-1 çalışmasına 3,125, 12,5, 50 µg/mL konsantrasyonlar seçilerek başlanmıştır ancak, Caco-2 çalışmaları sonucunda enoksaparin

miktarının tayininde sorun oluşmaması için dozlar 50, 75, 100 µg/mL yükseltilerek MTT-2 çalışması yapılmıştır.

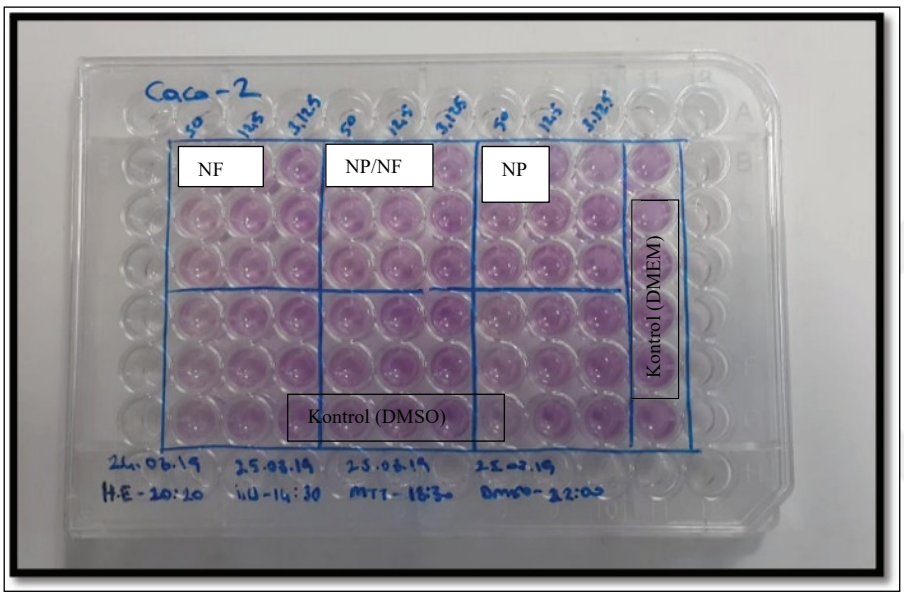
Çalışmamızda, Caco-2 hücreleri 96-kuyucuklu plaklara 1×10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. DMEM (DMEM: Dulbelcco's Modified Eagle Medium) içerisinde süspande edilen 200 µL hücre süspansiyonu kuyucuklara ekilerek bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler, nanosistemlerin farklı enoksaparin konsantrasyonlarına (50, 12,5, 3,125 µg/mL) 4 saat boyunca maruz bırakılmıştır.

Nanosistemlerin hücre kültür ortamına uygulanabilmesi için formülasyonlar steril dimetilsülfoksit (DMSO) ortamında hazırlanmıştır. Nanolif formülasyonlarının hazırlanması aşamasında, nanolifler öncelikle 1x1 cm^2 boyutlarında kesilmiş ve daha sonra çözünebilecekleri en düşük DMSO miktarının tespiti için ön çalışmalar yapılmıştır. Nanopartikül formülasyonunun hazırlanması aşamasında ise, nanopartikül formülasyonu üzerine aynı oranda DMSO eklenerek nanolif formülasyonlarında olduğu gibi sonikasyon işlemi ile çözünmesi sağlanmıştır. Her formülasyon ve tüm konsantrasyon değerleri için aynı oranda DMSO içeren kontroller hazırlanmıştır (Resim 3.7). DMSO kontrolleri için, %100 steril DMSO, DMEM ile seyreltilerek nanosistemlerde kullanılan yüzdelerde hücrelere eklenmiştir. Her ilaç standartı için kendi DMSO kontrolüne göre % hücre canlılığı, değerlendirilmekle birlikte DMSO kontrollerinin % hücre canlılığı ise sadece kültür ortamının uygulandığı kuyucuklardan elde edilen % hücre canlılık değeri, % 100 olarak (kontrol grubu) kabul edilerek hesaplanmıştır.



Resim 3.7. MTT çalışması için nanosistemlerin standartlarının hazırlanışı

İnkübasyondan sonra hücrelerin yaşayabilirliği tespit edilmiştir. Hücreler PBS içinde hazırlanan MTT çözeltisi ile (2,5 mg/mL) 37 ºC ve %5 CO_2 ortamında inkübasyondan sonra oluşan mavi-mor formazan kristalleri DMSO'de çözülerek, kolorimetrik olarak 540 nm'de okunmuştur (Resim 3.8). Her konsantrasyon 3 defa test edilerek 3 bağımsız deney grubu oluşturulmuştur. Absorbans canlı hücre sayısı ile orantılı olduğu için, hücre canlılığı yüzde olarak ifade edilmiştir.



Resim 3.8. MTT çalışması sonrası çözünen formazan kristallerinin görüntüsü

Nanosistemlerde Caco-2 hücrelerinden permeabilite çalışmaları

Nanosistemlerin barsak permeabilitelerini değerlendirmek üzere *"Caco-2 hücresi tek tabaka modeli"* kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle Caco-2 hücreleri % 10 fetal bovin serum ve penisilin-streptomisin (50 ünite/mL; 50 µg/mL) içeren DMEM kültür ortamı içinde kültüre edilmiştir ve hücreler 37°C'de, % 5 CO_2 içeren atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir. Deneylerde 26 pasaj sayısına sahip hücreler kullanılmıştır. Permeabilite deneyi için hücreler daha önceden belirlenen sayıda (60 000 hücre/ insert) insertlere (Thincert^{TM}, 12 well, 1,0 µm por çapı) ekilmiş ve 21 gün boyunca, gün aşırı kültür ortamları değiştirilerek takip edilmiştir (Resim 3.9). Bu süre sonunda Caco-2 hücrelerinin tek tabaka bütünlüğünün değerlendirilmesi transepitel elektrik rezistansının (TEER) ölçülmesi ile yapılmıştır. Tek tabaka bütünlüğünün değerlendirilmesi sonucu TEER değerleri; 600-700 ohm.cm^2 aralığında tespit edilmiştir ve belirlenen TEER değerleri hücrelerin permeabilite çalışması için kullanılabileceğini göstermiştir. Tabaka bütünlüğü sağlandıktan sonra apikal tarafta

bulunan hücrelere % 2,5 DMSO içeren Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) içinde hazırlanan formülasyonlar (0,5 ml) (NF, NP/NF, NP) ve bazolateral kısma ise aynı oranda DMSO içeren HBSS çözeltisi (1 ml) uygulanmıştır (Resim 3.9).



Resim 3.9. Caco-2 Permeabilite çalışmaları sırasında formülasyonların uygulandığı plaka görüntüsü

Hücreler 2 saat, 60 rpm ve 37 °C'de inkübe edildikten sonra bazolateral kısımdaki ortamlar alınıp metakromatik esasa dayalı spektrofotometrik ölçüm yöntemi ile analiz edilmiştir (Resim 3.10). Aşağıdaki eşitlik kullanılarak görünür permeabilite katsayısı (P_{app}, cm/sn) hesaplanmıştır (Eş 3.6) (Thanou ve diğerleri, 2001b; Stephansen, Garcia-Diaz, Jessen, Chronakis ve Nielsen, 2015).

$P_{app} = dC/dt.1/A.C_o)$ (Eş. 3.6)

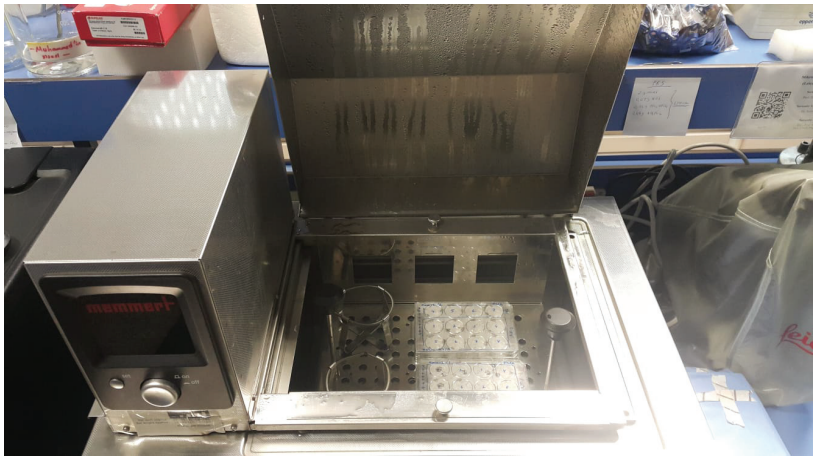
dC/dt = ilaç permeasyon oranı (µg/sn)

dC: Caco-2 çalışmaları sonucunda bazoletral kısımdan alınan örneğin metakromatik analiz ile ölçülmesi sonucu hesaplanan enoksaparin miktarı

dt: 2 saat (7200 sn)

A= insertlerin yüzey alanı (cell monolayer) (1,131 cm^2)

C_0= apikal bölgedeki başlangıç konsantrasyonu (µg/mL) (MTT çalışmaları sonucunda Caco-2 deneylerinde kullanılacak doz belirlenmiştir 75 µg/mL)



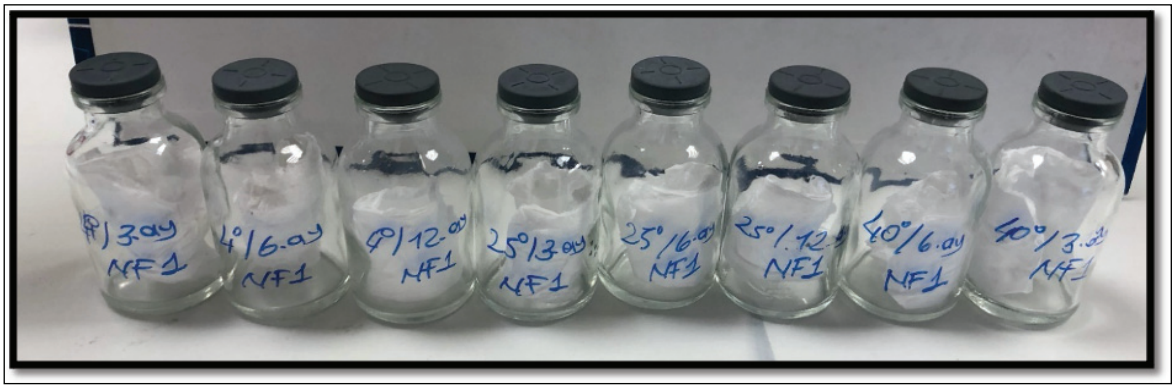
Resim 3.10. Caco-2 çalışmaları sırasında hücrelerin inkübasyon ortamları

Caco-2 tabakalarından yüksek oranda emilen ilaçlar yüksek permeabilite katsayısına sahip (Papp> $1x10^{-6}$) olarak değerlendirilmektedir (Yee, 1997). Ayrıca göreceli enoksaparin permeasyonu Eşitlik 3.7'ye göre hesaplanmıştır (Charoongchit ve diğerleri, 2017).

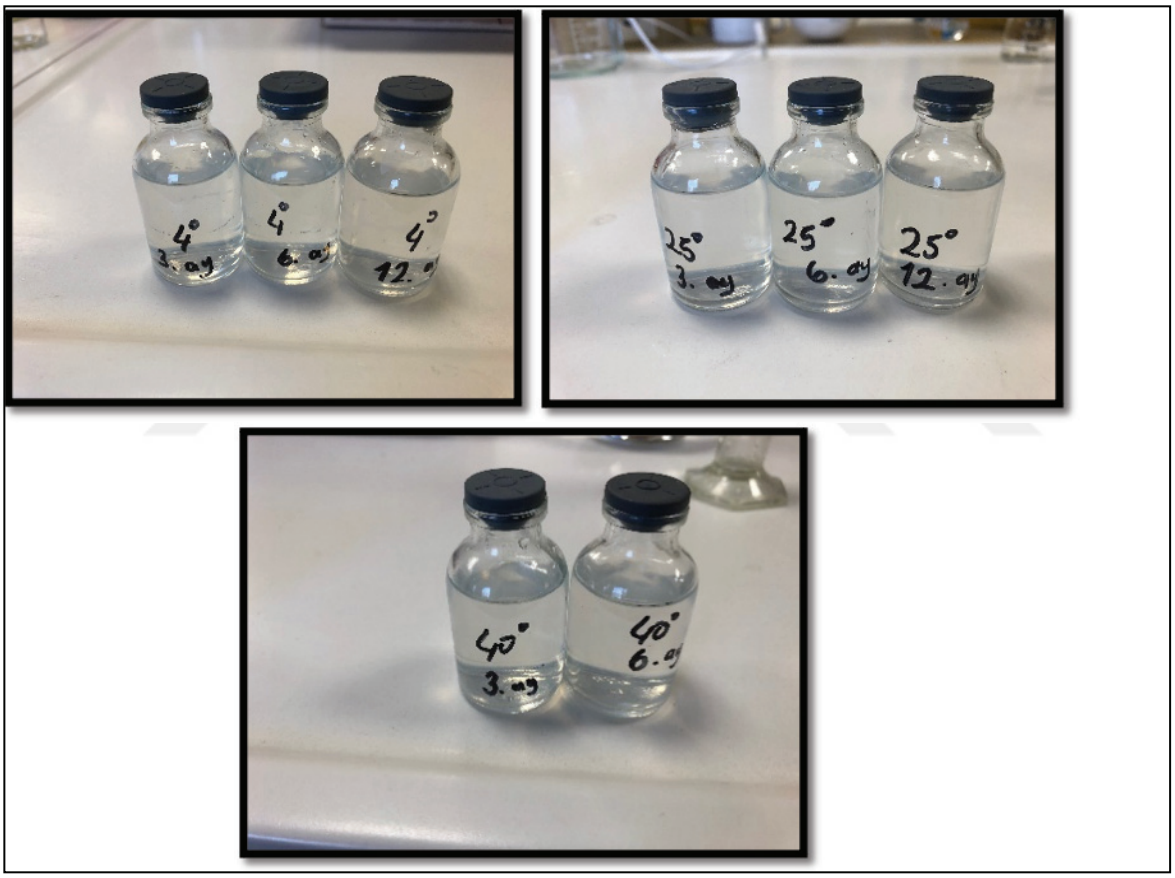
% göreceli enoksaparin permeasyonu = 2 saat sonra bazolateral kompartmanda tayin edilen enoksaparin miktarı (µg) / Başlangıçtaki enoksaparin miktarı (µg) (Eş. 3.7)

Nanosistemlerin stabilite çalışmaları

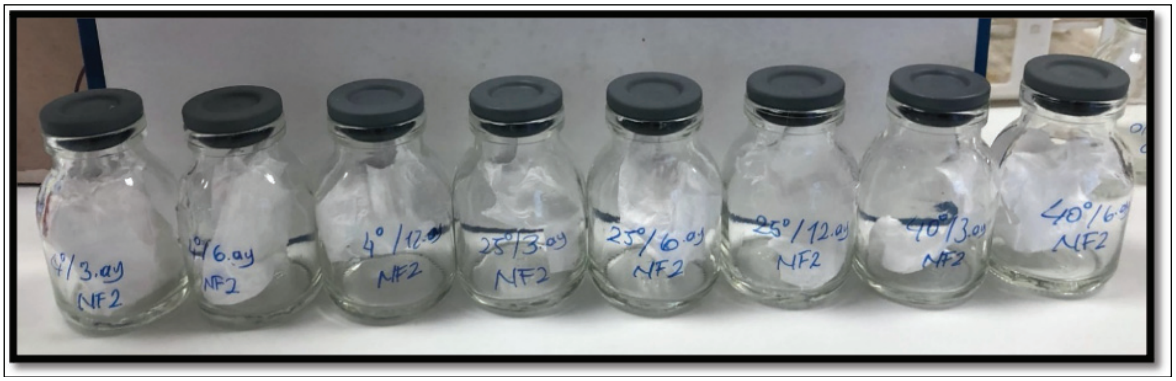
Stabilite çalışmaları ICH Stabilite Kılavuzu doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Stabilite çalışmaları 3 farklı ortamda (4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem) Hızlandırılmış testler (40ºC/%75 bağıl nem) 6 ay, uzun süreli testler (25ºC/%60 bağıl nem ve 4ºC/ortam nemi) 1 yıl devam etmiştir. Formülasyonlar ağzı kapalı olarak cam flakon şişelere alınmıştır (Resim 3.11-Resim 3.13). Nanoliflerden ise 3. 6. ve 12. aylarda örnek alınarak etkin madde miktar tayini, in vitro salım çalışması yapılmış ve SEM görüntüleri incelenerek ortalama lif çap ölçümleri yapılmıştır.



Resim 3.11. Stabilite çalışmaları için hazırlanan tabakalı nanolifler (NF)



Resim 3.12. Stabilite çalışmaları için hazırlanan nanopartiküller (NP)



Resim 3.13. Stabilite çalışmaları için hazırlanan nanopartikül yüklü tabakalı nanolifler (NP/NF)

3.5.4. İn-vivo deneyler

Deneyler Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Araştırma Merkezi Laboratuvarında yapılmıştır. Deneylerde Yeni Zelanda cinsi, 2.0-2.5 kg ağırlığında erkek tavşanlar kullanılmıştır (Resim 3.14).



Resim 3.14. İn vivo çalışmalarda kullanılan tavşanlar

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 24/12/2016 tarihli ve G.Ü.ET-16.079 kodlu kararı ile onay alınmıştır. Deney öncesi ve deney sırasında ad libitum

olarak beslenen tavşan grupları deney süresince ayrı ayrı kafeslerde olmak üzere bakılmıştır (Resim 3.15).



Resim 3.15. İn vivo çalışmalarda kullanılan tavşanların bulundukları ortam

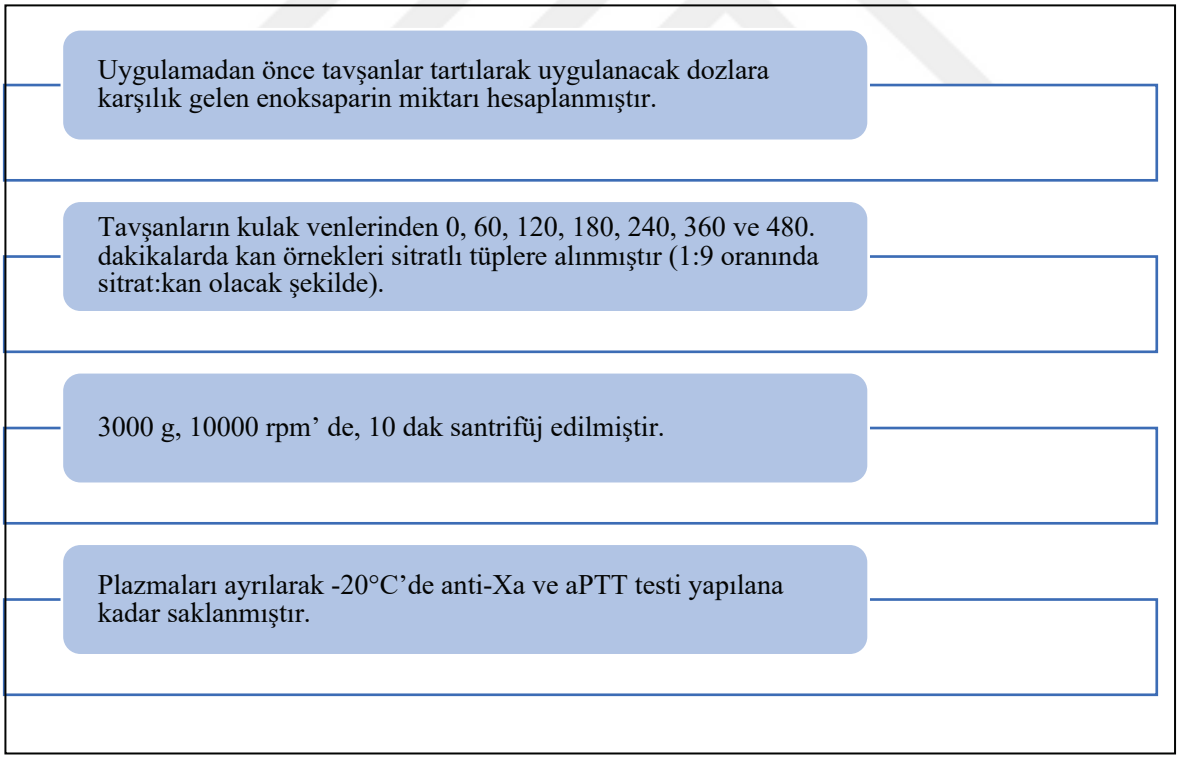
Formülasyonların tavşanlara uygulanması ve plazmalarında enoksaparin tayini amacıyla anti-Xa ve aPTT ölçümlerinin yapılması

Bu amaçla kullanılacak deney grupları Çizelge 3.4'de gösterilmektedir. DMAH türevlerinin oral uygulandığı in vivo çalışmalarda farklı dozlar kullanılmıştır (700-15000 IU/kg) (İskenderoğlu, 2007). Bizim çalışmalarımız için kullanılacak enoksaparin dozunun belirlenmesinde, tavşanların yutabileceği büyüklükte liflerin içerdiği etkin madde miktarı baz alınarak 2000 IU/kg dozu belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. İn-vivo çalışmalarda formülasyonların uygulandığı tavşan grupları

Deney Grupları	Formülasyonlar	Tavşan sayıları	Uygulama dozu IU/kg
A-1	NF nanolifleri oral verilmiştir.	6	2000
A-2	Nanopartiküller (NP) oral verilmiştir.	6	2000
A-3	NP/NF kombine sistemi oral verilmiştir.	6	2000
A-4	Enoksaparin çözeltisi oral verilmiştir.	6	2000
A-5	Enoksaparin çözeltisi SC verilmiştir (Pozitif kontrol grubu)	6	100
A-6	Kontrol grubu (oral serum fizyolojik verilmiştir.)	6	1 ml
	Toplam	36 tavşan	

Tavşanlar bir gece önceden aç bırakılarak Grup 1 ve 3'de formülasyonlar oral yoldan tablet yutturma aparatı yardımıyla, Grup 2 ve 4'te formülasyonlar ise 2 ml'lik enjektör kullanılarak verilmiştir. Grup 5'e izotonik sodyum klorür içinde çözelti halinde hazırlanan enoksaparin SC yoldan uygulanmıştır. Tavşan kanlarında aPTT ve anti-Xa ölçümü öncesi uygulanan işlem basamakları Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Tavşan kanlarında aPTT ve anti-Xa tayini için uygulanan işlem basamakları



Resim 3.16. Hazırlanan nanosistemlerin tavşanlara oral yoldan uygulanması

Formülasyonların uygulanmasından sonra tavşanlarda plazmada heparin tayini

Tavşanlara oral ve SC yoldan uygulanan formülasyonların ve kontrol grubu tavşanların plazmalarındaki enoksaparin miktarlarının tespiti için tavşanlarda aPTT ve anti-Xa ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler hizmet alımı olarak belirlenen Düzen Lab'da yapılmıştır. Bu testler için anti-Xa aktivitesini (Stago Liquid Anti-Xa) ve aPTT değerlerini (Stago CK-Prest aPTT) ölçen hazır kitler kullanılmıştır. Anti-Xa ölçümü için yapılan test, faktör Xa'nın

plazmaya eklenmesiyle, plazmadaki substratı hidrolize etmesi ve heparinin oluşturduğu kompleksin faktör Xa'yı inhibe etmesi prensibine dayanmaktadır. aPTT ölçümü için yapılan testte ise aPTT kaolin aktivatör kullanılmaktadır.

aPTT değerlerinden PKSolver programı kullanılarak etkin maddeye ait farmakokinetik parametrelerden t_{maks} (maksimum aPTT değerine ulaşma süresi), AUC_{0-t} (aPTT-zaman grafiğinde 0'dan t anına kadar hesaplanan eğri altında kalan alan) ve $aPTT_{maks}$ (maksimum aPTT değeri) hesaplanmıştır. Ayrıca enoksaparin emilimi, subkütan verildiğinde oral verilişe göre daha yüksek olduğu için, referans olarak subkütan yol alınarak bağıl biyoyararlanım hesabı Eşitlik 3.8'e göre yapılmıştır.

$$\text{Bağıl biyoyararlanım} = AUC_{test} \times Doz_{referans} / AUC_{referans} \times Doz_{test} \times 100 \quad \text{(Eş 3.8)}$$



Resim 3.17. Tavşanların kulak venlerinden kan örneklerinin alınması

Formülasyonların tavşanlara uygulandıktan sonra floresan mikroskobu ile barsaklarının görüntülenmesi

Barsaktan in vivo geçişin görüntülenmesi amacıyla sonuç formülasyonlara enoksaparin yerine floresin isotiyosiyonat (FI) (4 mg/kg) konularak hazırlanmış olan formülasyonlar (Çizelge 3.5), bir gece aç bırakılan tavşanlara uygulanarak 2 ve 4 saat sonra ötanazi

uygulanmıştır. Tavşanların mide, barsak segmentleri (duedonum, jejenum ve ileum) alınarak floresan mikroskopda (Resim 3.18) incelenmiştir. Alınan görüntülerden Image J programı kullanılarak floresan boya yoğunluğu hesaplanmış ve formülasyonlar karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.5. Floresan mikroskopunda görüntülenmek üzere formülasyonların uygulandığı tavşan grupları

	Formülasyonlar	Tavşan sayıları
B-1	FI-NF oral verilmiştir.	2
B-2	FI-NP oral verilmiştir.	2
B-3	FI-NP/NF oral verilmiştir.	2
B-4	FI çözeltisi oral verilmiştir.	2
B-5	FI çözeltisi subkütan verilmiştir.	2
B-6	Oral SF verilmiştir.	2



Resim 3.18. Kullanılan Floresan mikroskopu

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

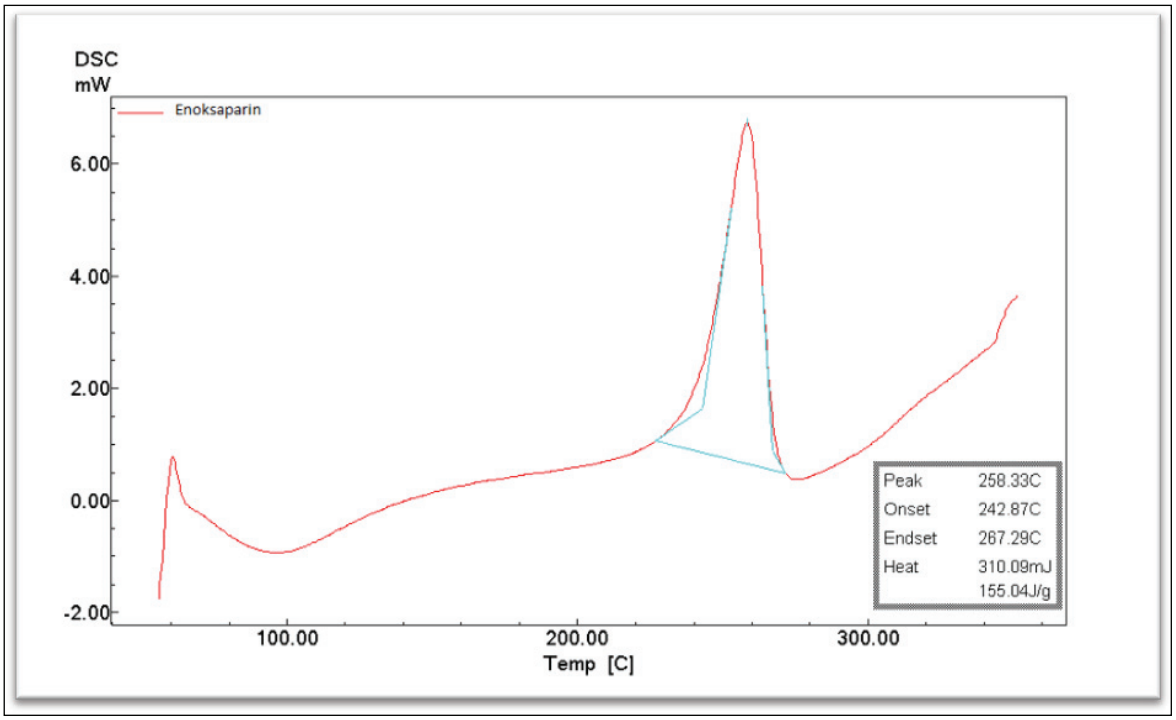
Tez çalışmasından elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programından (SPSS Version 16) yararlanılmıştır. Verilerin ortalama, standart sapma (SS) ve standart hata (SH) değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

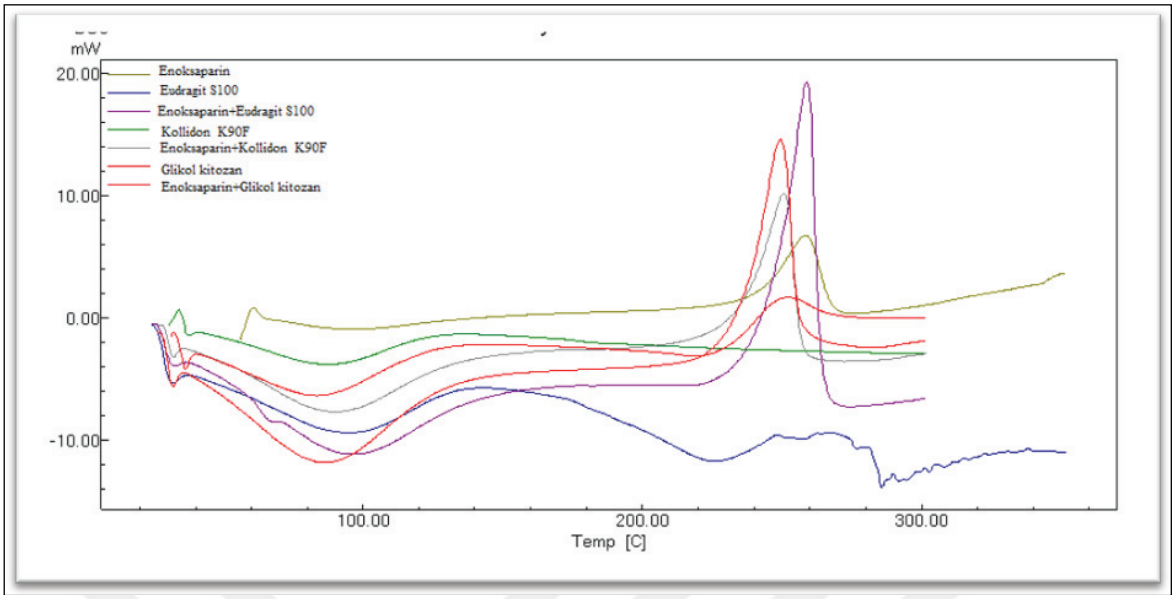
4.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

4.1.1. Diferansiyel taramalı kolorimetre (DSC) ölçümleri

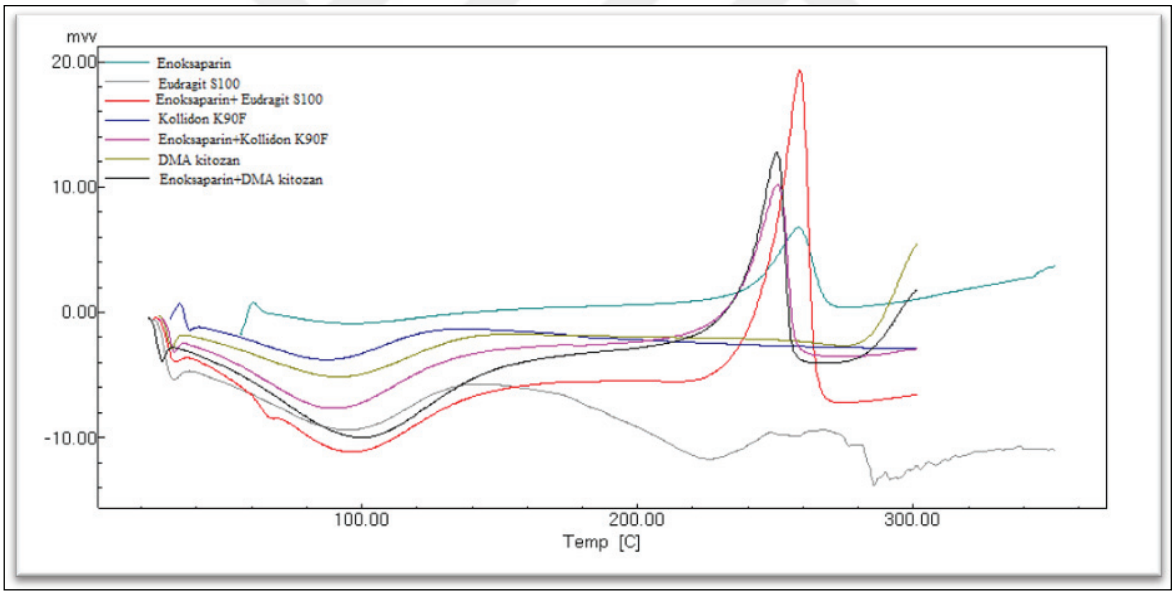
Etkin maddenin, polimer: etkin madde karışımlarının ve nanoliflerin DSC ölçümleri Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır (Şekil 4.1-4.4). Enoksaparin 258ºC'de ekzotermik pik vermiştir.



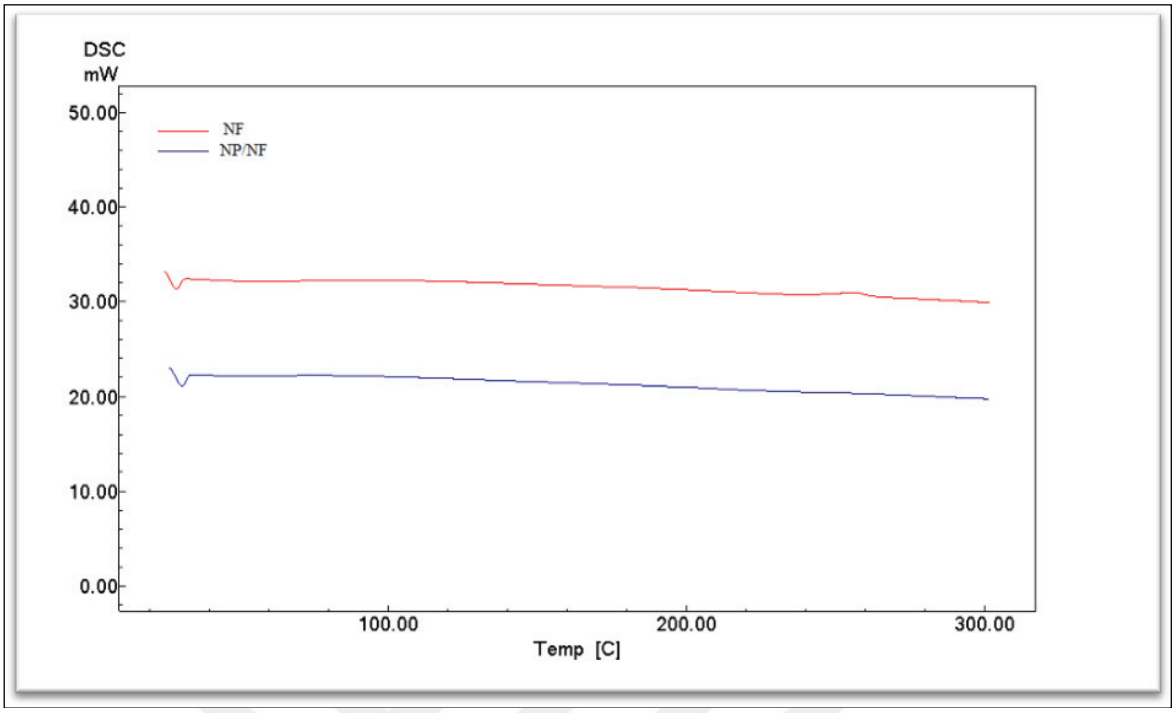
Şekil 4.1. Enoksaparine ait erime noktası piki



Şekil 4.2. NF formülasyonunda kullanılan polimerlerlerin enoksaparin ile fiziksel karışımlarının gösterdiği DSC pikleri



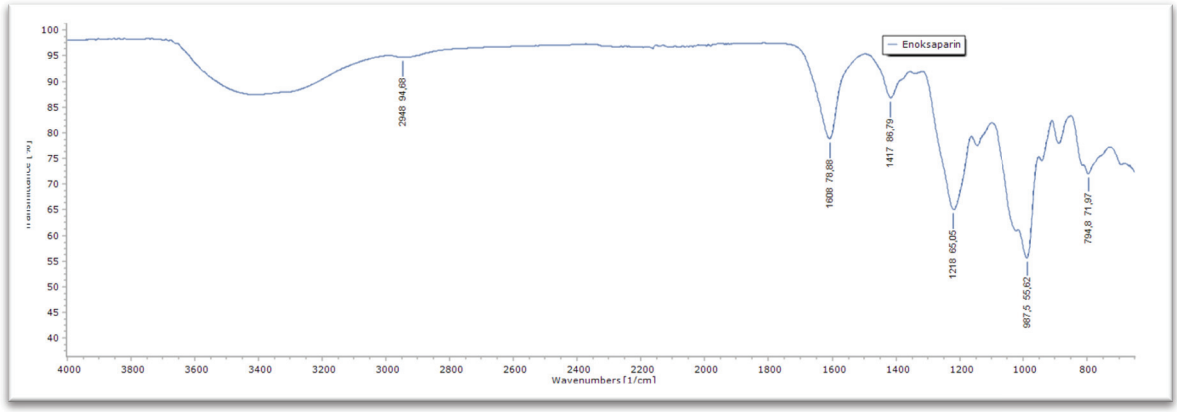
Şekil 4.3. NP/NF formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan polimerlerlerin enoksaparin ile fiziksel karışımlarının gösterdiği DSC pikleri



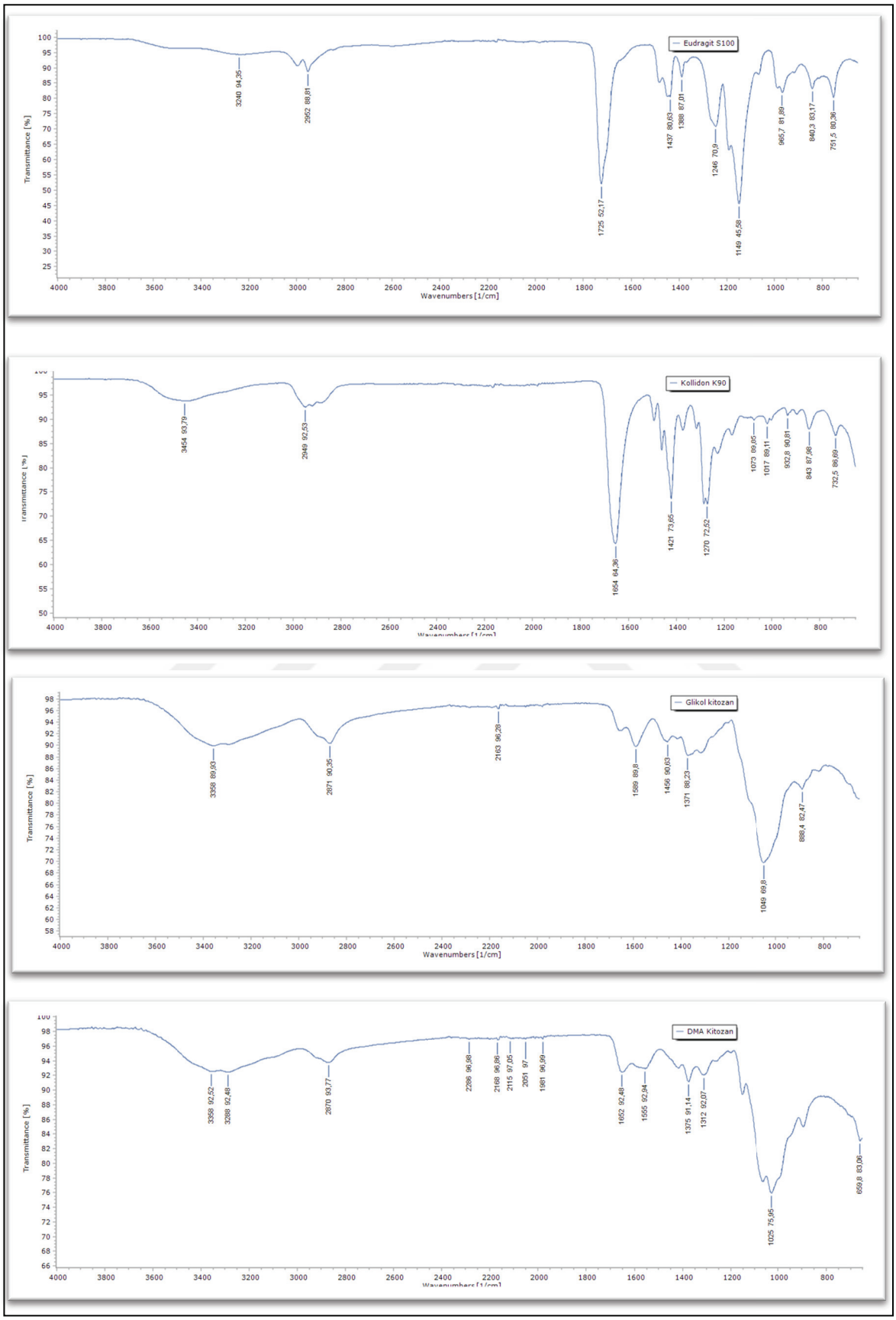
Şekil 4.4. NF ve NP/NF formülasyonlarının DSC pikleri

4.1.2. FT-IR ölçümleri

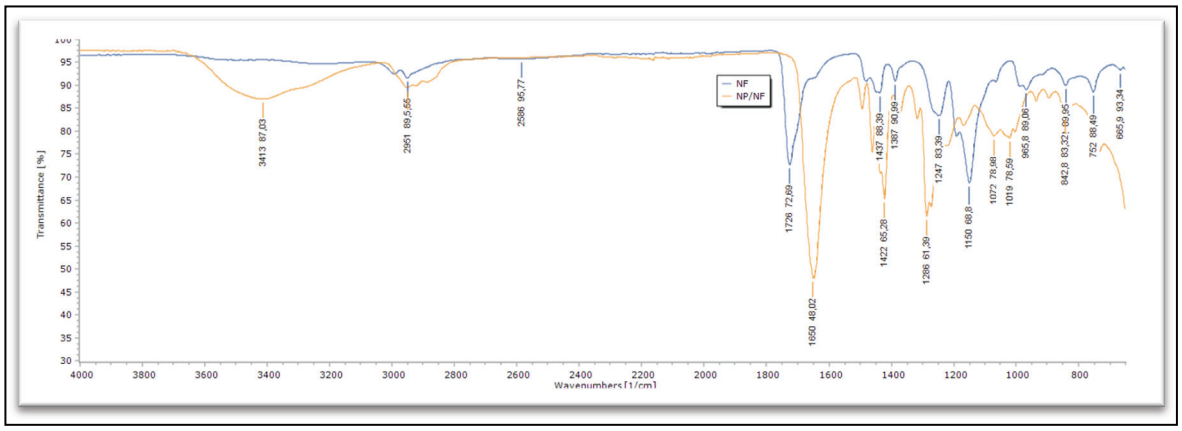
NF ve NP/NF formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan polimerlerin, nanoliflerin ve enoksaparinin FT-IR spektrumları Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi alınarak Şekil 4.5- Şekil 4.7 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Enoksaparine ait IR spektrumu



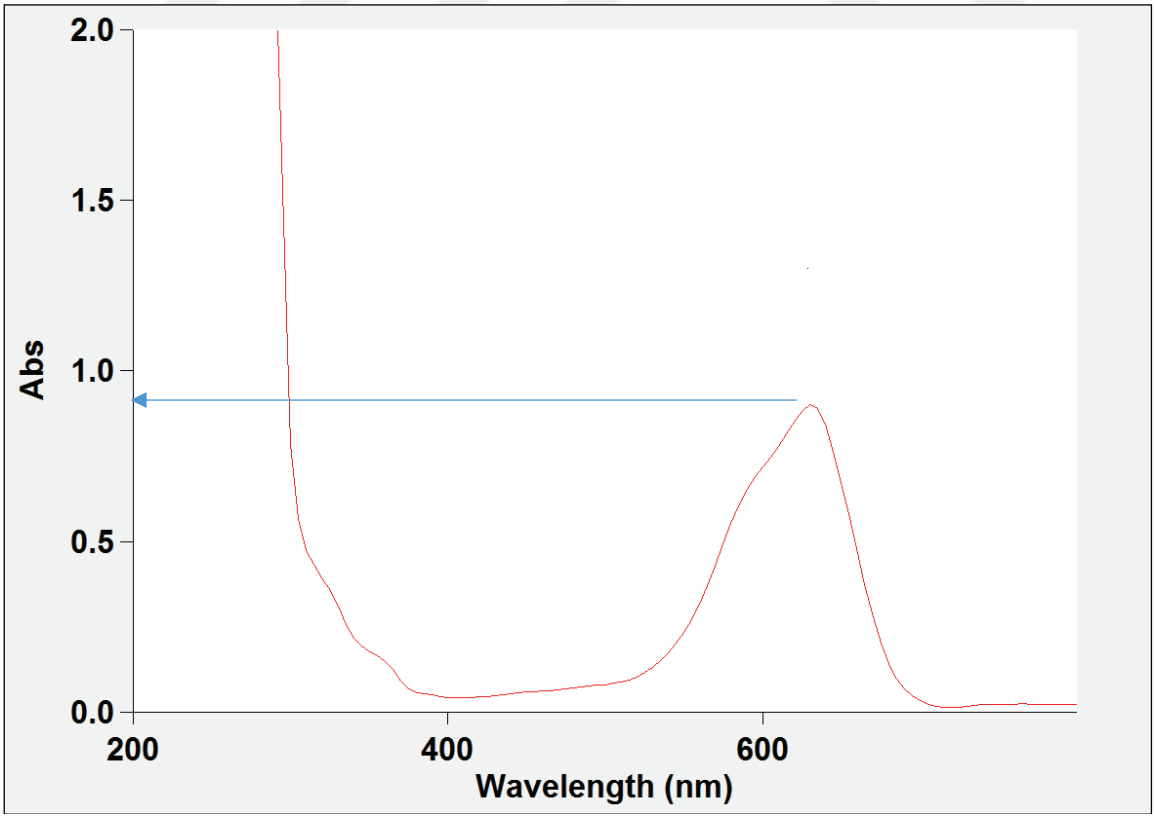
Şekil 4.6. Nanoliflerin tabakalarında yer alan polimerlerin IR spektrumu



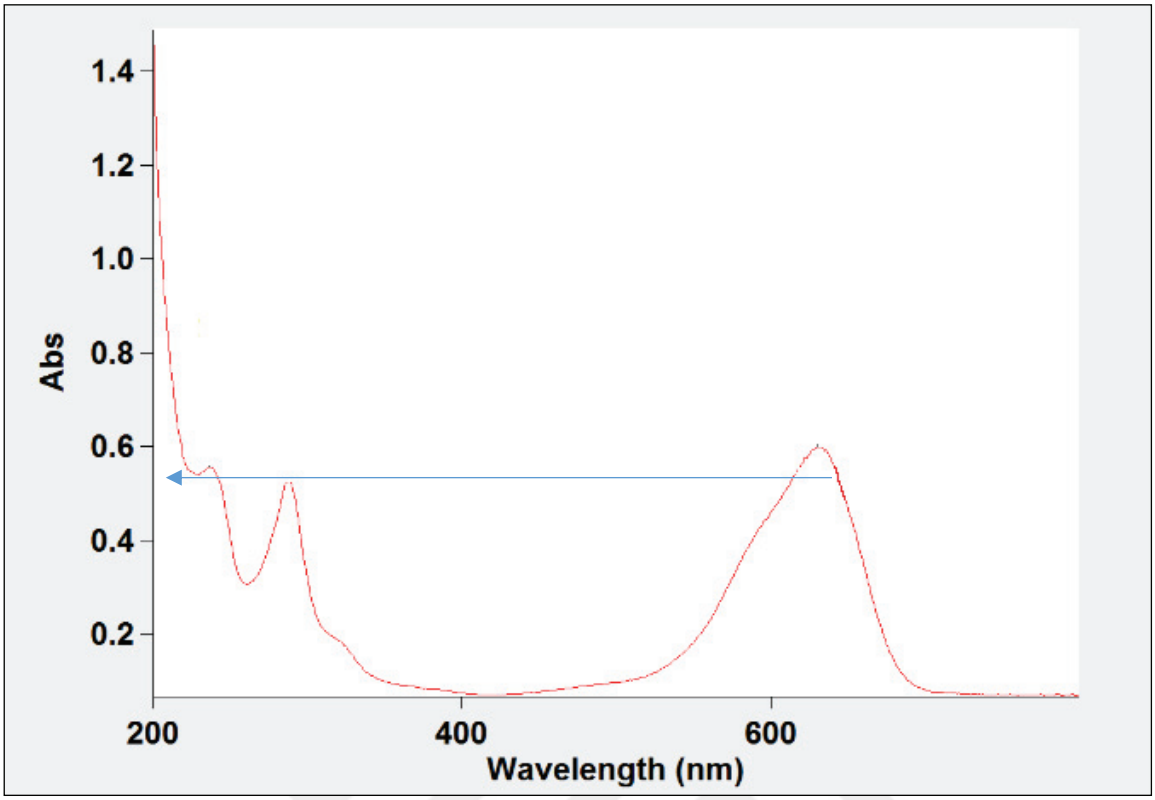
Şekil 4.7. NF ve NP/NF nanoliflerinin IR spektrumu

4.1.3. Etkin maddenin miktar tayini için standart doğrunun hazırlanması

Bölüm 3.2.3'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. Toluidin mavisi çözeltisi 631 nm'de maksimum absorbans vermiştir (Şekil 4.8). Toluidin mavisi çözeltisine enoksaparin eklenmesiyle toluidin mavisi-etkin madde kompleksi oluşmaktadır. Bu sebeple, absorbans değeri azalmaktadır (Şekil 4.9).



