T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RİBOSİKLİB İLACI İÇİN ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE TRANSDERMAL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ, İLAÇ SALIM VE *İN VİTRO* ETKİNLİK ÇALIŞMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nermin GÜNDÜZ

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

Temmuz 2024

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RİBOSİKLİB İLACI İÇİN ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE TRANSDERMAL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ, İLAÇ SALIM VE *İN VİTRO* ETKİNLİK ÇALIŞMALARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nermin GÜNDÜZ
36203613030

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Burhan ATEŞ
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sevgi BALCIOĞLU

Temmuz 2024

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca her aşamasında maddi ve manevi olarak yardım, öneri, tecrübe ve desteklerini esirgemeden bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan ve beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e,

Çalışmalarımda her konuda fikir danıştığım, beni sabırla dinleyen, hatalarım olduğunda çözüm bulmam için yanımda olan ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Sevgi BALCIOĞLU'na,

Çalışmalarım boyunca yanımda olan Ali KURUÇAY'a, desteğini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Tuğba AYGÜN ve Emine Büşra KAPLAN'a,

Tüm hayatım boyunca her konuda desteklerini gördüğüm, bugünlere gelmemi sağlayan aileme,

Tezin uygulama aşamasında FYL-2023-3196 çalışma numarası ile bu Yüksek Lisans tezimi desteklediği için İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Çalışmaleri Birimi'ne,

Tezin uygulama aşamasında 123Z470 çalışma numarası ile bu Yüksek Lisans tezimi desteklediği için ve bana TÜBİTAK-1002 programı kapsamında burs bağladığı için TUBİTAK'a,

Her zorlukta yanımda olan nişanlım Sabri TAVLAR'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum "Ribosiklib İlacı İçin Elektroeğirme Yöntemi ile Transdermal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, İlaç Salım ve *İn Vitro* Etkinlik Çalışmaları" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Nermin GÜNDÜZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**
ONUR SÖZÜ ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
SEMBOLLER VE KISALTMALAR ..... **viii**
ÖZET ..... **x**
ABSTRACT ..... **xi**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Meme Kanseri 3
2.2. Meme Kanserinde Kullanılan Tedaviler 6
2.3. Meme Kanseri Risk Faktörleri 7
2.4. Meme Kanseri Tedavisindeki Güncel Yaklaşımlar 8
2.4.1. Nanopartiküller/Parçacıklar 8
2.4.2. Genetik parmak izi/fingerprint ve gen terapi 9
2.4.3. Sinyal yolakları 9
3. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER VE KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI **11**
3.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler 11
3.1.1. Lipozomlar 11
3.1.2. Dendrimerler 11
3.1.3. Miseller 12
3.1.4. Polimerik Nanopartiküller 12
3.1.5. Nanolifler 12
3.1.6. Transdermal yamalar 13
3.2. Kontrollü İlaç Salımı 14
3.2.1. İlaç salım yolları 15
3.2.1.1. Oral yolla salım 15
3.2.1.2. Akciğerlere salım 15
3.2.1.3. Transdermal yolla salım 16
3.2.1.4. Diğer salım yolları 18
3.3. İlaç Salım Mekanizmaları 18
3.3.1. Difüzyon kontrollü sistemler 18
3.3.1.1. Membran (rezervuar) sistemler 19
3.3.1.2. Matriks (monolitik) sistemler 19
3.3.2. Çözünme kontrollü sistemler 20
3.3.3. Su-Geçiş kontrollü sistemler 20
3.3.6.1. Zincire takılı sistemler 22
4. MATERYAL VE YÖNTEM **23**
4.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler 23
4.2. Çalışmada kullanılan araç-gereçler 23
4.3. Mikrobiyal kondroitin sülfat üretimi 24
4.3.1. Mikrobiyal kondroitin üretimi 24
4.3.2. Kondroitin sülfatlama işlemi 25
4.4. Transdermal yamaların hazırlanması ve karakterizasyonu 25