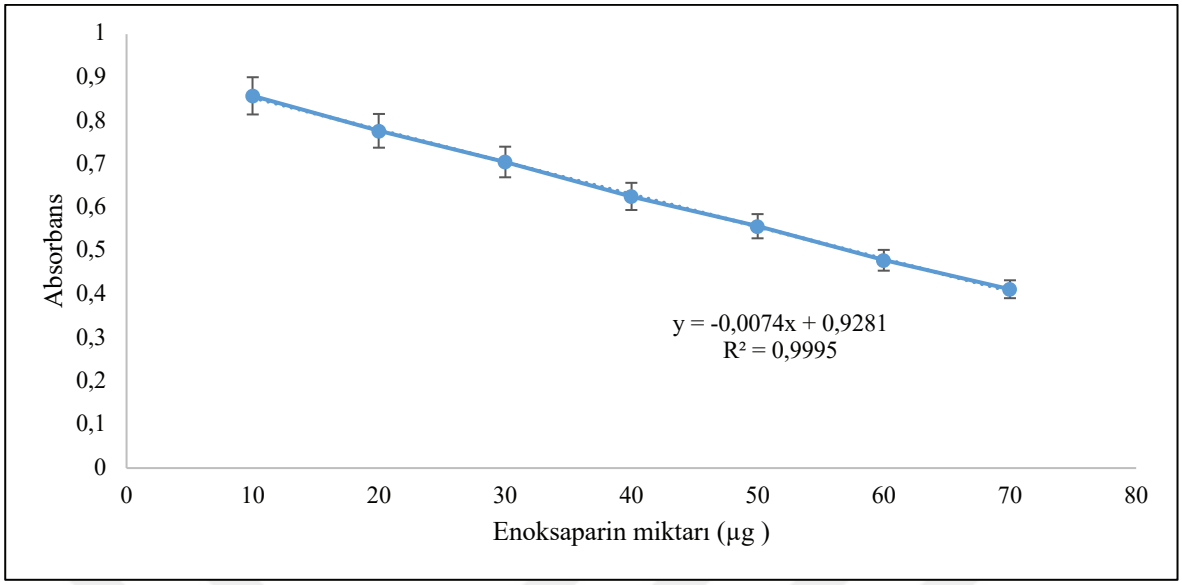
Şekil 4.8. Toluidin mavisi çözeltisinin tek başına verdiği spektrum, 631 nm'de maksimum absorbans göstermiştir



Şekil 4.9. Boya çözeltisine enoksaparin eklenmesiyle absorbansın düştüğü gösteren spekturum

Boyanın absorbansındaki düşüş, enoksaparin miktarıyla orantılı olduğu için farklı miktarlarda enoksaparin içeren çözeltilerin spektrofotometrede absorbansları okunarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

Farklı miktarlarda (10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg ve 70 µg) enoksaparin içeren çözeltilerdeki enoksaparin miktarlarının (µg) absorbansa karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Enoksaparinin metakromatik yöntemle çizilen kalibrasyon doğrusu

Miktar tayini yönteminin validasyonu

Enoksaparin'nin miktar tayini yönteminin validasyonu için, doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk (accuracy) ve seçicilik (specifity) çalışması yapılmıştır.

Doğrusallık

Üç farklı stok çözelti hazırlandıktan sonra 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg enoksaparin içeren örnekler alınarak boya çözeltileri ile birlikte spektrofotometrede absorbansları okunmuştur. Bulunan absorbans değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır ve Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Enoksaparine ait standart doğrunun hazırlanması için kullanılan miktarlar ve absorbansları (n=3, ortalama±SS)

Enoksaparin miktarı (µg)	Ortalama Absorbans
10	0,858±0,010
20	0,777±0,021
30	0705±0,011
40	0,626±0,011
50	0,557±0,012
60	0,478±0,013
70	0,412±0,001

Doğruluk

Üç farklı stok çözelti hazırlanarak aynı miktarda enoksaparin içeren çözeltilerin absorbansları okunmuştur. 20 µg, 40 µg ve 60 µg enoksaparin içeren miktarlar ve okunan absorbans sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Miktar tayini yönteminin doğruluk bulguları

Enoksaparin miktarı (µg)	Absorbans	Hesaplanan enoksaparin miktarı	Geri elde (%)
20	0,771	21,4	107
20	0,785	19,4	97,0
20	0,785	18,4	92,0
Ortalama	0,78	19,7	98,6
Standart sapma	0,011	1,5	7
Enoksaparin miktarı (µg)	Absorbans	Hesaplanan enoksaparin miktarı	Geri elde (%)
40	0,623	41,2	103
40	0,629	40,3	101
40	0,634	39,6	99,1
Ortalama	0,63	40,3	101
Standart sapma	0,005	0,7	2
Enoksaparin miktarı (µg)	Absorbans	Hesaplanan enoksaparin miktarı	Geri elde (%)
60	0,488	59,4	99,0
60	0,497	58,1	96,8
60	0,487	59,5	99,1
Ortalama	0,490	59,0	98,3
Standart sapma	0,005	0,8	1

Kesinlik

Farklı stok çözeltilerinden, 60 µg enoksaparin içerecek şekilde alınan örnekten yapılan gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Miktar tayini yönteminin gün içi kesinlik bulguları

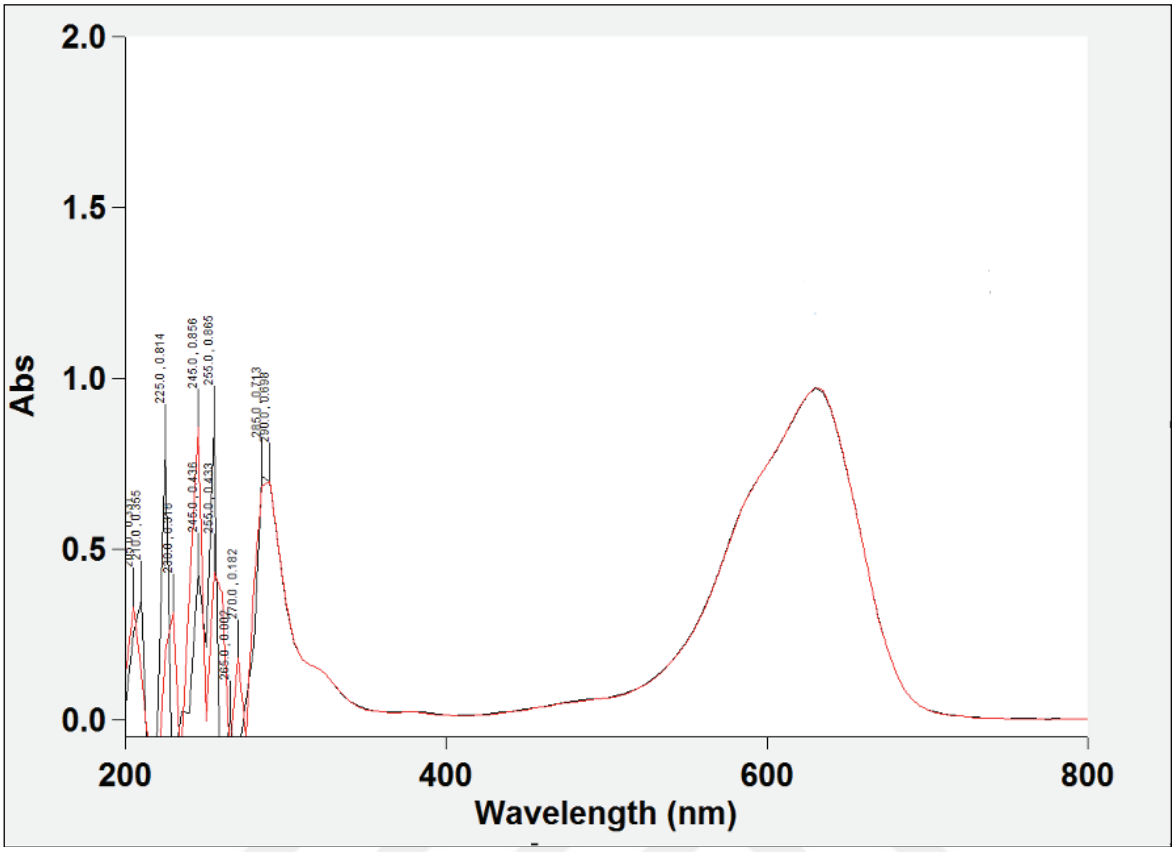
Enoksaparin miktarı (µg)	Absorbans	Hesaplanan enoksaparin miktarı	Geri elde (%)
60	0,475	61,1	101
60	0,474	60,9	102
60	0,475	60,9	101
60	0,477	61,0	102
60	0,476	61,3	102
60	0,474	61,1	102
60	0,473	61,2	102
60	0,475	61,2	102
60	0,477	60,8	101
60	0,477	61,2	102
Ortalama	0,475	61,0	102
Standart sapma	0,002	0,2	0

Çizelge 4.4. Miktar tayini yönteminin günler arası kesinlik bulguları

Enoksaparin (µg)	1.Gün hesaplanan enoksaparin miktarları	1.Gün hesaplanan % Geri elde	2.Gün hesaplanan enoksaparin miktarları	2.Gün hesaplanan % Geri elde	3.Gün hesaplanan enoksaparin miktarları	3.Gün hesaplanan % Geri elde
60	61,1	101	61,1	101	60,6	101
60	60,9	102	60,1	102	61,0	102
60	60,9	101	60,1	101	60,6 5	101
60	61,0	102	61,0	102	60,8	101
60	61,3	102	61,3	102	60,2	100
60	61,1	102	61,1	102	60,5	101
60	61,2	102	61,2	102	60,7	101
60	61,2	102	61,2	102	60,4	101
60	60,8	101	60,8	101	60,4	101
60	61,2	102	61,2	102	60,5	101
Ortalama	61,0	102	61,0	102	60,6	101
Standart sapma	0,2	0	0,3	0	0,2	0,3

Seçicilik

Toluidin mavisi ile yapılan tayin yönteminin seçiciliğini kanıtlamak üzere nanolif formülasyonlarında yer alan oranlarda yardımcı madde çözeltileri hazırlanarak maksimum dalga boyu taramaları yapılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Nanolif formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin enoksaparin olmaksızın alınan spektrumlarları

Duyarlılık sınırı ve saptama sınırı

UV miktar tayini yönteminin saptama sınırı (Limit of Detection) ve ölçme sınırı/duyarlılık (Limit of Quantification) hesaplamaları bölüm 3.2.3.'te te belirtilen denklemler kullanılarak bulunmuştur. Buna göre yöntemin en düşük saptama sınırı 2,33 µg olarak bulunurken, duyarlılık sınırı ise 7,77 µg bulunmuştur.

4.2. Nanosistemlerin Hazırlanması

4.2.1. Nanoliflerin hazırlanması

<u>Ko-aksiyel elektro-çekim çalışmaları</u>

- ✓ Eudragit S100 ve Kollicoat Mae 100-55 hidrofobik polimerler olduğu için suda çözünmemektedir. Enoksaparin ise suda yüksek oranda çözünür bu yüzden çekirdek

çözeltisinde kullanılan çözücü/çözücü karışımı, kabuk çözeltisiyle başlık ucunda tıkanıklık oluşturmaktadır.

- ✓ Çekirdek ve kabuk karışımları aynı çözücülerden olursa sorunun çözülebileceği düşünülmüştür. Ancak; enoksaparinin suda çözünüyor olması ve enterik polimerlerin organik solvanlarda çözünmesi nedeniyle ortak bir çözücü bulunamamıştır.
- ✓ Yapılan ön formülasyon çalışmalarında çekirdek akış hızının arttırılmasıyla lif yapısının bozulduğu gözlenmiştir. İşlem süresi uzatıldığında yükleme miktarının artacağı düşünülmüştür, ancak düşük akış hızına rağmen elektro-çekim işleminde duraksamalar olmuştur. Ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan nanoliflerden etkin madde miktar tayini yapılmıştır.
- ✓ Çekirdek karışımı için başlangıçta Polyox WSR N10-Polyox WSR N10 N80, Kollidon K30, propilen glikol kullanılmıştır. Fakat yine de kabuk çözeltisiyle benzer reolojik özellikler gösteren karışım bulunmamıştır.
- ✓ Bu tıkanıklık ve çözücü özelliklerinin farklı oluşu hem işlemin kesintiye uğramasına hem de yüklenen etkin madde miktarının düşmesine neden olmuştur.
- ✓ Etkin madde yüklenmesinin ve lif yapısının çekirdek kabuk karışımlarından etkilendiğine karar verilmiştir. Bunun sebebi; ko-aksiyal başlık üzerinde meydana gelen tıkanıklıklar ve çözücülerin buharlaşma noktaları, yüzey gerilimi gibi özelliklerinin farklı olmasıdır. Bu farklılıklar yüzünden elektro-çekim işleminde uygulanan voltaj, koaksiyal lifi oluşturacak optimum değere ayarlanamamaktadır. Kısaca; sulu çözeltinin yüzey gerilimi, etil alkol: DMF karışımından daha yüksek olacağı için çekirdek karışımından lif elde etmek için gereken voltaj, kabuk karışımından lif elde etmek için gerekli olandan farklıdır. Bu sebeple ortak bir voltaj ayarlanamamıştır.

Yapılan çalışmalarla koaksiyal elektro-çekim yöntemindeki sorunlar ve etkin maddenin yükleme oranının düşük olması nedeniyle çalışmalara klasik yöntemle tabakalı liflerin hazırlanmasıyla devam edilmiştir.

Klasik elektro-çekim yöntemiyle yapılan çalışmalar (Tabakalı lifler)

Nanoliflerin hazırlanmasında tasarlanan 3 tabakalı lif yapısını oluşturmak için ilk önce enterik polimer tabakası hazırlanmıştır. Ara tabaka içeriğinin belirlenmesinde çeşitli formülasyonlar hazırlanmıştır.

NF Formülasyonu: Ara tabakada enoksaparin içeren tabakalı lif formülasyonunda bazı problemler yaşanmıştır. Etkin maddenin sadece suda çözünmesi için kullanılacak olan çözücü tipleri sınırlı olmuştur. Elektro-çekim işleminde suyun kullanılması bazı zorluklara neden olmaktadır. Bunlar; suyun buharlaşma noktasının yüksekliği nedeniyle lif yapısının ıslanması, yüzey geriliminin büyük olması nedeniyle başlık ucunda oluşan damlanın lif haline gelemeden başlık ucunu tıkaması, lif çekimi için çok yüksek voltaj gerektirmesi vb.

Bütün bu zorlukları aşabilmek için enoksaparinin çözünebildiği ve elektro-çekim işlemi için uygun olan bir çözücü aranmıştır. Yapılan literatür taramaları ve yapılan uygulamalar sonucunda enoksaparinin belli alkol derecelerinde belirli oranlarda çözündüğü görülmüştür (Balestrino ve diğerleri, 2016). Etil alkol:su oranını belirlemek için ön çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarla doğrultusunda 40º alkolde en yüksek %8 konsantrasyonda enoksaparin çözeltisi homojen bir şekilde hazırlanmıştır (Balestrino ve diğerleri, 2016).

Sonrasında, bu çözelti içinde çözünecek bir polimer seçimi yapılmıştır. Polimeri belirlerken çözeltinin hem reolojik özellikleri hem de elektro-çekim işlemi için uygun olması göz önünde bulundurulmuştur. Daha önce çekirdek-kabuk nanolifleri için yapılan çalışmalarda çekirdek çözeltisi olarak enoksaparin ile birlikte hidrofilik polimerler kullanılmıştır. Bu doğrultuda Kollidon K90 ile enoksaparin çözeltisinden lif çekimi işleminin devamlı olması ve lif yapısının sağlam olmasından dolayı polimer olarak ara tabakada Kollidon K90 seçilmiştir. Polimer konsantrasyonu da %4 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, NF formülasyonunda; ara tabakada, 40° alkolde %8 enoksaparin çözüldükten sonra %4 Kollidon K90 ilave edilerek hazırlanan çözelti kullanılmıştır.

Viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümleri

Nanoliflerin hazırlanmasında kullanılan ve lif çekimi gerçekleşen etkin madde ve polimer çözeltilerinin viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Nanolif hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümü sonuçları (n=3, ortalama±SS)

Etkin madde/polimer	Konsantrasyon (%)	Çözücü	Viskozite (mPa.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey gerilimi (mN/m)
Enoksaparin:Polyox WSR N10	10:2,5	Su	102±30	15000±0	48,0±0,5
Enoksaparin:Polyox WSR N10	10:5	Su	105±33	12700±0	58,0±0,1
Enoksaparin:Polyox WSR N10	10:10	Su	161±22	10800±0	58,0±0,1
Enoksaparin:Kollidon K30	10:2,5	Su	2,0±0,5	14100±0	55,6±0,2
Enoksaparin:Kollidon K30	10:5	Su	6±5	13000±0	59,0±0,1
Enoksaparin:Kollidon K30	10:10	Su	5,0±57,1	11200±0	58,0±0,3
Enoksaparin	10	Su:Propilen glikol (1:1)	2±2	295±0	83,3±0,2
Kollicoat Mae 100-55	10	Etil alkol	109±71	41,4±0	22±0,1
Nanoliflerin alt ve üst tabakası (Eudragit S 100)	15	Etil alkol: DMF (6:4)	63±20,5	76,5±0	24,2±0,4
NF ara tabaka (Enoksaparin:Kollidon K90:Glikol kitozan)	8:4:0,25	40° alkol	146,3±18,20	3150±0	32,5±0,3
NP/NF ara tabaka (Kollidon K90, enoksaparin yüklü nanopartikül)	%7,5	Etil alkol:su (2:1)	150,8±16,7	2850±0	28,4±0,3

Eudragit S100'ün çözücüsü olarak kullanılan etil alkol: DMF oranını belirlemek amacıyla yapılan iletkenlik ölçüm sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı etil alkol: DMF oranları ile hazırlanan Eudragit S100 çözeltisinin iletkenlik ölçüm sonuçları (n=3, ortalama±SS) ve hazırlanan lifin durumu

Alkol:DMF	İletkenlik (µS/cm)	Lifin durumu
9:1	55,3±0	Sağlam, sürekli lif çekimi
8:2	56,6±0	Sağlam, sürekli lif çekimi
7:3	67,6±0	Sağlam, sürekli lif çekimi
6:4	76,5±0	Düzgün lif yapısı
5:5	Lif yapısı oluşmadı.	

Etil alkol: DMF oranları 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 ve 5:5 olacak şekilde %15'lik Eudragit S 100 çözeltileri hazırlanmış, hem iletkenlikleri ölçülmüş hem de lif yapıları incelenmiştir. Uygun oran olarak etil alkol: DMF oranı 6:4 olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Nanopartiküllerin hazırlanması

Nanopartiküllerin hazırlanması 3.4.3 bölümünde anlatıldığı gibi yapılmıştır. Önce, DMA kitozan ve enoksaparinin uygun konsantrasyonları ve a/a oranları belirlenmiştir. Bunun için önce farklı konsantrasyonlarda kitozan ve enoksaparin konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha önce yapılmış çalışmalardan edinilen bilgiler doğrultusunda kitozan konsantrasyonu %0,05, %0,1, %0,2, %0,3) olarak, enoksoparin konsantrasyonu (%0,1, %0,2, %0,3) olarak belirlenmiştir (Lin ve diğerleri, 2009; Shahbazi ve Hamidi, 2013). Önce kitozan konsantrasyonu sabit tutularak enoksaparin konsantrasyonu değiştirilmiş, sonra da enoksaparin konsantrasyonu sabit tutularak farklı kitozan konsantrasyonları denenmiştir. Aynı işlem parametreleriyle nanopartiküller hazırlanmıştır ve ortalama partikül çapı, PDI ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyondaki kitozan ve enoksaparin çözeltileriyle hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3,ortalama±SS)

Kitozan	Enoksaparin	a/a	Zeta potansiyel (mV)	Partikül çapı (nm)	PDI	Karıştırma süresi, hızı
%0,05	% 0,1	3:1	30,6±1,8	265±2	0,30±0,01	30 dak 1000 rpm
%0,05	% 0,2	3:1	33,1±0,6	296±5	0,32±0,00	
%0,05	% 0,3	3:1	31,6±0,9	305±8	0,34±0,04	
%0,1	% 0,1	3:1	27,6±0,8	360±1	0,45±0,01	
%0,1	% 0,2	3:1	28,0±1,6	550±12	0,54±0,04	
%0,1	% 0,3	3:1	27,0±0,4	412±6	0,51±0,00	
%0,2	% 0,1	3:1	28,0±1,9	538±17	0,56±0,03	
%0,2	% 0,2	3:1	33,0±4,6	809±86	0,90±0,05	
%0,2	% 0,3	3:1	30,3±2,5	935±35	0,93±0,06	
%0,3	% 0,1	3:1	30,3±4,2	739±17	0,98±0.04	
%0,3	% 0,2	3:1	29,5±2,7	1277±159	0,88±0.15	
%0,3	% 0,3	3:1	29,9±2,4	1202±160	0,99±0,02	

Kitozan konsantrasyonunun artması nanopartiküllerin çaplarını arttırmıştır. % 0,1 kitozan konsantrasyonuyla nanopartiküllerin hazırlanmasına devam edilmiştir. Farklı kitozan/enoksaparin a/a oranları denenerek en yüksek miktarda etkin maddenin yüklenmesi amaçlanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Ağırlık/ağırlık olarak farklı kitozan/enoksaparin oranlarıyla hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm (n=3, ortalama ±SS)

Kitozan	Enoksaparin	a/a	Enoksaparin (mg)	Zeta potansiyel (mV)	Partikül çapı (nm)	PDI	Karıştırma süresi, hızı	EE (%)
%0,1	%2	3:1	3,3	27,6±2,5	498±11	0,52±0,01	30 dak 1000rpm	88
%0,1	%2	2:1	5	38,6±0,7	524±9	0,44±0,05		95
%0,1	%2	1,5:1	6,6	15±0,7	1232±49	0,19±0,18		-
%0,1	%2	1:1	12	Agregasyon				-

Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılacak kitozan ve enoksaparin konsantrasyonları ve a/a oranları belirlendikten sonra optimum nanopartikül çapı ve yükleme etkinliklerine ulaşabilmek için işlem parametreleri değiştirilerek formülasyonlar hazırlanmıştır.

Önce kitozan çözeltisine enoksaparinin ilave edilme süresi belirlenmiştir. Bunun için farklı sürelerde (30sn, 60sn, 90sn ve birden ilave etme) nanopartiküller hazırlanmış ve Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. Enoksaparin çözeltisinin farklı ekleme sürelerinde kitozan çözeltisine ilave edilmesiyle hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3,ortalama ±SS)

Kitozan	Enoksaparin	Enoksaparin çözeltisinin ilave edilme süresi	Zeta potansiyel (mV)	Partikül çapı (nm)	PDI	Karıştırma süresi, hızı	Yükleme etkinliği (%)
%0,1	%2	30 sn	38,6±0,7	524±9	0,44±0,05	30 dak 1000 rpm	95
%0,1	%2	60 sn	38,8±1,0	657±8	0,47±0,03		80,5
%0,1	%2	90 sn	40,0±0,4	672±24	0,54±0,04		80,5
%0,1	%2	Tamamı aynı anda ilave edildi	38,0±0,7	695±3	0,51±0,16		87,4

Bu sonuçlara göre, partikül çapı ve PDI değeri en küçük, enkapsülasyon etkinliği en yüksek olan nanopartiküller, enoksaparin çözeltininin 30 sn süreyle ilave edilmesiyle elde edilmiştir.

Nanopartiküllerin oluşması için yeterli sürenin belirlenmesi amacıyla, üç farklı karıştırma süresinde nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan partiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, partikül çapı ve PDI değerinin en küçük ve zeta potansiyelinin en uygun olduğu karıştırma süresi olarak 30 dak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı karıştırma sürelerinde hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3,ortalama ±SS)

Kitozan	Enoksaparin	a/a	Zeta potansiyel (mV)	Partikül çapı (nm)	PDI	Karıştırma süresi (dak)	Karıştırma hızı(rpm)
%0,1	%2	2:1	18,5±0,9	784±18	0,93±0,05	15	1000
%0,1	%2	2:1	38,6±0,7	524±9	0,44±0,05	30	1000
%0,1	%2	2:1	16,5±1,2	945±15	1±0	60	1000

Karıştırma süresi belirlendikten sonra, farklı karıştırma hızları kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır ve Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, partikül çapı ve PDI değerinin en küçük ve zeta potansiyelinin en uygun olduğu karıştırma hızı 1000 rpm olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı karıştırma hızlarında hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI sonuçları (n=3, ortalama ±SS)

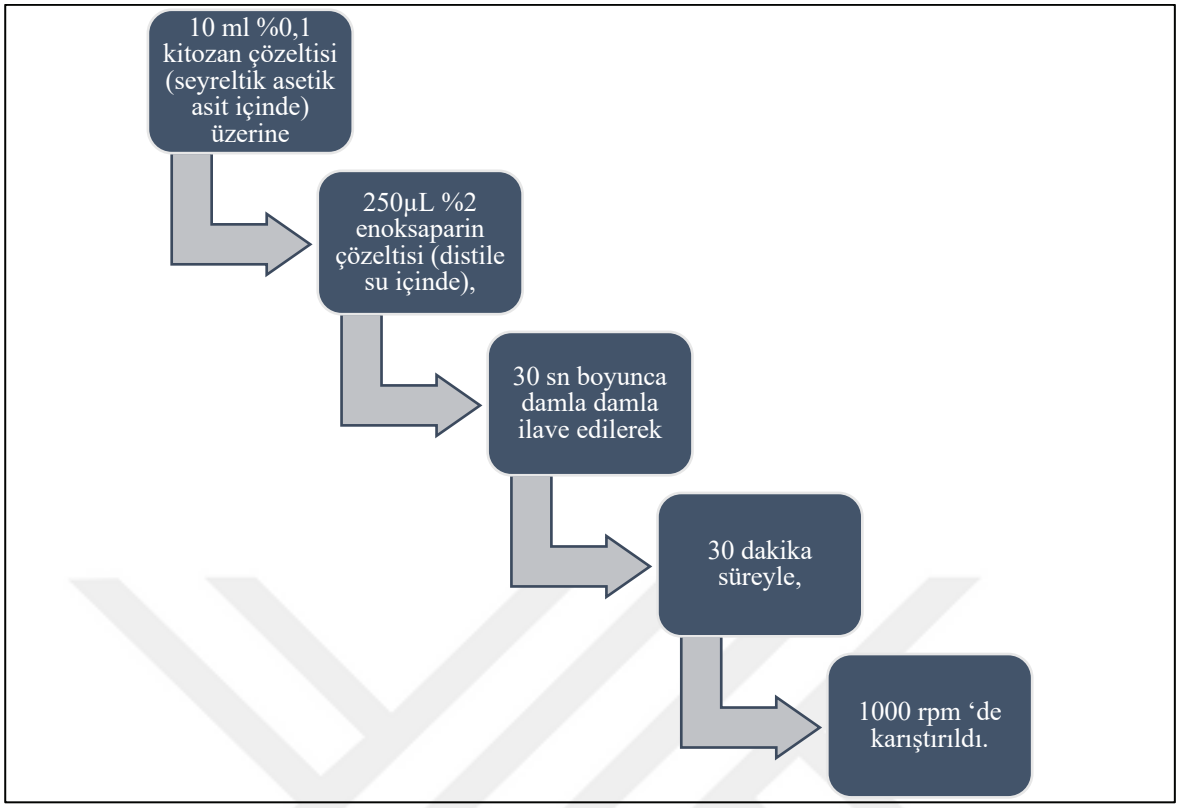
Kitozan	Enoksaparin	a/a	Zeta potansiyel (mV)	Partikül çapı (nm)	PDI	Karıştırma süresi(dak)	Karıştırma hızı (rpm)
% 0,1	% 2	2:1	19,9±0,9	1148±64	0,99±0,02	30	500
% 0,1	% 2	2:1	38,6±0,7	524±9	0,44±0,05	30	1000
% 0,1	% 2	2:1	20,8±0,6	522±9	0,51±0,05	30	1200

Formülasyon ve işlem parametreleri belirlendikten sonra sonuç nanopartikül formülasyonunun içerik, zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Sonuç NP formülasyonunun işlem parametreleri, zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3, ortalama ±SS)

Kitozan	Enoksaparin	a/a	Zeta potansiyel (mV)	Partikül çapı (nm)	PDI	Karıştırma süresi (dak)	Karıştırma hızı (rpm)	Yükleme Etkinliği (%)
%0,1	%2	2:1	38,6±0,7	524±9	0,44±0,05	30	1000	95

Sonuç nanopartikül formülasyonunun hazırlanması için uygulanan işlem basamakları Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. İyonik jelasyon yönteminin işlem basamakları

Ayrıca, 10 ml kitozan çözeltisiyle hazırlanan nanopartikül süspansiyonunda teorik olarak 5 mg enoksaparin bulunmaktadır (kitozan/enoksaparin, a/a oranı 2:1 olduğu için). Yükleme etkinliği %95 olduğu için pratikte ise 4,75 mg enoksaparin içermektedir.

4.3. Nanosistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları

Nanolif ve nanopartiküllerde; etkin madde yükleme etkinliği, in vitro salım, ex vivo permeabilite çalışması, hücre kültürü çalışmaları, stabilite ve in vivo çalışmaları ortak olarak yapılmıştır. Bu çalışmalar dışında formülasyonlara özgü yapılan çalışmalar ise aşağıda listelenmiştir.

Tabakalı nanoliflerde

- Yüzey morfolojisinin incelenmesi
- Lif çapı ölçümü
- Temas açısı ölçümü
- Porozite ve spesifik yüzey alanı ölçümü

- Mukoadhezyon ölçümleri

Nanopartiküllerde ise

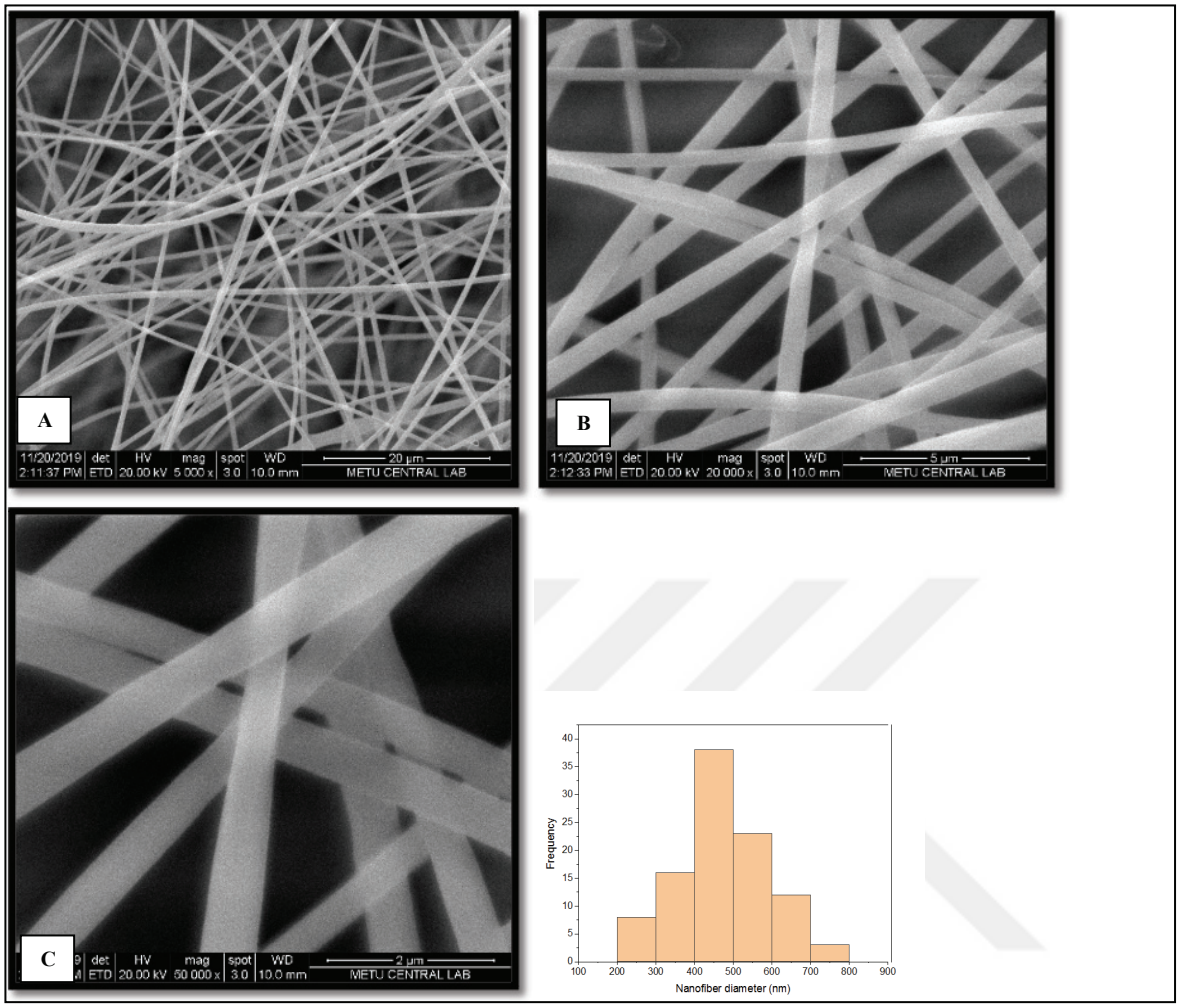
- Ortalama partikül çap,
- Zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

4.3.1. Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları

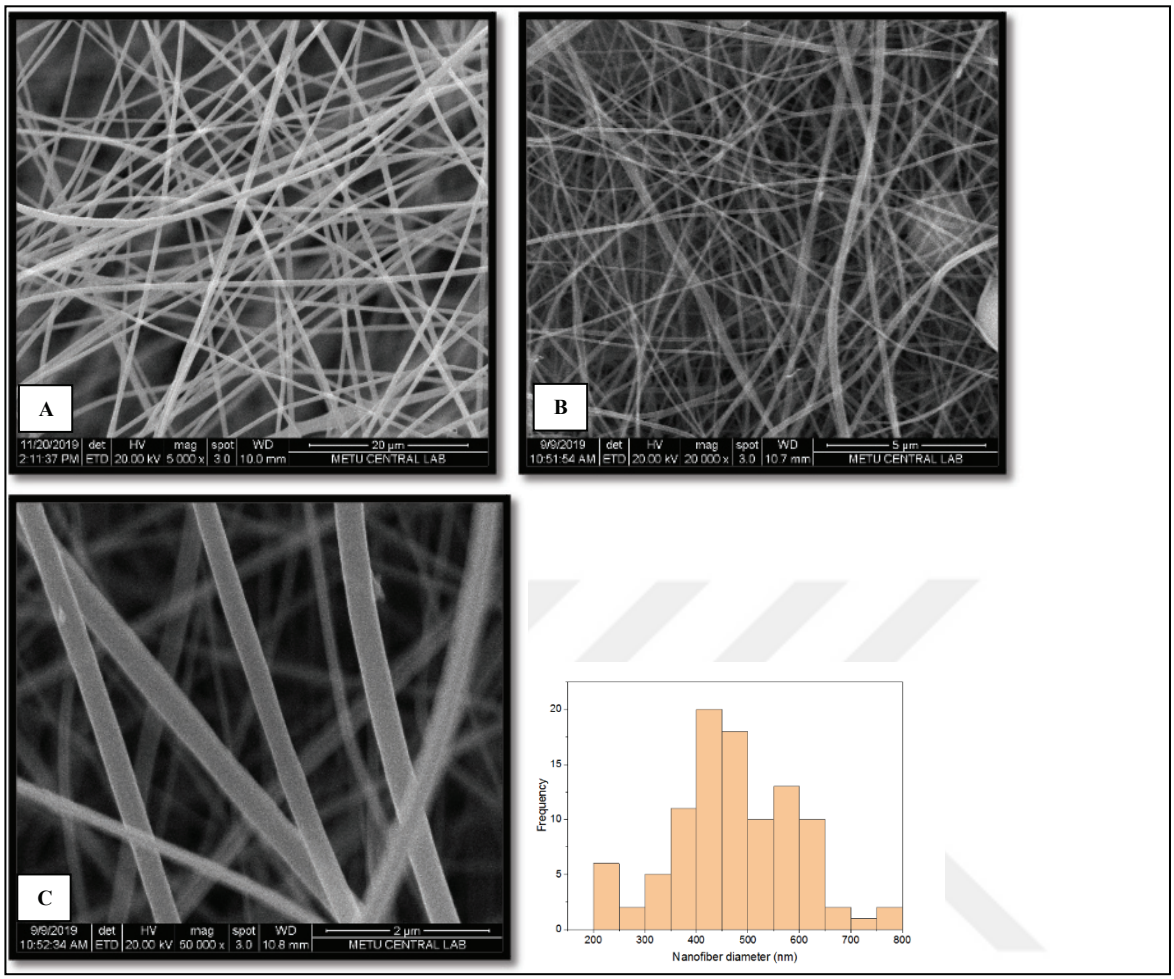
Yüzey Morfolojisi, Nanoliflerin Lif Çapı ve Lif Çapı Dağılımının İncelenmesi

Hazırlanan NF ve NP/NF formülasyonlarının alt-üst ve ara tabakalarının SEM görüntüleri ve lif çapı dağılım histogramları verilmiştir.

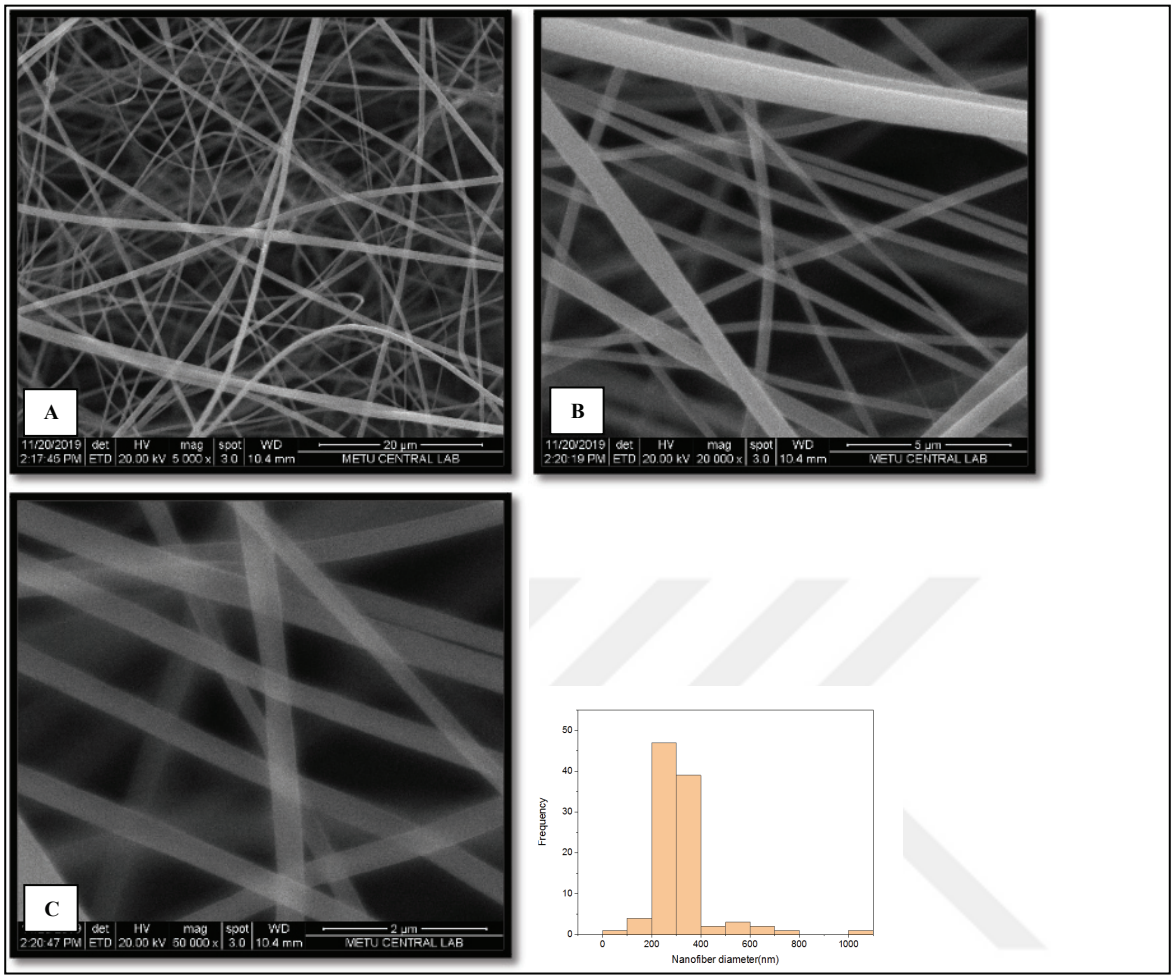
Alt ve üst tabakada yer alan Eudragit S100 tabakasının sonuçları Resim 4.1 ve Resim 4.2'de gösterilmiştir. NF formülasyonunun ara tabakasına ait sonuçlar Resim 4.3'te, NP/NF formülasyonunun ara tabakasına ait sonuçlar ise Resim 4.4'te gösterilmiştir.



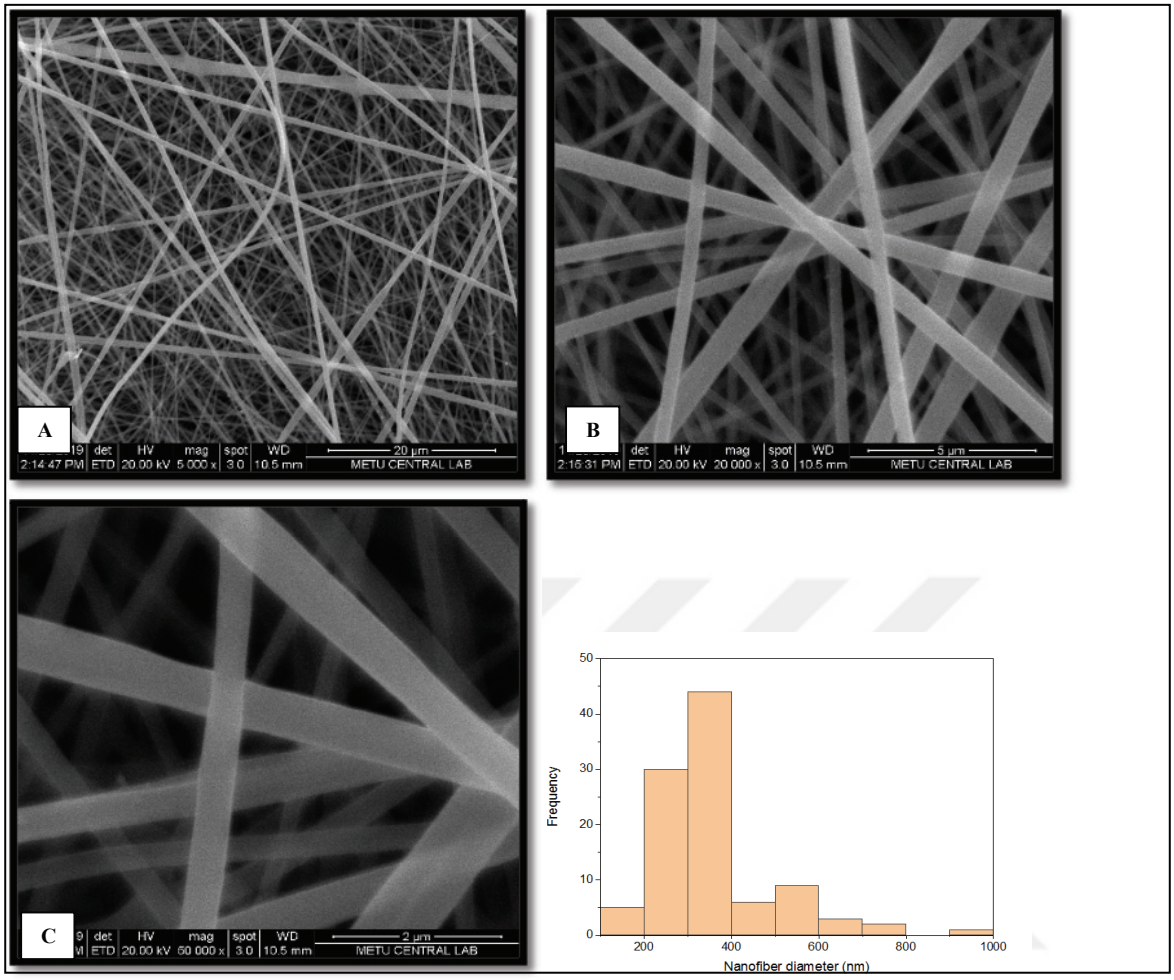
Resim 4.1. Nanoliflerin alt tabakası olan Eudragit S100 tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000)



Resim 4.2. Nanoliflerin üst tabakası olan Eudragit S100 tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000)



Resim 4.3. NF formülasyonunun ara tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000)



Resim 4.4. NP/NF formülasyonunun ara tabakasının SEM görüntüleri (A: 5000 x, B: 20 000 x, C: 50 000)

NF ve NP/NF formülasyonlarının üç tabakasına ait ortalama lif çapı ölçümleri Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Nanolif formülasyonlarının tabakalarının lif çapı (n=50, ortalama ± SS)

NF formülasyonu	
1. tabaka (üst tabaka): S100 tabakası	473±121 nm
2. tabaka (ara tabaka)	317±133 nm
3. tabaka (alt tabaka): S100 tabakası	483±125 nm
NP/NF ikili sistemi	
1. tabaka (üst tabaka): S100 tabakası	427±139 nm
2. tabaka (ara tabaka)	352±140 nm
3. tabaka (alt tabaka): S100 tabakası	415±108 nm

Nanoliflerin porozite, por çapı dağılımı, spesifik yüzey alanı ölçümleri

SEM görüntüleri kullanılarak hesaplanan porozite değerleri Çizelge 4.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. Nanoliflerin porozite değerleri (n=3, ortalama±SS)

Formülasyonlar	Porozite (%)
NF	53,7±3,9
NP/NF	50,5±4,2

ODTÜ Merkez Laboratuvarında çok noktalı BET analizi ile yapılan nanoliflere ait spesifik yüzey alanı ölçüm sonuçları Çizelge 4.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15. Nanoliflerin spesifik yüzey alan ölçüm sonuçları (n=3, ortalama)

Formülasyonlar	Spesifik Yüzey Alanı (m^2/g)
NF	9,46
NP/NF	3,04

Nanoliflerin temas açılarının ölçülmesi

Nanoliflerin farklı noktalarında yapılan ölçüm sonucu bulunan ortalama temas açısı değerleri Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Nanoliflerin temas açısı ölçümleri (n=3, ortalama ± SS)

Formülasyonlar	Temas açısı (º)
NF	113±2
NP/NF	105±81

Nanosistemlerin mukoadhezyon özelliklerinin incelenmesi

Texture Analyser TA-XT cihazında yapılan ölçüm sonuçları Çizelge 4.17'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. Nanoliflerin mukoadhezyon testi sonuçları (n=3, ortalama± SS)

Formülasyonlar	AUC (N.mm)	Mukozal yüzeyin alanı (πr^2)	Mukoadhezyon işi (AUC/πr^2)
NF	0,22±0,09	1,1304	0,19±0,08
NP/NF	2,99±0,88	1,1304	2,65±0,78

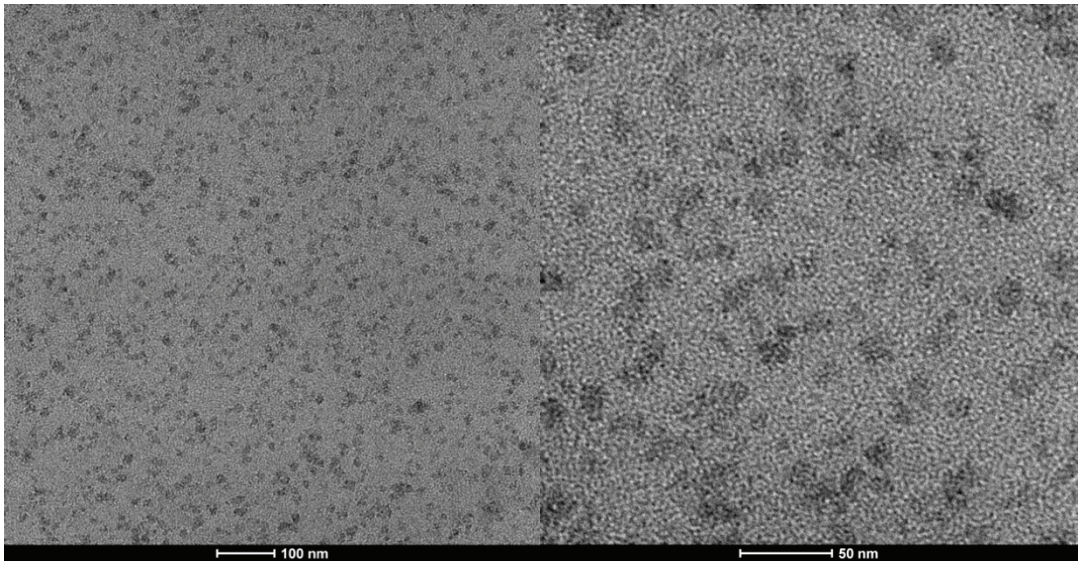
4.3.2. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları

Nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, dağılımı, TEM görüntülerinin incelenmesi ve zeta potansiyel ölçümü

Ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri nanopartiküllerin etkinliği ve fiziksel stabilitesi açısından önemlidir. Çalışmalar sonucu seçilen optimum nanopartikül formülasyonunun ölçüm değerleri ise Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Nanopartikül süspansiyonuna ait TEM görüntüleri ise Resim 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.18. NP/NF hazırlanması için hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel, partikül çapı ve PDI ölçüm sonuçları (n=3, ortalama ±SS)

Kitozan	Enoksaparin	Kitozan/ Enoksaparin (a/a)	Zeta potansiyel (mV)	Partikül çapı (nm)	PDI
% 0.1	% 2	2:1	38,6±0,7	524±9	0,44±0,05



Resim 4.5. Nanopartikül süspansiyonunundan alınan TEM incelemesi sonuçları

4.3.3. Nanoliflerde ve nanopartiküllerde ortak yapılan karakterizasyon çalışmaları

Nanosistemlerde ekin madde yükleme etkinliği

Nanolif formülasyonlarına yüklenen enoksaparin miktarı (µg/cm^2) ve nanopartiküllerde bulunan enoksaparin miktarları (µg /mL) Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Nanosistemlerin miktar tayini ve yükleme etkinlikleri (n=3, ortalama± SS)

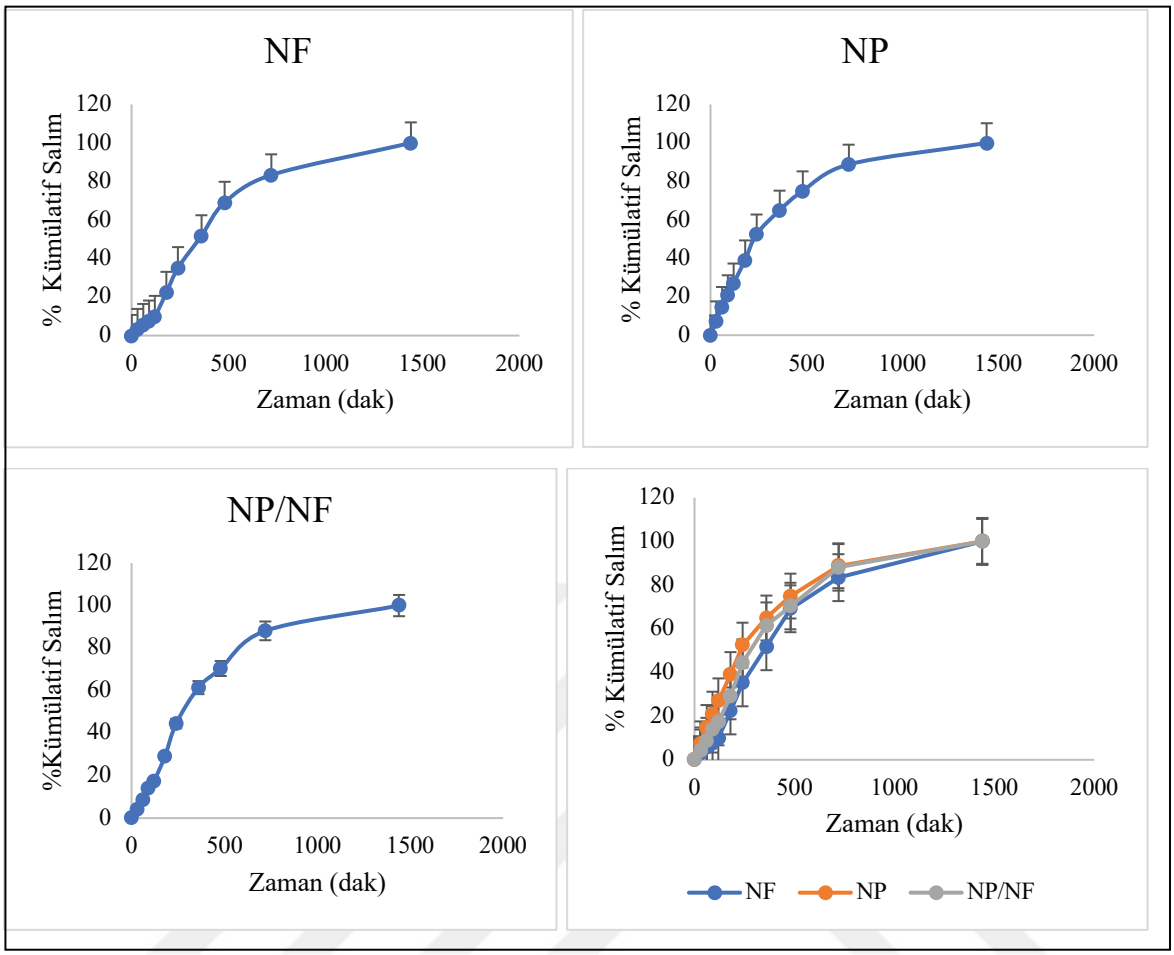
Formülasyonlar	Yüklenen miktar
NF	390 ±9 µg/cm^2
NP	475 µg /mL (%95±0)
NP/NF	399 ±14 µg/cm^2

Nanosistemlerden Enoksaparinin salım hızı tayini

İn vitro salım çalışmasının sonuçları Çizelge 4.20'de gösterilmiştir. Salım profilleri Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20. Nanolif ve nanopartikül formülasyonlara ait in vitro salım sonuçları (n=3, ortalama±SS)

	NF	NP	NP/NF
Zaman (dak)	Ortalama kümülatif (%) salım	Ortalama kümülatif (%) salım	Ortalama kümülatif (%) salım
0	0	0	0
30	3,10±1,52	7,31±2,33	4,12±3,61
60	5,71±2,78	14,7±3,54	8,54±6,93
90	7,46±3,40	20,9±7,13	13,9±10,05
120	9,89±4,13	27,0±10,7	17,2±12,7
180	22,3±5,1	39,0±8,7	29,1±10,5
240	35,2±5,3	52,5±6,2	44,4±10,3
360	51,7±3,3	64,9±3,4	61,3±8,5
480	69,1±4,3	74,9±5,1	70,3±11,0
720	83,4±2,4	88,8±1,6	88,1±2,3
1440	100±0	100±0	100±0

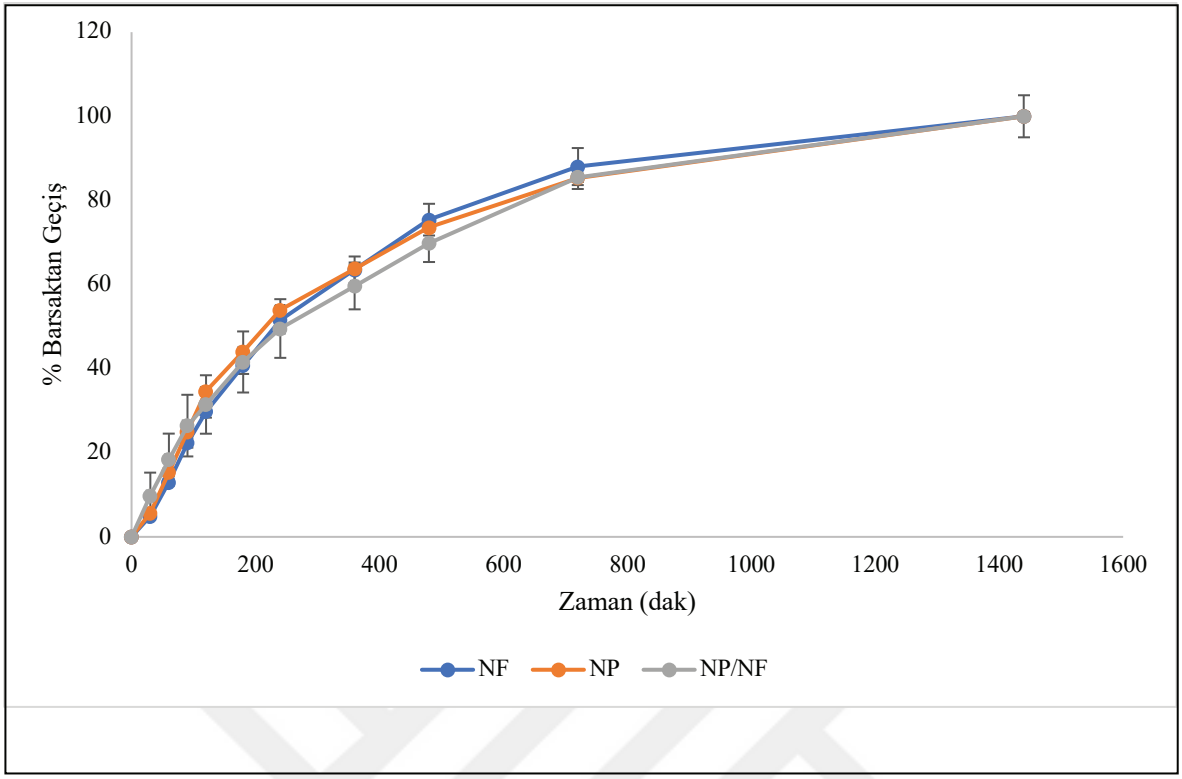


Şekil 4.13. NF, NP ve NP/NF formülasyonlarının in vitro salım profilleri (n=3, ortalama±SH)

NF ve NP/NF formülasyonlarında, in vitro salım sonuçlarına göre pH 1,2 ortamında ilk 2 saatte etkin madde salımı %20'nin altında bulunmuştur.

Tavşan intestinal dokusundan enoksaparin'in geçiş çalışmaları

Franz difüzyon hücresi ile tavşan intestinal dokusu kullanılarak yapılan geçiş çalışması sonucunda, formülasyonlara ait %barsaktan geçiş sonuçları Şekil 4.14'de gösterilmiştir ve nanosistemlerin tavşan barsaklarından geçişleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).



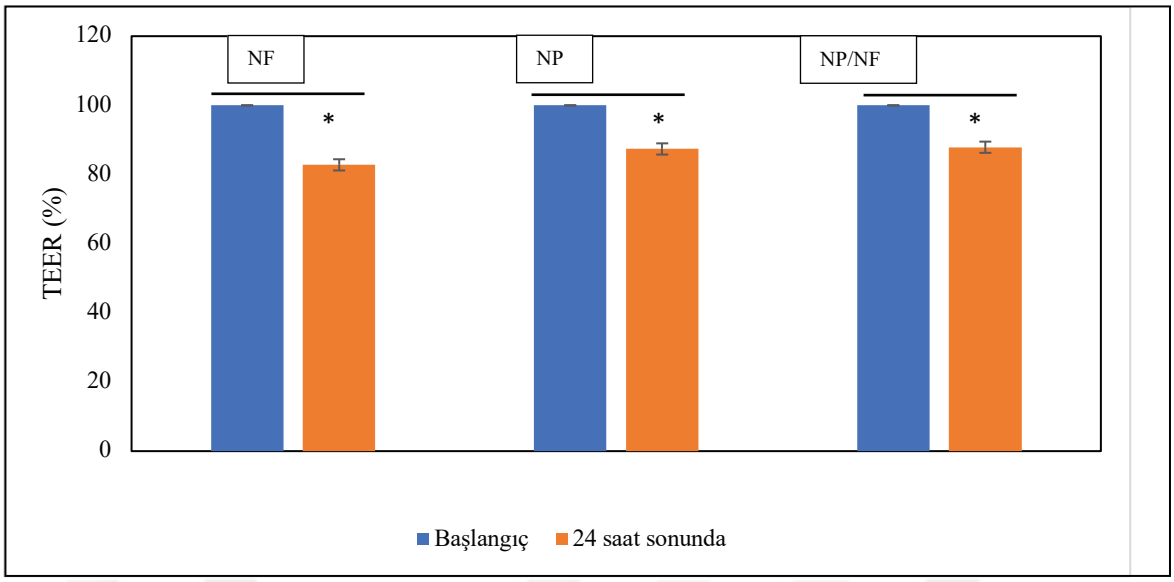
Şekil 4.14. NF, NP ve NP/NF formülasyonlarının intestinal dokusundan geçiş profilleri (n=3, ortalama±SS, p>0,05)

Üç nanosistemin tavşan intestinal geçişlerine göre hesaplanan akı değerleri ve permeabilite katsayıları Çizelge 4.21'de gösterilmiştir. Formülasyonlardan hesaplanan akı değerleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0,05)

Çizelge 4.21. Nanosistemlerin tavşan intestinal dokusundan geçişleri sonucu hesaplanan akı değerleri ve permeabilite katsayıları (n=3, ortalama±SS, p>0,05)

Nanosistemler	Akı ($mg.cm^{-2}\,h^{-1}$)	Permeabilite katsayısı ($cm.h^{-1}$)
NF	0,12±0,01	$59{,}7.10^{-3}\pm5.10^{-3}$
NP	0,07±0,02	$50{,}1.10^{-3}\pm18.10^{-3}$
NP/NF	0,07±0,01	$49{,}7.10^{-3}\pm8.10^{-3}$

Tavşanlardan alınan ince barsak örneklerinin transepitel elektrik rezistansının ölçümü (TEER) ile membrandaki elektriksel direnç değişiminden, membranın bütünlüğü hakkında yorum yapılmıştır ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Formülasyonların tavşan intestinal dokusundan geçiş çalışmalarında kullanılan barsak örneklerinin TEER değerleri başlangıçta ölçülen değerlere göre %12-17 arasında azalmıştır.

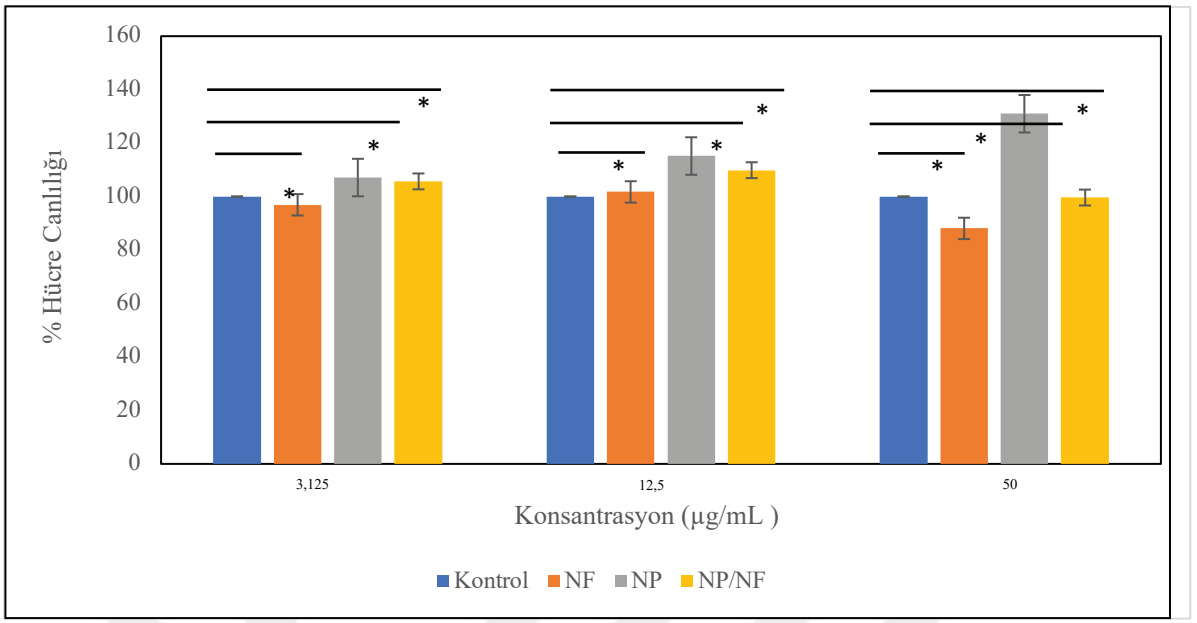


Şekil 4.15. Tavşan intestinal dokusundan penetrasyon çalışmalarından sonra TEER ölçümleri (n=3, ortalama ±SH, *:p>0,05)

Hücre kültürü çalışmaları

Nanosistemlerde MTT analizi

Hücre kültürü çalışmalarının ilk basamağı olan MTT testi ile nanosistemlerin sitotoksisite profillerinin sonuçları Çizelge 4.22'de ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir. MTT-1 çalışmasına göre tüm formülasyonlar için uygulanan her konsantrasyonda (50, 12,5, 3,125 µg/mL) % hücre canlılığı %80'nin üzerinde bulunmuştur. Bu sonuçlar hazırlanan nanosistemlerin Caco-2 hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etki yaratmadığını ve Caco-2 permeabilite çalışmaları için 50 µg/mL enoksaparin dozunun güvenle kullanılabileceğini göstermiştir. Kontrol grubundan elde edilen % hücre canlılığı ile formülasyonların uygulandığı hücrelerden elde edilen % hücre canlılıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0,05).

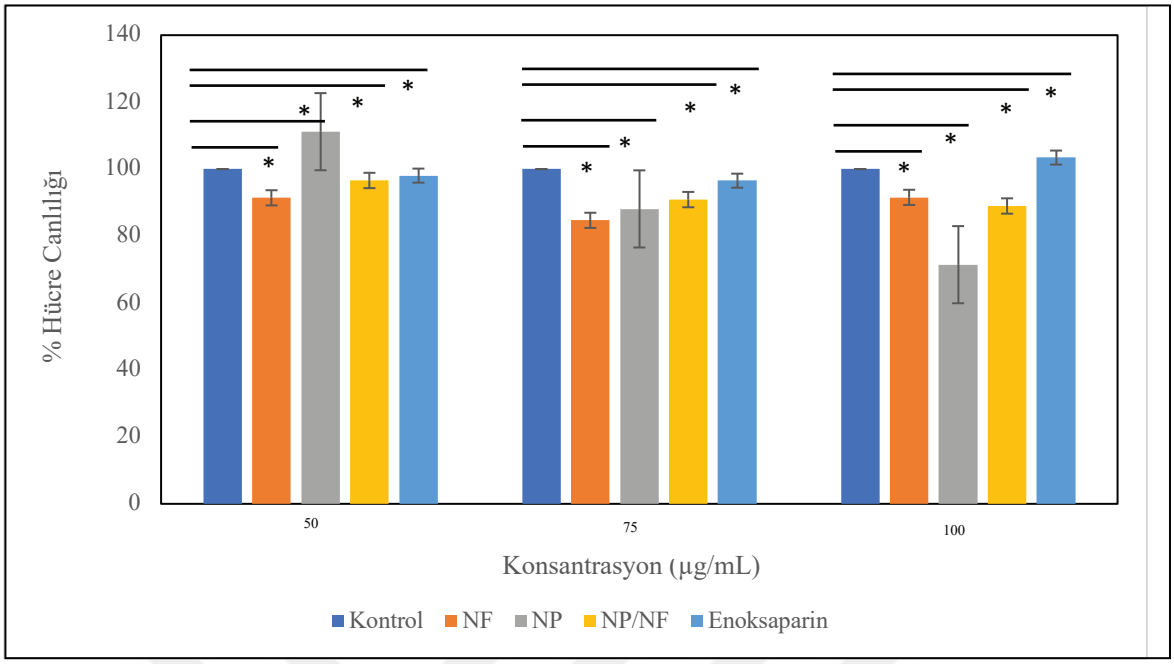


Şekil 4.16. 4 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı sonuçları (MTT-1) (n=3, ortalama ± SH, *:p>0,05)

Çizelge 4.22. Nanosistemlerin MTT analizi sonuçları (n=3, ortalama ± SH)

	NF	NP	NP/NF
Konsantrasyon (µg/mL)	% Hücre Canlılığı		
3,125	97,0 ± 5,0	107 ± 7	106 ± 15
12,5	102 ± 8	115 ± 18	110 ± 6
50	88,1 ± 12,0	131 ± 10	100 ± 13

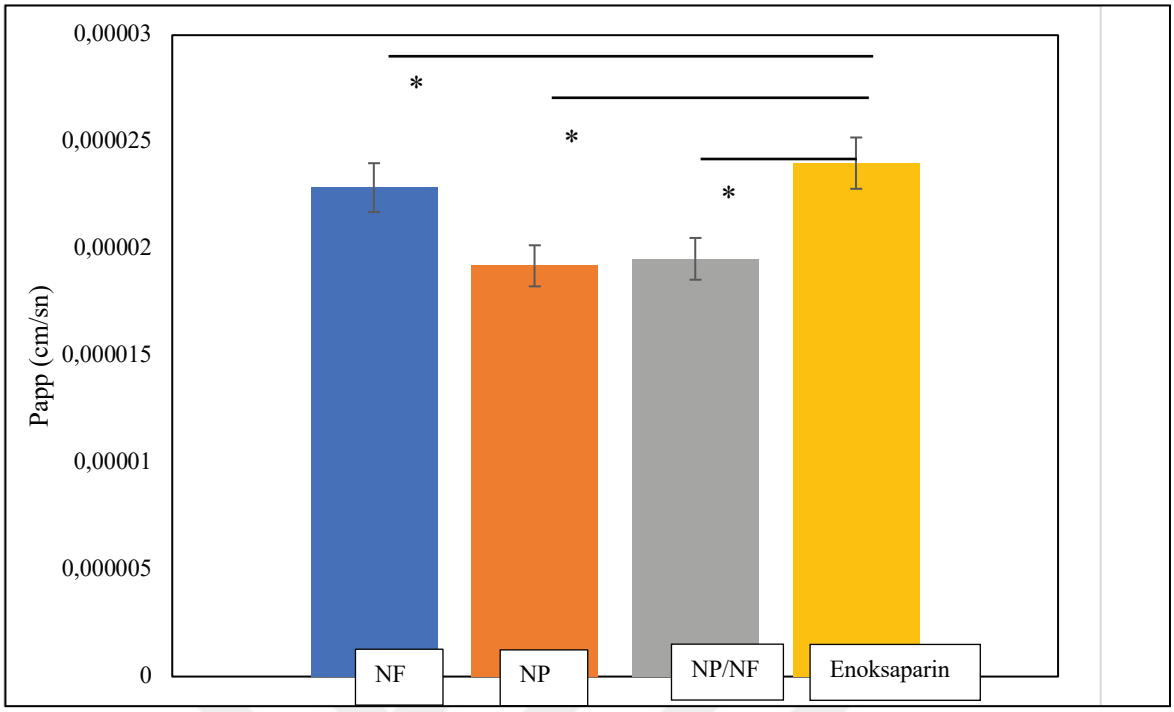
İkinci aşamada, Caco-2 permeabilite çalışmalarında kullanılmak üzere seçilecek formülasyonun dozunun tayin edilmesinde problem yaşanmaması ve geliştirilen analitik yöntem ile daha hassas ve etkin bir şekilde tayin edilebilmesi için toksik olmayan en yüksek dozun seçilmesi gerekliliği sonucu, MTT-2 çalışması yapılmıştır ve sonuçları Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar için 50 ve 75 µg/mL konsantrasyonlarda hücre canlılığı %80'nin üzerinde saptanmıştır. NP formülasyonu için 100 µg/mL konsantrasyonda %hücre canlılığının %80'nin altında olması, geçiş çalışmaları için kullanılabilecek en güvenli dozun 75 µg/mL olduğunu göstermiştir. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında Caco-2 permeabilite çalışmalarında kullanılmak üzere enoksaparin konsantrasyonu 75 µg/mL olarak seçilmiştir. Kontrol grubundan elde edilen % hücre canlılığı ile formülasyonların uygulandığı hücrelerden elde edilen % hücre canlılıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (p>0,05).



Şekil 4.17. 2 saat inkübasyon sonrası Caco-2 hücrelerinin hücre canlılığı sonuçları (MTT-2) (n=3, ortalama ± SH, *:p>0,05)

Nanosistemlerde Caco-2 permeabilite çalışmaları

Caco-2 permeabilite çalışması sonucunda saptanan permeabilite katsayıları Şekil 4.18'de, göreceli enoksaparin geçirgenlik değerleri Çizelge 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.18. Etkin madde ve formülasyonların permeabilite katsayıları (n=3, ortalama ± SH, *:p>0,05)

Formülasyonlar ve etkin maddenin permeabilite katsayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05).

Çizelge 4.23. Nanolif formülasyonlarının göreceli enoksaparin permeabilitesi (n=3, ortalama ± SS)

Formülasyon	% Göreceli enoksaparin permeabilitesi
NF	6,28 ± 0,41
NP	5,11 ± 0,39
NP/NF	6,39 ± 0,39
Enoksaparin	5,37 ± 0,99

Nanosistemlerin stabilite çalışmaları

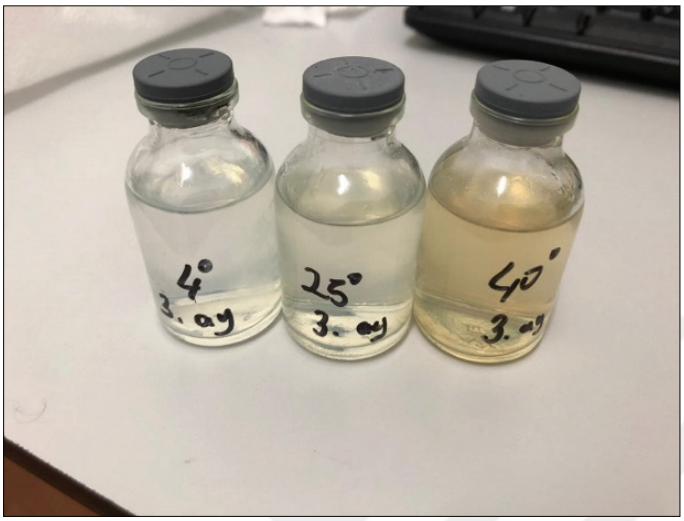
Uzun süreli stabilite çalışması 12. ayda, hızlandırılmış stabilite çalışması ise 6. ay'da sona ermiştir.

Nanopartiküllerin stabilite çalışma sonuçları

4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen nanopartikül süspansiyonu 3 ay sonunda bozulmuştur. Renk ve kıvam olarak görüntüsü

değişmiştir (Resim 4.6). Bunun sebebinin NP çözeltilerinin asidik pH'sına bağlı olarak etkin maddenin bozunmaya uğraması olacağı düşünülmüştür.

Bu nedenle stabilite çalışmalarına NF ve NP/NF formülasyonlarında devam edilmiştir.

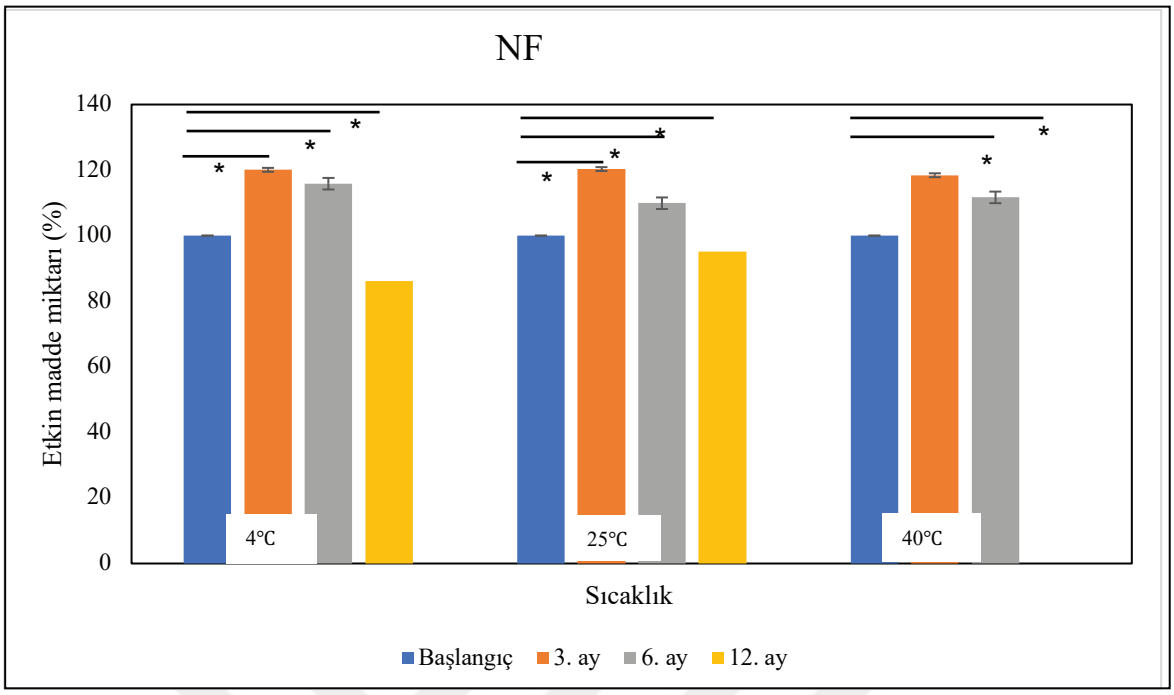


Resim 4.6. 4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen NP formülasyonunun 3. ay sonundaki görünüşü

NF ve NP/NF formülasyonlarına ait stabilite çalışmasının sonuçları

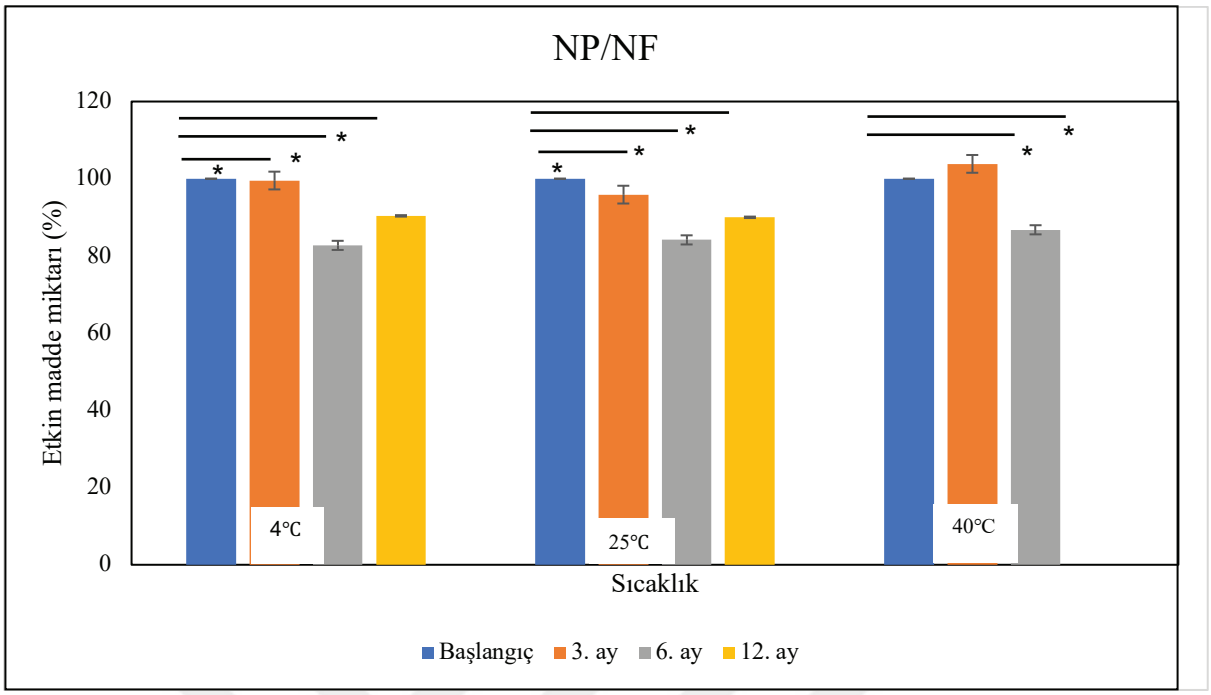
Uzun süreli stabilite testleri 12 ay boyunca, hızlandırılmış testler ise 6 ay boyunca yapılarak etkin madde miktar tayini, in vitro salım çalışması ve nanoliflere ait SEM görüntüleri alınmıştır.

Stabilite çalışmaları boyunca nanolif formülasyonlarına ait % etkin madde miktarı tayini sonuçları Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.19. 4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen NF formülasyonlarında yapılan miktar tayini sonuçları (n=3, ortalama ± SH, *: p>0,05)

4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında NF formülasyonunda başlangıca göre 3., 6. ve 12. ay sonunda, etkin madde miktarında gözlenen değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05).

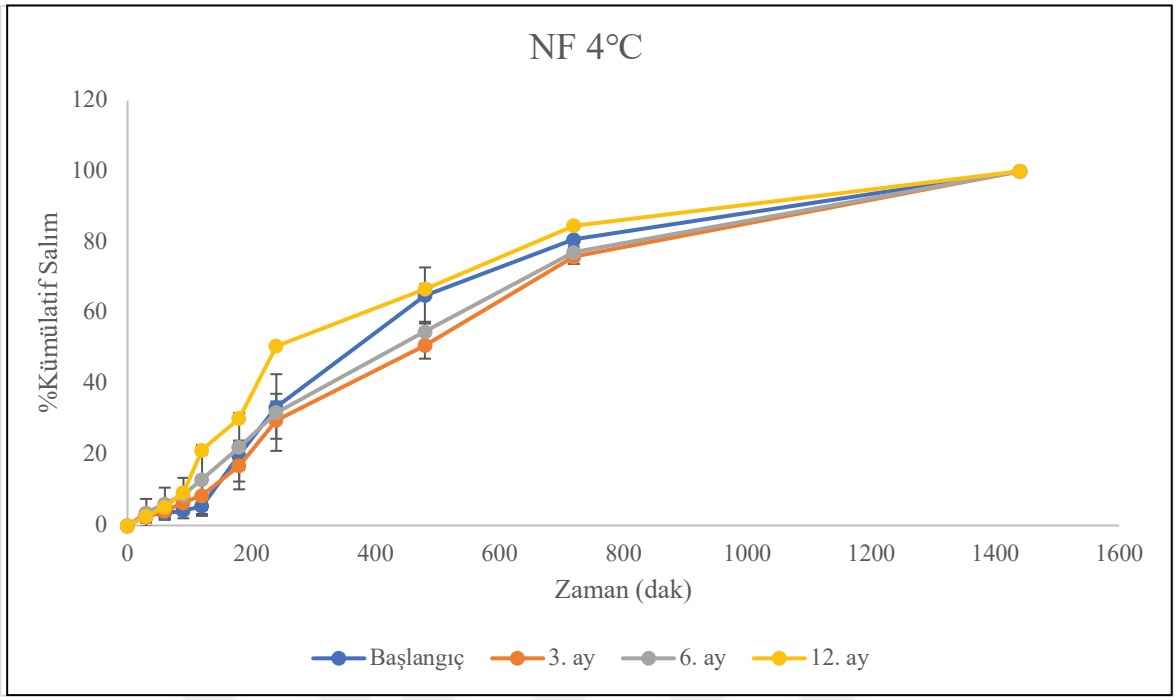


Şekil 4.20. 4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen NP/NF formülasyonlarında yapılan miktar tayini sonuçları (n=3, ortalama ± SH, *: p>0,05)

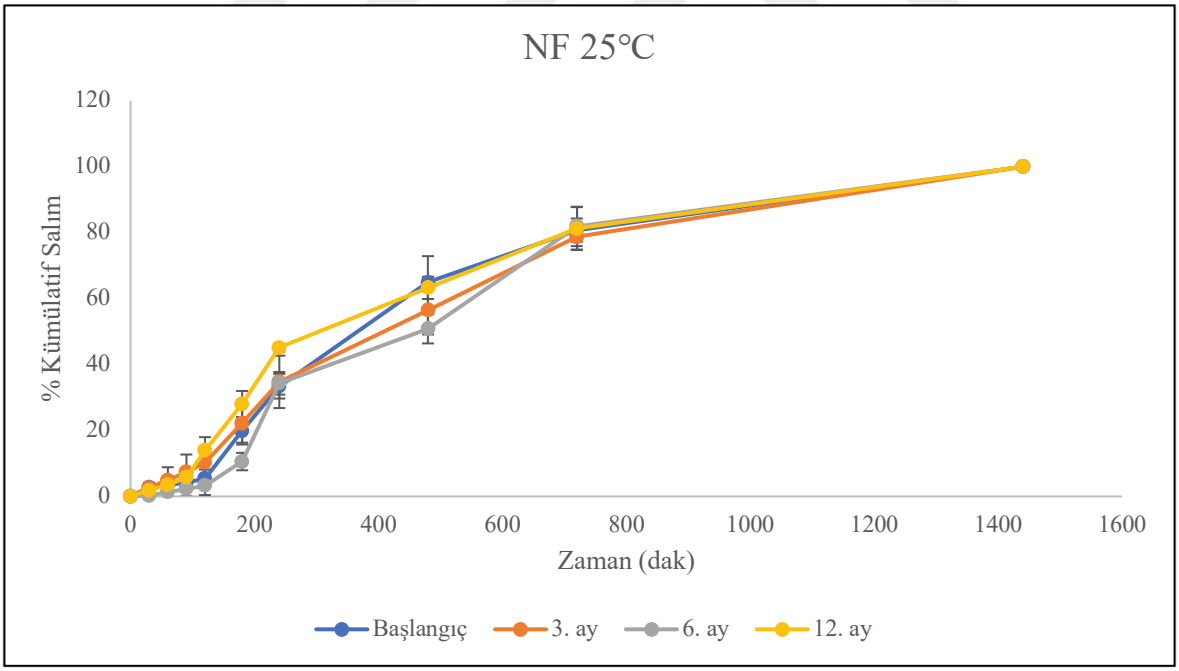
4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında NP/NF formülasyonunda başlangıca göre 3., 6. ve 12. ay sonunda, etkin madde miktarında gözlenen değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05).