4.4.1. Elektroeğrilmiş ilaç rezervuarının üretilmesi 26
4.4.2. Elektroeğrilmiş ilaç salım katmanının üretilmesi 27
4.4.3. Yapışkan katmanın üretimi 27
4.5. Transdermal yamaların yapısal, termal ve morfolojik karakterizasyonu ...28
4.6. Transdermal yamaların biyokimyasal karakterizasyonları 28
4.6.1. Transdermal yamaların şişme derecesinin belirlenmesi 28
4.6.2. Transdermal yama kalınlıklarının belirlenmesi 29
4.6.3. Transdermal yamaların katlama dayanıklılığı 29
4.6.4. Ağırlık homojenliği 29
4.6.5. Transdermal yamaların soyulma direncinin belirlenmesi 29
4.6.6. Transdermal yamaların ilaç tutma verimliliği 29
4.6.7. Transdermal yamaların *in vitro* ilaç salım düzeylerinin belirlenmesi 30
4.7. Transdermal yamaların *in vitro* etkinliğinin belirlenmesi 30
4.7.1. Transdermal yamaların *in vitro* biyouyumluluklarının belirlenmesi..30
4.7.2. Transdermal yamaların *in vitro* antikanser aktivitesinin belirlenmesi31
4.7.3. *İn vitro* difüzyon testi 31
4.8. İstatistiksel analizler 32
5. BULGULAR 33
5.1. Mikrobiyal kondroitin sülfat yapısının karakterizasyonu....33
5.2. Transdermal yamaların hazırlanması ve yapısal, termal ve morfolojik karakterizasyonları....34
5.2.1. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 transdermal yamalarının yapısal karakterizasyonları 35
5.2.2. P-CS-1-R, P-CS-2-R, P-CS-4-R transdermal yamalarının FTIR sonuçları 36
5.2.3. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA, P-CS-4-TA transdermal yamalarının FTIR sonuçları 38
5.2.4. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 transdermal yamalarının termal karakterizasyonları 38
5.2.5. P-CS-1-R, P-CS-2-R, P-CS-4-R transdermal yamalarının termal karakterizasyonları 42
5.2.6. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA transdermal yamalarının termal karakterizasyonları 44
5.2.7. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 transdermal yamalarının SEM analiz sonuçları 46
5.3. Transdermal yamaların biyokimyasal karakterizasyonları 48
5.3.1. Transdermal yamaların şişme derecesinin belirlenmesi 49
5.3.2. Transdermal yamaların yama kalınlıklarının belirlenmesi 50
5.3.3. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 yamalarının katlama dayanıklılığı....51
5.3.4. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 yamalarının ağırlık homojenliği 52
5.3.5. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait soyulma direnci sonuçları 52
5.3.6. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR, P-CS-4-RR transdermal yamalarına ait ilaç tutma verimliliği 53
5.3.7. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarının verimliliği 55
5.3.8. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR ve P-CS-4-RR transdermal yamalarına ait *in vitro* ilaç salımı düzeylerinin belirlenmesi 56
5.3.9. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarına ait *in vitro* ilaç salımı düzeylerinin belirlenmesi 57

5.4. Transdermal Yamaların *İn Vitro* Etkinliğinin Belirlenmesi 58
5.4.1. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 transdermal yamaların *in vitro* biyouyumluluklarının belirlenmesi 58
5.4.2. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 transdermal yamalarına ait *in vitro* antikanser aktivitesinin belirlenmesi 60
5.4.3. *İn vitro* difüzyon testi sonuçları.....62
6. TARTIŞMA ve SONUÇ.....64
7. KAYNAKLAR.....72
ÖZGEÇMİŞ…….…… 77