Stabilite çalışmaları sonucunda her üç sıcaklıkta bekletilen formülasyonlarda yapılan in vitro salım çalışmasının sonuçları Şekil 4.21-4.26'te gösterilmiştir.

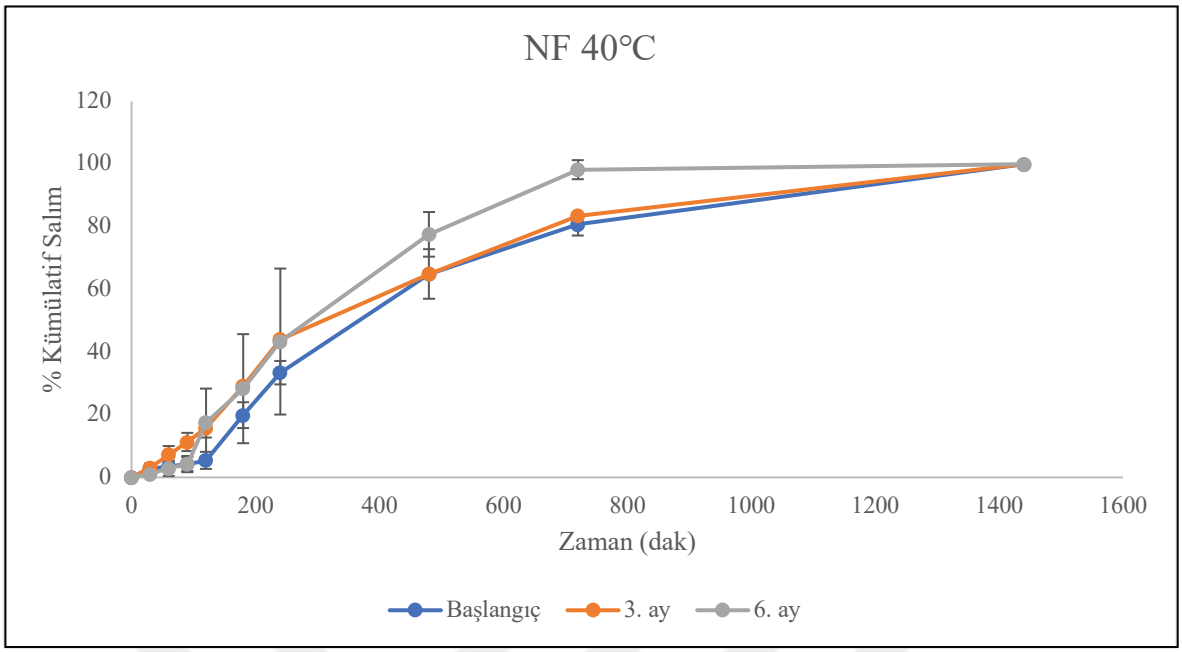
NF formülasyonunda, Hixson-Crowell (reaksiyon hız sabiti; k=0,00057 dak^{-1}); NP/NF formülasyonunda birinci derece kinetikle (reaksiyon hız sabiti k=0,0023 dak^{-1}) etkin madde salımı gerçekleşmektedir. Stabilite çalışmaları boyunca yapılan in vitro salım deneyleri sonucunda 3., 6. ve 12. ay sonunda (4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem koşullarında bekletilen) nanoliflerden etkin maddenin salım kinetiğinin ve reaksiyon hız sabitlerinin anlamlı olarak değişmediği görülmüştür (p>0,05).



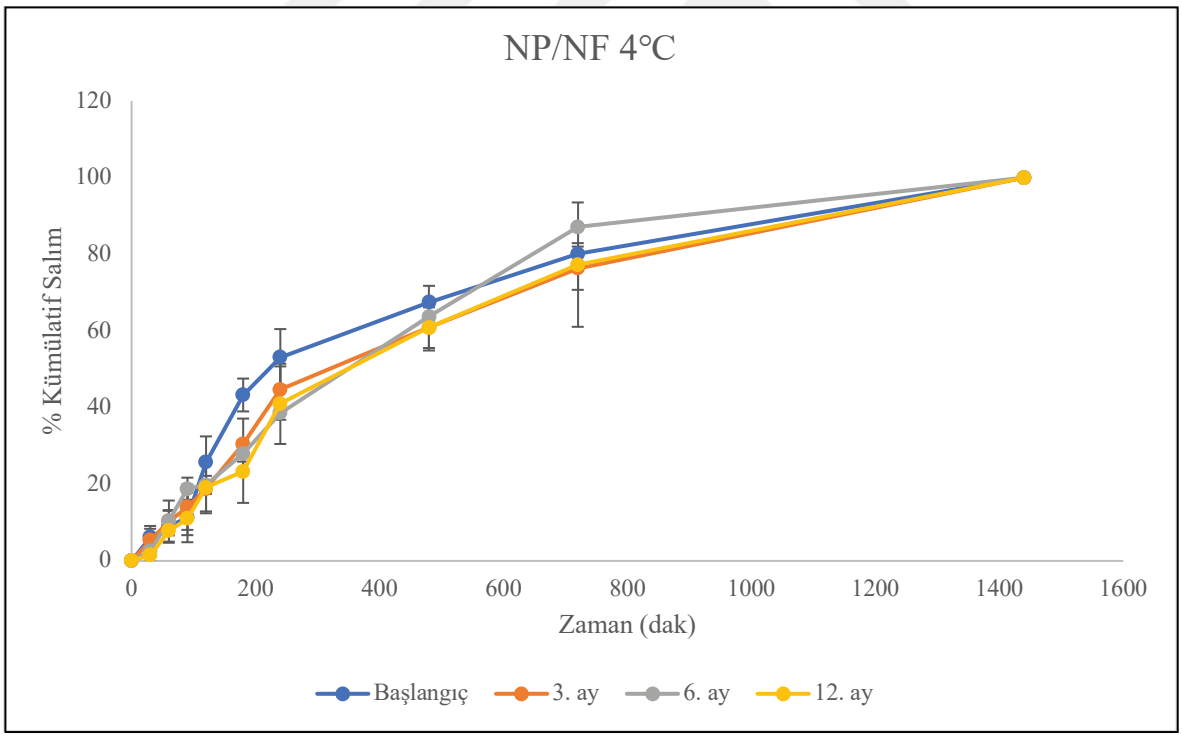
Şekil 4.21. 4ºC/ortam nemde bekletilen NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS)



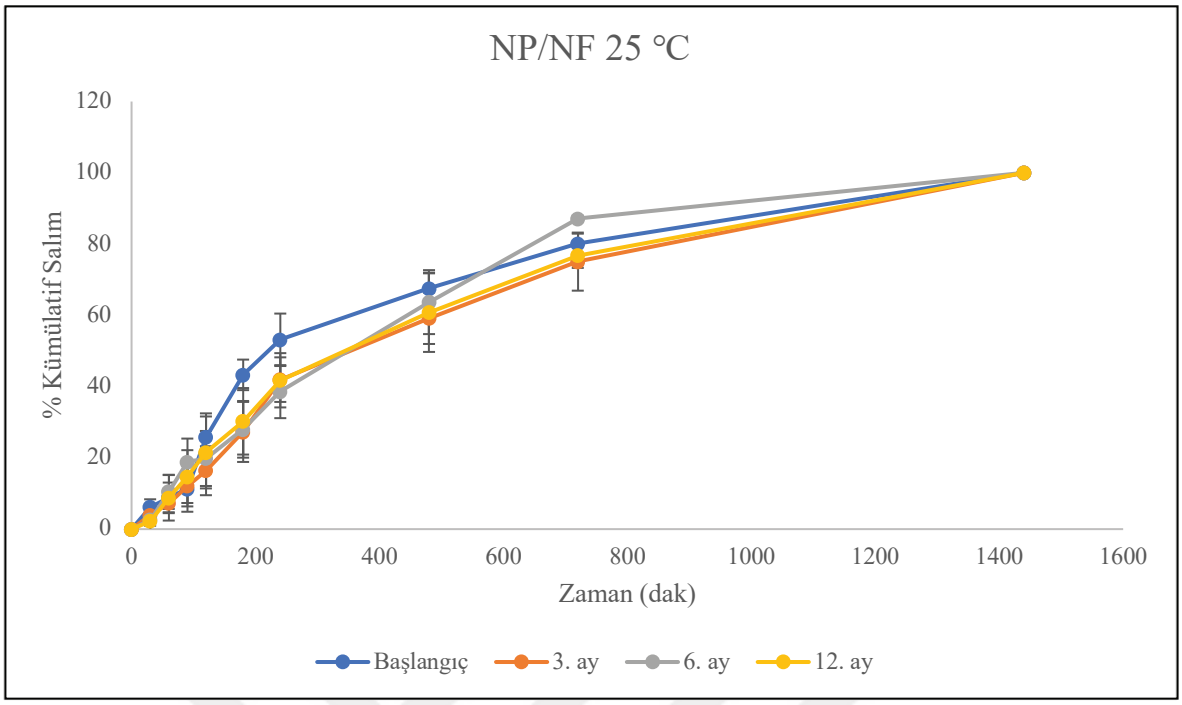
Şekil 4.22. 25ºC/%60 bağıl nemde bekletilen NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS)



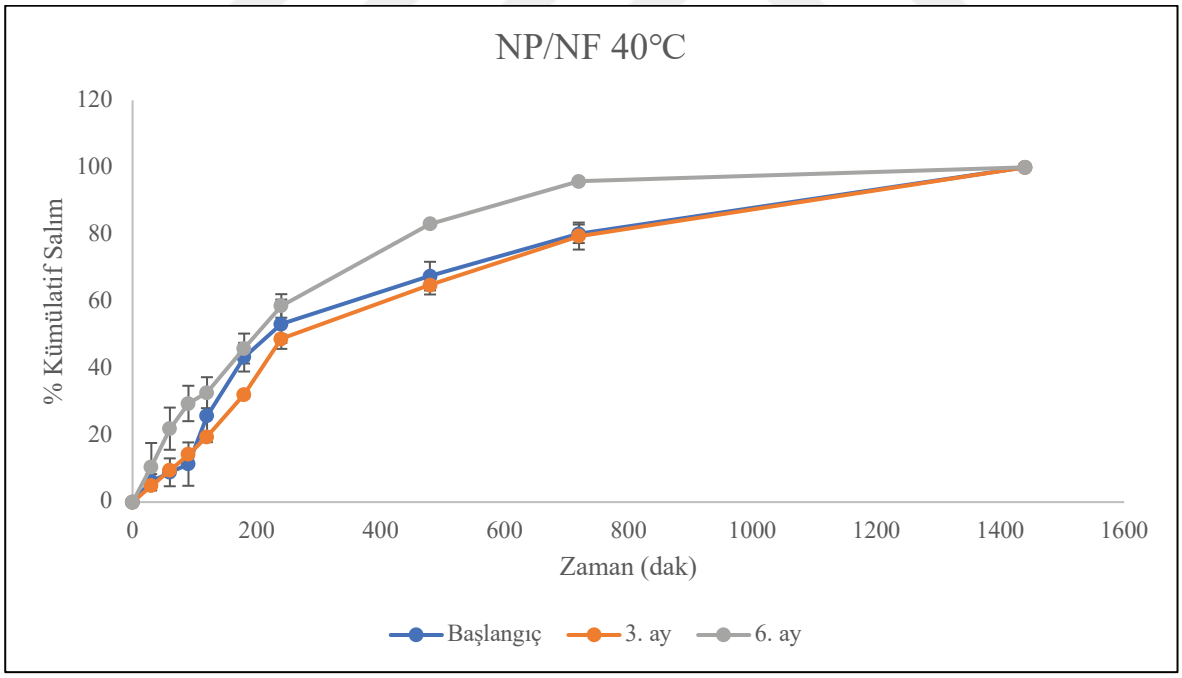
Şekil 4.23. 40ºC/%75 bağıl nemde bekletilen NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS)



Şekil 4.24. 4ºC/ortam neminde bekletilen NP/NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS)



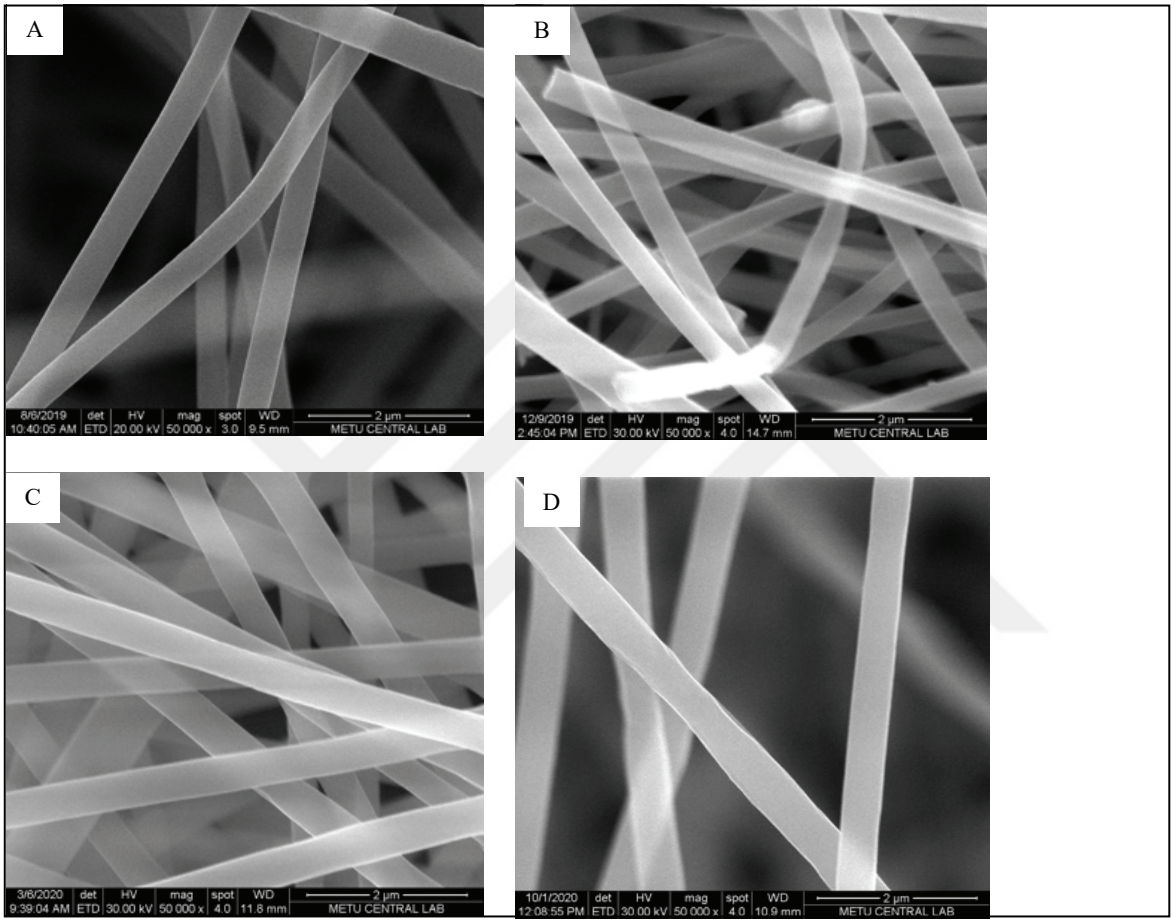
Şekil 4.25. 25ºC/%60 bağıl nemde bekletilen NP/NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS)



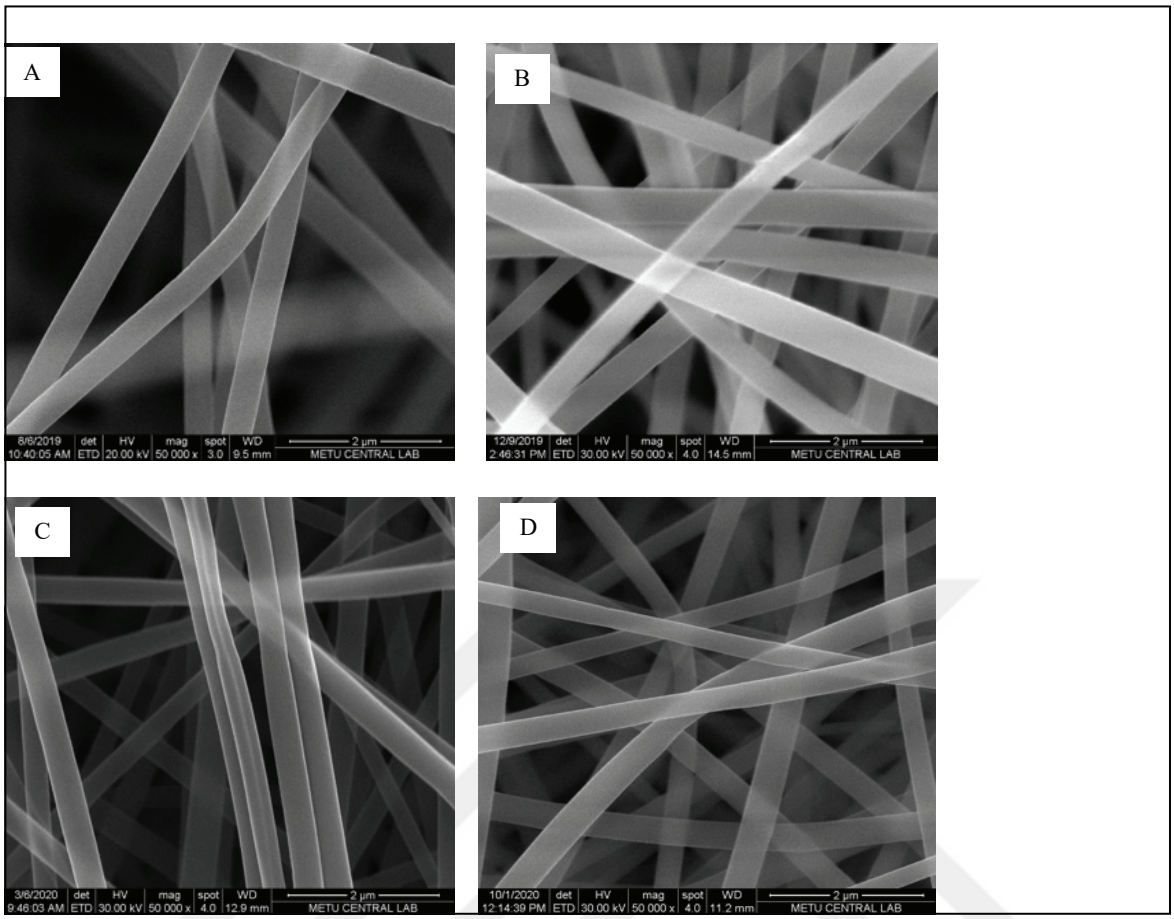
Şekil 4.26. 40ºC/%75 bağıl nemde bekletilen NP/NF formülasyonunda in vitro salım profilleri (n=3, ortalama ±SS)

Nanoliflerin SEM sonuçları

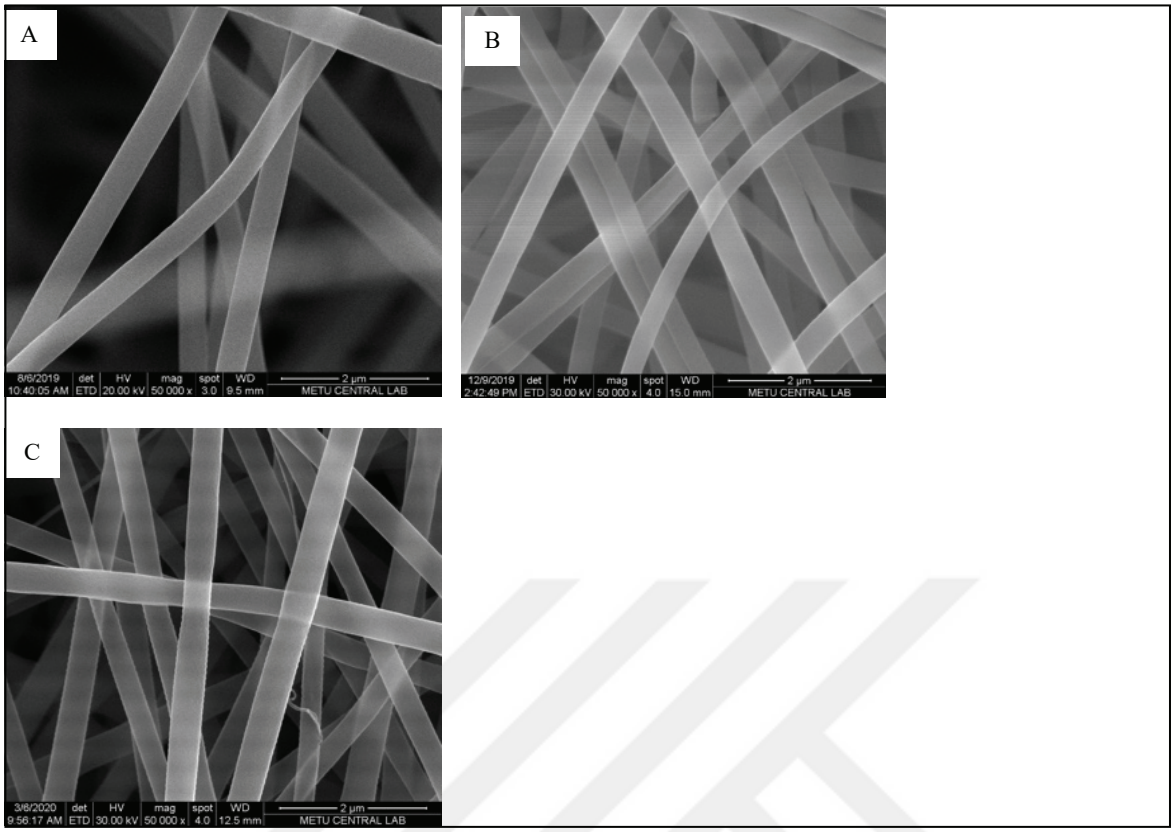
Stabilite çalışmaları sonucunda nanoliflerden alınan SEM görüntüleri Resim 4.7 – Resim 4.12'de gösterilmiştir. Ortalama lif çapı ölçüm sonuçları Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25'de gösterilmiştir.



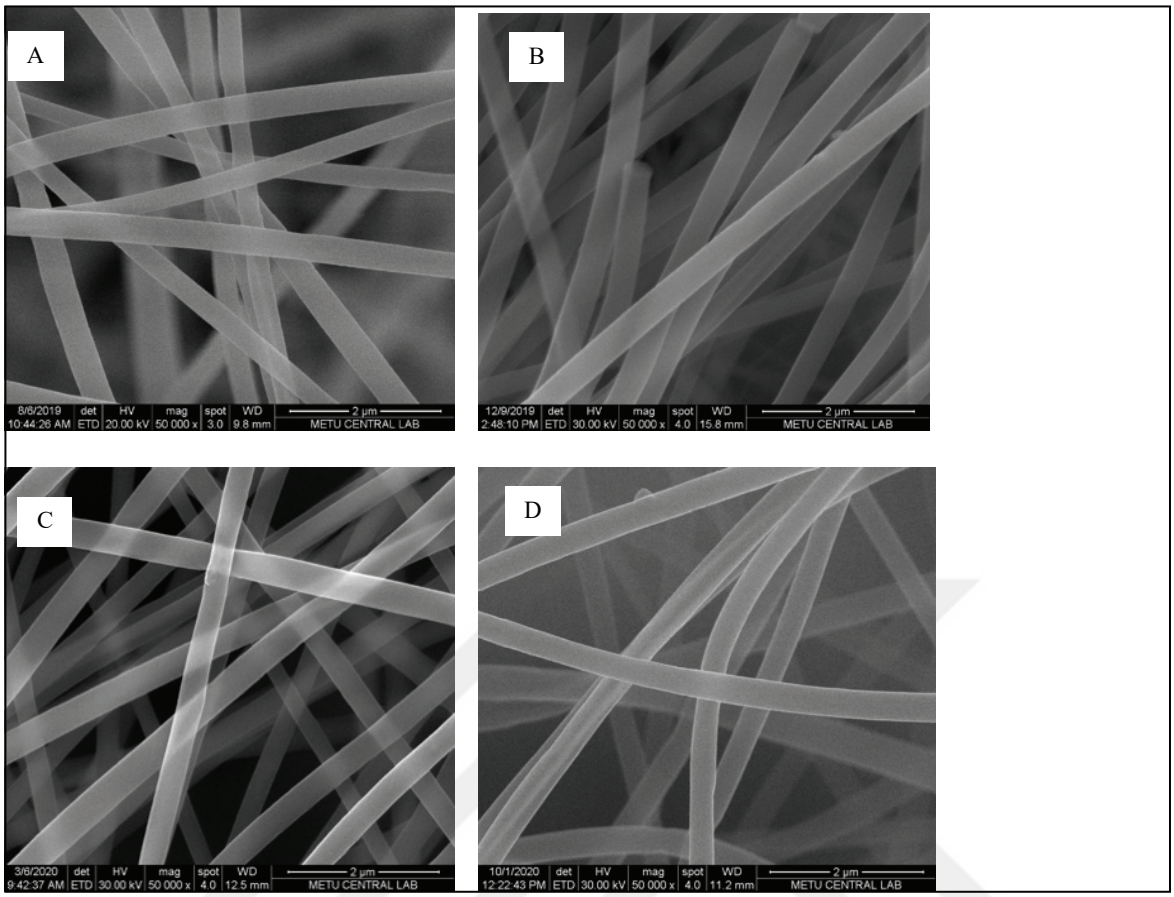
Resim 4.7. NF formülasyonuna ait 4°C /ortam neminde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay)



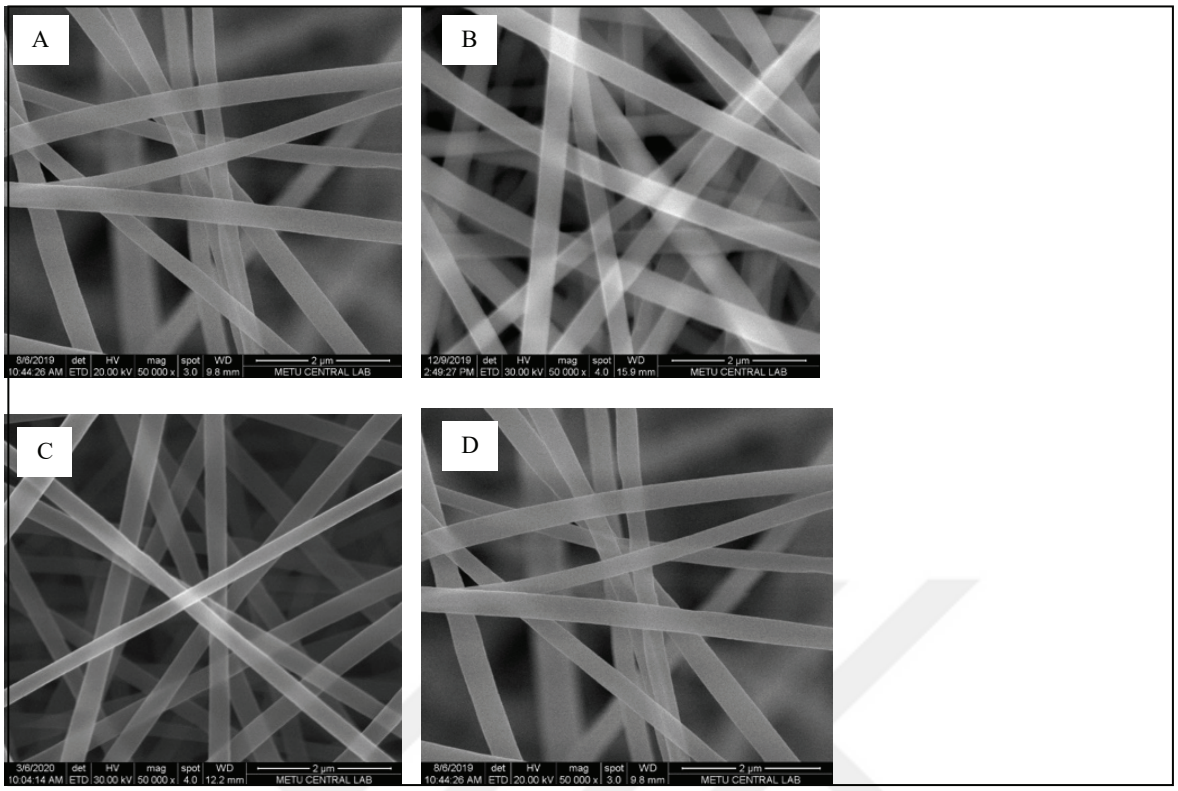
Resim 4.8. NF formülasyonuna ait 25°C'de yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay)



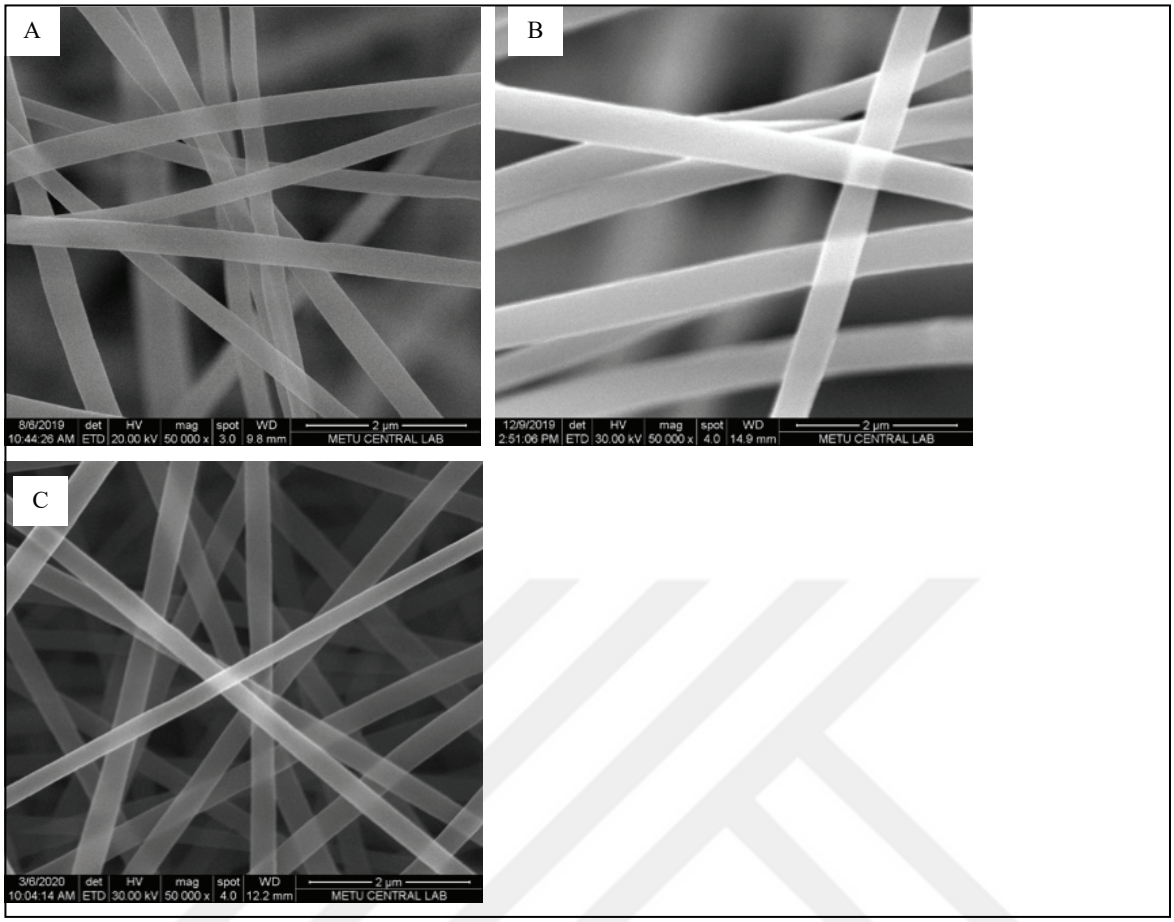
Resim 4.9. NF formülasyonuna ait 40ºC/%75 bağıl nem'de yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay)



Resim 4.10. NP/NF formülasyonuna ait 4°C /ortam neminde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay)



Resim 4.11. NP/NF formülasyonuna ait 25ºC/%60 bağıl nemde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay, D:12. ay)



Resim 4.12. NP/NF formülasyonuna ait 40ºC/%75 bağıl nemde yapılan stabilite çalışması sonucu SEM görüntüleri, 50 000x (A: Başlangıç, B: 3.ay, C: 6. ay)

Çizelge 4.24. NF formülasyonunun stabilite çalışmaları sonunda hesaplanan lif çapları (n=50, ortalama±SS, p>0,05)

NF		3. ay (nm)	6.ay (nm)	12. ay (nm)
Başlangıç	4°C /ortam nemi	364±77	356±96	351±64
430±94 nm	25ºC/%60 bağıl nem	347±69	326±74	321±53
	40ºC/%75 bağıl nem	335±91	330±55	

Çizelge 4.25. NP/ NF formülasyonunun stabilte çalışmaları sonunda lif çapı (n=50, ortalama±SS, p>0,05)

NP/NF		3. ay (nm)	6.ay (nm)	12. ay (nm)
Başlangıç	4°C /ortam nemi	344±67 nm	341±94	311±70
364±80 nm	25ºC/%60 bağıl nem	328±67 nm	299±63	290±76
	40ºC/%75 bağıl nem	325±61 nm	309±80	

Stabililite çalışmaları sonucunda 3., 6. ve 12. aylarda alınan SEM görüntüleri sonucunda yapılan ortalama lif çapı ölçümlerine göre, başlangıçta ölçülen lif çapları anlamlı olarak değişmemiştir ($p>0,05$).

4.3.4. İn-vivo deneyler

Belirlenen optimum formülasyonlar in vivo çalışmalar için kullanılmıştır. İn vivo deneylerde kullanılan tavşan grupları Çizelge 3.4'te listelenmiştir.

Formülasyonların tavşanlara uygulanması ve plazmalarında enoksaparin tayini amacıyla anti-Xa ve aPTT ölçümlerinin yapılması

Tavşanların plazmalarından yapılan aPTT ve anti-Xa ölçümlerinin sonuçları Çizelge 4.26-Çizelge 4.31'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. A1 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS)

t(dak)	A1-1	A1-2	A1-3	A1-4	A1-5	A1-6	aPTT ortalama	SS
0	20,4	26,6	22,5	20,4	26,6	22,5	23,2	2,8
60	46,2	17,5	18,6	14,7	14,6	16	21,3	12,3
120	-	17,1	22	12,7	14,7	14,2	16,1	3,6
240	15,7	19,9	23,9	16,3	13,8	14,8	17,4	3,8
360	15,3	14,1	17,6	15,5	17,5	13,8	15,6	1,6
480	18,2	17	41,6	14,8	13,5	16,1	20,2	10,6
t(dak)	A1-1	A1-2	A1-3	A1-4	A1-5	A1-6	anti-Xa ortalama	SS
0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0,03	0,01	0,06	0,01	0	0,018	0,023
120	0	0,03	0	0,04	0	0,04	0,0183	0,020
240	0	0,03	0	0,05	0	0,01	0,015	0,021
360	0,03	0,02	0,01	0,05	0	0,07	0,030	0,026
480	0,02	0,02	0	0	0,01	0	0,008	0,010

Çizelge 4.27. A2 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS)

t(dak)	A2-1	A2-2	A2-3	A2-4	A2-5	A2-6	aPTT ortalama	SS
0	20,4	26,6	22,5	20,4	26,6	22,5	23,2	2,8
60	52,4	17,3	15,9	39	16,2	-	28,2	16,7
120	20,2	13,1	-	24,4	16,1	17	18,2	4,3
240	-	-	-	-	74	31,5	52,7	30,0
360	-	20,3	15	17,7	13,9	14,9	16,4	2,6
480	-	24,9	51,5	14,8	17,5	16,8	25,1	15,2
t(dak)	A2-1	A2-2	A2-3	A2-4	A2-5	A2-6	anti-Xa ortalama	SS
0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0,02	0	0,74	0,39	3,95	0,850	1,547
120	0	0,02	0,01	0,22	0,06	-	0,052	0,098
240	2,85	2,32	3,39	3,66	3,95	0,95	2,853	1,100
360	3,52	0,10	0,00	0,05	0,05	0,13	0,642	1,410
480	3,82	1,76	2,13	0,03	0,03	0,02	1,230	1,550

Çizelge 4.28. A3 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS)

t(dak)	A3-1	A3-2	A3-3	A3-4	A3-5	A3-6	aPTT ortalama	SS
0	20,4	26,6	22,5	20,4	26,6	22,5	23,2	2,8
60	-	22,1	18,1	46,2	13,4	14,1	22,8	13,5
120	-	-	13	15	15,5	16,8	15,1	1,6
240	-	14,5	19,5	16	19,7	-	17,4	2,6
360	13,3	-	16,2	18,6	17,1	16,7	16,4	1,9
480	13,4	-	-	48,8	66,3	-	42,8	27,0
t(dak)	A3-1	A3-2	A3-3	A3-4	A3-5	A3-6	anti-Xa ortalama	SS
0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0,01	0	0	0	0	0,03	0,007	0,012
120	0	0	0	0,01	0,04	0,04	0,015	0,020
240	0	0,03	0	0	0,01	0,07	0,018	0,028
360	0	0	0,02	0	0	0,03	0,008	0,013
480	0,04	0	0,04	0	3,64	3,84	1,260	1,922

Çizelge 4.29. A4 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS)

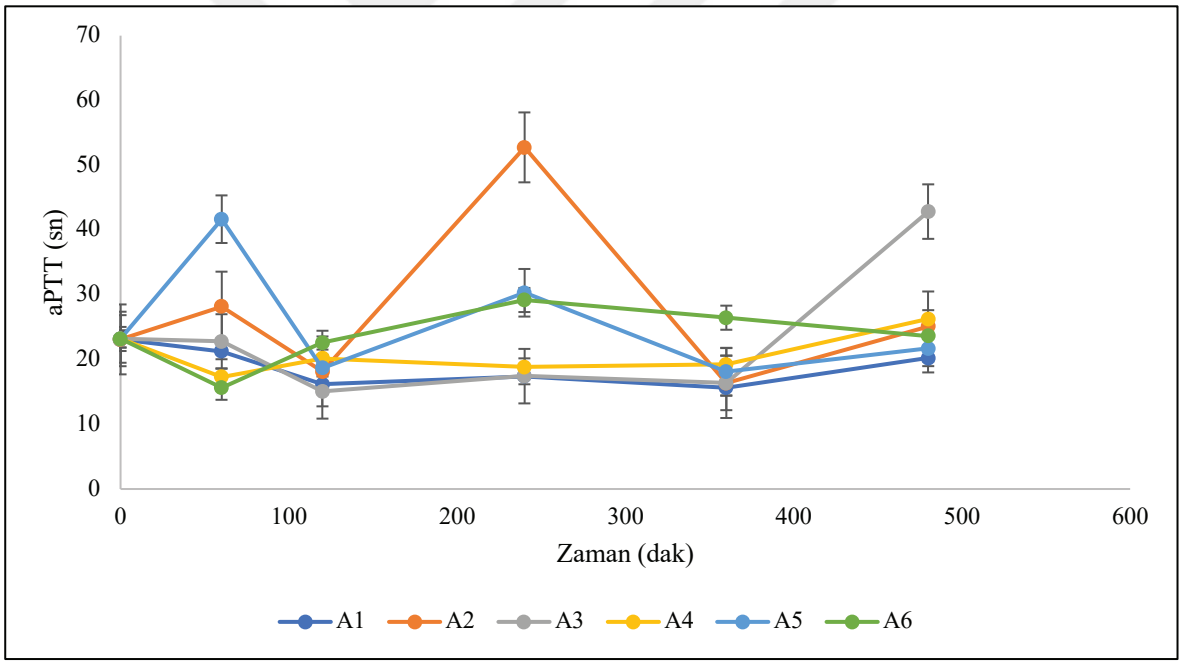
t(dak)	A4-1	A4-2	A4-3	A4-4	A4-5	A4-6	aPTT ortalama	SS
0	20,4	26,6	22,5	20,4	26,6	22,5	23,2	2,8
60	18,5	18,7	18,6	17,1	13,3	17,5	17,3	2,1
120	18,8	27,2	-	17,7	-	17	20,2	4,7
240	23,2	14,6	-	-	20,4	17,1	18,8	3,8
360	21,1	12,9	17,1	16	28,6	19,8	19,3	5,4
480	20,2	-	-	-	35,9	22,7	26,2	8,4
t(dak)	A4-1	A4-2	A4-3	A4-4	A4-5	A4-6	anti-Xa ortalama	SS
0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0,02	0,08	0	0,05	0,01	0,027	0,032
120	0	0	0	0,02	0	0,05	0,012	0,020
240	0	0	-	0	0,05	0,04	0,018	0,025
360	0	0,08	0,03	0,03	0	0,01	0,025	0,030
480	0	-	0,01	0	0	0	0,002	0,004

Çizelge 4.30. A5 grubundaki altı tavşanın plazmalarında tayin edilen aPTT ve anti-Xa değerleri (n=6, ortalama±SS)

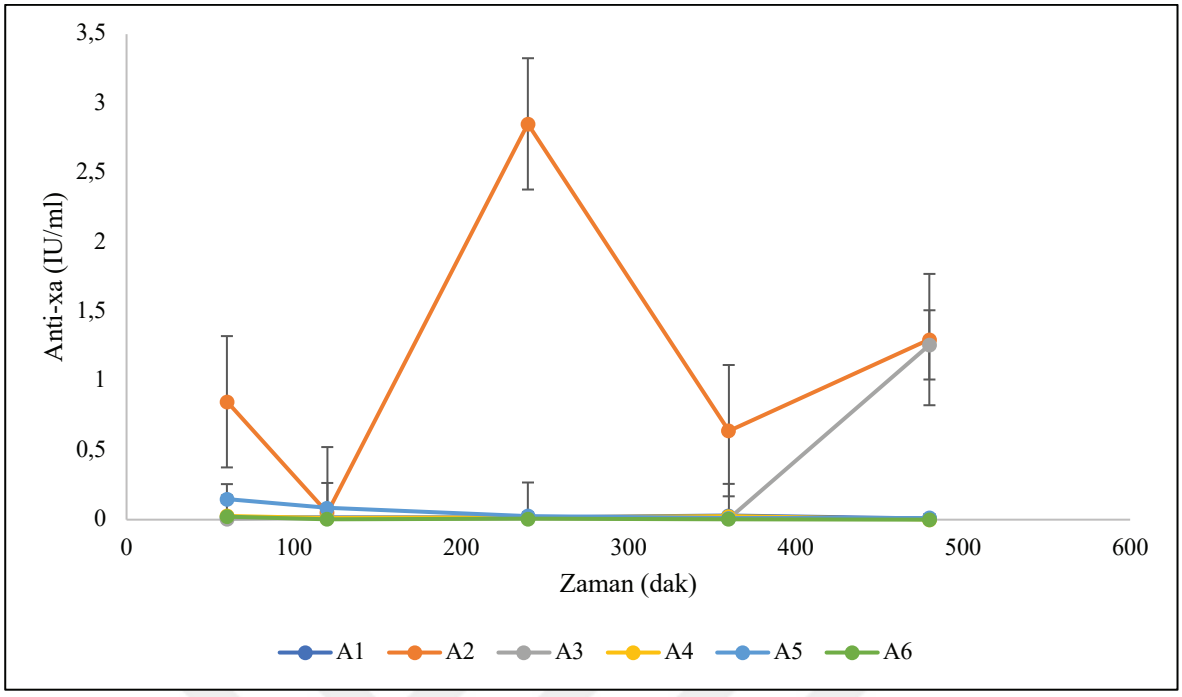
t(dak)	A5-1	A5-2	A5-3	A5-4	A5-5	A5-6	aPTT ortalama	SS
0	20,4	26,6	22,5	20,4	26,6	22,5	23,2	2,8
60	23,4	82,1	11	77,2	14,6	-	41,7	35,0
120	22,7	19,5	17,2	-	20,3	13,7	18,7	3,4
240	83,6	29,3	18,6	17,1	18,5	14,7	30,3	26,6
360	23,5	16,8	-	-	12,8	19,4	18,1	4,5
480	27,1	31,3	-	-	12,3	16	21,7	9,0
t(dak)	A5-1	A5-2	A5-3	A5-4	A5-5	A5-6	anti-Xa ortalama	SS
0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0,01	0,48	0,03	0,28	0,09	0,148	0,193
120	0	0,14	0,05	0,05	0,13	0,13	0,083	0,058
240	0	0	0,07	0	0,05	0,04	0,027	0,031
360	0	0	0,02	0	0,05	0	0,012	0,020
480	0	0,02	0	-	0,03	0,02	0,014	0,013

Çizelge 4.31. A6 tavşan grubu tavşanların plazmalarındaki aPTT ve antiXa değerleri (n=6, ortalama±SS)

t(dak)	A6-1	A6-2	A6-3	A6-4	A6-5	A6-6	aPTT ortalama	SS
0	20,4	26,6	22,5	20,4	26,6	22,5	23,2	2,8
60	17,4	13,3	18,1	11,5	14,8	18,7	15,6	2,9
120	39,7	13,1	-	16,5	21	-	22,6	11,9
240	26,1	52,3	13,9	13,1	15,2	54,5	29,2	19,4
360	32,7	13,2	13,4	14,1	14,9	70,4	26,5	22,8
480	20	54,1	15,2	18,2	14,2	20	23,6	15,1
t(dak)	A6-1	A6-2	A6-3	A6-4	A6-5	A6-6	anti-Xa ortalama	SS
0	-	-	-	-	-	-	-	-
60	0	0,02	0,02	0,04	0,05	0	0,022	0,020
120	0	0	0	-	0,02	0	0,004	0,009
240	0	0	0	0	0,04	0	0,007	0,016
360	0	0	0	0,01	0,01	0	0,003	0,005
480	-	-	-	-	-	-	0	0



Şekil 4.27. İn vivo çalışmalar sonunda tavşan gruplarına ait aPTT sonuçları (n=6, ortalama ±SH)



Şekil 4.28. İn vivo çalışmalar sonunda tavşan gruplarına ait anti-Xa sonuçları (n=6, ortalama ±SH)

pKsolver programı kullanılarak, aPTT değerlerinden $AUC_{0\text{-}t}$ ve $aPTT_{maks}$ değerleri ve etkili bulunan sonuç formülasyonların uygulandığı A2 ve A3 tavşan gruplarında bağıl biyoyararlanım hesaplanmıştır, oral heparin çözeltisi ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır ve Çizelge 4.32'de gösterilmiştir.

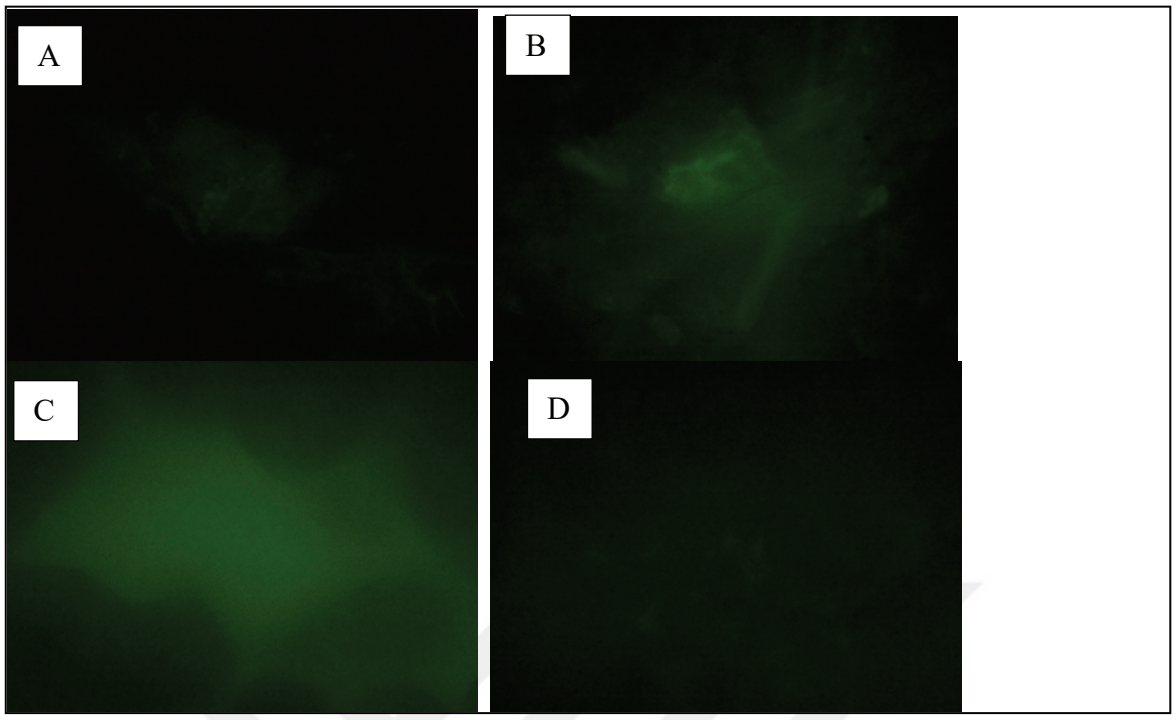
Çizelge 4.32. İn vivo çalışmalarda kullanılan tavşan gruplarında aPTTmaks, AUC_{0-t} (aPTT üzerinden) ve bağıl biyoyararlanım değerleri

	aPTTmaks (sn)	AUC_{0-t} (sn*saat)	T_{maks} (saat)	Bağıl biyoyarlanım(*) (%)
A1 (oral NF) 2000 IU/kg	23,2	-	0	-
A2 (oral NP) 2000 IU/kg	52,7	230,3	4	5,7
A3 (oral NP/NF) 2000 IU/kg	42,8	167,4	8	4,1
A4 (oral enoksaparin çözeltisi) 2000 IU/ kg	26,3	-	8	-
A5 (SC enoksaparin çözeltisi) 100 IU/ kg	41,7	200,0	1	100
A6 (Kontrol grubu, oral SF)	29,2			

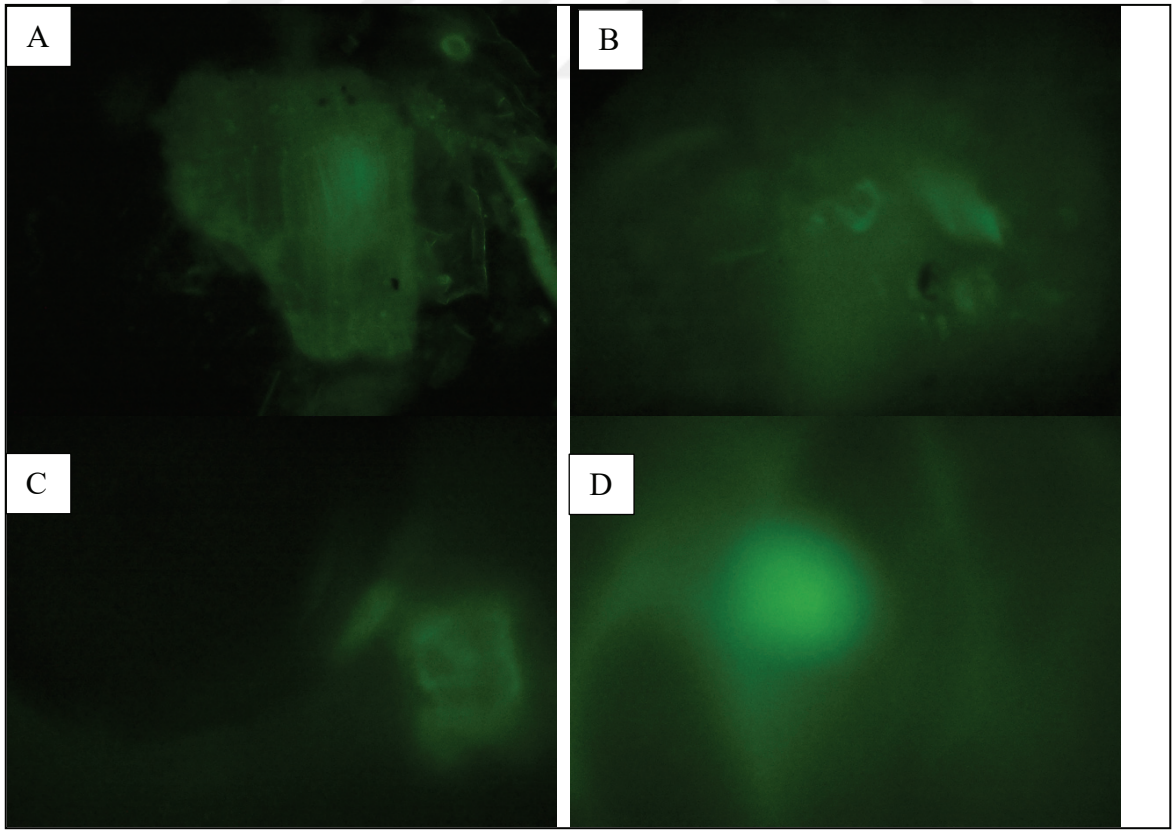
*Bağıl biyoyararlanım hesaplanırken SC veriliş yolu referans alınmıştır.

Formülasyonların tavşanlara uygulandıktan sonra floresan mikroskobu ile barsaklarının görüntülenmesi

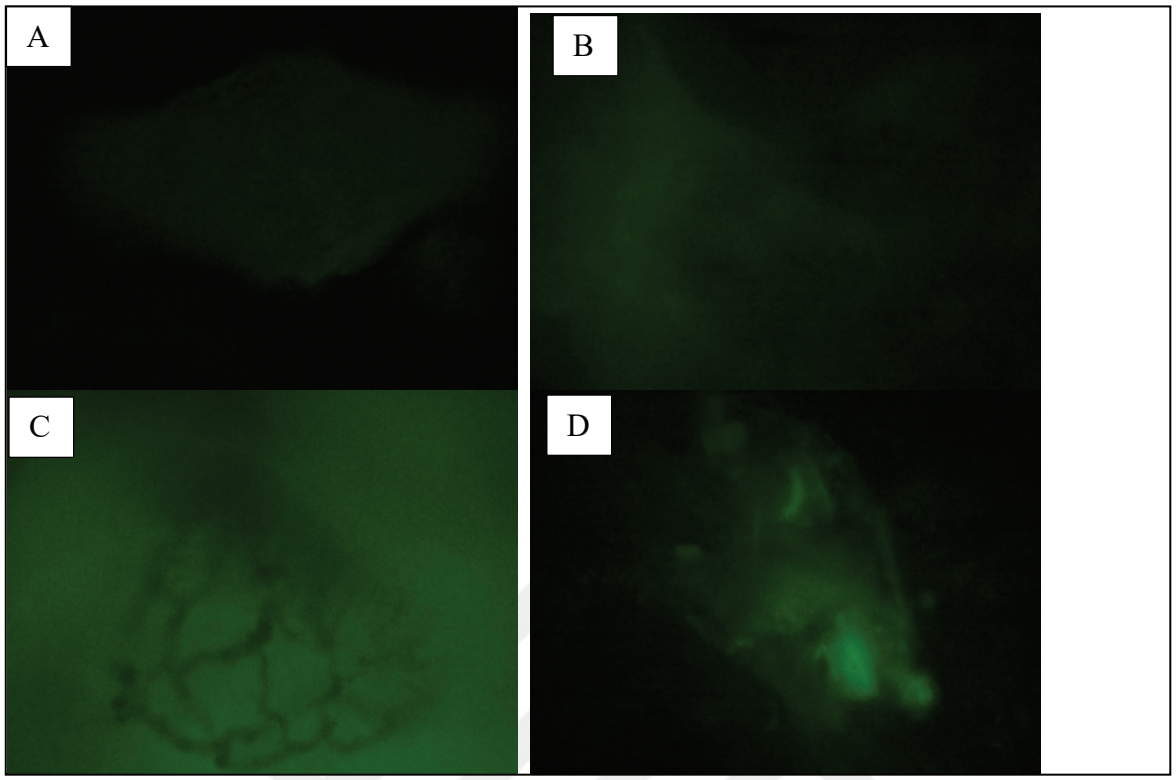
FI taşıyan formülasyonların tavşanlara uygulanması sonrasında her bir tavşan grubunda bulunan iki tavşandan biri 2. saat diğeri 4. saat sonrasında ötenazi yapıldıktan sonra tavşanların barsak görüntüleri floresan mikroskopta incelenmiş ve Resim 4.13-Resim 4.24'de gösterilmiştir. Ayrıca alınan ince barsak kesitlerindeki floresan boyanın yoğunlukları hesaplanarak Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Ayırca FI-NP çözeltsinin TEM görüntüleri ise Resim 4.25'te gösterilmiştir.



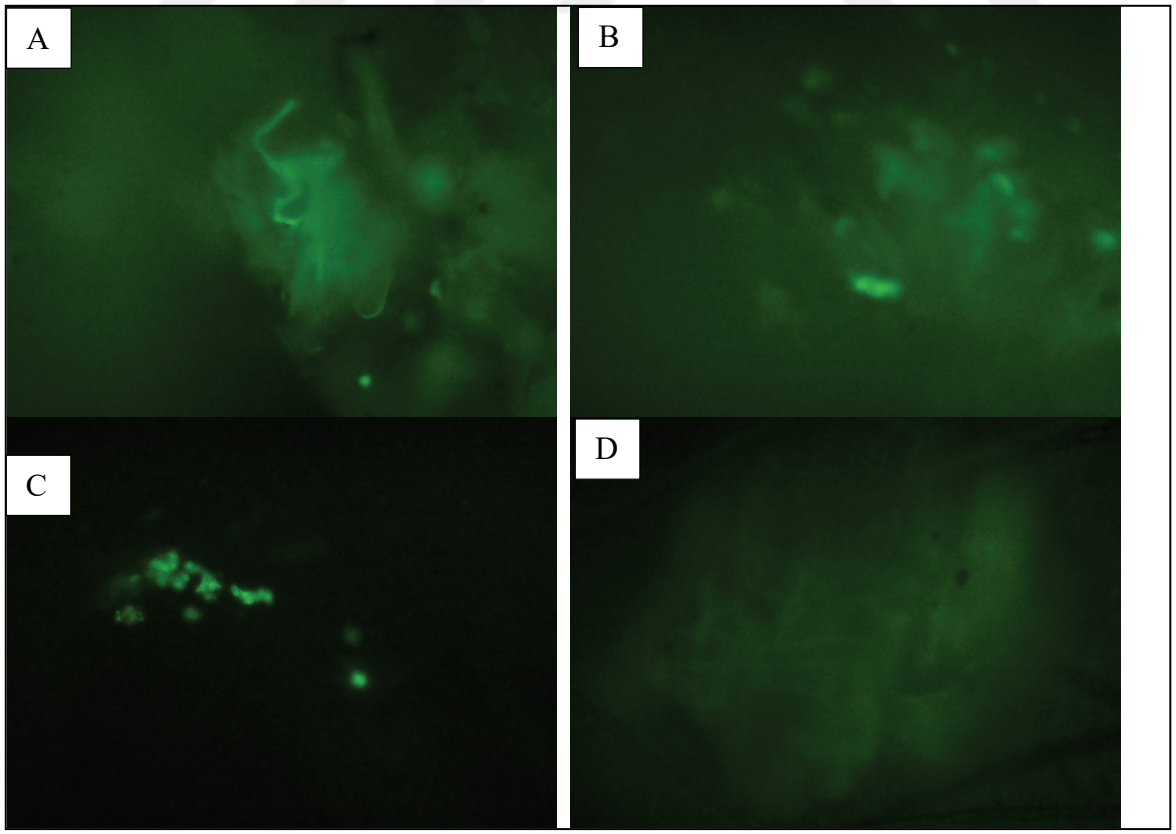
Resim 4.13. FI-NF'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



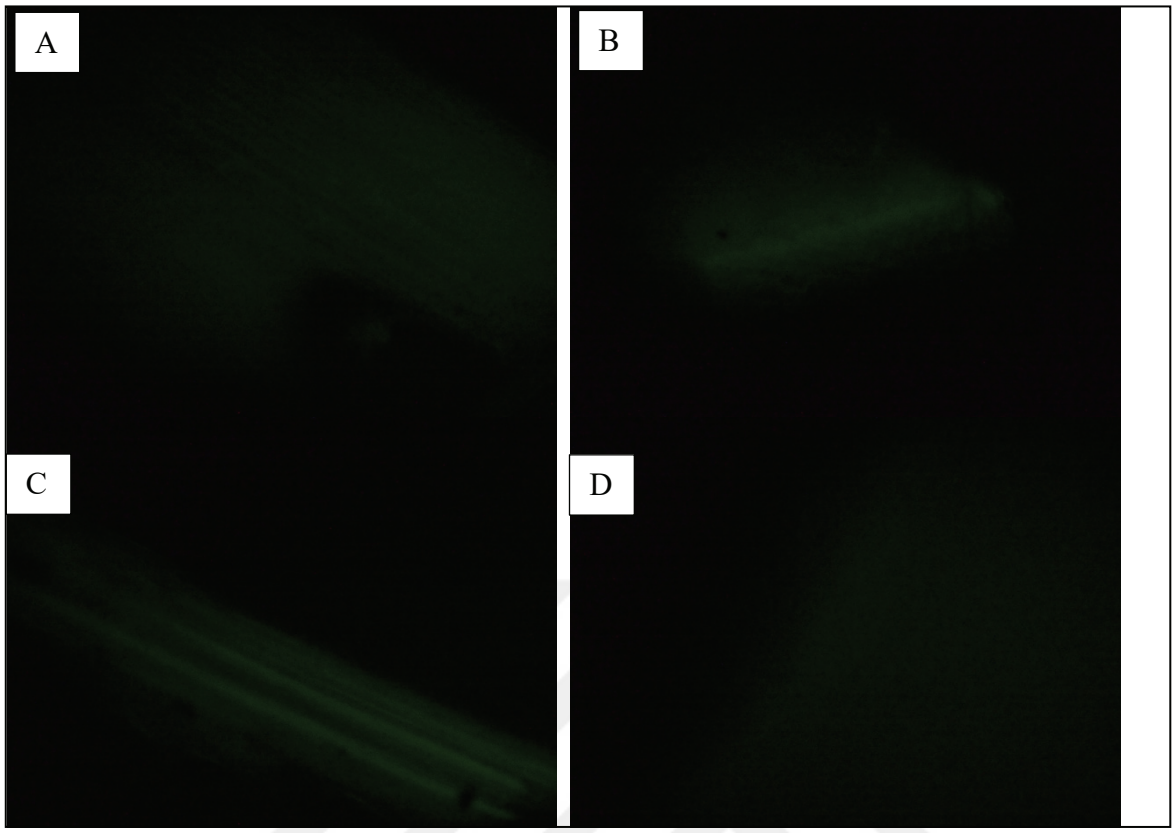
Resim 4.14. FI-NF'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



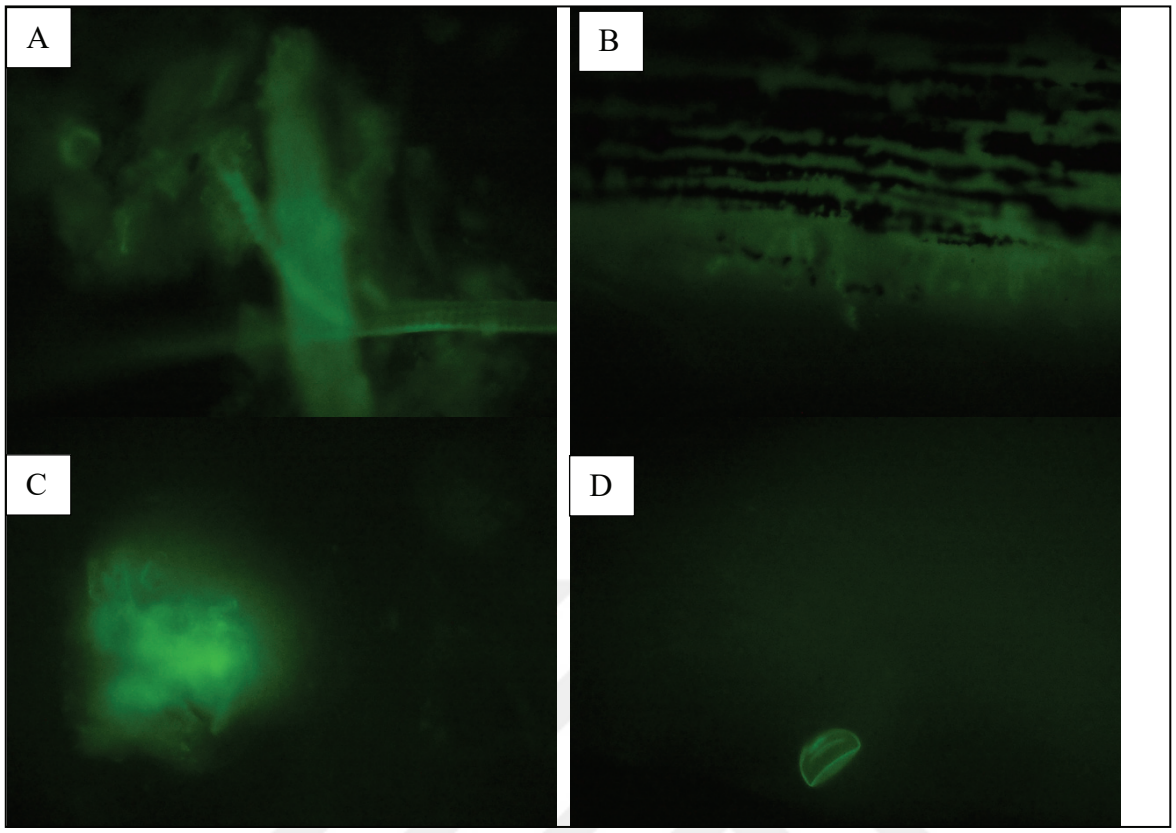
Resim 4.15. FI-NP'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



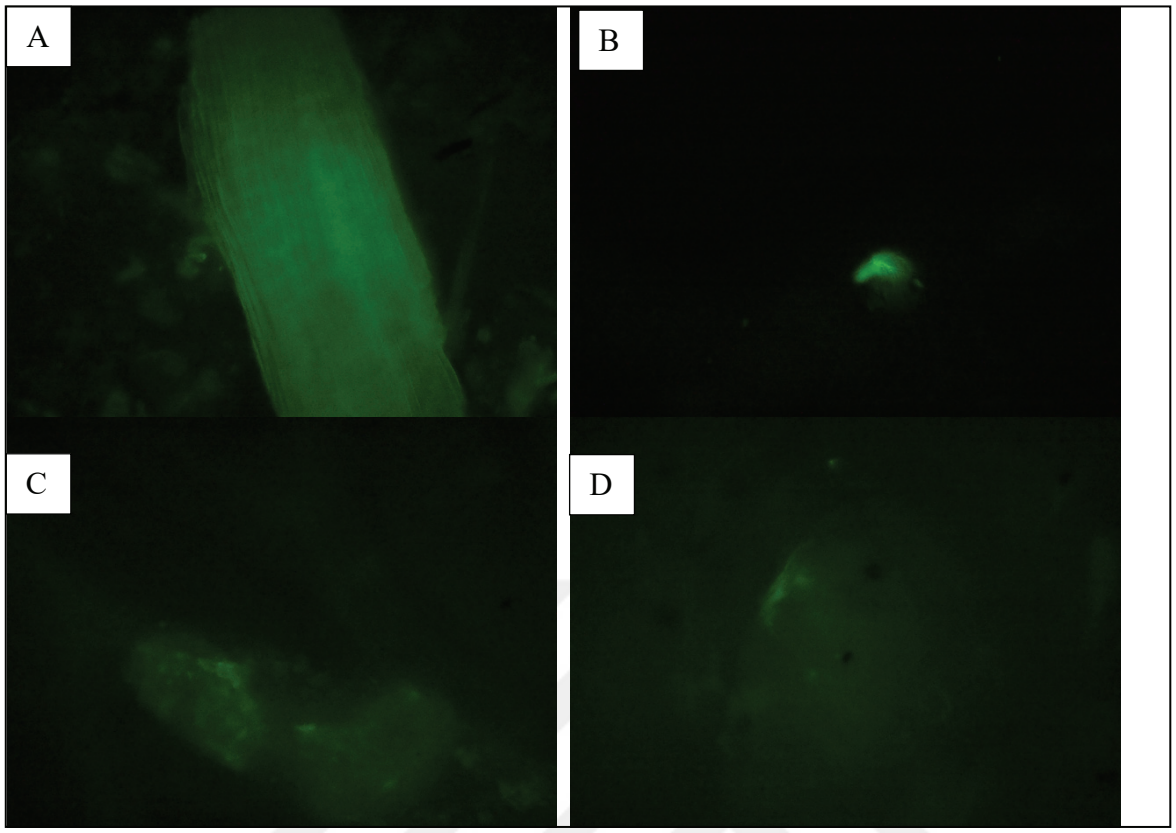
Resim 4.16. FI-NP uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



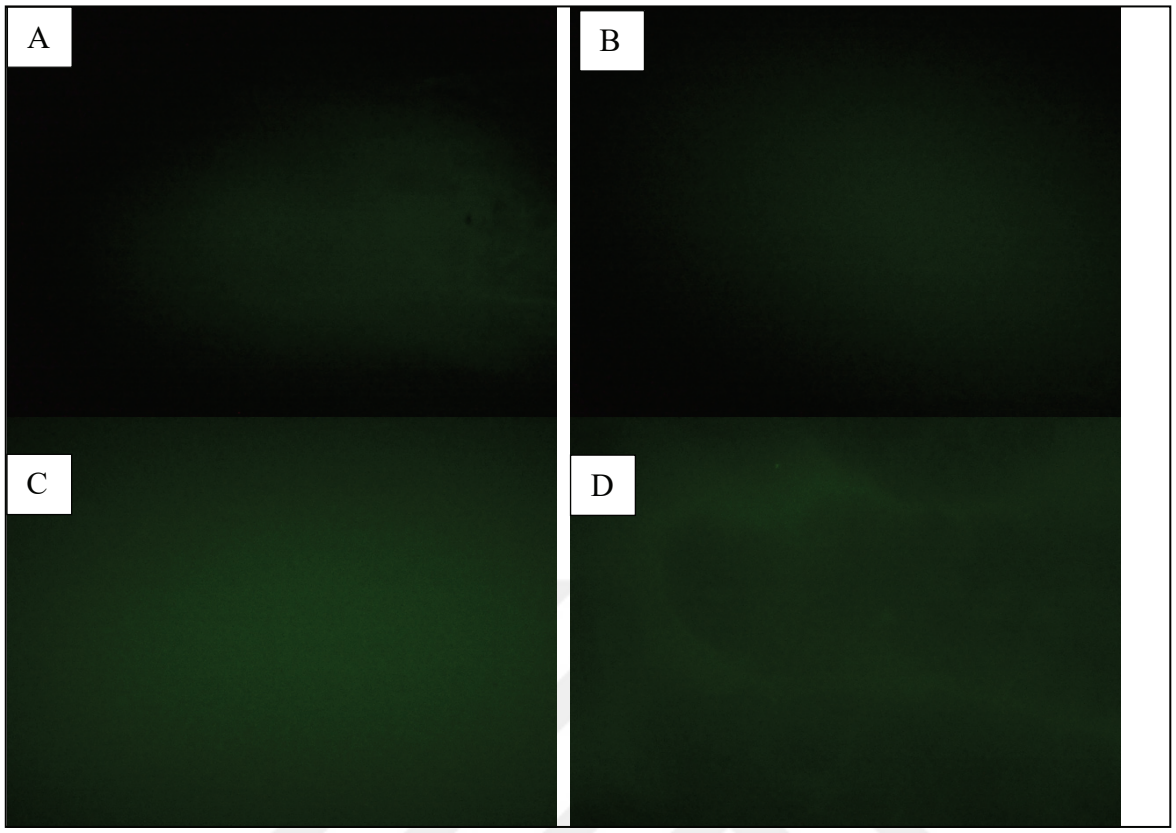
Resim 4.17. FI-NP/NF uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



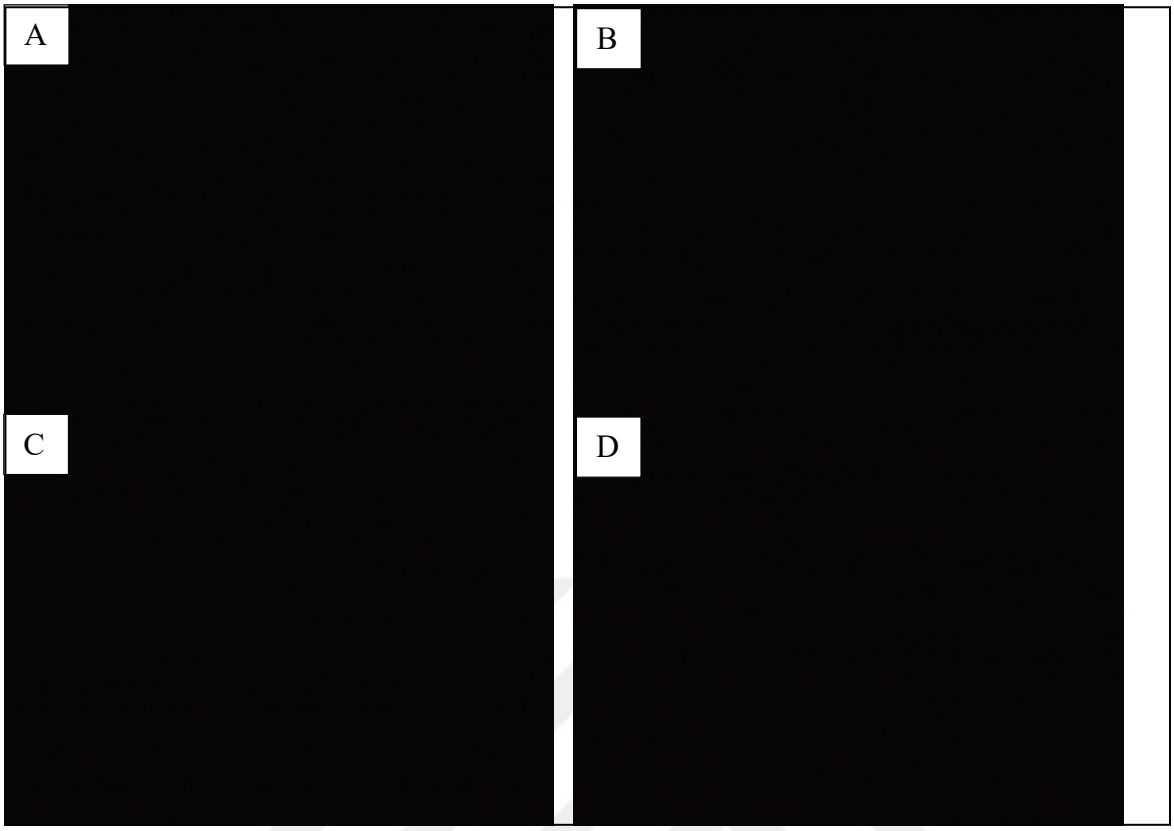
Resim 4.18. FI-NP/NF'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



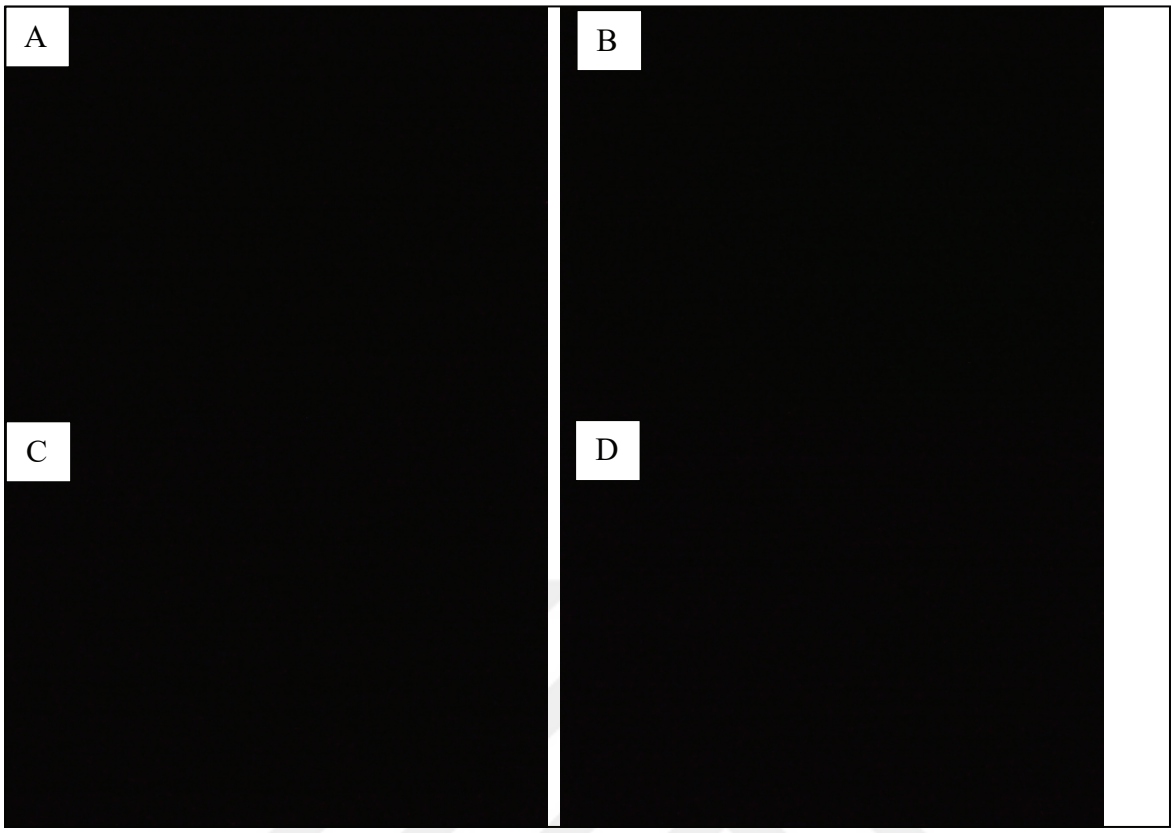
Resim 4.19. Oral FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



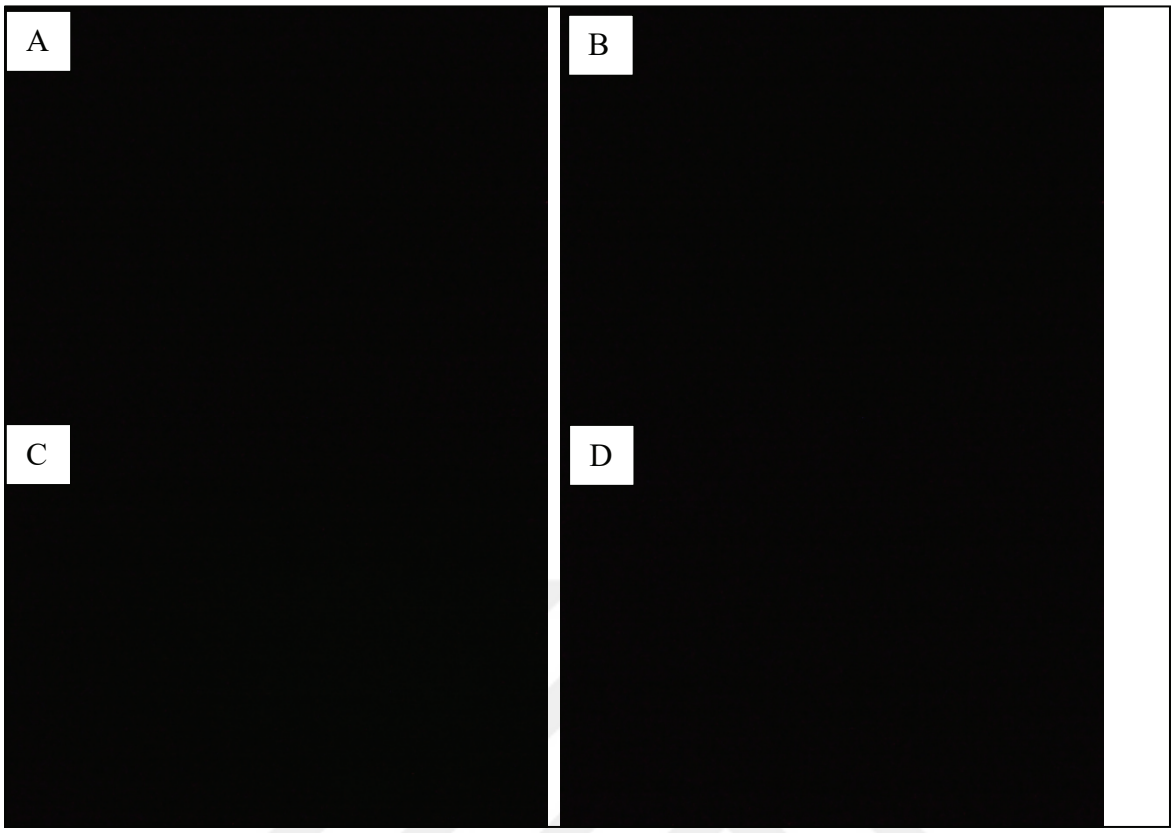
Resim 4.20. Oral FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



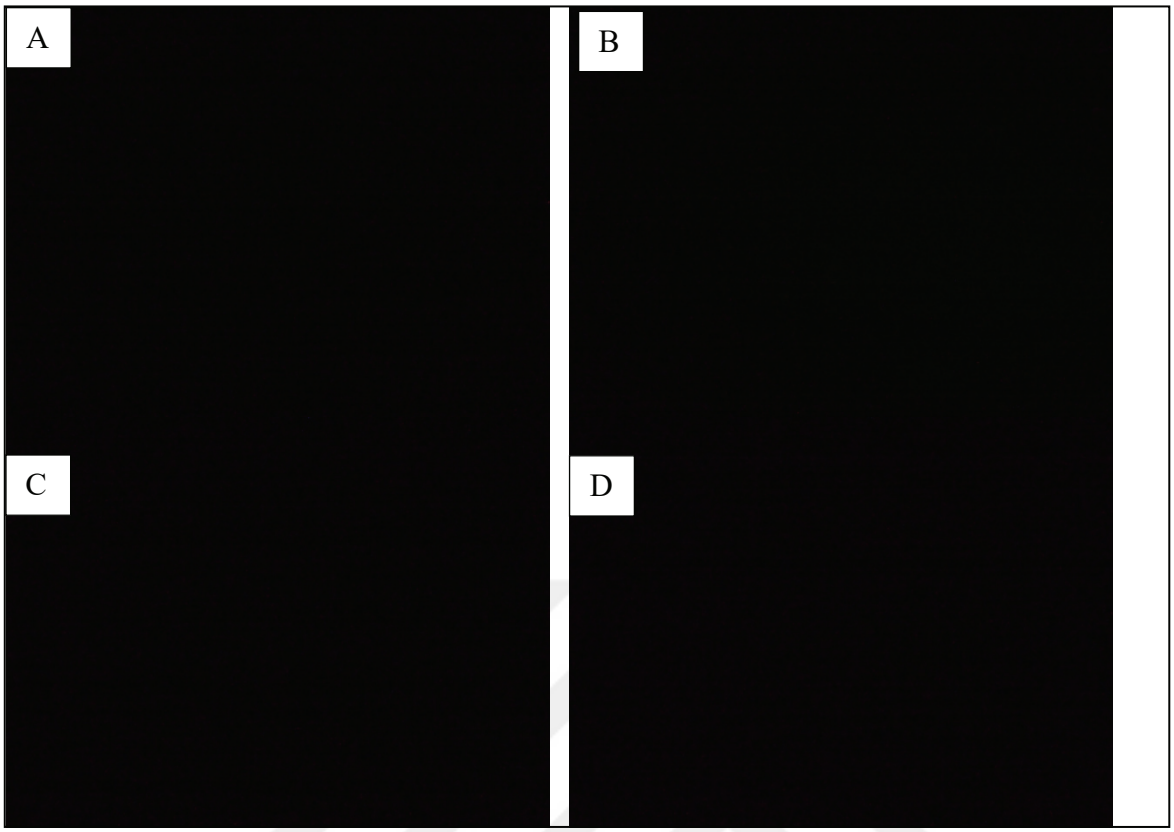
Resim 4.21. SC FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



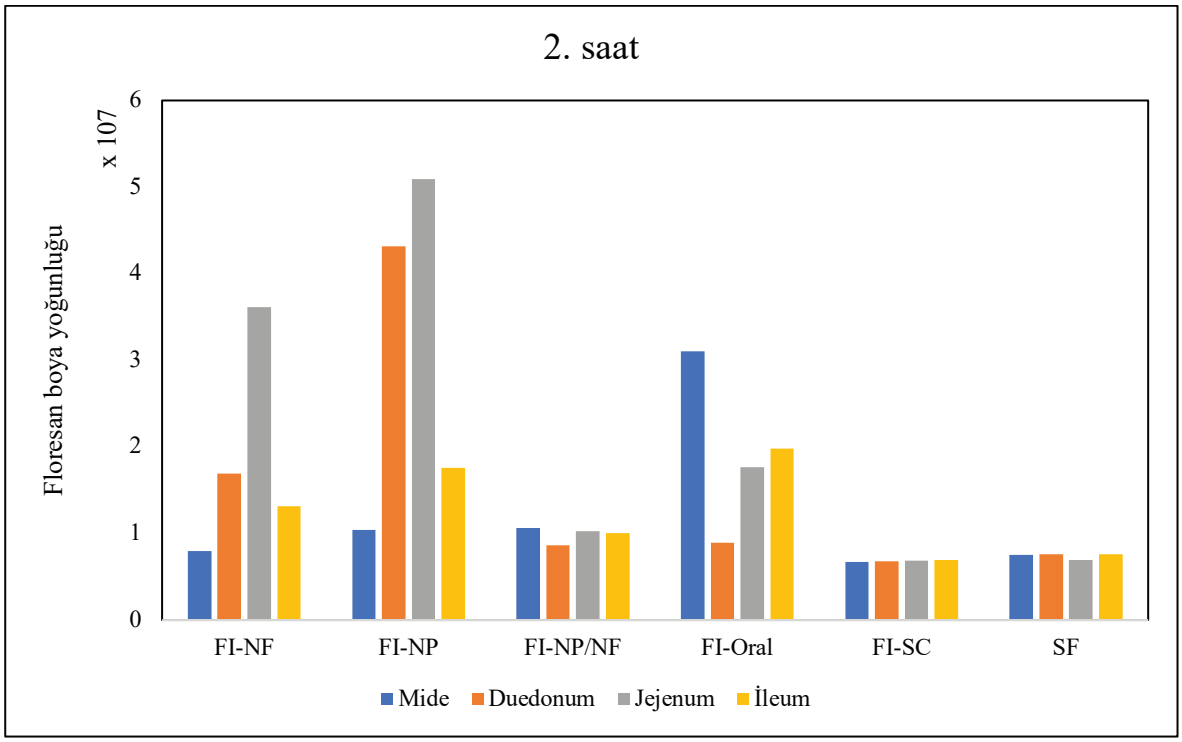
Resim 4.22. SC FI çözeltisi'nin uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



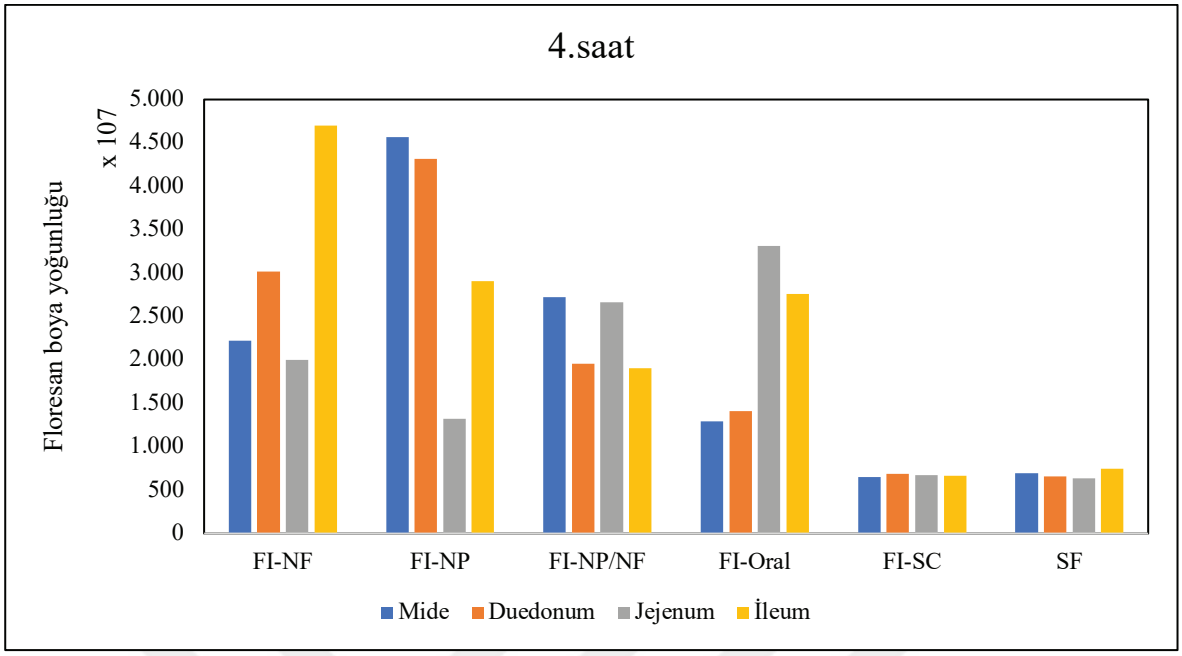
Resim 4.23. Oral SF'nin uygulandığı tavşanlardan 2. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



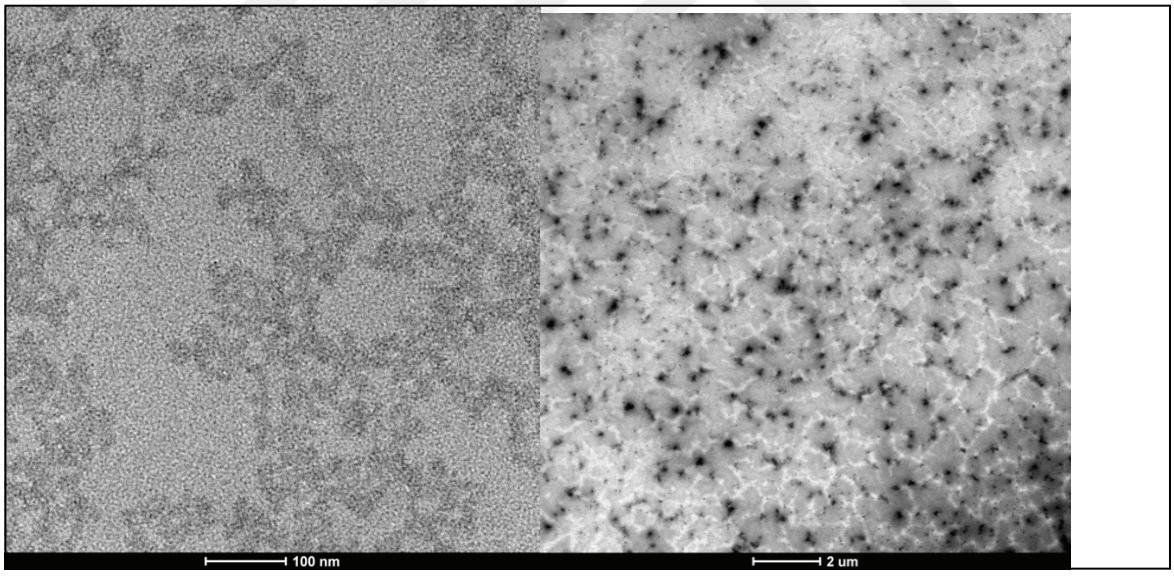
Resim 4.24. Oral SF uygulandığı tavşanlardan 4. saat sonunda alınan dokuların floresan mikroskop görüntüleri (A: mide, B: duedonum, C: jejenum, D: ileum)



Şekil 4.29. Floresan madde yüklü formülasyonların tavşanlara oral yoldan uygulanmasından 2 saat sonra ince barsaklardan alınan görüntülerden hesaplanan floresan boya yoğunlukları



Şekil 4.30. Floresan madde yüklü formülasyonların tavşanlara oral yoldan uygulanmasından 4 saat sonra ince barsaklardan alınan görüntülerden hesaplanan floresan boya yoğunlukları



Resim 4.25. FI-NP formülasyonununTEM incelemesi sonucu alınan görüntüleri

5. TARTIŞMA

Tezin amacı doğrultusunda, enoksaparin yüklü nanosistemler hazırlanmıştır. Nanolifler elektro-çekim yöntemiyle elde edilmiş, optimum formülasyon ve işlem parametreleri belirlenmiştir. NF ve NP/NF olmak üzere iki sonuç lif formülasyonu belirlenmiştir. NP/NF (nanopartikül yüklü nanolif) hazırlanmadan önce enoksaparin yüklü nanopartiküllerin hazırlanması (NP) ile ilgili çalışmalar yapılarak optimum formülasyon içeriği ve formülasyon parametreleri belirlenmiştir. Sonuç formülasyonlar üzerinde in vitro karakterizasyon, hücre kültürü ve in vivo çalışmalar yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

5.1. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

5.1.1. Diferansiyel taramalı kolorimetre (DSC) ölçümleri

Formülasyonlarda kullanılan etkin madde ve polimerler arasında herhangi bir geçimsizlik ya da etkileşim olup olmadığının belirlenmesi ve maddelerin termal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DSC çalışmaları yapılmıştır. Etkin madde ve polimerlerin tek başına ve fiziksel karışımlarının termogramları karşılaştırılmıştır.