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Meme kanserinin yayılımının şematik gösterimi……..…4
Şekil 2. 2. Palbosiklib'in kimyasal yapısı…….....4
Şekil 2. 3. Abemasiklib'in kimyasal yapısı…….……..5
Şekil 2. 4. Ribosiklib'in kimyasal yapısı…….……6
Şekil 3. 1. İlaç taşıyıcı sistemler…….….13
Şekil 3.2. Transdermal yamanın deriye uygulanması ve ilacın yayılması……17
Şekil 4.1. Kondroitin üretimi……...…….……25
Şekil 4.2. Hazırlanacak transdermal yama dizaynı…….……26
Şekil 4.3. Rezervuar ve ilaç salım katmanı üretilmesinin şematik gösterimi…….……..27
Şekil 4.4. Franz difüzyon hücresi dizaynı …….……..32
Şekil 5.1. Mikrobiyal kondroitin sülfatın MALDI TOF kromotogramı…….…..34
Şekil 5.2. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 transdermal yamaların FTIR spektrumları…..…..…36
Şekil 5.3. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R ve Ribosiklib'in FTIR spectrumları……37
Şekil 5.4. P-CS-4-R ve P-CS-4'e ait FTIR spectrumları ……...…….….37
Şekil 5.5. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA'ya ait FTIR spectrumları…….….38
Şekil 5.6. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4'e ait TGA termogramları…….……39
Şekil 5.7. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4'e ait DSC termogramları…….……40
Şekil 5.8. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4'e ait DTA termogramları……..……40
Şekil 5.9. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R'ye ait TGA termogramları……41
Şekil 5.10. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-R-4'ye ait DSC termogramları……..42
Şekil 5.11. . P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-R-4'ye ait DTA termogramları……42
Şekil 5. 1. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA'ya ait TGA termogramları…….43
Şekil 5. 2. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-R-TA'ya ait DSC termogramları……44
Şekil 5.14. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-R-TA'ye ait DTA termogramları….……44
Şekil 5.15. Transdermal yamaların SEM görüntüleri; **a)** P-CS-1 yamasına ait, **b)** P-CS-2 yamasına ait ve **c)** P-CS-4 yamasına ait SEM görüntüsü…….……..45
Şekil 5.16. Transdermal yapaların ortalama fiber çapları ve dağılımı……..46
Şekil 5.17. Tannik asitle kaplı yamanın deri üzerine yapışması……...46
Şekil 5.18. Tannik asit içeren ve tannik asit içermeyen yamaların SEM görüntüleri..…47

Şekil 5.19. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 polimerlerinin şişme dereceleri……..49

Şekil 5.20. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait kalınlık homojeniteleri……....49

Şekil 5.21. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait katlama dayanıklılığı sonuçları….50

Şekil 5.22. P-CS-1(a), P-CS-2(b), P-CS-4(c)yamalarının katlama sonrası deformasyonları…….50

Şekil 5.23. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait ağırlık homojeniteleri ……..…..51

Şekil 5.24. Soyulma direnci anaizi sonucunda kPa değerleri……...52

Şekil 5.25. Ribosiklib'in kalibrasyon grafiği……....53

Şekil 5.26. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR ve P-CS-4-RR transdermal yamalarına ait % ilaç tutma verimliliği sonuçları……..54

Şekil 5.27. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarına ait % ilaç tutma verimliliği…….……..……..55

Şekil 5.28. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR, P-CS-4-RR transdermal yamalarının % ilaç salım grafiği…….…..56

Şekil 5.29. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarının % ilaç salım grafiğ…….……....57

Şekil 5.30. .P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait % hücre canlılığ…...……..……58

Şekil 5.31. Transdermal yamaların L-929 hücreleri üzerindeki morfolojik etkileri; **A)**Kontrol, **B)** P-CS-1, **C)** P-CS-2, **D)** P-CS-4 transdermal yama grupları ……...59

Şekil 5.32. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R yamalarının % inhibisyonu…….60

Şekil 5.33. Ribosiklib içerikli transdermal yamaların MCF-7 hücreleri üzerindeki morfolojik etkileri; **A)** Kontrol **B)** P-CS-1-R, **C)** P-CS-2-R, **D)** P-CS-4-R transdermal yama grupları ……...61

Şekil 5.34. *İn vitro* difüzyon çalışmasının şematik gösterimi……..62

Şekil4.35. P-CS-1-TA-RR-RD, P-CS-2-TA-RR-RD ve P-CS-4-TA-RR-RD transdermal yamalarına ait % ilaç geçirgenliği……..62