Etkin maddenin DSC termogramı incelendiğinde literatür ile uyumlu olarak 258°C'de ekzotermik pik görülmüştür (Bkz. Şekil 4.1) (Nallaguntla ve diğerleri, 2016). Etkin maddenin formülasyonlarda kullanılan polimerlerle 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarından elde edilen DSC termogram piklerinde değişim gözlenmemiştir. Fiziksel karışımların termogramları sonucunda 250-300°C arasında yayılan bir erime piki görülmüştür. Bu da enoksaparinden kaynaklanmaktadır. Etkin madde ve polimerler arasında sonuç formülasyonu etkileyen bir etkileşim saptanmamıştır (Bkz. Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Ayrıca hazırlanan sonuç lif formülasyonlarında etkin maddeye ve polimerlere ait piklerin görülmemesi gerek polimerlerin gerekse etkin maddenin elektroçekim işlemi sırasında amorf forma dönüştüğü şeklinde yorumlanmıştır (Bkz Şekil 4.4).

Literatürde liflerle yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar görülmektedir. İndometazin yüklü nanoliflerin hazırlandığı bir çalışmada Eudragit RS 100 ve Eudragit S 100 kullanılmış ve formülasyonların DSC termogramlarında etkin maddeye ait spesifik erime pikine

rastlanmamıştır. Liflerden alınan piklerin polimerin erimesinden kaynaklandığı ve etkin maddenin amorf yapıya dönüşmesinden dolayı pikin görülmediği yorumu yapılmıştır (Akhgari ve diğerleri, 2013). Başka bir çalışmada ise, diklofenak sodyumun Eudragit L 100-55 ile lifleri hazırlanmış, liflerin DSC termogramları incelendiğinde etkin maddeye ve polimere ait piklerin kaybolduğu ve etkin maddenin amorf yapıya dönüştüğü belirtilmiştir (Shen ve diğerleri, 2011). Bu çalışmalarla benzer sonuçların alındığı başka bir çalışmada ise ketoprofene ait erime pikleri Eudragit ile hazırlanan nanoliflerin termogramlarında görülmemiştir (Reda, Wen ve El-Kamel, 2017).

5.1.2. FT-IR ölçümleri

Nanoliflerin yapısına giren polimerlerin ve enoksaparinin FT-IR spektrumları Şekil 4.5-4.7'de gösterilmektedir. Bu spektrumlar incelendiğinde,

✓ Enoksaparine ait spesifik pikler:
1218,65 cm^{-1}'de S=O gerilimi bantı,
2948,94 cm^{-1}'de C-H gerilim bantı
1608 cm^{-1}'de amid I, karbonil
1417 cm^{-1}'de amid II bantları literatürle uyumlu bulunmuştur (Lavanya ve diğerleri, 2017; Eleraky, Swarnakar, Mohamed, Attia ve Pauletti, 2020).

✓ Eudragit S100'ün
2952,8 cm^{-1}'de C- H arasında bulunan gerilme tipi,
1725,52 cm^{-1}'de C=O (karboksilik asit) gerilme tipi (metakrilik asit türevi bir polimer olduğu için)
1437,80 cm^{-1}'de O-H bağından ve 1149,45 cm^{-1}'de C-O piki bağından kaynaklıdır (Akhgari ve diğerleri, 2013; Mehta, Chawla, Sharma ve Pawar, 2013)

✓ Kollidon K90'a ait;
2949,92 cm^{-1}'de C-H gerilimi,
1655,64 cm^{-1}'de C=O gerilimi
1421,73 cm^{-1}'de CH_2 ye ait C-H gerilmi
1270,72 cm^{-1}'de C-N gerilim bantı görülmüştür (Asawahame ve diğerleri, 2015)

✓ Glikol kitozanda ise
3358,89 cm^{-1}'de O-H gerilimi
2871,90 cm^{-1}'de C-H bağı
1559,89 cm^{-1}'de C=O gerilimi
1456,90 cm^{-1}'de C-H gerilim bantı görülmüştür (A. Mansur ve H. Mansur, 2015)

✓ DMA kitozana ait
3358,92 cm^{-1}'de O-H gerilimi
2870,93 cm^{-1}'de C-H gerilimi
1652,92 cm^{-1}'de NH_2 salınımı (Reinas, Hoscheid, Outuki ve Cardoso, 2014).

NF ve NP/NF formülasyonunda FTIR analizleri sonucunda 2950 cm^{-1}'de ve 1700 cm^{-1}'de Eudragit'e ait spesifik olan 2950 cm-1'de ve 1700 cm-1'de O-H ve C=O gerilim bantları görülmektedir. Bunun sebebi analiz için alınan kesitte en yüksek oranda Eudragit bulunmasıdır (alt ve üst tabakada bulunduğu için). Enoksaparine ait olan 1217 cm^{-1} ve 1400 cm^{-1}'de sırasıyla S=O ve amid II gerilim bantları nanolif formülasyonlarına ait spekturumlarda görülmektedir. Bu da etkin maddenin nanoliflerin yapısına girdiğini göstermektedir.

Daha önce yapılan bir nanolif çalışmasında da etkin maddeye ait spesifik piklerin, nanolifin spektrumunda görülmesi, etkin maddenin lif yapısına girdiğinin göstergesi olarak yorumlanmıştır (Khoshbakht, Ashgari Sana, Fathi-Azarbayjani ve Sharifi, 2020). Benzer sonuçların alındığı başka bir çalışmada ise kurkumin, polietilen oksit ve hidroksipropil selüloz içeren nanolifler hazırlanmış ve FT-IR çalışması sonucunda, nanoliflerin spektrumunda polimerlere ve etkin maddeye ait spesifik pikler görülmüştür (Rüzgar ve diğerleri, 2013).

5.1.3. Etkin maddenin miktar tayini için standart doğrunun hazırlanması

Enoksaparine ait standart doğrunun ve kalibrasyon denkleminin belirlenmesinde metakromatik analiz yapılmıştır. Bu analizin temel prensibi kullanılan renkli madde ile etkin maddenin kompleks oluşturması ve etkin maddenin miktarının artışına bağlı olarak boyanın UV absorbansının azalmasıdır. Toluidin mavisinin UV spektrumu literatür ile uyumlu bulunmuştur (Smith ve diğerleri, 1980). Boyanın maksimum absorbans verdiği dalga boyu

631 nm'dir (Bkz. Şekil 4.8). Boya çözeltisine enoksaparin ilavesi boyanın absorbansını düşürmektedir (Bkz. Şekil 4.9). Bu yönteme göre enoksaparin konsantrasyonu artacak şekilde boya ile karıştırılarak bir metod oluşturulmuş ve absorbansları alınmıştır (Macintosh, 1941). Bu doğrultuda miktarın artışına bağlı olarak absorbans belirli düzeyde azaldığı için kalibrasyon denklemi belirlenebilmiştir. Analitik yöntem validasyonları da tamamlanarak yöntemin geçerliliği ispat edilmiştir. Ayrıca toluidin mavisi ile yapılan tayin yönteminin seçiciliğini kanıtlamak için formülasyonlarda yer alan maddelerin boyanın maksimum dalga boyunu değiştirmediği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.11). Piklerde kayma ve absorbans değerlerinde değişim gözlenmemiştir. Toluidin mavisi ile yardımcı maddeler etkileşmemektedir.

Enoksaparinin miktar tayinin yapılması için farklı boyalar da kullanılmaktadır. Azure II (Hallan ve diğerleri, 2017; Jiao ve diğerleri, 2002), Azure A (Trapani ve diğerleri, 2013), toluidin mavisi (Iskenderoğlu ve diğerleri., 2013) en yaygın kullanılan boyalardır. Bütün boyaların etki mekanizması benzerdir. Metotlar, heparin ve boyanın oluşturduğu kompleksin boyanın absorbansının düşürmesi prensibine dayanmaktadır. Daha önce bölümümüzde yapılan bir tez çalışmasında (İskenderoğlu, 2007) toluidin mavisi kullanılması hem de tayin yöntemiyle ilgili literatür ve bilgi alt yapısını elde ettiğimiz için tez çalışması için bu yöntem seçilmiştir.

5.2. Nanosistemlerin Hazırlanması

5.2.1. Nanoliflerin hazırlanması

Nanoliflerin hazırlanmasında sonuç formülasyona ulaşmak için yapılan çalışmalar, ko-aksiyel nanolifler ve tabakalı lifler iki ayrı başlık altında incelenmiştir.

Ko-aksiyel nanolif hazırlama çalışmaları: Enoksaparin yüklü nanolifleri hazırlayabilmek ve mide pH'sından koruyabilmek için başlangıçta çekirdek-kabuk yapılı liflerin hazırlanması planlanmıştı. Ancak etkin madde çözeltisi (çekirdek) ve polimer çözeltisinin (kabuk) reolojik özelliklerinin ve buharlaşma noktalarının farklı olmasından dolayı ko-aksiyel elektro-çekim işlemi sırasında sorunlarla karşılaşılmıştır. Etkin maddenin yüksek oranda suda çözünmesi ve kullanılan kabuk polimerin de su gibi hidrofilik çözücülerde çözünmemesinden dolayı, cihazın ko-aksiyel başlık ucunda tıkanmalar meydana gelerek jet

oluşmasının aksamasına neden olmuştur. Ayrıca kabuk çözücüsü olarak yüksek oranda etil alkol kullanılmıştır (polimerin çözünmesi için). Çekirdek çözeltisinde ise etkin maddenin çözünebilmesi için su bulunmaktadır. Bu durumda farklı uçuculuğa sahip çözeltiler oluşmuştur. Elektro-çekim işleminde voltajın artmasıyla lifler oluşurken çözücü buharlaşmaktadır. Farklı çözeltilerin buharlaşma hızları farklı olduğu için lif yapısının bozulmasına neden olmuştur.

Bütün bunlar da işlem süresini kısaltarak etkin maddenin yükleme miktarını düşürmüştür. Bu sebeple tabakalı liflerin hazırlanması yöntemi denenmiştir.

Tabakalı liflerin hazırlanması ile ilgili çalışmalar

Elektro-çekim işleminde etil alkol sıklıkla kullanılmaktadır. Yüzey geriliminin düşük olması ve pek çok polimeri çözmesi nedeniyle tercih edilir. Ancak buharlaşma noktası 78ºC olduğu için bazı çalışmalarda hızlı buharlaşmasından dolayı farklı çözücülerle karışım halinde kullanılmıştır (Yang ve diğerleri, 2004). Bizim çalışmalarımızda hem ko-aksiyel liflerin hazırlanması için yapılan formülasyon çalışmalarında hem de literatür taramalarımız sonucunda enterik polimerin çözücüsü olarak DMF ile (buharlaşma noktası 138ºC) karışımı kullanılmıştır. Buharlaşma noktası yüksek ve düşük çözücülerin lif çekimi için kullanılması yaygın bir yaklaşımdır.

Dimetil asetamid (DMAc) ve etil alkol/metanolün birlikte kullanıldığı bir çalışmada Eudragit L100-55 ile kabuk çözeltisi hazırlanmış ve diklofenak sodyumun kolona hedeflendirilmesi amaçlanmıştır (Shen ve diğerleri, 2011). Eudragit E 100 nanoliflerin hazırlandığı bir başka çalışmada çözücü olarak etil alkol:DMF karışımı kullanılmıştır (Li, Yang, Wang ve Yu, 2017). Eudragit L 100 kullanılarak ko-aksiyel nanoliflerin hazırlandığı bir çalışmada ise etil alkol: DMAc 7:3 oranı seçilerek çekirdek-kabuk yapılı nanolifler hazırlanmıştır (Han ve Steckl, 2017). Aynı polimerin kullanıldığı bir diğer çalışmada ise 9:1 oranında etil alkol: DMAc kullanılmıştır (Yu ve diğerleri, 2013).

Tabakalı liflerin alt ve üst tabakasını oluşturan Eudragit S100 için çözücü seçiminde de etil alkol:DMF ile farklı oranlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Hem çözeltinin iletkenliğinin yükselmesi hem de lif yapısının uygunluğu açısından 6:4 etil alkol:DMF oranı belirlenmiştir.

NF formülasyonunda ara tabaka çözeltisi için en uygun çözücü olarak su:etil alkol karışımı kullanılmıştır. Enoksaparin suda çözünmektedir, ancak suyun yüzey geriliminin ve buharlaşma noktasının yüksek olmasından dolayı elektro-çekim işlemi kesintiye uğramaktadır. Bu sebeple yardımcı çözücü olarak etil alkol kullanılmıştır. Etil alkol:su oranının belirlenmesinde ise enoksaparinin çökmeden homojen çözündüğü konsantrasyon göz önüne alınmıştır. Enoksaparin, 40º alkolde maksimum %8 konsantrasyonda çözünmektedir (Balestrino ve diğerleri, 2016).

Ara tabaka çözeltisinden lif elde edebilmek için polimerik özellikte bir madde de gerekmektedir. Bu amaçla su: etil alkol karışımında çözünen ve daha önce denediğimiz polimerlerden olan polivinil pirolidon türevi Kollidon K90 (PVP K 90) kullanılmıştır. Bu polimer hem molekül ağırlığının yüksek oluşu hem de daha önce yapılan nanolif çalışmalarında lif yapısının beklenen özelliklerde olmasından dolayı tercih edilmiştir. Daha önce yapılmış bir çalışmada da PVP K 90'ın farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış, viskozite, iletkenlik, yüzey gerilimi gibi elektro-çekim için önemli parametreleri ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonda hazırlanan polimer çözeltilerinin lif yapıları karşılaştırılmıştır. Ayrıca çözücü olarak su: etil alkol karışımı kullanılmıştır. Çözücü karışımında su miktarının artışı lif yapısını bozduğu ve polimer konsantrasyonunun artışının lif kalınlığını arttırdığı gösterilmiştir (Asawahame ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada da su: etil alkol karışımı çözücü olarak kullanılarak %13-17 konsantrasyonda PVP K 90, elektro-çekim işlemi için kullanılmıştır. Polimer konsantrasyonunun artışı lif çapını arttırmıştır (Sipos ve diğerleri, 2019).

Bizim çalışmalarımızda NF formülasyonunun ara tabaka lifini hazırlamak için, 40º alkolde çözünen Kollidon K90 konsantrasyonu da %4 olarak belirlenmiştir.

Enoksaparinin anyonik özellikte olması ince barsaklardan emilimini engelleyen faktörlerden biridir. Bu amaçla formülasyonların katyonik hale getirilmesi planlanmıştır. Ara tabaka çözeltisinde lif formülasyonunun katyonik özellik kazanması için hem suda çözünebilen hem de biyouyumlu olan katyonik bir polimer olan glikol kitozan kullanılmıştır. Ara tabaka çözeltisine ilave edilecek glikol kitozan miktarı yapılan zeta potansiyeli ölçümleri ile belirlenmiştir. Ara tabaka için kullanılacak çözeltiye farklı konsantrasyonlarda (%0,25, %0,5, %1) glikol kitozan ilave edilerek zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçümünün partiküler sistemler için geçerli olduğu bilinmekle birlikte ortamın katyonik

özellik kazanıp kazanmadığının değerlendirilebilmesi açısından bu ölçümler gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümlere göre, %0,25 glikol kitozan sonuç formülasyonun ara tabakasında kullanılmak üzere belirlenmiştir. Kitozan konsantrasyonunun artışının lif yapısını etkilediği literatürde gösterilmiştir. Bu sebeple, çözeltiyi katyonik hale getiren en düşük konsantrasyon seçilmiştir. Farklı nanolif çalışmalarında da kitozan ve türevleri polimer olarak kullanılmıştır (Martinova ve Lubasova, 2008; Elsabee, Naguib ve Morsi, 2012; Lemma, Bossard ve Rinaudo, 2016).

Viskozite ölçümleri

Kullanılan çözeltinin viskozite ölçümü elektro-çekim işlemi için önemli bir kriterdir. Viskozitesi düşük olan polimer çözeltilerinde akışın düzenli olmaması nedeniyle lif yapısı ıslanabilirken, viskozitenin aşırı yüksek olması nanoliflerin çapının artmasına neden olmaktadır. Elektro-çekim işleminde kullanılan çözeltilerin viskozitelerinin belli bir değerde olması gerekmektedir (Haider ve diğerleri, 2018; Okutan, Terzi ve Altay, 2014).

Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan çözeltilerin viskozite ölçüm sonuçları Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Enoksaparinin suda çözünmesi nedeniyle birlikte kullanılacak polimer seçimi sınırlı olmuştur ve yapılan ilk çalışmalarda düşük molekül ağırlıklı polimerlerle çalışmalara başlanmıştır. Ko-aksiyel elektro-çekim işleminde kullanılan çekirdek karışımları arasında enoksaparin ve düşük molekül ağırlıklı polivinil pirolidon türevi olan Kollidon K 30 ile hazırlanan çözeltilerin viskozitesi düşük bulunmuştur ve lif çekimini zorlaştırmıştır. Bu sebeple daha sonraki çalışmalarda, tabakalı liflerin hazırlanmasında ara tabakanın lif çekimi için kullanılacak olan çözeltide, yüksek molekül ağırlıklı Kollidon türevlerinden olan Kollidon K90 kullanılmıştır.

Ko-aksiyel lif çalışmalarında, çekirdek çözeltisinin viskozitesinin kabuk çözeltisinden çok düşük olması da elektro-çekim işleminin duraksama nedenlerinden biridir. Ko-aksiyel elektro çekim yönteminde kullanılan çekirdek ve kabuk çözeltilerinin viskoziteleri arasındaki fark önemlidir. Kabuk çözeltisinin viskozitesinin daha yüksek olması gerekmektedir (Lu ve diğerleri, 2016; Moghe ve Gupta, 2008).

Devamlı ve düzgün yapılı lifler çok düşük viskozitede oluşmamaktadır. Ayrıca çok yüksek viskozite de çözeltinin akışını zorlaştırmaktadır. Polimer çözeltisinin uygun viskoziteye sahip olması çözeltideki polimer miktarıyla ilgilidir (Akhgari ve diğerleri, 2017).

Tabakalı liflerin hazırlanmasında ise ara tabaka, alt ve üst tabaka lifleri ayrı olarak çekildiği için çözeltilerin viskozitelerinin birbirine göre düşük ya da yüksek olması lif çekiminde sorun yaratmamıştır. Tabakalı liflerin hazırlanmasında kullanılan çözeltilerin viskoziteleri lif çekimi için uygun bulunmuştur. Viskozitenin optimum değeri, elektro-çekim işleminde kullanılan polimer ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Literatürde, 20 poise'nin üzerinde viskoziteye sahip çözeltilerde elektro-çekimin zorlaştığı ve 20 poisenin altında (yüzey gerilimi de 35-55 mN/m arasında olmak şartıyla) lif çekiminin gerçekleştiği görülmektedir (Amariei, Manea, A. P. Bertea, A. Bertea ve Popa, 2017)

İletkenlik ölçümleri

Çözeltinin iletkenliği Taylor konisinin ve lif yapısının oluşumunu etkiler. Düşük iletkenliğe sahip polimer çözeltisi ile elektro-çekim işlemi gerçekleşmezken, iletkenliğin artması damla üzerindeki yükün artmasına neden olarak düzgün yapılı liflerin oluşmasını sağlar (Pelipenko ve diğerleri, 2013). Bazı çalışmalarda ise iletkenlik artışının nanolifin çapının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Medeiros, Mattoso, Offeman, Wood ve Orts, 2008).

Nanoliflerin kabuk kısmını oluşturan Eudragit S100 polimerinin çözücüsünü belirlemek için de iletkenlik ölçümleri yapılmıştır (Çizelge 4.6). Çözücü olarak kullanılan etil alkol: DMF karışımındaki DMF miktarının belirlenmesi için iletkenlik ölçümleri yapılmıştır. Çözücüye DMF eklenmesi çözücünün buharlaşma noktasını yükselttiği için tercih edilmiş, ancak DMF miktarının artışına bağlı olarak lif yapısının inceldiği ve iletkenliğin yükseldiği görülmüştür. Çözücünün uygun oranının seçilmesi amacıyla, farklı oranlarda (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 etil alkol: DMF) karışımlar hazırlanmış, lif yapıları ve iletkenlik değerleri incelenmiştir. En yüksek iletkenlik değerine ve uygun lif yapısına 6:4 oranında ulaşılmıştır. Daha önce yapılan lif çalışmaları incelendiğinde, etil alkolün elektro-çekim işleminde sıklıkla kullanılmasına rağmen, daha çok yardımcı çözücülerle (DMF, DMAc, Hekzafluoro-isoproponal gibi buharlaşma noktası yüksek çözücülerle) karışım halinde kullanıldığı görülmektedir. Bu durumun birkaç avantajı vardır. Etil alkolün hızlı buharlaşması elektro-çekim cihazının başlığının ucunda tıkanıklık olmasına neden olabilmektedir. Buharlaşmanın geç olması ise

nanolifin ıslanmasına neden olur bu yüzden buharlaşma noktaları yüksek ve düşük olan çözücüler karışım halinde kullanılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada Eudragit S100'ün, %10 ve %13 konsantrasyonda, etil alkol:DMF karışımında 8:2 oranında karışımı hazırlanarak etkin maddenin kolona hedeflendirilmesi için lifleri hazırlanmıştır. (Illangakoon ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada da yine %13,5 Eudragit S100 etil alkol:DMAc karışımında 2:8 oranında hazırlanarak lif çekimi yapılmıştır (Jia ve diğerleri, 2017).

Hazırlanan sonuç lif formülasyonlarının her ikisinin de ara tabakasında su bulunduğu için iletkenlik değerleri yüksek bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.5). Bu, liflerin düzgün çekilmesinde rol oynamıştır.

Elektro-çekim işleminin gerçekleşmesi için polimer çözeltisinin iletkenliğinin olması gerekmektedir (Amariei ve diğerleri, 2017). Lif çalışmalarına kullanılan bütün çözeltilerin iletkenlikleri lif çekimi için uygun bulunmuştur.

Yüzey gerilimi ölçümleri

Lif oluşumu için polimer çözeltisinin yüzey geriliminin çok yüksek olmaması beklenmektedir. Uygulanan elektriksel alan, kullanılan çözeltinin yüzey gerilimini baskılayacak değere kadar yükseldiğinde, yani kritik voltaj seviyesine ulaştığında lif çekimi gerçekleşir. Kritik voltajda, başlık ucunda küresel şekilde oluşan damla Taylor konisi şeklini alır. Eğer yüzey gerilimi çok yüksek bir çözücü kullanılırsa yeterli voltajın sağlanması zorlaşır ve lif çekimi gerçekleşmez (Zuo ve diğerleri, 2005). Su ile hazırlanan çözeltilerin yüzey gerilimlerinin yüksek olması elektro-çekim işlemlerindeki en büyük sorun olarak karşımıza çıkmıştır. Ko-aksiyel lif çalışmalarında çekirdek karışımında çözücü olarak su, kabuk karışımı etil alkol içermekteydi. Bu sebebeple bu iki karışımın yüzey gerilimleri arasındaki fark yüksek olduğu için ortak bir voltaj değeri ayarlanıp sürekli bir lif çekimi yapılamamıştır.

Tabakalı lif çalışmalarında ise, etkin maddenin su içeren bir çözücüde, kabuk polimer tabakasının ise hidrofobik bir çözücüde hazırlanmasının elektro-çekim işlemini etkilemediği görülmüştür. Bunun nedeni her tabaka için lif çekiminin ayrı bir elektro-çekim işlemi ile

gerçekleşmesidir. Ayrıca enoksaparin içeren ara tabakada çözücü olarak etil alkol:su karışımı kullanılması yüzey gerilimini düşürmüş, lif oluşturmak için gerekli olan voltaj değeri azalmış ve lif çekiminin kesintisiz olmasını sağlamıştır. Literatürde elektro-çekim işlemi için yüzey geriliminin önemi vurgulanmış, yüzey geriliminin çok yüksek veya çok düşük olması durumunda lif çekiminin zorlaşacağı belirtilmiştir. Ayrıca kullanılan polimer ve çözücü özellikleri çekim işlemi için yeterli olan yüzey gerilim değerini değiştirdiği için kullanılan çözelti ve elektro-çekim işlemi için optimum yüzey gerilimi değeri bulunmalıdır. Kaynaklarda elektro çekim işleminde kullanılan çözeltilerin yüzey gerilimi değerlerinin 20-45 mN/m (20ºC) arasında değiştiği görülmektedir (Williams, Raimi-Abraham ve Ruo, 2018).

5.2.2. Nanopartiküllerin hazırlanması

Nanopartiküllerin hazırlanmasında iyonik jelasyon yöntemi kullanılarak çapraz bağlayıcıya gerek duyulmadan enoksaparin ve düşük molekül ağırlıklı kitozan (DMA) arasında kendiliğinden jelleşme ile nanopartiküller elde edilmiştir. Bu yöntemde kitozan ve enoksaparin a/a oranı ve kitozan konsantrasyonu gibi önemli parametreler optimize edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.7- 4.11).

Heparin ve türevleri ile kitozan kullanılarak nanopartiküllerin hazırlandığı çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalarda kitozan ve etkin madde konsantrasyonu, kitozan/heparin (a/a) oranları ve işlem parametreleri optimize edilmiştir. Heparinin ülser tedavisinde kullanılmasına yönelik yapılan bir çalışmadan heparin-kitozan nanopartikülleri iyonik jelasyon yöntemiyle hazırlanmış ve en düşük partikül çapı ve PDI değerine kitozan/heparin oranı 3:1 olduğunda ulaşılmıştır. Kitozanın heparine göre ağırlıkça oranının artışı partikül çapını arttırmıştır (Lin ve diğerleri, 2009). Başka bir çalışmada ise kitozan konsantrasyonunun heparin nanopartiküllerinin çapı üzerine olan etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmada kitozan konsantrasyonu %0,1'den %1' e çıkarıldığında nanopartiküllerin çapının arttığı gözlenmiştir. Zeta potansiyel bu değişimden cok etkilenmemiştir (Liu ve diğerleri, 2007). Bizim çalışmalarımızda da kitozan konsantrasyonu arttıkça partiküllerin çapı artmıştır. Ayrıca kitozanın heparine göre ağırlık oranı arttıkça da partikül çapının arttığı görülmüştür. İyonik jelasyon işlem parametrelerinin optimize edildiği başka bir çalışmada ise, karıştırma hızı ve heparin çözeltisinin kitozan çözeltisine ilave edilme hızları değiştirilerek nanopartiküllerin yapısı incelenmiştir. Karıştırma hızı belirli bir değere kadar

arttıkça nanopartiküllerin çapı azalmıştır (500 rpm'den 2000 rpme kadar), ancak hızın daha da artması nanopartikül çapını etkilememiştir. Heparin çözeltisinin ilave edilme hızı nanopartiküllerin çapını önemli derecede etkilememiştir (Shahbazi ve Hamidi, 2013). Bizim çalışmalarımızda ise karıştırma hızı nanopartiküllerin çapını etkilemezken, heparin çözeltisinin ilave edilme hızı nanopartikül çapını değiştirmiştir. Heparin çözeltisinin kitozan çözeltisine birden ilave edilmesi nanopartiküllerin çapını arttırdığı için, 30 sn boyunca eklenmesi (50 ml kitozan çözeltisi için) uygun bulunarak 1000 rpm karıştırma hızında nanopartiküller hazırlanmıştır (Bkz. Çizelge 4.9)

5.3. Nanosistemlerin Karakterizasyon Çalışmaları

5.3.1. Nanoliflerin karakterizasyon çalışmaları

Yüzey morfolojisi, nanoliflerin lif çapı ve lif çapı dağılımının incelenmesi

Sonuç nanolif formülasyonlarının (NF ve NP/NF) SEM analizleri sonucunda düzgün, homojen ve pürüzsüz yapıda oldukları gözlenmiştir (Bkz Resim 4.1-4.4).

Alınan görüntülerden 100 tane nanolifin çap ölçümü ile ortalama lif çapları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.13). NF formülasyonunda tabakaların lif çapı 310-485 nm arasında, NP/NF'de 350-480 nm arasında bulunmuştur. Bütün tabakaların lif çapının nanometre boyutunda bulunması oral veriliş için uygun olduğunu göstermiştir. Nanoliflerin oral ilaç verilişi için kullanıldığı bir çalışmada, diklofenak sodyum içeren Eudragit nanolifleri hazırlanmış ve nanoliflerin çapları 362-445 nm arasına bulunmuştur (Shen ve diğerleri, 2011). Başka bir çalışmada ise çapları 160- 275 nm arasında olan nanolifler meloksikamın oral verilişi için hazırlanmıştır (Samprasit ve diğerleri, 2015).

NP/NF formülasyonunun ara tabakasının lif çapı, NF formülasyonundan büyük bulunmuştur. Nanopartikül eklenmesinin lif çapını artırdığı gözlenmiştir. Wang ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada nanoliflere eklenen nanopartiküllerin lif çapını arttırdığını gözlemlemiş ve bu sonuç çalışmamızla uyumlu bulunmuştur (Wang ve diğerleri, 2011). Sridhar ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da nanoliflere altın nanopartikül yüklenmesinin lif çapını artırdığı gözlenmiştir (S. Sridhar, Venugopal, R.

Sridhar ve Ramakrishna, 2015). Lif çapındaki artışın, polimer çözeltisindeki elektron yük yoğunluğunun azalmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Nanoliflerin porozite, por çapı dağılımı, spesifik yüzey alanı ölçümleri

Nanoliflerin porozitesinin ve spesifik yüzey alanının yüksek olması beklenmektedir. Literatürde polimerik nanoliflerin porozitesinin genellikle %50-60 arasında olduğu görülmüştür (Malik ve diğerleri, 2015). Hazırlanan formülasyonlar oral veriliş için tasarlanmıştır. Oral verilişde % porozite değeri transdermal kullanılan liflerde olduğu kadar kritik bir parametre olmamasına rağmen, nanoliflere ait spesifik bir özellik olan poröz yapının oluştuğunu göstermek amacıyla ölçümler değerlendirilmiştir. NF ve NP/NF formülasyonlarında yakın porozite değerleri (%50 ve %53) bulunmuştur (Çizelge 4.14). Her iki lif formülasyonunun alt ve üst tabakaları aynı polimerden oluştuğu için sonuçlar yakın bulunmuştur. Hazırlanan nanoliflere ait porozite değerlerinin %50 ve daha yüksek bulunması, nanoliflerin porozite özelliklerin uygun olduğunu göstermektedir.

NF formülasyonunun spesifik yüzey alan değeri, NP/NF formülasyonundan yaklaşık üç katı yüksek bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.15). Normalde NP/NF formülasyonunun nanopartikül içermesi nedeniyle, spesifik yüzey alanının daha yüksek olması beklenmekteydi. Bu farkın sebebi nanoliflerin hazırlanmasında kullanılan ara tabakaların farklı olmasıdır. Literatürde de farklı polimerler ve farklı konsantrasyonları ile hazırlanan nanoliflerde spesifik yüzey alanlarının değiştiği gösterilmiştir (Sirc ve diğerleri, 2012). Ayrıca içeriklerin farklı olması işlem parametrelerini de etkilediği için nanoliflerin spesifik yüzey alanları değişebilmektedir. Omollo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da elektro-çekim çözeltisine farklı polimerlerin ilavesinin spesifik yüzey alanını beş kat arttırdığı belirlenmiştir (Omollo, Zhang, Mwasiagi ve Ncube, 2016).

Nanoliflerin temas açılarının ölçülmesi

Nanosistemlerin GIS sıvısıyla karşılaştığında daha geç sürede parçalanarak etkin maddenin salımını geciktirmesi açısından temas açıları önemlidir. NF ve NP/NF liflerinin temas açıları 90º'den yüksek ve yakın değerde bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.16). 90º'den yüksek olması yüzeyin hidrofobik özellikte olduğunu göstermektedir. Eudragit S100 polimeri her iki formülasyonun alt ve üst tabakasında yer alması ve hidrofobik olması nanoliflerin temas

açılarının yükselmesine neden olmuştur. Literatürde Eudragit türevleri ve farklı hidrofobik polimerler kullanılarak yapılan nanolif çalışmalarında temas açıları sonuçlarımızla paralel olarak 90º'den yüksek bulunmuştur.

Bir nanolif çalışmasında da Eudragit L-100 kullanıldığında liflerin temas açıları 100º-118º arasında değişmiştir. Hidrofobik polimerin konsantrasyonu arttıkça nanolifin temas açısı yükselmiştir. Ayrıca hidrofilik polimerlerin lif yapısına eklenmesinin nanoliflerin temas açısını düşürdüğü de gözlenmiştir (Giram, Shitole, Nande, Sharma ve Garnaik, 2018). Başka bir çalışmada hidrofobik poliüretan ile hazırlanan nanoliflerin temas açısıları 90º'nin üzerinde bulunmuştur (Unnithan, Gnanasekaran, Sathishkumar, Lee ve Kim, 2014).

Nanoliflerin mukoadhezyon özelliklerinin incelenmesi

Formülasyonların mukoadhezyon özellikleri incelendiğinde; NP/NF formülasyonunda mukozadhezyon işi, NF formülasyonundan yüksek bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.17). Bunun nedeni olarak, NP/NF formülasyonunda bulunan nanopartiküllerin yapısında biyoadhezif polimer olan kitozanın kullanılması olduğu düşünülmüştür. NF formülasyonunda ise ara tabakada glikol kitozan kullanılmıştır. Ancak, glikol kitozan konsantrasyonu %0,25 olduğu için, NP/NF formülasyonunda bulunan nanopartiküllerin yapısındaki kitozan miktarından düşüktür.

Kitozan, mukoadhezif sistemlerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Pérez-González, Villarreal-Gómez, Serrano-Medina, Torres-Martínez ve Cornejo-Bravo, 2019). Yapılan çalışmalarda da biyoadhezif polimerlerin lif hazırlanmasında kullanılmasıyla liflerin mukoadhezyon özelliklerinin arttığı görülmüştür. Bir araştırmada, progesteron yüklü nanolifler mukoadhezif polimer kullanılarak hazırlanmış ve hazırlanan formülasyonlarda polimer miktarının artışına bağlı olarak mukoadhezyonun arttığı görülmüştür (Brako ve diğerleri, 2018). Başka bir çalışmada ise, farklı kitozan tipleri kullanılarak nanolifler hazırlanmış ve mukoadhezyon özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Mukoadhezyonun fazla olmasının hidrofilik özellik ve ıslanmayla ilgisinin vurgulandığı bu çalışmada molekül ağırlığı yüksek olan kitozanların mukoadhezif özelliğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Mendes ve diğerleri, 2018).

5.3.2. Nanosistemlerde etkin madde yükleme etkinliği

Etkin madde yükleme etkinliğinin artması için elektro-çekim işleminin kesintisiz yürümesi gerekmektedir. Ko-aksiyel elektro-çekim yönteminde işlemin duraksaması ve başlık ucunun tıkanması nedeniyle lif çekim işlemi kesintiye uğramış ve etkin maddenin liflere yüklenmesi zorlaşmıştır. Tabakalı nanoliflerin hazırlanmasıyla elektro-çekim işlemi kesintisiz yürütülerek bu kaybın en aza indirilmesi sağlanmıştır.

Tabakalı liflerin hazırlanması için yapılan önformülasyon çalışmalarında nanoliflere yüklenen enoksaparin miktarını arttırmak için çeşitli değişiklikler yapılarak maksimum enoksaparin miktarına bu şekilde ulaşılmıştır. Sonuç lif formülasyonlarında lifin cm^2'sine düşen µg etkin madde miktarı hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 4.19). Daha önce yapılan bir çalışmada, glutamin nanolifler oral mukozit tedavisi için hazırlanmış ve farklı polimerler kullanılmıştır. Formülasyonlara yüklenen glutamin miktarı 452 $\mu g/cm^2$ bulunmuştur (Tort ve Acartürk, 2016). Aynı araştırmacıların yaptıkları başka bir çalışmada ise yara tedavisinde kullanılmak üzere doksisilin yüklü tabakalı nanolifler hazırlanmış ve etkin madde miktarı 260 $\mu g/cm^2$ olarak tespit edilmiştir (Tort ve diğerleri, 2017). Etkin madde miktarının 1,53 mg/cm^2 bulunduğu başka bir çalışmada, difenhidramin başarılı bir şekilde liflere yüklenmiş ve yüklenen miktarın yeterli olduğu yorumu yapılmıştır (Dott ve diğerleri, 2013).

Nanopartiküllerde %95 yükleme etkinliğine ulaşılmıştır. Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarının yüksek olması, nanopartikül yüklü liflerin hazırlanmasında yaşanacak madde kaybının en aza indirilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla optimum nanopartikül formülasyonunu seçerken yükleme etkinliği önemli bir kriter olmuştur.

5.3.3. Nanosistemlerden enoksaparinin salım hızı tayini

Çalışmada etkin madde salımının pH 1,2'de minimum olması ve salımın barsak ortamında gerçekleşmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan in vitro salım çalışmasında, in vivo ortamı taklit edebilmek amacıyla pH 1,2 (mide) ve pH 7,4 (barsak) tamponları kullanılmıştır. Farklı kaynaklarda duedonum pH'sının 4.5-6, ince barsak pH'sının 5,7-7,9 arasında değiştiği görülmektedir (Evans ve diğerleri, 1988; Singh, 2016). Enterik polimer ile kaplanarak hazırlanan tabakalı NF ve NP/NF formülasyonunda, ilk 2 saatlik sürede salım %20'nin altında gerçekleşerek 24 saat sonunda tamamlanmıştır (Bkz. Şekil 4.13). Nanopartiküllerde

ise salım, ilk 2 saatte %40 olmuştur, bunun sebebi pH 1,2'de salımı yavaşlatacak herhangi bir polimerin NP formülasyonunda bulunmamasıdır.

Nanolif ve nanopartikül formülasyonu arasında etkin madde salımının pH 1,2'de istatistiksel olarak farklı bulunması ($p<0,05$), enoksaparinin mide ortamında korunarak, barsakdan emiliminin arttırılması açısından önemlidir ve nanoliflerden alınan salım sonuçları bu açıdan uygun görülmüştür.

Kabuk kısmında Eudragit S100 kullanılarak hazırlanan bir nanolif çalışmasında, 5-fluorourasil yüklü çekirdek-kabuk nanoliflerle etkin maddenin mide pH'sından korunması sağlanmıştır. Lifler kabuk kısmında enterik polimerin bulunmasına bağlı olarak, kabuk kısmında S100 içermeyen nanoliflere göre düşük pH'da daha yavaş salım göstermiştir (Illangakoon ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada ise; Eudragit S100, ketoprofenin oral verilişi için kullanılmış ve bu polimerin kullanılması etkin madde salımının pH 1,2'de ilk 2 saat boyunca %2 civarında kalmasını sağlamıştır (Reda ve diğerleri, 2017).

Heparin yüklü mikropartiküller hazırlanarak yapılmış bir çalışmada pH duyarlı Eudragit P-4135F polimeri kullanıldığında etkin madde salımı pH 1,2'de, 4 saat boyunca %20'nin altında bulunmuştur (Meissner, Ubrich, El, Maincent ve Lamprecht, 2007). Benzer bir çalışmada, biyoparçalanır (polikaprolakton- PCL ve polilaktid ko glikolid -PLGA) ve biyoparçalanmayan (Eudragit RS PO ve Eudragit RL PO) kullanılarak heparinin mikroenkapsülasyonu yapılmıştır. Eudragit RS PO ve RL PO kullanılarak hazırlanan mikropartiküllerde etkin madde salımı, yalnız PCL ve PLGA polimerleri ile hazırlanan mikropartiküllere göre pH 1,2'de daha düşük bulunmuştur (Hoffart ve diğerleri, 2003). Heparin yüklü aljinat jel boncuk sistemiyle yapılan bir çalışmada ise, heparinin salımı ilk 120 dakikada pH 1,2'de %40'ın altında kalmıştır (Iskenderoğlu ve diğerleri, 2013).

5.3.4. Tavşanların intestinal dokusundan enoksaparin'in geçiş oranının tespiti

Permeasyon çalışmalarında vücut sıvılarını taklit etmek amacıyla pH 7,4 tampon kullanılmıştır. Formülasyonların tavşan intestinal dokusundan permeasyonları ve permeabilite katsayıları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Bkz. Çizelge 4.21) ($p>0,05$). Her üç formülasyonda da katyonik özellikte kitozan kullanılması nedeniyle, barsaklardan permeasyonun benzer olduğu düşünülmektedir.

İn vitro salım çalışmasında ilk 2 saatte, pH 1,2'de NP formülasyonunda enoksaparinin salımı, NF ve NP/NF'ye göre hızlı gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, formülasyonlar oral yoldan tavşanlara verildiğinde ince barsaklardan geçişlerinin yakın olmasına karşın, nanosistemlerin mide ortamında etkin maddeyi salım hızları farklı olacağı için oral biyoyararlanımlarının etkileneceğini göstermiştir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında katyonik özellikteki kitozanın kullanılmasının, NP ve NP/NF formülasyonlarının in vivo ortamda tavşan barsaklarından emilimini olumlu etkileyeceği düşünülmektedir

Formülasyonların hazırlanmasındaki amaç, mide ortamında etkin maddenin korunması ve katyonik özellik kazandırılan nanosistemin, negatif özellikteki membranlardan penetrasyonunun arttırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda her formülasyonda bulunan kitozanın permeasyonu arttırmada etkili olduğu ve üç formülasyonun da barsaktan geçebildiği görülmüştür.

Heparin türevlerinin oral biyoyararlanımını arttırmak için yapılmış çalışmalarda katyonik polimerler kullanılarak, in vivo ortamda etkin maddenin barsak geçişlerinin arttırılması amaçlanmıştır (Thanou ve diğerleri, 2001b). DMAH türevi olan tinzaparinin oral verilmesi amacıyla kitozan nanopartiküllerin hazırlandığı bir başka çalışmada ise trimetil kitozan ve sodyum aljinat ile nanopartiküller hazırlanarak barsaktan geçiş çalışması yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda, nanopartiküler sistemler DMAH'in barsak geçişlerini arttırmıştır. Permeabilite katsayıları, serbet DMAH'e göre 2 kat artmıştır (Yan ve diğerleri, 2020). Başka bir çalışmada ise kitozan, karboksimetil kitozan ve n-trimetil-karboksi kitozan kullanılarak DMAH nanopartikülleri hazırlanmıştır. İn vitro permeasyon çalışmalarında kontrol grubu olarak DMAH çözeltisi ile kitozan içeren nanopartiküller kıyaslanmıştır. Kitozan türevlerinin formülasyonlarda yer alması in vitro permeasyonu arttırmıştır (Mahjub ve diğerleri, 2016).

Ayrıca, DMAH'ın oral kullanımı için, bromalin ile kompleks oluşturması planlanarak farklı oranlarda DMAH ile formülasyonlar hazırlanmıştır. Barsak geçiş çalışmaları sonucunda ise heparinin permeabilite katsayısının kullanılan kompleks oluşturucu maddenin miktarına bağlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Araştırmacılar permeabilite katsayılarını 1-1,7 $x10^{-5}$ cm/sn aralığında bulmuştur ve DMAH'in hücre membranlarından geçişinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır (Grabovac ve Bernkop-Schnürch, 2006).

Tavşan barsaklarında yapılan TEER ölçümü, membranın bütünlüğünü göstermektedir. Başlangıçta ve 24 saatlik deney süresi sonunda yapılan TEER değerleri %12-17 arasında düşüş göstermiştir (Bkz. Şekil 4.15).

Bulunan sonuçlara benzer olarak; daha önce Caco-2 hücre hattıyla yapılan başka bir permeabilite çalışmasında 3. saat sonunda %16-20 arasında TEER düşüşü gösterilmiş ve araştırmacılar membran bütünlüğünün korunduğunu belirtmişlerdir (Laffleur, Psenner ve Suchaoin, 2015).

Diğer bir çalışmada nanopartiküllerin geçiş çalışmalarında kullanılan Caco-2 hücrelerinde 4. saat sonunda % 20-60 arasına düşüş bulunan TEER sonuçlarıyla doku bütünlüğünün korunduğu yorumu yapılmıştır (Sandri ve diğerleri, 2007).

5.3.5. Hücre kültürü çalışmaları

Nanosistemlerde MTT analizi

Caco-2 hücrelerinden geçiş çalışmalarında kullanılacak etkin madde dozu ve sitotoksik etki göstermeyen en yüksek etkin madde dozunu belirlemek için yapılan MTT deney prosedürü iki farklı zamanda tekrarlanmıştır. Bunun amacı, daha hassas ve etkili bir tayin yapabilmek için dozun arttırılmasıdır. MTT-1 çalışmasına göre tüm formülasyonlarda kullanılan konsantrasyonlarda (50, 12,5 ve 3,125 µg/mL) hücre canlılığı %80'nin üzerinde bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.16) ve Caco-2 permeabilite çalışmaları için 50 µg/mL enoksaparin dozunun kullanabileceği düşünülmüştür.

İkinci MTT çalışmasında hazırlanan formülasyonların etkin maddenin permeasyonunu nasıl etkilendiğinin de incelenebilmesi amacıyla deney prosedürüne enoksaparin de eklenmiştir. Bu amaçla aynı MTT çalışma prosedürü, formülasyonların farklı dozlarına (100, 75, 50 µg/ml) iki saat boyunca maruz bırakılarak tekrarlanmıştır. MTT-2 çalışmasında da MTT-1 çalışmasında olduğu gibi her formülasyon ve tüm konsantrasyon değerleri için aynı oranda DMSO içeren kontroller hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerdeki DMSO yüzdesi %0,6-4 arasında değişmekle birlikte hücre canlılığı tüm DMSO yüzdeleri için %80'nin üzerinde saptanmıştır. 50 ve 75 µg/mL lik enoksaparin konsantrasyonu tüm formülasyonlar için hücre canlılığı %80'nin üzerinde saptanırken NP formülasyonu için 100 µg/ml

konsantrasyonda %hücre canlılığının %80'nin altında bulunması geçiş çalışmaları için kullanılabilecek en güvenli dozun 75 µg/ml olduğunu göstermiştir (Bkz. Şekil 4.17). Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında Caco-2 permeabilite çalışmalarında kullanılmak üzere enoksaparin konsantrasyonu 75 µg/ml olarak seçilmiştir.

Nanosistemlerde Caco-2 hücrelerinden permeabilite çalışmaları

Etkin madde ve formülasyonlara ait permeabilite katsayılarının (P_{app}) 1,92 – 2,40x10^{-5} cm/sn değerleri arasında olduğu gözlenmiştir. Etkin madde ve formülasyonların permeabilite değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Bkz. Şekil 4.18). Genel olarak literatürde P_{app} değerleri barsak emilimi ile ilişkilendirilmiş ve P_{app} değerleri 10 x10^{-6} dan büyük olan bileşikler ya da sistemler için emilimleri yüksek olarak değerlendirilmiştir (Yee, 1997; Kogan, Kesselman, Danino, Aserin ve Garti, 2008).

Volpe ve ark. yapmış oldukları çalışmada ilaçların deneysel geçirgenlik değerleri ile absorpsiyonları arasındaki ilişkiyi incelemek ve ilaçları düşük/yüksek permeabilite durumlarına göre optimize ve valide edilmiş bir protokolle sınıflandırmak için 20'den fazla model ilaç kullanmıştır. Caco-2 hücre hattı üzerinde 2 saat süre ile gerçekleştirilen permeabilite çalışmalarında, değerlendirilen özel protokolün ilaç maddelerini BCS (Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi) Kılavuzu'ndaki spesifikasyonlara göre "yüksek veya düşük geçirgenlik" olarak başarılı bir şekilde sınıflandırabildiğini göstermişlerdir (Volpe ve diğerleri, 2007). Ayrıca bu çalışmada, labetalol'ün geçirgenliğinin (14,96x10^{-6} cm/dak) değerlendirilmesinde yüksek/düşük geçirgenlik sınıf sınırı olduğunu ve ilaçların geçirgenlik sınıflandırmalarında bir iç standart olarak kullanılabileceğini bildirmiştir (Volpe ve diğerleri, 2007). Bu literatür, enoksaparin ve hazırlanan nanolif formülasyonlarının geçirgenliklerinin yüksek olduğunu destekler niteliktedir.

Charoongchit ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada çeşitli katyonik triblok (P(CatCLCL)2-PEG) ve diblok (P(CatCLCL)-mPEG) poli (e-kaprolakton)-ko-poli (etilen glikol) kopolimerlerinin enoksaparinin oral yoldan verilmesinde potansiyel kullanımları araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar genel olarak kopolimerlerin farklı yapılarının moleküler özellikler, enoksaparinin enkapsülasyonu, partikül özellikleri ve ilacın Caco-2 hücrelerinden geçirgenliği üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Caco-2 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen in vitro permeabilite çalışmaları ise P (CatCLCL) 2-PEG ve P

(CatCLCL) -mPEG kopolimerlerinin bağırsak hücre modeli olan Caco-2 hücreleri boyunca enoksaparin geçirgenliğini artırabildiğini göstermiş ve hazırlanan nanopartiküler sistemler için % göreceli enoksaparin geçirgenlik değerleri 3,0±1,5 – 6,9±2,4 arasında bulunmuştur (Charoongchit ve diğerleri, 2017). Tez kapsamında hazırlanan nanosistemler için elde edilen % göreceli enoksaparin geçirgenlik değerleri 5,11±0,39 – 6,39±0,39 arasında olup (Çizelge 4.23) ilgili literatür ile kıyaslanınca enoksaparin geçirgenliği için daha olumlu bir alternatif sunmuştur. Bu sonuçlar göz önüne alındığında hazırlanan formülasyonların ilacın oral biyoyararlanımının artırılmasında umut vaad edici bir yaklaşım sunduğunu ortaya çıkarmıştır. Enoksaparinin tek başına uygulanmasının, hazırlanan formülasyonlarla benzer permeabilite sonuç vermesi, mide asidinden korunan formülasyonların daha etkili olacağını göstermektedir.

5.3.6. Nanosistemlerin stabilite çalışmaları

NP formülasyonunda, yapılan zeta potansiyel, PDI ve partikül çapı ölçümleri sonucunda partikül çapının mikrometre büyüklüğüne ulaşması, PDI değerinin yükselmesi ve dış görünüşünün incelenmesi sonucu partiküllerin bileşerek çöktükleri sonucuna varılmıştır (Bkz. Resim 4.6).

Nanoliflerde yapılan stabilite çalışmalarının yorumlanması

Etkin madde miktar tayininin yorumlanması

Stabilite çalışmaları formülasyonun seçimi, hangi sıcaklıkta saklanması gerektiği ve daha sonraki aşamada yapılacak ambalaj seçiminde yol gösterici olarak yapılmaktadır. NF formülasyonunda zamanla etkin madde miktarı ilk 6 ayda artmış olarak görünmektedir (Bkz Şekil 4.19). Bu sonuçların elde edilmesinin sebebi, başlangıçta bulunan etkin madde miktarının hesaplandığı lif parçasının bölgesinin, stabilite çalışmaları için kullanılan lif parçalarından farklı olmasıdır. Buna bağlı olarak, liflere yüklenen etkin madde lifin her bölgesinde homojen olarak dağılmamış olabilir. Her ne kadar lifin orta bölgelerinden alınan parçalar ile stabilite çalışmaları yapılsa da madde miktarının bu şekilde artış göstermesinin nedeni olarak etkin maddenin homojen dağılmaması olduğu düşünülmüştür. Yapılan bir çalışmada da nanoliflerin içindeki etkin maddenin farklı bölgelerde homojen dağılmadığı gösterilmiştir (Park ve diğerleri, 2010). NF formülasyonunda, 12 aylık süre sonunda 4°C ve

25°C' de başlangıca göre % etkin madde miktarı azalmıştır. 3. ve 6. aylarda etkin madde miktarının, önce artış sonra düşüş göstermesinin liflerdeki stabilite sorunlarından çok, etkin madde miktar tayini yapılan bölgelerdeki homojen olmayan madde dağılımından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

NP/NF formülasyonunda % etkin madde miktarı 3. ayda %95-99 arasında bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.20). Ancak NF formülasyonunda olduğu gibi yapılan ölçümlerde 3. ay sonunda hesaplanan madde miktarı %3 artış göstermiştir. 6. ayda ise etkin madde miktarı %81-87 arasında değişmektedir. 12. ay sonunda ise iki sıcaklıkta da etkin madde miktarı benzer şekilde bulunarak %90 seviyelerinde tespit edilmiştir. 40°'de 6 ay sonunda yapılan miktar tayininde artış görülmesinin sebebi, lifin bölgesel olarak farklı miktarlarda etkin madde içermesinden ve lif içinde yer alan nanopartiküllerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, iki nanolif formülasyonunda, 3., 6. ve 12. ay sonunda hesaplanan etkin madde miktarları başlangıçta hesaplanan etkin madde miktarına göre bütün saklama koşullarında anlamlı olarak değişmemiştir ($p>0,05$).

Daha önce yapılan bir çalışmada meloksikam yüklü nanolifler hazırlanmış ve uzun süreli stabilite test koşullarında 1. ayda yapılan ölçümlerde 25°C'de, etkin madde miktarı başlangıç miktarından yüksek bulunmuştur. Daha sonraki aylarda ise etkin madde miktarı azalarak başlangıç miktarına yakın hesaplanmıştır. Düşük nem ve sıcaklıkta nanoliflerin daha stabil olduğu yorumu yapılmıştır (Samprasit ve diğerleri, 2015). Başka bir çalışmada ise minoksidil sülfat içeren nanoliflerde 4°C ve 25°C'de yapılan stabilite testleri sonucunda 25°C'de etkin madde miktarı başlangıca göre artmıştır (Aleanizy ve diğerleri, 2020). Eudragit E 100 ile nanoliflerin hazırlandığı bir çalışmada ise hızlandırılmış ve uzun süreli test koşullarında 3. ve 6. ay sonuda liflerdeki % etkin madde miktarı anlamlı olarak değişmemiştir ($p>0,05$) (Baranauskaite ve diğerleri, 2019).

İn-vitro salım sonuçlarının yorumlanması

NF formülasyonu için 3. ve 6. ay sonunda 40°C de bekletilen liflerde etkin madde salımı 4°C ve 25°C'ye göre hızlanmıştır ancak etkin madde salımı ilk iki saaate %20'nin altında bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.21-4.23). NP/NF formülasyonunda da 6. ay sonunda 40°C'de bekletilen liflerden etkin madde salımı ilk iki saatte ph 1,2 ortamında %20'nin üzerinde

çıkmıştır (Bkz. Şekil 4.26). Liflerden etkin madde salımında oluşan bu farkın nedeni; sıcaklık artışının, nanolifin dış tabakalarında bulunan ve pH bağımlı çözünen Eudragit S100 polimerinin yapısının değişmesine neden olabileceği düşünülmüştür. Eudragit türevleriyle hazırlanan formülasyonlardan etkin maddenin salımınının sıcaklık artışına bağlı olarak değiştiği çalışmalar bulunmaktadır (Kibria, Ariful Islam ve Jalil, 2009; Fan, Sun, Li, Yang, Ma ve Sun, 2017).

Ancak; 12 aylık süre sonunda bütün koşullarda, ilk 2 saatte pH 1,2'de liflerden etkin madde salımının %20'nin altında olması olumlu bir sonuç olarak gözlenmiştir.

Nanoliflerin tenoksikamın kontrollü salımı için hazırlandığı bir çalışmada da yapılan stabilite testleri sonucunda 25°C'de etkin madde salımı önemli derecede değişmemiştir (Bonthagarala, Swain, Rao ve Dasari, 2015).

SEM görüntülerinin yorumlanması

Stabilite çalışmalarında tüm örneklerin SEM görüntülerinde 12. ay sonunda nanolif yapısının korunduğu görülmektedir (Bkz. Resim 4.7-Resim 4.12).

Her iki nanolif formülasyonunun bütün sıcaklıklarda 3., 6. ve 12. ay sonunda morfolojik görünüşlerinde bir değişiklik saptanmamıştır, nanoliflerin yerleşiminin ve yapısının bozulmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca; nanoliflerin lif çaplarında bütün sıcaklıklarda 12. ay sonunda anlamlı bir değişim görülmemiştir (Bkz Çizelge 4.24 ve Çizelge 4.25) ($p>0,05$). Literatürde de hızlandırılmış ve uzun süreli stabilite test koşullarında nanoliflerin çaplarında önemli değişikliklerin olmadığı gösterilmiştir (Charernsriwilaiwat, Rojanarata, Ngawhirunpat, Sukmave Opanasopit, 2013; Samprasit ve diğerleri, 2015; Tort ve Acartürk, 2016).

Hızlandırılmış stabilite çalışmalarında 40°C'de bekletilen liflerin, in vitro salım hızları ve etkin madde miktarları açısından değişime uğradığı görülmüştür. Yüksek sıcaklığın nanoliflerin stabilitesi üzerine olumsuz etkilediği daha önce yapılmış çalışmalarda da gösterilmiştir (Silva ve diğerleri, 2020).

5.3.7. İn vivo deneyler

Formülasyonların uygulanmasından sonra tavşanlarda plazmada heparin tayini

Sonuç formülasyonların in vitro karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra hem in vitro sonuçları desteklemek hem de formülasyonların biyolojik ortamda beklenen etkiyi gösterip göstermediklerini yorumlamak amacıyla in vivo deneyler gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda tavşanlar 6 gruba ayrılarak formülasyonlar uygulanmıştır.

Enoksaparinin piyasa preparatı subkütan kullanılmaktadır. Tavşanlara enoksaparin çözeltisinin subkütan yoldan verildiği kontrol grubuna (A5) ek olarak ilaç uygulanmayan kontrol grubu (A6) da oluşturulmuştur (Bkz Çizelge 3.4)

Tavşanlara uygulanan enoksaparin dozlarının belirlenmesi için daha önce yapılan çalışmalar incelenmiş ve DMAH'lerin oral verilmesi için farklı dozların kullanıldığı görülmüştür (700-15000 IU/kg) (İskenderoğlu, 2007). Bizim çalışmalarımızda enoksaparin dozu, hem liflere yüklenen enoksaparin miktarından, hem de tavşanların oral yoldan alabileceği büyüklükte lifin verilebilmesi açısından 2000 IU/kg olarak belirlenmiştir. Heparin ve türevlerinin etkisi aPTT ve anti-Xa değerleri takip edilerek değerlendirilmektedir. aPTT değeri için hayvanlara ait kesin değerler bulunmamasına rağmen sağlıklı bir insanda 26-35 sn arası normal kabul edilir (Bahadır, Akça, Bülbül, Kahveci ve Özkara, 2015). Heparin ve türevlerinin kullanımıyla bu değer 40-70 sn'ye yükselmektedir (Van Roessel, Middeldorp, Cheung, Zwinderman ve Pont, 2014). aPTT değerinin 100 sn'nin üzerine çıkması kanamalara yol açar.

Literatürde anti-Xa değerinin 0,2 IU/mL ve üzeri olması durumunda heparinin etkili olduğu kabul edilmektedir. Farmakokinetik hesaplamaların yapıldığı farklı çalışmalarda C_{maks} değerleri 0,2 anti-Xa IU/mL üzerinde olan sonuçlar başarılı bulunmuştur (Motlekar ve diğerleri, 2006).

Yaptığımız in vivo çalışmalarda, tavşan plazmalarında ölçülen anti-Xa sonuçlarına bakıldığında, ölçümlerin bir kısmının sıfır değerinde bir kısmının da 0,2 IU/mL limitinin üzerinde olduğu görülmektedir. Bulunan değerlerin standart sapmalarının oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle in vivo çalışmaları yorumlayabilmek için ve farmakokinetik

parametrelerin belirlenmesi için aPTT değerleri kullanılmıştır. aPTT ölçümü heparin tedavisinin izlenmesi için yaygın olarak kullanılan duyarlı bir tarama testidir (Tang, Qian ve Fang, 2020). Heparin kullanılarak yapılan çalışmalar incelendiğinde, in vivo sonuçların değerlendirilmesi için aPTT değerlerinin ve buna bağlı olarak hesaplanan farmakokinetik parametrelerin kullanıldığı da görülmektedir (Yan ve diğerleri, 2020).

Tavşan plazmalarından aPTT ölçümleri yapıldıktan sonra pkSolver programı kullanılarak farmakokinetik parametreler (t_{maks} ve AUC_{0-t}) hesaplanmıştır. Ayrıca formülasyonların bağıl biyoyararlanımları subkütan yol referans alınarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.32'te gösterilmiştir. Formülasyonların etkinlik değerlendirmesinde aPTT değerleri 40 sn'nin altında bulunan formülasyonlar için AUC_{0-t} hesaplaması yapılmamıştır. A1 grubu ve A4 grubunda bulunan tavşanların bütün zaman noktalarında aPTT sürelerinin 40 sn'nin altında bulunması nedeniyle, bu gruplar için bağıl biyoyararlanım ve AUC_{0-t} hesaplamaları yapılmamıştır.

NP (A2) ve NP/NF (A3) formülasyonunun oral uygulandığı tavşanlarda gruplar arasında en yüksek pıhtılaşma süreleri ($aPTT_{maks}$) (NP'de 52,7sn ve NP/NF'de 42,8 sn) ve en yüksek AUC_{0-t} (NP'de 230,3 NP/NF'de 167,4) değerleri elde edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.32).

NF formülasyonunun uygulandığı tavşanlarda (A1), aPTT değerleri A2 ve A3 gruplarından düşük ve istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca A4 (oral enoksaparin çözelti) grubu ve A6 (kontrol grubu) ortalama aPTT değerleri, A5 grubundan (subkütan enoksaparin çözeltisinin uygulandığı grup) farklı bulunmuştur ($p<0,05$).

A5 grubundan elde edilen aPTT değerleri A3 ve A2 grubundan düşük bulunmuştur ve A3 grubundan farkı istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bağıl biyoyararlanım değerleri ise A2 grubunda %5,7, A3 grubunda %4,1 olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda maksimum aPTT değerleri SC uygulama, oral NP ve oral NP/NF formülasyonları için 41,6 sn, 52,7 sn ve 42,8 sn olarak bulunmuştur. NP ve NP/NF formülasyonları için aPTT değerleri oral enoksaparin çözeltisine göre 2 ve 1,63 kat artmıştır. Oral uygulanan formülasyonlarda etkili antikoagülan değere NP ve NP/NF formülasyonları ile ulaşılmıştır. Oral uygulanan NP ve NP/NF formülasyonlarının t_{maks} değerleri 4 ve 8 saattir. Etki süresinin uzadığı görülmektedir. Oral NF (A1) formülasyonunun

uygulandığı tavşanlarda aPTT değerleri etkili seviyenin (<40 sn) altında bulunmuştur. Bunun sebebi Eudragit S 100 polimerinin anyonik özellikte olması (Patra ve diğerleri, 2017) ve nanoliflerin ara tabakasında enoksaparin ile birlikte bulunan glikol kitozanın yeterli katyonik özellik kazandırmaması olabilir. Ayrıca NF formülasyonunun mukoadhesif özelliği NP/NF formülasyonundan daha düşük bulunmuştur. NP ve NP/NF formülasyonlarında ise kitozan nanopartikülleri yer almaktadır. Negatif yüklü enoksaparinin kitozan ile nanopartikül haline getirilmesi ile katyonik özellikte nanopartiküller hazırlanmaktadır.

Oral ilaç verilişinde ince barsaklarda aşılması gereken önemli bariyer mukozadır. Mukozadaki mukus salgısı epitel yüzeyini kaygınlaştırır, oral verilen nanopartiküler sistemlerin önce mukusa yapışması ve geçmesi gerekmektedir. Mukus tabakasındaki boşluklardan nanoboyuttaki partiküller difüze olabilirler. Partiküllerin geçişinde enterositler ve M hücreleri büyük rol oynamaktadır. Özellikle M hücreleri endositoz yapabilme özelliğinden dolayı nanopartiküllerin geçişini sağlar. Genel olarak 1 mikrometreden küçük partiküllerin M hücreleri tarafından alınarak hücre membranlarından geçebildiği bilinmektedir. Nanopartiküler sistemlerin boyutlarının azalmasıyla intestinal mukozadan geçişleri de artmaktadır (Acartürk, 2014). Mukoadhesif ve katyonik özellikteki kitozan nanopartikülleri (NP) negatif yüklü hücre membranlarıyla etkileşir, enoksaparinin paraselüler mekanizma ile penetrasyonunu artırır, böylece biyoyararlanımı ve antikoagulan aktivitesi artar ve aPTT süresi artar. NP formülasyonunun aPTT süresini uzatması kitozan nanopartiküllerinin de belli bir oranda mide asidinden korunduğunu göstermektedir. Literatürde de bu bulgumuzu destekleyen örnekler bulunmaktadır (Sun ve diğerleri, 2010; Yan ve diğerleri, 2020).

Kitozan nanopartikülleri içeren nanolif formülasyonu olan NP/NF kombine formülasyon, aPTT süresini arttırarak etkisini 8. saatte göstermiştir. Nanoliflerin alt ve üst tabakasında bulunan polimerin pH'ya bağımlı olarak geç çözünmesi nedeniyle pik süresi uzayarak maksimum aPTT değerine 8. saatte ulaşılmıştır. NP/NF formülasyonunun uygulanması ile enoksaparinin kontrollü bir şekilde salımı mümkün olmaktadır.

Bu sonuçlara bağlı olarak enoksaparinin emiliminde mide asidinden korunmasının yanısıra dozaj şeklinin partiküler formda ve pozitif yüklü olmasının çok önemli olduğu yorumu yapılmıştır. Nanopartiküler yapı emilimi arttırmaktadır. Oral uygulanacak sonuç

formülasyonda nanopartikül ve nanopartikül yüklü nanolif formülasyonlarının aynı dozaj şekli içinde birlikte verilmesi durumunda etkinin nispeten hızlı başlamasından sonra daha uzun süre kontrollü olarak devam etmesi mümkün olabilecektir.

Alınan sonuçlar, nanopartiküllerin ve nanopartiküllerin liflere yüklenmesinin heparinin oral etkinliğini arttırdığını göstermiştir. Bu sonuçlarımıza benzer olarak daha önce yapılan bazı çalışmalar bulunmaktadır.

DMAH'nin (enoksaparin) oral verilişi için aljinat-kitozan nanopartiküllerinin hazırlandığı bir çalışmada, nanopartiküler yapının anti-Xa ve aPTT üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir. Oral yoldan sıçanlara 50 mg/kg dozda, enoksaparin çözeltisi ve kitozan nanopartikülleri uygulanmıştır. Kitozan nanopartiküllerin aljinat ile kombine verildiği sistemde C_{maks} değeri 0,37 IU/mL, aPTT=27 sn ile aljinat bulunmayan nanopartiküllerden (aPTT= 22 sn) daha yüksek bulunmuştur. Ancak her iki nanopartikül formülasyonu da (%0,24 ve %0,39), oral enoksaparin çözeltisinden (%0,16) daha yüksek oral biyoyararlanım göstermiştir. Bunun nedeni olarak kitozanın paraselüler yoldan geçişi arttırmasıdır. Nanopartiküllerin parçalanmasından sonra kitozanın barsak mukozasına yapışarak sıkı kavşakların açılması sonucu DMAH'nin emilimini arttırdığı yorumu yapılmıştır (Bagre ve diğerleri, 2013). Başka bir çalışmada ise DMAH ile trimetil kitozan nanopartikülleri hazırlanarak sıçanlara oral yoldan aynı dozlarda uygulanmıştır. Nanopartiküllerle, oral DMAH çözeltisinden iki kat daha uzun pıhtılaşma süresine ulaşılmıştır. Bunun nedeni olarak trimetil kitozanın DMAH'ın inetestinal permeasyonunu arttırması olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Paliwal ve diğerleri, 2012). Ancak bu çalışmada etkili aPTT değerine hiçbir formülasyon ile ulaşılamadığı görülmektedir. Sonuçlar sadece kendi arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

2020 yılında yapılan başka bir başka çalışmada ise trimetil kitozan ve sodyum aljinat DMAH'nin oral verilişi için kullanılmış ve nanopartikülleri hazırlanmıştır. İn vitro ve in vivo karakterizasyon çalışmaları sonucunda ülseratif kolit üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sıçanlara 50mg/kg dozda DMAH çözeltisi ve nanopartiküler üç ayrı sıçan grubuna uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda, maksimum pıhtılaşma zamanı 47,3 sn ile DMAH yüklü trimetil kitozan nanopartiküllerinde görülmüştür. Kitozanın yüksek katyonik yük yoğunluğu ve yüksek mukoadhezyon özelliğinden dolayı negatif yüklü hücre membranlarından DMAH emilimini arttırdığı gösterilmiştir. Buna karşılık; sodyum aljinatın

nanopartiküllere eklenmesi hem nanopartiküllerin çapını arttırmış hem de nanopartiküllerin yüzeyindeki artan negatif yük yoğunluğu DMAH emilimini olumsuz etkilemiştir (Yan ve diğerleri, 2020). Bu çalışmada 47,3 sn ile etkili aPTT değerine ulaşıldığı görülmektedir.

Sonuçlar biyoyararlanım açısından değerlendirildiğinde A2 grubunda %5,7, A3 grubunda %4,1 bağıl biyoyararlanım sonuçları elde edilmiştir. Heparin türevlerinin oral verilmesine yönelik yapılan çalışmalarda uygulanan heparin dozunun bağıl biyoyararlanımı etkilediği görülmüştür. Bir çalışmada, farklı molekül ağırlığına sahip kitozanlar ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları, enoksaparin dozu 1000 IU/kg olacak şekilde sıçanlara oral yoldan uygulanmıştır. Bütün formülasyonların bağıl biyoyararlanımları %5-%10 arasında bulunmuştur (Sun ve diğerleri, 2010). Başka bir çalışmada ise 50mg/kg (5000 IU/kg) dozlarda düşük molekül ağırlıklı heparin içeren ve tiyollenmiş kitozan ile hazırlanan nanopartiküller sıçanlara oral verildikten sonra bağıl biyoyararlanımları %21'e kadar yükselmiştir (Fan ve diğerleri, 2016). A2 ve A3 grubundan elde edilen bağıl biyoyararlanım uygulanan enoksaparin dozuna (2000 IU/kg) bağlı olacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Sonuç olarak nanopartikül ve nanopartiküllerin nanoliflere yüklenmesiyle hazırlanan kombine sistemin oral verilmesiyle pıhtılaşma sürelerinin etkili seviyede uzadığı görülmüştür. Mukoadhezif özellikteki katyonik kitozan nanopartiküllerinin nanoliflere yüklenmesi sonucunda elde edilen kombine sistemin enoksaparini mide asidinden koruyarak barsağa ulaşacağı ve katyonik nanopartiküllerin barsaktan geçerek etki göstereceği düşünülmektedir.

Formülasyonların tavşanlara uygulandıktan sonra floresan mikroskobu ile barsaklarının görüntülenmesi

Sonuç formülasyonlarda enoksaparin yerine floresin izosiyanat (FI) yüklenmesiyle hazırlanan nanosistemler, tavşanlara uygulandıktan sonra ötenazi yapılarak mide ve barsak kesitleri floresan mikroskopta incelenmiştir. Floresan mikroskopta görüntüleme amacıyla kullanılan gruplarından (Bkz Çizelge 3.5) FI-NF grubunda, 2. saat sonunda alınan barsak kesitlerindeki floresan boya yoğunluğu 4. Saat sonunda alınan kesitlere göre daha düşük bulunmuştur. 4. saat sonunda tavşanlardan alınan barsak kesitleri arasında ise en yüksek boya yoğunluğu ileumda görülmüştür (Bkz Resim 4.13- Resim 4.14 ve Şekil 4.29- Şekil 4.30).

FI-NP grubunda 4. saat sonunda tavşanlardan alınan barsak kesitlerinde 2. saatte alınan kesitlere göre daha yoğun boya bulunmuştur (Bkz Resim 4.15- Resim 4.16 ve Şekil 4.29- Şekil 4.30).

FI-NP/NF grubunda da FI-NF grubuna benzer sonuçlar gözlenerek 2. saat sonunda mide, duedonum, jejenumdan alınan kesitlerde floresan boya yoğunluğu 4. saat sonunda alınan kesitlerden düşük bulunmuştur (Bkz Resim 4.17- Resim 4.18 ve Şekil 4.29- Şekil 4.30).

FI çözeltisinin oral verildiği grupta ise 2. ve 4. saat sonunda bütün dokularda yoğunlukları farklı olarak boyanmalar gözlenmiştir (Bkz Resim 4.19 ve Resim 4.20). SC FI (Bkz. Resim 4.21 ve Resim 4.22) ve oral SF (Bkz. Resim 4.23 ve Resim 4.24) uygulanan tavşanların mide, duedonum, jejenum ve ileumlarından alınan kesitlerde floresan bir görüntü oluşmamıştır.

Ayrıca floresan boyanın barsak kesitlerindeki yoğunluğunun hesaplandığı grafiklere bakıldığında, NF, NP ve NP/NF formülasyonlarının uygulandığı tavşan barsaklarının tüm kesitlerindeki boya yoğunlukları kontrol grubundan (Oral SF) yüksek bulunmuştur.

Alınan bu görüntülerin sonucunda, FI-NF ve FI-NP/NF grubunda bulunan tavşanlara (ara tabakasında FI ve FI nanopartiküllerin olduğu tabakalı lifler) verilen floresan boyanın, ince barsağın son kısmı olan ileuma 2. saat sonunda daha az ulaştıkları düşünülmüştür. FI yüklü nanopartiküllerde bulunan floresan boya ise 2. saat sonunda ince barsağın bütün kesitlerinde açığa çıkmıştır. Hazırlanan FI-NP formülasyonunun mide ortamından geçişi ve ince barsak yüzeyine ulaşmasının nanoliflere göre daha hızlı olduğu düşünülmüştür. Bunun sebebinin ise nanoliflerin alt ve üst tabakasında bulunan Eudragit S100 polimerinin floresan boyayı mide ortamında daha uzun süre koruması olduğu sonucuna varılmıştır. Ayırca, NP/NF formülasyonunda da en yüksek pıhtılaşma süresine ($aPTT_{maks}$ 42,8 sn, 8.saat) 4. saatten sonra ulaşılması da floresan boyanın 4. saat sonunda barsağın bütün kesitlerinde görülmesinin destekler bir sonuç olmuştur.

Heparin ve türevlerinin oral verilişi için yapılan bazı çalışmalarda, floresan görüntüleme amacıyla etkin madde yerine floresan boyalar ile formülasyonlar hazırlanmış ve in vivo çalışmalarda hayvanların intestinal dokuları incelenmiştir. Bu çalışmalarda da bizim çalışmamıza benzer sonuçlara ulaşılarak kontrol gruplarında floresan görüntü alınmamıştır

ve floresan boya yüklü formülasyonların verildiği hayvan gruplarında ise boyanmalar gözlenmiştir (Paliwal ve diğerleri, 2012; Tang ve diğerleri, 2020). Benzer sonuçların alındığı başka bir çalışmada ise, floresan boya çözeltisinin oral verildiği gruplarda da hayvanların barsak kesitlerinde boyanma olmamıştır (Yan ve diğerleri, 2020). Kitozan nanopartiküllerin enoksaparinin verilişi için hazırlandığı bir çalışmada ise, FI yüklü nanopartiküllerin verildiği sıçan gruplarında 1. saat sonunda ince barsaklarda floresan boyaya rastlanmıştır (Bagre ve diğerleri, 2013).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında DMAH türevi olan enoksaparinin oral verilişinin sağlanması için elektro-çekim yöntemiyle tabakalı nanolifler (NF) başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca nanoliflerin kitozan nanopartiküllerle kombine sistemleri (NP/NF) de hazırlanarak in vitro ve in vivo karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- ✓ Nanoliflerin hazırlanması sonucunda etkin maddenin yapısının bozulmadığı FT-IR ve DSC çalışmaları ile gösterilmiştir.
- ✓ SEM görüntüleri incelenerek homojen dağılımlı düzgün yapılı liflerin elde edildiği görülmüştür.
- ✓ Liflerin ortalama çapı 300-500 nm arasında bulunmuştur.
- ✓ Nanopartiküllerin ortalama çapı 400-500 nm arasında ve maksimum %95 etkin madde yükleme kapasitesine ulaşılmıştır.
- ✓ Liflerin poroziteleri %50'den yüksek bulunmuştur.
- ✓ Hidrofobik polimerle kaplanan liflerin temas açıları 100º'den yüksek bulunmuştur.
- ✓ Nanoliflerin etkin madde yükleme etkinliği 390-400 μg/cm^2 arasında bulunmuştur.
- ✓ İn vitro salım çalışmaları sonucunda NF ve NP/NF formülasyonları etkin madde salımını pH 1,2'de (<%20 etkin madde salımı) geciktirmiştir. Nanolifler pH 7,4'de kontrollü salım göstermiştir.
- ✓ MTT çalışmaları sonucunda 75 μg/mL enoksaparin dozunun hücre canlılığı üzerinde sitotoksisite göstermediği bulunmuştur.
- ✓ Caco-2 permeasyon çalışmaları sonucunda enoksaparin ve nanosistemlerin permeasyonları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.
- ✓ İn-vivo hayvan deneyleri sonucunda oral uygulanan NP ve NP/NF formülasyonları ile etkili aPTT süresine (52,7 ve 42,8 sn) ulaşılmıştır.
- ✓ Caco-2 permeasyon çalışmalarında göreceli permeabilite değeri en yüksek bulunan NP/NF formülasyonunun in vivo çalışmalar sonucunda etkili aPTT süresine ulaşması, elde edilen bulguların birbirini desteklediğini göstermektedir.
- ✓ Floresan mikroskop görüntüleme çalışmalarında ise, formülasyonlarda floresan boyanın bulunması tavşan barsaklarında boyamalar oluştururken, sübkütan verilen grupta barsak kesitlerinde boyanma görülmemiştir.

Sonuç olarak enoksaparin-kitozan nanopartikülleri ve nanopartiküllerin Eudragit S100 nanoliflerine yüklenmesiyle hazırlanan kombine NP/NF sistemi ile enoksaparinin oral uygulanmasına yönelik ümit verici sonuçlara ulaşılmıştır. Hazırlanan nanosistemlerin hücre kültürü çalışmaları ile hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Tavşanlarda oral olarak uygulanan NP ve NP/NF kombine sisteminin antikoagulan tedavinin en önemli göstergelerinden biri olan aPTT süresini uzatarak etkili olduğu görülmüştür. Ancak biyoyararlanımın artması için dozla ilgili olarak tekrar değerlendirme yapılması uygun olacaktır. Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde geliştirilen nanopartikül ve nanopartikül yüklü nanolif sistemlerinin enoksaparinin oral uygulanmasında umut vaat ettiği ve çalışmaların öngörülen hedefe ulaştığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmalarda görülen bazı sorunlar ve çözüm önerileri aşağıda verilmiştir:

- ✓ Enoksaparinin subkütan verilişinde doz ayarlaması yapılabilmektedir, ancak nanoliflerde bulunan enoksaparinin miktarı lifin tamamında homojen değildir. Bu sebeple in vivo çalışmalarda doz ayarlaması zorlaşmıştır. Enoksaparinin oral verilişi ile ilgili yapılacak olan çalışmalar için nanolif formülasyonlarında bu zorluğun olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

- ✓ Enoksaparinin oral etkinliğinin arttırılmasında nanopartikül ve nanopartikül yüklü nanolif formülasyonlarının hibrit sistem olarak birlikte verilmesinin etkili olduğu görülmüştür. İki nanosistemin tek bir dozaj formu içinde birlikte verilmesi ile etkinin nispeten hızlı başlamasından sonra uzun süre kontrollü olarak devam etmesi mümkün olabilecektir. Tavşanlarda elde edilen sonuçların klinik etkinlik çalışmaları ile doğrulanması gereklidir.

- ✓ Hazırlanan nanosistemlerin stabilitesinin sağlanabilmesi için ambalaj sisteminin dikkatle seçilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Acartürk, F. (2014). Nanotaşıyıcıların Oral Uygulanması. In A. Zırh Gürsoy (Ed.), *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*. İstanbul: Konrollü Salım Sistemleri Derneği, 227-241.

Ahmed, R. M. (2017). Surface Characterization and Optical Study on Electrospun Nanofibers of PVDF/PAN Blends. *Fiber and Integrated Optics*, 36(1–2), 78–90.

Akhgari, A., Heshmati, Z. and Makhmalzadeh, B. S. (2013). Indomethacin electrospun nanofibers for colonic drug delivery: Preparation and characterization. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 85–90.

Akhgari, A., Shakib, Z. and Sanati, S. (2017). A review on electrospun nanofibers for oral drug delivery. *Nanomedicine Journal,* 4(4), 197-207.

Akhtar, F., Wan, X., Wu, G., Kesse, S., Wang, S.and He, S. (2018). Low-Molecular-Weight Heparins: Reduced Size Particulate Systems for Improved Therapeutic Outcomes. *Molecules*, 23(7), 1757.

Alam, F., Al-Hilal, T. A., Chung, S. W., Seo, D., Mahmud, F., Kim, H. S. and Byun, Y. (2014). Oral delivery of a potent anti-angiogenic heparin conjugate by chemical conjugation and physical complexation using deoxycholic acid. *Biomaterials,* 35(24), 6543-6552.

Aleanizy, F. S., Alqahtani, F. Y., Alkahtani, H. M., Alquadeib, B., Eltayeb, E. K., Aldarwesh, A. and Alsarra, I. A. (2020). Colored polymeric nanofiber loaded with minoxidil sulphate as beauty coverage and restoring hair loss. *Scientific reports,* 10(1), 1-8.

Amariei, N., Manea, L. R., Bertea, A. P., Bertea, A. and Popa, A. (2017). The Influence of Polymer Solution on the Properties of Electrospun 3D Nanostructures. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 209(1), 012092.

Asawahame, C., Sutjarittangtham, K., Eitssayeam, S., Tragoolpua, Y., Sirithunyalug, B. and Sirithunyalug, J. (2015). Formation of orally fast dissolving fibers containing propolis by electrospinning technique. *Chiang Mai Journal of Science*, 42(2), 469–480.

Bagre, A. P., Jain, K., Jain, N. K. (2013). Alginate coated chitosan core shell nanoparticles for oral delivery of enoxaparin: in vitro and in vivo assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1), 31–40.

Bahadır, A., Akça, Ö., Bülbül, İ., Kahveci, R. ve Özkara, A. (2015). Supervarfarinin cilt emilimi sonucu ortaya çıkan INR yüksekliği ve vitamin K eksikliği: Olgu sunumu. *Medeniyet Medical Journal*, 30(2), 99-101

Balestrino, D., Quintana, M., Charbonnel, N., Forestier, C., Lartigue, C. and Souweine, B. (2016). Compatibility of injectable anticoagulant agents in Ethanol; In vitro antibiofilm activity and impact on polyurethane catheters of enoxaparin 400 U/mL in 40% v/v Ethanol. *PLos one,* 11(7), e0159475.

Baranauskaite, J., Adomavičiūte, E., Jankauskaite, V., Marksa, M., Barsteigiene, Z. and Bernatoniene, J. (2019). Formation and investigation of electrospun Eudragit E100/oregano mats. *Molecules*, 24(3), 1–13.

Baughman, R. A., Kapoor, S. C., Agarwal, R. K., Kisicki, J., Catella-Lawson, F. and FitzGerald, G. A. (1998). Oral delivery of anticoagulant doses of heparin: a randomized, double-blind, controlled study in humans. *Circulation,* 98(16), 1610-1615.

Bhardwaj, N. and Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances,* 28(3), 325-347.

Bonthagarala, B., Swain, S., Rao, P. V. and Dasari, V. (2015). Design and Characterization of Controlled Release tenoxicam Nanofibers by Electrospinning Technique. *International Journal of Biomedical and Advance Research*, 6(3), 220.