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

CDK	**:** Sikline bağımlı kinaz
CDK 4	**:** Sikline bağımlı kinaz 4
CDK 6	**:** Sikline bağımlı kinaz 6
CFC	**:** Kloroflorokarbon
CS	**:** Kondroitin sülfat
DMEM	**:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	**:** Dimetilsülfoksit
DSC	**:** Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
ER	**:** Östrojen reseptörü
ER pozitif/HER2	**:** Östrojen pozitif/insan epidermal büyüme faktörü
FBS	**:** Fetal Bovine Serum
FDA	**:** Gıda ve İlaç Yönetim
FTIR	**:** Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HER2	**:** İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
HPLC	**:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
L-929	**:** Fare fibroblast hücresi
MCF-7	**:** İnsan meme kanseri hücresi
MTT	**:** 3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür
P-CS-1	**:** %10 PCL %1 CS içeren yama
P-CS-2	**:** %10 PCL %2 CS içeren yama
P-CS-4	**:** %10 PCL %4 CS içeren yama
P-CS-1-R	**:** %10 PCL %1 CS ve Ribosiklib içeren yama
P-CS-2-R	**:** %10 PCL %2 CS ve Ribosiklib içeren yama
P-CS-4-R	**:** %10 PCL %4 CS ve Ribosiklib içeren yama
P-CS-1-RD	**:** %10 PCL %1 CS ve Ribosiklib içeren ilaç salım katmanı
P-CS-2-RD	**:** %10 PCL %2 CS ve Ribosiklib içeren ilaç salım katmanı
P-CS-2-RD	**:** %10 PCL %4 CS ve Ribosiklib içeren ilaç salım katmanı
P-CS-1-RR	**:** %10 PCL %1 CS ve Ribosiklib içeren rezervuar katmanı
P-CS-2-RR	**:** %10 PCL %2 CS ve Ribosiklib içeren rezervuar katmanı
P-CS-4-RR	**:** %10 PCL %4 CS ve Ribosiklib içeren rezervuar katmanı
P-CS-1-TA	**:** %10 PCL %1 CS ve TA bileşenli yama
P-CS-2-TA	**:** %10 PCL %2 CS ve TA bileşenli yama
P-CS-4-TA	**:** %10 PCL %4 CS ve TA bileşenli yama
P-CS-1-TA-RR-RD	**:** %1 CS içeren Rezervuar,ilaç salımı,%15 TA ve Ribosiklib içeren transdermal yama
P-CS-2-TA-RR-RD	**:** %2 CS içeren Rezervuar,ilaç salımı,%15 TA ve Ribosiklib içeren transdermal yama
P-CS-4-TA-RR-RD	**:** %4 CS içeren Rezervuar,ilaç salımı,%15 TA ve Ribosiklib içeren transdermal yama

PBS : Fosfat tampon çözeltisi
PCL : Polikaprolakton
Rb : Retinablastoma proteini
SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu
TA : Tannik asit
TGA : Termogravimetrik analiz

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RİBOSİKLİB İLACI İÇİN ELEKTROEĞİRME YÖNTEMİ İLE TRANSDERMAL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ, İLAÇ SALIM VE *İN VİTRO* ETKİNLİK ÇALIŞMALARI

Nermin GÜNDÜZ

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

77+XI sayfa

2024

Danışman: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

Meme kanseri tedavisinde kullanılan Ribosiklib, sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olarak görev yapar ve yüksek dozlarda kullanıldığında ciddi yan etkilere neden olur. Bu nedenle Ribosiklibin yan etkilerini azaltmak, yarılanma ömrünü uzatmak ve etkin dozunu düşürmek amacıyla transdermal yama sistemleri geliştirilmiştir.

Çalışma kapsamında transdermal yamalar, elektroeğirme yöntemi ile nanofiber membran formda ve biyouyumlu polikaprolakton/kondroitin sülfat (PCL/CS) polimerlerden hazırlanmıştır. CS mikrobiyal olarak üretilmiştir. Yamalar için optimizasyon çalışmaları yapılarak 3 farklı yama (rezervuar ve ilaç salım katmanı) seçilmiştir. Her bir yamada PCL oranı sabit olup, CS miktarı %1, %2 ve %4 olarak ayarlanmıştır. Yapısal ve morfolojik karakterizasyon FTIR, TGA, DSC ve SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra şişme derecesi, yama kalınlığı, katlama dayanıklılığı ve ağırlık homojenliği testleri yapılmıştır.

Ribosiklib, yamaya dahil edilerek salım çalışmaları HPLC kullanılarak gerçekleştirilmiş ve %95 ile %96 aralığında salım elde edilmiştir. Bu aşamada L929 (fare fibroblast) hücre hattı ile *in vitro* biyouyumluluk çalışmaları gerçekleştirilerek %90 ve %95 aralığında biyouyumluluk elde edilmiştir. MCF-7 (insan meme kanseri) hücre hattı ile *in vitro* sitotoksisite testi yapılarak Ribosiklib ile kıyaslama yapılmış ve %93-94 aralığında sitotoksisite gözlemlenmiştir. Son olarak yamalar tannik asit ile kaplanarak yapışkan form kazandırılmış ve *ex vivo* difüzyon testi ile rat derisi üzerinde 48 saatte %70-80 aralığında ilaç geçirgenliği gözlenmişitir. Son olarak 5 katmanlı yama formülasyonu elde edilmiş olup katmanlar sırasıyla geçirgen olmayan sırt tabakası, elektroeğrilmiş ilaç rezervuarı katmanı, elektroeğrilmiş ilaç salım katmanı, yapışkan tabaka ve koruyucu tabakadır.

Bu çalışma kapsamında üretimi kolay, düşük maliyetli, biyouyumlu ve geniş yüzey alanı sağlayan transdermal yama sistemleri geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, transdermal yama, biyouyumluluk, Ribosiklib, elektroeğirme

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEMS USING ELECTROSPINNING METHOD FOR RIBOCICLIB, DRUG RELEASE, AND *IN VITRO* EFFICACY STUDIES

Nermin GÜNDÜZ

Inonu University
Institute of Science
Department of Chemistry

77+XI sayfa

2024
Supervisor: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

Ribociclib, used in breast cancer treatment, acts as a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor and causes serious side effects when used in high doses. Therefore, transdermal patch systems have been developed to reduce the side effects, prolong the half-life and reduce the effective dose of Ribociclib.

In this study, transdermal patches were prepared from biocompatible polycaprolactone/chondroitin sulfate (PCL/CS) polymers in nanofiber membrane form by electrospinning method. CS was microbially produced. Optimization studies were performed for patches and 3 different patches (reservoir and drug release layer) were selected. The ratio of PCL in each patch was fixed and the amount of CS was adjusted as 1%, 2% and 4%. Structural and morphological characterization was carried out by FTIR, TGA, DSC and SEM analysis. Swelling degree, patch thickness, folding endurance and weight uniformity tests were then performed.

Ribociclib was incorporated into the patch and release studies were performed using HPLC and release in the range of 95% to 96% was obtained. At this stage, *in vitro* biocompatibility studies were performed with the L929 (mouse fibroblast) cell line and biocompatibility in the range of 90% and 95% was obtained. *In vitro* cytotoxicity test was performed with MCF-7 (human breast cancer) cell line and cytotoxicity in the range of 93-94% was observed. Finally, the patches were coated with tannic acid to give them an adhesive form and *ex vivo* diffusion test showed drug permeability in the range of 70-80% in 48 hours on rat skin. Finally, a 5-layer patch formulation was obtained, which consisted of a non-permeable back layer, an electrospun drug reservoir layer, an electrospun drug release layer, an adhesive layer and a protective layer.

In this study, transdermal patch systems that are easy to manufacture, low cost, biocompatible and provide large surface area were developed.

Keywords: Breast cancer, transdermal patch, biocompatibility, Ribociclib, electrospinning

1. GİRİŞ

Kanser, genellikle bir hücrenin anormal büyümesi ve çoğalması sırasında kontrolün kaybolması sonucunda ortaya çıkar. Bu kontrol kaybı, hücrelerin düzensiz ve sınırsız bir şekilde bölünmesine neden olarak tümör oluşumuna yol açar. Karsinogenez süreci, üç ana evrede gerçekleşmektedir: başlangıç, ilerleme ve gelişme evreleri. Kanserin başlangıç evresi, hücrenin genetik yapısında bir etkene maruz kalması sonucu ilk genetik yapılarda değişiklik olması ile başlar. Başlangıç evresi, hücrenin genetik yapısında bir ajana maruz kalması ile sonuçlanan ilk genetik mutasyonların meydana gelmesi ile oluşur. Bu mutasyonlar, hücrenin DNA'sında kalıcı değişiklikler yaratır. Ancak, kanserin gelişmesi için yeterli değildir. Başlangıç hücresinin kanser hücresine dönüşebilmesi için, hücresel proliferasyona neden olan ek faktörlerle aktive edilmesi gerekmektedir. Bu süreç ilerleme evresi olarak adlandırılır. İlerleme evresinde, hücreler daha fazla genetik değişikliklere uğrar ve bu değişiklikler hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına yol açar. Gelişim aşamasında, başlangıç ve ilerleme evrelerinde ortaya çıkan hücreler bir tümör kütlesi meydana getirir.Bu kütle, büyüme sinyallerine bağımlı olmadan büyüyebilen, büyüme karşıtı sinyallere duyarsız hale gelen, apoptozdan kaçınabilen, anjiyogenezi sürdüren ve çevre dokuları istila ederek metastaz yapabilen hücrelerden oluşur (Açıkgöz ve Akal Yıldız, 2017).