Brako, F., Thorogate, R., Mahalingam, S., Raimi-Abraham, B., Craig, D. Q. M. and Edirisinghe, M. (2018). Mucoadhesion of Progesterone-Loaded Drug Delivery Nanofiber Constructs. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(16), 13381–13389.

Brunauer, S., Emmett, P. H. and Teller, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60(2), 309–319.

Bruni, G., Maggi, L., Tammaro, L., Canobbio, A., Di Lorenzo, R., D'Aniello, S., Domenighini, C., Berbenni, V., Milanese, C. and Marini, A. (2015). Fabrication, Physico-Chemical, and Pharmaceutical Characterization of Budesonide-Loaded Electrospun Fibers for Drug Targeting to the Colon. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), 3798–3803.

Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L. and Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125–132.

Can, N. and Ersoy, M. S. (2014). Nanolif yapılı polimerik doku iskeleleri. *Journal of Textiles and Engineers/Tekstil ve Mühendisliği*, 21(95), 38-50.

Chandy, T., Rao, G. H. R., Wilson, R. F. and Das, G. S. (2002). Delivery of LMW heparin via surface coated chitosan/peg-alginate microspheres prevents thrombosis. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 9(2), 87–96.

Charernsriwilaiwat, N., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Sukma, M. and Opanasopit, P. (2013). Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with Garcinia mangostana extracts. *International Journal of Pharmaceutics*, 452(1–2), 333–343.

Charoongchit, P., Suksiriworapong, J., Mao, S., Sapin-Minet, A., Maincent, P. and Junyaprasert, V. B. (2017). Investigation of cationized triblock and diblock poly(ε-caprolactone)-co-poly(ethylene glycol) copolymers for oral delivery of enoxaparin: In vitro approach. *Acta Biomaterialia*, 61, 180–192.

Chen, R., Huang, C., Ke, Q., He, C., Wang, H. and Mo, X. (2010). Preparation and characterization of coaxial electrospun thermoplastic polyurethane/collagen compound nanofibers for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2), 315–325.

Chen, X., Wang, J., An, Q., Li, D., Liu, P., Zhu, W. and Mo, X. (2015). Electrospun poly(l-lactic acid-co-ε-caprolactone) fibers loaded with heparin and vascular endothelial growth factor to improve blood compatibility and endothelial progenitor cell proliferation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, 106–114.

Cho, S. Y., Sim, J. S., Kang, S. S., Jeong, C. S., Linhardt, R. J. and Kim, Y. S. (2003). Enhancement of heparin and heparin disaccharide absorption by the Phytolacca americana saponins. A*rchives of Pharmacal Research,* 26(12), 1102-1108.

Chronakis, I. S. (2010). Micro-/nano-fibers by electrospinning technology. In Qin Y. (Ed), *Micromanufacturing engineering and technology*. United Kingdom: William Andrew, pp. 264-266.

Cui, W., Chang, J. and Dalton, P. D. (2011). Electrospun fibers for drug delivery. *Comprehensive Biomaterials*, 4, 445-462.

De Jong, W. H., and Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133-149.

De Vrieze, S., Van Camp, T., Nelvig, A., Hagström, B., Westbroek, P. and De Clerck, K. (2009). The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science,* 44(5), 1357-1362.

Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. and Beck Tan, N. C. (2001). The effect of processing variables on the morphology of electrospun. *Polymer*, 42, 261–272.

Doğan, G. and Başal, G. (2009). Elektrolif çekim yöntemine göre elde edilen biyopolimer nanoliflerin ilaç salınım sistemleri yara örtüsü ve doku iskelesi olarak kullanımları. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi,* 3(2), 58-70.

Doshi, J. and Reneker, D. H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *Journal of Electrostatics*, 35(2-3), 151-160.

Dott, C., Tyagi, C., Tomar, L. K., Choonara, Y. E., Kumar, P., du Toit, L. C. and Pillay, V. (2013). A mucoadhesive electrospun nanofibrous matrix for rapid oramucosal drug delivery. *Journal of Nanomater*ials, 2013, 1-19

Dufresne, M. H. and Leroux, J. C. (2004). Study of the micellization behavior of different order amino block copolymers with heparin. *Pharmaceutical Research*, 21(1), 160-169.

Elahi, M. F., Lu, W., Guoping, G. and Khan, F. (2013). Core-shell fibers for biomedical applications-a review. *Journal of Bioenginering and Biomedical Science,* 3(1), 1-14.

Eleraky, N. E., Swarnakar, N. K., Mohamed, D. F., Attia, M. A. and Pauletti, G. M. (2020). Permeation-Enhancing Nanoparticle Formulation to Enable Oral Absorption of Enoxaparin. *American Association of Pharmaceutical Scientists,* 21(3), 1–11.

Ellison, C. J., Phatak, A., Giles, D. W., Macosko, C. W. and Bates, F. S. (2007). Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer*, 48(11), 3306–3316.

Esentürk, İ., Erdal, M. S. and Güngör, S. (2016). Electrospinning method to produce drug-loaded nanofibers for topical/transdermal drug delivery applications. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 46(1), 49-69.

Elsabee, M. Z., Naguib, H. F. and Morsi, R. E. (2012). Chitosan based nanofibers, review. *Materials Science and Engineering C*, 32(7), 1711–1726.

Evans, D. F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A. G., Dyson, T. J. and Hardcastle, J. D. (1988). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*, 29(8), 1035–1041.

Fan, B., Xing, Y., Zheng, Y., Sun, C. and Liang, G. (2016). PH-responsive thiolated chitosan nanoparticles for oral low-molecular weight heparin delivery: In vitro and in vivo evaluation. *Drug Delivery*, 23(1), 238–247.

Fan, R., Sun, Y., Li, B., Yang, R., Ma, W. and Sun, J. (2017). Preparation and stability investigation of tamsulosin hydrochloride sustained release pellets containing acrylic resin polymers with two different techniques. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(2), 193-201.

Giram, P. S., Shitole, A., Nande, S. S., Sharma, N. and Garnaik, B. (2018). Fast dissolving moxifloxacin hydrochloride antibiotic drug from electrospun Eudragit L-100 nonwoven nanofibrous Mats. *Materials Science and Engineering C*, 92(June), 526–539.

Goonoo, N., Bhaw-Luximon, A. and Jhurry, D. (2014). Drug loading and release from electrospun biodegradable nanofibers. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(9), 2173-2199.

Gonze, M. D., Manord, J. D., Leone-Bay, A., Baughman, R. A., Garrard, C. L., Sternbergh III, W. C. and Money, S. R. (1998). Orally administered heparin for preventing deep venous thrombosis. *The American Journal of Surgery,* 176(2), 176-178.

Gonze, M. D., Salartash, K., Sternbergh III, W. C., Baughman, R. A., Leone-Bay, A. and Money, S. R. (2000). Orally administered unfractionated heparin with carrier agent is therapeutic for deep venous thrombosis. *Circulation,* 101(22), 2658-2661.

Grabovac, V. and Bernkop-Schnürch, A. (2006). Improvement of the intestinal membrane permeability of low molecular weight heparin by complexation with stem bromelain. *International Journal of Pharmaceutics*, 326(1-2), 153-159.

Haider, A., Haider, S., Kang, I. K. (2018). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1165–1188.

Hales, D., Casteran, M., Sapin-Minet, A., Tomuţa, I., Achim, M., Vlase, L. and Maincent, P. (2015). Development of enoxaparin sodium polymeric microparticles for colon-specific delivery. *Clujul Medical,* 88(3), 357.

Hallan, S. S., Nidhi, Kaur, V., Jain, V. and Mishra, N. (2017). Development and characterization of polymer lipid hybrid nanoparticles for oral delivery of LMWH. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(8), 1631-1639.

Han, D. and Steckl, A. J. (2017). Selective pH-responsive Core–sheath nanofiber membranes for Chem/bio/med applications: targeted delivery of functional molecules. *ACS Applied Materials and Interfaces,* 9(49), 42653-42660.

He, C. L., Huang, Z. M., Han, X. J., Liu, L., Zhang, H. S. and Chen, L. S. (2006). Coaxial electrospun poly(L-lactic acid) ultrafine fibers for sustained drug delivery. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 45 B(4), 515–524.

He, X., Cheng, L., Zhang, X., Xiao, Q., Zhang, W. and Lu, C. (2015). Tissue engineering scaffolds electrospun from cotton cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 115, 485–493.

Hemeda, H., Kalz, J., Walenda, G., Lohmann, M. and Wagner, W. (2013). Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*, 15(9), 1174-1181.

Hirsh, J., Anand, S. S., Halperin, J. L. and Fuster, V. (2001). Guide to anticoagulant therapy: Heparin: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation,* 103(24), 2994-3018.

Hoffart, V., Ubrich, N., Simonin, C., Babak, V., Vigneron, C., Hoffman, M. and Maincent, P. (2002). Low molecular weight heparin-loaded polymeric nanoparticles: formulation, characterization, and release characteristics. *Drug development and Industrial pharmacy*, 28(9), 1091-1099.

Hoffart, V., Ubrich, N., Lamprecht, A., Bachelier, K., Vigneron, C., Lecompte, T., Hoffman, M. and Maincent, P. (2003). Microencapsulation of low molecular weight heparin into polymeric particles designed with biodegradable and nonbiodegradable polycationic polymers. *Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents*, 10(1), 1–7.

Hoffart, V., Lamprecht, A., Maincent, P., Lecompte, T., Vigneron, C. and Ubrich, N. (2006). Oral bioavailability of a low molecular weight heparin using a polymeric delivery system. *Journal of Controlled Release*, 113(1), 38–42.

Hohman, M. M., Shin, M., Rutledge, G. and Brenner, M. P. (2001). Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids,* 13(8), 2201-2220.

Hsu, K. H., Fang, S. P., Lin, C. L., Liao, Y. S., Yoon, Y. K. and Chauhan, A. (2016). Hybrid Electrospun Polycaprolactone Mats Consisting of Nanofibers and Microbeads for Extended Release of Dexamethasone. *Pharmaceutical Research*, 33(6), 1509–1516.

Hu, X., Liu, S., Zhou, G., Huang, Y., Xie, Z. and Jing, X. (2014). Electrospinning of polymeric nano fi bers for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 185, 12–21.

Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. (2003). A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 63(15), 2223–2253.

Huang, C., Chen, S., Lai, C., Reneker, D. H., Qiu, H., Ye, Y. and Hou, H. (2006). Electrospun polymer nanofibres with small diameters. *Nanotechnology*, 17(6), 1558–1563.

Illangakoon, U. E., Gill, H., Shearman, G. C., Parhizkar, M., Mahalingam, S., Chatterton, N. P. and Williams, G. R. (2014a). Fast dissolving paracetamol/caffeine nanofibers prepared by electrospinning. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1–2), 369–379.

Illangakoon, U. E., Nazir, T., Williams, G. R. and Chatterton, N. P. (2014b). Mebeverine-loaded electrospun nanofibers: Physicochemical characterization and dissolution studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(1), 283–292.

Illangakoon, U. E., Yu, D. G., Ahmad, B. S., Chatterton, N. P. and Williams, G. R. (2015). 5-Fluorouracil loaded Eudragit fibers prepared by electrospinning. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(2), 895–902.

İskenderoğlu, C. (2007). *Düşük molekül ağırlıklı heparinin oral ilaç şekli üzerine çalışmalar*, Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 164.

Iskenderoğlu, C., Acartürk, F., Erdoğan, D. and Bardakçi, Y. (2013). In vitro and in vivo investigation of low molecular weight heparin-alginate beads for oral administration. *Journal of Drug Targeting*, 21(4), 389–406.

Jarusuwannapoom, T., Hongrojjanawiwat, W., Jitjaicham, S., Wannatong, L., Nithitanakul, M., Pattamaprom, C., Koombhongse, P., Rangkupan, R. and Supaphol, P. (2005). Effect of solvents on electro-spinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. *European Polymer Journal*, 41(3), 409–421.

Jia, D., Gao, Y., Williams, G. R. (2017). Core/shell poly(ethylene oxide)/Eudragit fibers for site-specific release. *International Journal of Pharmaceutics*, 523(1), 376–385.

Jiang, Y. N., Mo, H. Y. and Yu, D. G. (2012). Electrospun drug-loaded core-sheath PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 438(1–2), 232–239.

Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Lecompte, T. and Maincent, P. (2002). In vitro and in vivo evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation*, 105(2), 230–235.

Kamble, P., Sadarani, B., Majumdar, A. and Bhullar, S. (2017). Nanofiber based drug delivery systems for skin: A promising therapeutic approach. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 41, 124–133.

Kanani, A. G. and Bahrami, S. H. (2011). Effect of changing solvents on poly (ε-caprolactone) nanofibrous webs morphology. *Journal of Nanomater,* 2011, 1-10.

Karewicz, A., Zasada, K., Szczubiałka, K., Zapotoczny, S., Lach, R. and Nowakowska, M. (2010). "Smart" alginate-hydroxypropylcellulose microbeads for controlled release of heparin. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1–2), 163–169.

Kaplan, M., Tuğcu-Demiröz, F., Vural, İ. and Çelebi, N. (2018). Development and characterization of gels and liposomes containing ovalbumin for nasal delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 44, 108-117.

Kast, C. E., Guggi, D., Langoth, N. and Bernkop-Schnürch, A. (2003). Development and in vivo evaluation of an oral delivery system for low molecular weight heparin based on thiolated polycarbophil. *Pharmaceutical Research,* 20(6), 931-936.

Kayaalp, O. (1992). *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Cilt 2. 6. Baskı. Ankara: Feryal Matbaacılık, 1386-1437.

Kenawy, E. R., Bowlin, G. L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D. G., Sanders, E. H. and Wnek, G. E. (2002). Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled Release*, 81(1–2), 57–64.

Khatun, Z., Nurunnabi, M., Cho, K. J., Byun, Y., Bae, Y. H. and Lee, Y. K. (2014). Oral absorption mechanism and anti-angiogenesis effect of taurocholic acid-linked heparin-docetaxel conjugates. *Journal of Controlled Release*, 177(1), 64–73.

Khoshbakht, S., Asghari-Sana, F., Fathi-Azarbayjani, A. and Sharifi, Y. (2020). Fabrication and characterization of tretinoin-loaded nanofiber for topical skin delivery. *Biomaterials Research,* 24(1), 1-7.

Kibria G., Ariful Islam K. M. and Jalil, R. U. (2009). Stability study of ambroxol hydrochloride sustained release pellets coated with acrylic polymer. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 36-43.

Kim, S. K., Lee, D. Y., Lee, E., Lee, Y. Kyu, Kim, C. Y., Moon, H. T. and Byun, Y. (2007). Absorption study of deoxycholic acid-heparin conjugate as a new form of oral anti-coagulant. *Journal of Controlled Release*, 120(1–2), 4–10.

Kim, J. Y., Al-Hilal, T. A., Chung, S. W., Kim, S. Y., Ryu, G. H., Son, W. C. and Byun, Y. (2015). Antiangiogenic and anticancer effect of an orally active low molecular weight heparin conjugates and its application to lung cancer chemoprevention. *Journal of Controlled Release*, 199, 122-131.

Ko, F. K. (2004). Nanofiber technology: Bridging the gap between nano and macro world. *Nanomaterials Handbook, Second Edition*, 603–628.

Kogan, A., Kesselman, E., Danino, D., Aserin, A. and Garti, N. (2008). Viability and permeability across Caco-2 cells of CBZ solubilized in fully dilutable microemulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 66(1), 1-12.

Komsuoğlu B., Tuncer C., Kulan K. Klinik Kardiyoloji-Kardiyovasküler (2000). *Farmakoloji-Kardiyovasküler İlaç Rehberi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 405-416.

Kulkarni, A., Bambole, V. A. and Mahanwar, P. A. (2010). Electrospinning of Polymers, Their Modeling and Applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 49(5), 427–441.

Kurmi, B., Tekchandani, P., Paliwal, R. and Paliwal, S. (2015). Nanocarriers in Improved Heparin Delivery: Recent Updates. *Current Pharmaceutical Design*, 21(30), 4509–4518.

Laffleur, F., Psenner, J. and Suchaoin, W. (2015). Permeation enhancement via thiolation: in vitro and ex vivo evaluation of hyaluronic acid-cysteine ethyl ester. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 104(7), 2153-2160.

Lamprecht, A., Ubrich, N. and Maincent, P. (2007). Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(3), 632–638.

Lavanya, N., Muzib, I., Jithan, A. and Umamahesh, B. (2017). Novel nanoparticles for the Oral Delivery of Low Molecular Weight Heparin: in Vitro and in Vivo Assessment. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(2), 254-261.

Lee, Y. K., Kim, S. H. and Byun, Y. (2000). Oral delivery of new heparin derivatives in rats. *Pharmaceutical Research*, 17(10), 1259–1264.

Lee, Y. K., Nam, J. H., Shin, H. C. and Byun, Y. (2001). Conjugation of low-molecular-weight heparin and deoxycholic acid for the development of a new oral anticoagulant agent. *Circulation*, 104(25), 3116–3120.

Lee, K. H., Kim, H. Y., Ryu, Y. J., Kim, K. W and Choi, S. W. (2003). Mechanical behavior of electrospun fiber mats of poly(vinyl chloride)/polyurethane polyblends. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 41(11), 1256–1262.

Lee, D. Y., Lee, J., Lee, S., Kim, S. K. and Byun, Y. (2007). Liphophilic complexation of heparin based on bile acid for oral delivery. *Journal of Controlled Release*, 123(1), 39–45.

Lemma, S. M., Bossard, F. and Rinaudo, M. (2016). Preparation of pure and stable chitosan nanofibers by electrospinning in the presence of poly(ethylene oxide). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1790.

Leone-Bay, A., Paton, D. R., Variano, B., Leipold, H., Rivera, T., Miura-Fraboni, J., Baughman, R. A. and Santiago, N. (1998). Acylated non-α-amino acids as novel agents for the oral delivery of heparin sodium, USP. *Journal of Controlled Release*, 50(1–3), 41–49.

Li, X., Kanjwal, M. A., Lin, L. and Chronakis, I. S. (2013). Electrospun polyvinyl-alcohol nanofibers as oral fast-dissolving delivery system of caffeine and riboflavin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 182–188.

Li, Z., and Wang, C. (2013). *One dimensional nanostructures*. (First edition). Berlin: Springer-Verlag, 15-28.

Li, J. J., Yang, Y. Y., Wang, K. and Yu, D. G. (2017). Eudragit E100 Nanofibers Fabricated with Varied Solvent Mixtures as the Sheath Working Fluids During Electrospinning. *DEStech Transactions on Biology and Health*, 2017, 42-48.

Lin, Y. H., Chang, C. H., Wu, Y. S., Hsu, Y. M., Chiou, S. F. and Chen, Y. J. (2009). Development of pH-responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-Helicobacter pylori therapy. *Biomaterials*, 30(19), 3332–3342.

Liu, G., Qiao, L. and Guo, A. (1996). Diblock copolymer nanofibers. *Macromolecules*, 29(16), 5508–5510.

Liu, Z., Jiao, Y., Liu, F. and Zhang, Z. (2007). Heparin/chitosan nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation. *Journal of Biomedical Materials Research,* 83(3), 806-812.

Loscertales, I. G., Barrero, A., Guerrero, I., Cortijo, R., Marquez, M. and Gañán-Calvo, A. M. (2002). Micro/nano encapsulation via electrified coaxial liquid jets. *Science*, 295(5560), 1695–1698.

Lu, Y., Huang, J., Yu, G., Cardenas, R., Wei, S., Wujcik, E. K. and Guo, Z. (2016). Coaxial electrospun fibers: applications in drug delivery and tissue engineering. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 8(5), 654-677.

Luong-Van, E., Grondahl, L., Chua, K. N., Leong, K. W., Nurcombe, V. and Cool, S. M. (2006). Controlled release of heparin from poly(ε-caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials*, 27(9), 2042–2050.

Macintosh, F. C. (1941). A colorimetric method for the standardization of heparin preparations. *Biochemical Journal*, 35(7), 776–782.

Mahjub, R., Heidari Shayesteh, T., Radmehr, M., Vafaei, S. Y., Amini, M., Dinarvand, R. and Dorkoosh, F. A. (2016). Preparation and optimization of N-trimethyl-O-carboxymethyl chitosan nanoparticles for delivery of low-molecular-weight heparin. *Pharmaceutical Development and Technology*, 21(1), 14–25.

Malik, R., Garg, T., Goyal, A. K. and Rath, G. (2015). Polymeric nanofibers: Targeted gastro-retentive drug delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 23(2), 109–124.

Malkov, D., Wang, H. Z., Dinh, S. and Gomez-Orellana, I. (2002). Pathway of oral absorption of heparin with sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate. *Pharmaceutical Research,* 19(8), 1180-1184.

Mansur, A. A. and Mansur, H. S. (2015). Quantum dot/glycol chitosan fluorescent nanoconjugates. *Nanoscale Research Letters,* 10(1), 1-9.

Martinová, L. and Lubasová, D. (2008). Electrospun Chitosan Based Nanofibers. *Research Journal of Textile and Apparel*, 12(2), 72–79.

Medeiros, E. S., Mattoso, L. H. C., Offeman, R. D., Wood, D. F. and Orts, W. J. (2008). Effect of relative humidity on the morphology of electrospun polymer fibers. *Canadian Journal of Chemistry*, 86(6), 590–599.

Megelski, S., Stephens, J. S., Chase, D. B. and Rabolt, J. F. (2002). Micro-and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules,* 35(22), 8456-8466.

Mehta, R., Chawla, A., Sharma, P. and Pawar, P. (2013). Formulation and in vitro evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 4(1), 31–41.

Meissner, Y., Ubrich, N., El Ghazouani, F., Maincent, P. and Lamprecht, A. (2007). Low molecular weight heparin loaded pH-sensitive microparticles. *International Journal of Pharmaceutics,* 335(1-2), 147-153.

Mendes, A. C., Moreno, J. S., Hanif, M., Douglas, T. E. L., Chen, M. and Chronakis, I. S. (2018). Morphological, mechanical and mucoadhesive properties of electrospun chitosan/phospholipid hybrid nanofibers. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2266.

Mishra, R. K., Mishra, P., Verma, K., Mondal, A., Chaudhary, R. G., Abolhasani, M. M. and Loganathan, S. (2019). Electrospinning production of nanofibrous membranes. *Environmental Chemistry Letter*s, 17(2), 767-800.

Moghe, A. K. and Gupta, B. S. (2008). Co-axial electrospinning for nanofiber structures: Preparation and applications. *Polymer Reviews*, 48(2), 353–377.

Mohammadian, F. and Eatemadi, A. (2017). Drug loading and delivery using nanofibers scaffolds. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology,* 45(5), 881-888.

Motlekar, N. A., Srivenugopal, K. S., Wachtel, M. S. and Youan, B. B. C. (2006). Modulation of gastrointestinal permeability of low-molecular-weight heparin by L-arginine: in-vivo and in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology,* 58(5), 591-598.

Motlekar, N. A., Srivenugopal, K. S., Wachtel, M. S. and Youan, B. B. C. (2005). Oral delivery of low-molecular-weight heparin using sodium caprate as absorption enhancer reaches therapeutic levels. *Journal of Drug Targeting*, 13(10), 573.

Mousa, S. A., Zhang, F., Aljada, A., Chaturvedi, S., Takieddin, M., Zhang, H. and Linhardt, R. J. (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral heparin solid dosage form in healthy human subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47(12), 1508-1520.

Nagpal, K., Singh, S. K. and Mishra, D. N. (2010). Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(11), 1423–1430.

Nallaguntla, L., Muzib, Y., Aukunuru, J. and Balekari, U. (2016). Preparation and evaluation of a novel oral delivery system for low molecular weight heparin. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 6(3), 148-157.

Nayak, R., Padhye, R., Kyratzis, I. L., Truong, Y. B. and Arnold, L. (2012). Recent advances in nanofibre fabrication techniques. *Textile Research Journal*, 82(2), 129–147.

Neves, A. R., Correia-da-Silva, M., Sousa, E. and Pinto, M. (2016). Strategies to overcome heparins' low oral bioavailability. *Pharmaceuticals,* 9(3), 37.

Niu, H., Zhou, H. and Wang, H. (2019). Electrospinning: an advanced nanofiber production technology. *Energy Harvesting Properties of Electrospun Nanofibers*, 1, 1-44.

Okutan, N., Terzi, P. and Altay, F. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids*, 39, 19–26.

Omollo, E., Zhang, C., Mwasiagi, J. I. and Ncube, S. (2016). Electrospinning cellulose acetate nanofibers and a study of their possible use in high-efficiency filtration. *Journal of Industrial Textiles*, 45(5), 716-729.

O'Reilly, R. A. (1995). Pıhtılaşma bozukluklarında kullanılan ilaçlar. B.,G. Katzung (Editör), Çev: Özüner Z, Süzer Ö. *Temel ve Klinik Farmakoloji,* Cilt 2. 6 baskı. İstanbul: Barış Kitabevi, 672-690.

Paliwal, R., Paliwal, S. R., Agrawal, G. P. and Vyas, S. P. (2011a). Recent advances in search of oral heparin therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, 32(2), 388-409.

Paliwal, R., Paliwal, S. R., Agrawal, G. P. and Vyas, S. P. (2011b). Biomimetic solid lipid nanoparticles for oral bioavailability enhancement of low molecular weight heparin and its lipid conjugates: in vitro and in vivo evaluation. *Molecular Pharmaceutics*, 8(4), 1314-1321.

Paliwal, R., Paliwal, S. R., Agrawal, G. P. and Vyas, S. P. (2012). Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 422(1–2), 179–184.

Patra, C. N., Priya, R., Swain, S., Kumar Jena, G., Panigrahi, K. C. and Ghose, D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 33–45.

Park, J. H., Karim, M. R., Kim, I. K., Cheong, I. W., Kim, J. W., Bae, D. G. and Yeum, J. H. (2010). Electrospinning fabrication and characterization of poly (vinyl alcohol)/montmorillonite/silver hybrid nanofibers for antibacterial applications. *Colloid and Polymer Science*, 288(1), 115-121.

Pelipenko, J., Kocbek, P. and Kristl, J. (2015). Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, 484(1–2), 57–74.

Pelipenko, J., Kristl, J., Janković, B., Baumgartner, S. and Kocbek, P. (2013). The impact of relative humidity during electrospinning on the morphology and mechanical properties of nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1), 125–134.

Pérez-González, G. L., Villarreal-Gómez, L. J., Serrano-Medina, A., Torres-Martínez, E. J. and Cornejo-Bravo, J. M. (2019). Mucoadhesive electrospun nanofibers for drug delivery systems: applications of polymers and the parameters' roles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 5271–5285.

Pillay, V., Dott, C., Choonara, Y. E., Tyagi, C., Tomar, L., Kumar, P., Du Toit, L. C. and Ndesendo, V. M. K. (2013). A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. *Journal of Nanomaterials*, 2013, 1-22.

Prasad, Y. R., Minamimoto, T., Yoshikawa, Y., Shibata, N., Mori, S., Matsuura, A. and Takada, K. (2004). In situ intestinal absorption studies on low molecular weight heparin in rats using Labrasol as absorption enhancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 271(1-2), 225-232.

Ray, S. S., Chen, S. S., Li, C. W., Nguyen, N. C. and Nguyen, H. T. (2016). A comprehensive review: Electrospinning technique for fabrication and surface modification of membranes for water treatment application. *RSC Advances*, 6(88), 85495–85514.

Reda, R. I., Wen, M. M., and El-Kamel, A. H. (2017). Ketoprofen-loaded Eudragit electrospun nanofibers for the treatment of oral mucositis. I*nternational Journal of Nanomedicine,* 12, 2335.

Reinas, A. E., Hoscheid, J., Outuki, P. M. and Cardoso, M. L. C. (2014). Preparation and characterization of microcapsules of Pterodon pubescens Benth. By using natural polymers. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(4), 919–930.

Reneker, D. H., Kataphinan, W., Theron, A., Zussman, E. and Yarin, A. L. (2002). Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning. *Polymer*, 43(25), 6785–6794.

Reneker, Darrell H. and Yarin, A. L. (2008). Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, 49(10), 2387–2425.

Rivera, T. M., Leone-Bay, A., Paton, D. R., Leipold, H. R. and Baughman, R. A. (1997). Oral delivery of heparin in combination with sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl) amino] caprylate: pharmacological considerations. *Pharmaceutical Research,* 14(12), 1830.

Rüzgar, G., Birer, M., Tort, S. and Acartürk, F. (2013). Studies on improvement of water-solubility of curcumin with electrospun nanofibers. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 143–149.

Salartash, K., Gonze, M. D., Leone-Bay, A., Baughman, R., Sternbergh III, W. C. and Money, S. R. (1999). Oral low–molecular weight heparin and delivery agent prevents jugular venous thrombosis in the rat. *Journal of Vascular Surgery,* 30(3), 526-532.

Samprasit, W., Akkaramongkolporn, P., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., Kaomongkolgit, R. and Opanasopit, P. (2015). Fast releasing oral electrospun PVP/CD nanofiber mats of taste-masked meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics*, 487(1–2), 213–222.

Sandri, G., Cristina, M., Rossi, S., Ferrari, F., Gibin, S., Zambito, Y., Di, G. and Caramella, C. (2007). Nanoparticles based on N -trimethylchitosan : Evaluation of absorption properties using in vitro (Caco-2 cells) and ex vivo (excised rat jejunum) models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 65(1) 68–77.

Sang, K. K., Eun, H. L., Vaishali, B., Lee, S., Lee, Y. K., Kim, C. Y., Hyun, T. M. and Byun, Y. (2005). Tricaprylin microemulsion for oral delivery of low molecular weight heparin conjugates. *Journal of Controlled Release*, 105(1–2), 32–42.

Schiffman, J. D. and Schauer, C. L. (2008). A review: electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polymer Reviews,* 48(2), 317-352.

Schmitz, T., Leitner, V. M. and Bernkop-Schnürch, A. (2005). Oral heparin delivery: Design and in vivo evaluation of a stomach-targeted mucoadhesive delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(5), 966–973.

Shahbazi, M. A. and Hamidi, M. (2013). The impact of preparation parameters on typical attributes of chitosan-heparin nanohydrogels: Particle size, loading efficiency, and drug release. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39(11), 1774–1782.

Sharma, A., Gupta, A., Rath, G., Goyal, A., Mathur, R. B. and Dhakate, S. R. (2013). Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(27), 3410–3418.

Sharma, R., Singh, H., Joshi, M., Sharma, A., Garg, T., Goyal, A. K. and Rath, G. (2014). Recent advances in polymeric electrospun nanofibers for drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 31(3), 187–217.

Shen, X., Yu, D., Zhu, L., Branford-White, C., White, K. and Chatterton, N. P. (2011). Electrospun diclofenac sodium loaded Eudragit® L 100-55 nanofibers for colon-targeted drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 408(1–2), 200–207.

Sill, T. J. and Von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006.

Silva, N. H. C. S., Mota, J. P., de Almeida, T. S., Carvalho, J. P. F., Silvestre, A. J. D., Vilela, C., Rosado, C. and Freire, C. S. R. (2020). Topical drug delivery systems based on bacterial nanocellulose: Accelerated stability testing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1262.

Singh, A. K. (2016). Nanoparticle Pharmacokinetics and Toxicokinetics. In *Engineered Nanoparticles*, 229-293.

Sipos, E., Kósa, N., Kazsoki, A., Szabó, Z. I. and Zelkó, R. (2019). Formulation and characterization of aceclofenac-loaded nanofiber based orally dissolving webs. *Pharmaceutics*, 11(8), 1–11.

Sipos, E., Szabó, Z. I., Rédai, E., Szabó, P., Sebe, I. and Zelkó, R. (2016). Preparation and characterization of nanofibrous sheets for enhanced oral dissolution of nebivolol hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 224–228.

Sirc, J., Hobzová, R., Kostina, N., Munzarová, M., Juklíčková, M., Lhotka, M., Kubinová, Š., Zajícová, A. and Michálek, J. (2012). Morphological characterization of nanofibers: Methods and application in practice. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 1-14.

Smith, P. K., Mallia, A. K. and Hermanson, G. T. (1980). Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparation. *Analytical Biochemistry,* 109(2), 466–473.

Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S. and Park, W. H. (2004). The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 45(9), 2959–2966.

Son, Y. J., Kim, Y., Kim, W. J., Jeong, S. Y. and Yoo, H. S. (2015). Antibacterial Nanofibrous Mats Composed of Eudragit for pH-Dependent Dissolution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(8), 2611-2618.

Sridhar, S., Venugopal, J. R., Sridhar, R. and Ramakrishna, S. (2015). Cardiogenic differentiation of mesenchymal stem cells with gold nanoparticle loaded functionalized nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 134, 346-354.

Stephansen, K., García-Díaz, M., Jessen, F., Chronakis, I. S. and Nielsen, H. M. (2015). Bioactive protein-based nanofibers interact with intestinal biological components resulting in transepithelial permeation of a therapeutic protein. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(1), 58–66.

Su, Y., Li, X., Liu, Y., Su, Q., Qiang, M. L. W. and Mo, X. (2011). Encapsulation and controlled release of heparin from electrospun poly (l-lactide-co-ε-caprolactone) nanofibers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,* 22(1-3), 165-177.

Sultanova, Z., Kaleli, G., Kabay, G. and Mutlu, M. (2016). Controlled release of a hydrophilic drug from coaxially electrospun polycaprolactone nanofibers. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 133–138.

Sun, W., Mao, S., Wang, Y., Junyaprasert, V. B., Zhang, T., Na, L. and Wang, J. (2010). Bioadhesion and oral absorption of enoxaparin nanocomplexes. *International Journal of Pharmaceutics,* 386(1-2), 275-281.

Sun, B., Long, Y. Z., Zhang, H. D., Li, M. M., Duvail, J. L., Jiang, X. Y. and Yin, H. L. (2014). Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. *Progress in Polymer Science,* 39(5), 862-890.

Süpüren Mengüç, G., Kanat, Z., Çay, A., Kırcı, T., Gülümser, T. and Tarakçıoğlu, I. (2007). Nano Lifler (Bölüm 2). *Tekstil ve Konfeksiyon,* 17(2), 83-89.

Taepaiboon, P., Rungsardthong, U. and Supaphol, P. (2006). Drug-loaded electrospun mats of poly (vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology,* 17(9), 2317.

Tang, B., Qian, Y. and Fang, G. (2020). Development of lipid–polymer hybrid nanoparticles for improving oral absorption of enoxaparin. *Pharmaceutics*, *12*(7), 1–11.

Thakkar, S. and Misra, M. (2017). Electrospun polymeric nanofibers : New horizons in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(June), 148–167.

Thanou, M., Verhoef, J. C., Nihot, M. T., Verheijden, J. H. and Junginger, H. E. (2001a). Enhancement of the intestinal absorption of low molecular weight heparin (LMWH) in rats and pigs using Carbopol (R) 934P. *Pharmaceutical Research,* 18(11), 1638.

Thanou, M., Nihot, M. T., Jansen, M., Verhoef, J. C. and Junginger, H. E. (2001b). Mono-N-carboxymethyl chitosan (MCC), a polyampholytic chitosan derivative, enhances the intestinal absorption of low molecular weight heparin across intestinal epithelia in vitro and in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(1), 38–46.

Tort, S. and Acartürk, F. (2015). Wound Healing and Electrospun Wound Dressings: Review. *Turkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 4(2), 68–78.

Tort, S. and Acartürk, F. (2016). Preparation and characterization of electrospun nanofibers containing glutamine. *Carbohydrate Polymers*, 152, 802–814.

Tort, S., Acartürk, F. and Beşikci, A. (2017). Evaluation of three-layered doxycycline-collagen loaded nanofiber wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), 642–653.

Trapani, A., Garcia-Fuentes, M. and Alonso, M. J. (2008). Novel drug nanocarriers combining hydrophilic cyclodextrins and chitosan. *Nanotechnology*, 19(18),185101.

Trapani, Adriana, Di Gioia, S., Ditaranto, N., Cioffi, N., Goycoolea, F. M., Carbone, A., Garcia-Fuentes, M., Conese, M. and Alonso, M. J. (2013). Systemic heparin delivery by the pulmonary route using chitosan and glycol chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutic*s, 447(1–2), 115–123.

Tungprapa, S., Jangchud, I. and Supaphol, P. (2007). Release characteristics of four model drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats. *Polymer*, 48(17), 5030–5041.

Turaç, N. ve Ünsal, A. (2020). Düşük Molekül Ağirlikli Heparin Uygulamasi. *Journal of Anatolia Nursing and Health Sciences*, 23(1), 169–175.

Unnithan, A. R., Gnanasekaran, G., Sathishkumar, Y., Lee, Y. S. and Kim, C. S. (2014). Electrospun antibacterial polyurethane-cellulose acetate-zein composite mats for wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 102(1), 884–892.

Van der Schueren, L., Steyaert, I., De Schoenmaker, B. and De Clerck, K. (2012). Polycaprolactone/chitosan blend nanofibres electrospun from an acetic acid/formic acid solvent system. *Carbohydrate Polymers*, 88(4), 1221-1226.

Van Roessel, S., Middeldorp, S., Cheung, Y. W., Zwinderman, A. H. and de Pont, A. C. (2014). Accuracy of aPTT monitoring in critically ill patients treated with unfractionated heparin. *New England Journal of Medicin*e, 72(6), 305-310.

Vasudev, S. C., Chandy, T. and Sharma, C. P. (1997). Development of chitosan/polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin-heparin for preventing cardiovascular thrombosis. *Biomaterials,* 18(5), 375-381.

Vasudev, S. C., Chandy, T., Sharma, C. P., Mohanty, M. and Umasankar, P. R. (2000). Synergistic effect of released aspirin/heparin for preventing bovine pericardial calcification. *Artificial Organs,* 24(2), 129-136.

Volpe, D. A., Faustino, P. J., Ciavarella, A. B., Asafu-Adjaye, E. B., Ellison, C. D., Yu, L. X. and Hussain, A. S. (2007). Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24(1), 39–47.

Wang, Y., Qiao, W., Wang, B., Zhang, Y., Shao, P. and Yin, T. (2011). Electrospun composite nanofibers containing nanoparticles for the programmable release of dual drugs. *Polymer Journal*, 43(5), 478–483.

Wang, J., An, Q., Li, D., Wu, T., Chen, W., Sun, B., EI-Hamshary, H., Al-Deyab, S. S., Zhu, W. and Mo, X. (2015). Heparin and vascular endothelial growth factor loaded poly(l-lactide-co-caprolactone) nanofiber covered stent-graft for aneurysm treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(11), 1947–1960.

Williams, G. R., Raimi-Abraham, B. T. and Luo, C. J. (2018). *Electrospinning fundamentals*. Nanofibres in Drug Delivery; UCL Press: London, UK, 24-59.

Windsor, E. and Cronheim, G. E. (1961). Gastro-intestinal absorption of heparin and synthetic heparinoids. *Nature*, 190, 263–264.

Xing, X., Wang, Y., Li, B. (2008). Nanofibers drawing and nanodevices assembly in poly(trimethylene terephthalate. *Optics Express,* 16(14), 16815.

Yan, Y., Sun, Y., Wang, P., Zhang, R., Huo, C., Gao, T., Song, C., Xing, J. and Dong, Y. (2020). Mucoadhesive nanoparticles-based oral drug delivery systems enhance ameliorative effects of low molecular weight heparin on experimental colitis. *Carbohydrate Polymers*, 246(277), 116660.

Yang, Q., Zhenyu, L. I., Hong, Y., Zhao, Y., Qiu, S., Wang, C. E. and Wei, Y. (2004). Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 42(20), 3721–3726.

Ye, Y. J., Zhou, Y. Q., Jing, Z. Y., Liu, Y. Y. and Yin, D. C. (2018). Electrospun Heparin-Loaded Core–Shell Nanofiber Sutures for Achilles Tendon Regeneration In Vivo. *Macromolecular Bioscience,* 18(7), 1800041.

Yee, S. (1997). In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - Fact or myth. Içinde *Pharmaceutical Research,* 14(6) 763–766.

Yıldız, A., Okyar, A., Baktır, G., Araman, A. and Özsoy, Y. (2005). Nasal administration of heparin-loaded microspheres based on poly (lactic acid). *Il Farmaco,* 60(11-12), 919-924.

Yıldız-Peköz, A. and Özsoy, Y. (2017). Inhaled heparin: therapeutic efficacy and recent formulations. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 30(3), 143-156.

Yu, D. G., Shen, X. X., Branford-White, C., White, K., Zhu, L. M. and Bligh, S. A. (2009). Oral fast-dissolving drug delivery membranes prepared from electrospun polyvinylpyrrolidone ultrafine fibers. *Nanotechnology,* 20(5), 055104.

Yu, D. G., Branford-White, C., Shen, X. X., Zhang, X. F. and Zhu, L. M. (2010). Solid dispersions of ketoprofen in drug-loaded electrospun nanofibers. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(7), 902-908.

Yu, D. G., Wang, X., Li, X. Y., Chian, W., Li, Y. and Liao, Y. Z. (2013). Electrospun biphasic drug release polyvinylpyrrolidone/ethyl cellulose core/sheath nanofibers. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5665–5672.

Yuan, X., Zhang, Y., Dong, C. and Sheng, J. (2004). Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. *Polymer International,* 53(11), 1704-1710.

Zagho, M. M. and Elzatahry, A. (2016). Recent Trends in Electrospinning of Polymer Nanofibers and their Applications as Templates for Metal Oxide Nanofibers Preparation. *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*, 1, 3–24.

Zambito, Y. (2013). Nanoparticles Based on Chitosan Derivatives. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, 2013, 243-263.

Żarska, M., Dzida, M. and Apelblat, A. (2017). Surface tensions and densities of concentrated aqueous solutions of citric acid. *Journal of Molecular Liquids*, 228, 91-95

Zhang, C., Yuan, X., Wu, L., Han, Y. and Sheng, J. (2005). Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal*, 41(3), 423–432.

Zheng, J. Y., Zhuang, M. F., Yu, Z. J., Zheng, G. F., Zhao, Y., Wang, H. and Sun, D. H. (2014). The effect of surfactants on the diameter and morphology of electrospun ultrafine nanofiber. *Journal of Nanomaterials,* 2014, 1-9.

Zong, X., Kim, K., Fang, D., Ran, S., Hsiao, B. S. and Chu, B. (2002). Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer,* 43(16), 4403-4412.

Zuo, W., Zhu, M., Yang, W., Yu, H., Chen, Y. and Zhang, Y. (2005). Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning. *Polymer Engineering and Science*, 45(5), 704–709.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 24/12/2016-E.156791

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Füsun ACARTÜRK, Gamze RÜZGAR ve Serdar TORT'tan oluşan, G.Ü.ET-16.079 kod numaralı ve "***Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin Oral Verilmesi Amacıyla Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi***" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-16.079 and entitled ***"Development and Evaluation of Activity of Nano-Delivery Systems Containing Low Molecular Weight Heparin for Oral Administration"*** is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Commitee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Tavşan Yeni Zelanda
Hayvan Sayısı : 46

Ek:1 Liste

Aslı Gibidir
T.C.G.Ü. HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ankara
Tel 0 (312) 202 20 57 Faks 0 (312) 202 20 ..
e-Posta hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için Nursel Güner
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No 202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :16.12.2016 TOPLANTI SAYİSİ : 14

ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdülkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Uzm.Dr.Müryide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

Aslı Gibidir
T.C.G.Ü. HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
Prof. Dr. Abdülkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Rüzgar Özemre, Gamze

Uyruğu : TC

Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2015-Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi	2012
Lise	TED Kayseri Koleji Vakfı Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-Devam ediyorum	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Rüzgar, G., Birer, M., Tort, S., and Acartürk, F. (2013). Studies on improvement of water-solubility of curcumin with electrospun nanofibers. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 143.

Bildiriler

Rüzgar Özemre, G., Tort, S., and Acartürk, F. (2015, Kasım). *Studies on improvement of water solubility with electrospun nanofibers i curcumin*- GPSS, Türkiye (poster)

Rüzgar Özemre, G., Tort, S., and Acartürk, F. (2018, Eylül). *Preparation and characterization of low molecular weight heparin loaded coaxial nanofibers*. 19th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS, Türkiye (poster)

Rüzgar Özemre, G., Tort, S., and Acartürk, F. (2018, Temmuz). *Preparation of heparin-loaded nanofibers using two different core solutions*. 12th International Symposium on Pharmaceutical. ISOPS, Türkiye (poster)

Rüzgar Özemre, G., Tort, S., and Acartürk, F. (2018, Mart). *Development and evaluation of nanofiber containing low molecular weight heparin for oral administration PBP*-11th World Meeting on Pharmaceutics Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. İspanya (poster)

Rüzgar Özemre, G., Tort, S., and Acartürk, F. (2018, Eylül). *Low molecular weight heparin loaded nanofibers prepared with different core polymer solutions*. 17th Annual Congress on Pharmaceutics Drug Delivery Systems, Prag (sözlü bildiri)



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR…