Meme kanseri, üç ana evrede gelişen, dünya genelinde en sık teşhis edilen ve en fazla ölüme yol açan kanser türüdür. Bu çalışmada ise meme kanserinde hedefe yönelik bir tedavi, etkin dozun az olduğu, yan etkilerin minimal düzeyde olacağı ekonomik bir ilaç taşıyıcı sistem olan transdermal yama hazırlanmıştır. Ribosiklib meme kanserinde kullanılan bir kemoterapi ilacı olup genel olarak oral yoldan günlük 600 mg alınır.Ribosiklib'in birçok kanser ilacında olduğu gibi bazı yan etkileri mevcuttur (Syed, 2017). Yapılan çalışmada ise temel amaç, meme kanserinde kullanılan kemoterapi ilacı Ribosiklib'in yan etkilerini azaltmak, hedefe yönelik tedavi sağlamak ve etkin dozun az olduğu ekonomik bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmektir. Belirlenen formulasyonlarda 3 farklı yama hazırlanmıştır. PCL ve CS içerikli elektroeğirme yöntemiyle yamalar hazırlanmış ve CS ekibimiz tarafında mikrobiyal olarak üretilmiştir. 3 bileşendeki fark CS miktarının değişkenlik göstermesidir.

%10 PCL konsantrasyonuna sahip polimer çözeltisinde %1, %2 ve %4 konsantrasyonlarında CS çözeltisi bulunmaktadır. PCL/CS transdermal yaması hazırlandıktan sonra ilaç emdirilerek ilaçlı ve ilaçsız olarak çeşitli karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Yamanın kapsamlı karakterizasyonu FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi), TGA (Termogravimetrik Analiz), DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı), DTA (Diferansiyel Termal Analizi) ve SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) analizleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, yamaların şişme derecesi, yama kalınlığının belirlenmesi, katlanma dayanıklılığı ve ağırlık homojenliği testleri gerçekleştirilmiştir. İlaç salımı ve yamalardaki ilaç verimi için HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) ile analizler yapılmış %89 ile %98 oranında Ribosiklib salımı gözlemlenmiştir. Yamaların L-929 (Fare fibroblast hücresi) hücresinde %86 ile %100 oranında biyouyumluluk gösterdiğini ve MCF-7 (İnsan meme kanseri) hücresinde %90 inhibisyona ulaşıldığı gözlemlenmiştir. *Ex vivo* ilaç salımı olarak rat derisi kullanılarak % 50 ilaç salımı belirlenmiştir. 5 farklı katmandan oluşan transdermal yama da yapışkan katman olarak TA (tannik asit) kullanılıp kuvvetli yapışma özelliğiyle deriye uyum artmıştır. Katmanlar sırasıyla geçirgen olmayan sırt tabakası, elektroeğrilmiş polimerlerden oluşan ilaç rezervuarı katmanı, elektroeğrilmiş ilaç salım katmanı, yapışkan tabaka ve koruyucu katmanlar kullanılarak Ribosiklib salımı için transdermal yama dizayni hazırlanmıştır. Bu katmanlar, yamanın dayanıklılığını ve biyobozunurluğunu optimize etmek amacıyla tasarlanmıştır. Ribosiklib'in yan etkilerini azaltmak ve etkinliğini artırmak amacıyla geliştirilen mikrobiyal CS temelli transdermal yamaların, kemoterapi ilaçlarının kontrollü salımında başarılı olduğunu göstermiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Kanserler genellikle Şekil 2.1'de görüldüğü üzere tek bir hücrenin, normal büyüme ve replikasyon süreçlerindeki kontrolünü kaybetmesi ile ortaya çıkmaktadır. Meme kanseri ise dünyada en sık teşhis edilen (%25) ve kadınlarda en çok ölüme sebep olan (%15) kanser türüdür (Samant et al., 2021). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2020 yılında 2.3 milyon kadın meme kanserine yakalanmış ve 685.000 kişinin ölümüyle sonuçlanmıştır. Ayrıca yine 2020 yılında toplamda 7.8 milyon kadına son 5 yıllık süreçte meme kanseri teşhisi konulmuştur. Bu da meme kanserini en yaygın kanser türü yapmaktadır (Breast Cancer, n.d.).(TUB) Meme kanseri daha çok 40 yaşın üzerindeki kadınlarda görülür. Yaş ilerledikçe giderek önemi artarak daha sık görülür. Genetik faktörlere bağlı formlar tüm meme kanserlerinin %10'unu oluşturur ve bu gruptaki hastalarda, daha genç yaşta ve her iki memede kanser görülme sıklığı yüksek olmaktadır (Sted, 2004,).

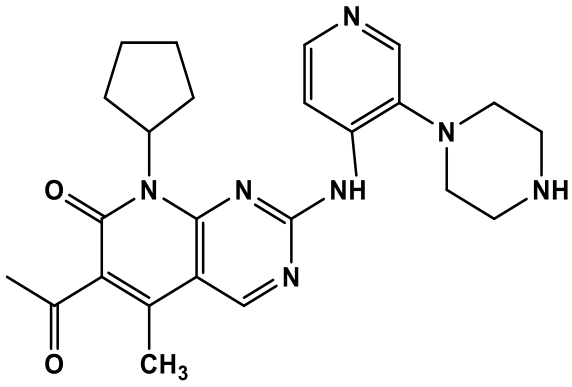
Meme kanseri, genellikle Şekil 2.1'de görüldüğü gibi, tek bir hücrenin normal büyüme ve çoğalma süreçlerindeki kontrolü kaybetmesi sonucunda ortaya cıkmaktadır ve dünya genelinde en sık teşhis edilip (%25) kadınlarda en fazla ölüme yol açan (%15) kanser türüdür (Samant et al., 2021). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre, 2020 yılında 2.3 milyon kadın meme kanserine yakalanarak 685.000 kişinin ölümüyle sonuçlanmıştır. Ayrıca son beş yıl içerisinde toplamda 7.8 milyon kadına meme kanseri teşhisi konularak yaygın bir kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır (Breast Cancer, n.d.) (TUB). Meme kanseri genel olarak 40 yaş ve üzeri kadınlarda yaygın olarak görülmektedir. Genetik faktörlerin etkisi ise tüm meme kanserlerinin %10'unu oluşturur ve bu grupta olan hastalarda genç yaşlarda her iki memede de kanserin görülme olasılığı artmaktadır.



Şekil 2.1. Meme kanserinin yayılımının şematik gösterimi

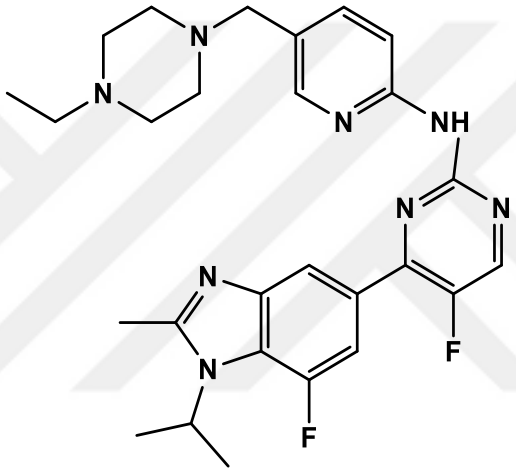
Meme kanseri tedavisinde çeşitli tedavi yolları olduğu kadar çeşitli ilaçlar da kullanılmaktadır. Hormon bağımlı meme kanserlerinde, CDK4 ve CDK6 genlerinin aşırı ekspresyonu gözlenir. Bu sinyal yolaklarının belirli ilaçlarla inhibe edilmesi, hücre proliferasyonunu durdurarak kanserin ilerlemesini yavaşlatır.

Palbosiklib (Şekil 2.2), PD 0332991 koduyla bilinmekte ve meme kanseri tedavisnde kullanılarak FDA tarafından Nisan 2013'te onay almıştır. Pyridoprimidin bileşiklerinden geliştirilen bu ilaç, ağızdan alınabilen ve siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) ile siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) için seçici inhibitör olarak etki göstermektedir. Retinoblastoma proteini (Rb) genellikle meme kanseri alt gruplarında etkinlik göstermektedir.Yapılan faz II klinik çalışmalarında kombinasyon halinde kullanılan palbosiklib ve letrozol, tek bileşenim kullanımına kıyasla %51 ve üzerinde tedavide hastalık ilerlemesi azalmıştır. Bu kombinasyon, kemoterapi ve iyonlaştırıcı radyasyon tedavisinde kombinasyon halinde klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Arslan ve diğ., 2022).



Şekil 2. 5. Palbosiklib'in kimyasal yapısı

Abemaciclib, ER pozitif / HER2 negatif meme kanseri tedavisinde kullanılan bir ilaçtır ve 2018 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Abemaciclib (Şekil 1.3.), CDK4 ve CDK6 adı verilen iki protein kinazını hedef alarak çalışır. Bu kinazlar, hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli rol oynarlar. Abemaciclib'in CDK4'e karşı CDK6'ya göre çok daha etkili olduğu belirtilmektedir. Bu, Abemaciclib'in özellikle CDK4 ve CDK6'nın inhibisyonu yoluyla hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişini bloke etme kapasitesinin yüksek olduğunu gösterir. ER pozitif / HER2 negatif meme kanseri, östrojen reseptörü (ER) pozitif olan ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) negatif olan kanser hücrelerini tanımlamaktadır. Bu tür kanserlerde abemaciclib, hücrelerin aşırı büyümesini ve bölünmesini engelleyerek tedavi edici etki gösterir (Kim, 2017).



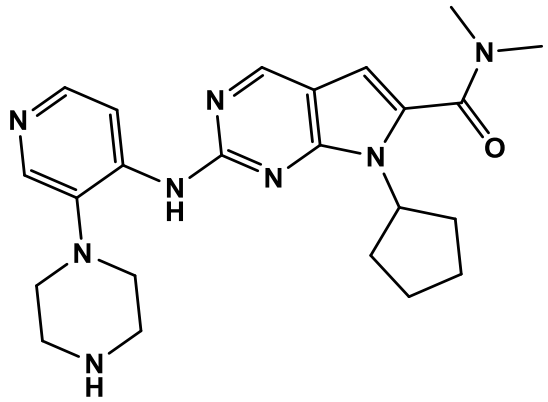
Şekil 2. 6. Abemasiklib'in kimyasal yapısı

Ribosiklib, kanser tedavisinde kullanılan siklin bağımlı kinaz (CDK) 4 ve 6'nın oral, küçük moleküllü bir inhibitörü olarak geliştirilmektedir. CDK4/6 kinazları, regülatör protein siklin D'ye (CCND1 geni tarafından kodlanır) bağlanarak aktif forma ulaşır ve siklin D-CDK4/6 kompleksi, retinoblastoma proteini (Rb) fosforilasyonu yoluyla G1 fazından S fazına doğru hücre döngüsü işleyişinde kritik bir rol oynar. CDK4/6'nın aşırı ekspresyonu ve CCND1 amplifikasyonu genellikle hormon reseptörü (HR)-pozitif meme kanserlerinde gözlemlenir ve bu durum endokrin tedavi direnci ile ilişkilidir (Tripathy ve diğ., 2017).

Ribosiklib'in letrozol adlı inhibitörü ile kombinasyon halindeki tablet formülasyonu, HR-pozitif, (HER2)-negatif ileri veya postmenopozal evrede kadınlarda metastatik meme kanseri tedavisinde Mart 2017'de ABD'de onaylanmıştır.

Ribosiklib'in önerilen başlangıç dozu, 28 günlük bir döngüde 7 gün tedaviyi takiben 21 ardışık gün boyunca günde bir kez 600 mg'dır.

Ribosiklib, 28 günlük döngü boyunca sürekli olarak günde bir kez 2,5 mg letrozol ile birlikte verilmelidir. Bu onay, MONALEESA-2 çalışmasının faz III aşamasından elde edilen ara sonuçlara dayanmaktadır (Syed, 2017)



Şekil 2. 7. Ribosiklib'in kimyasal yapısı

2.2.Meme Kanserinde Kullanılan Tedaviler

Hastanın genel durumuna ve hastalığın kaçıncı evresinde olduğuna göre meme kanserinde tedaviler kişiden kişiye farklılık gösterebilir. Temel olarak 5 tedavi yöntemi kullanılmaktadır (Ak ve diğ., n.d.)

- **Cerrahi Tedavi:** Genellikle hastaların tedavisi cerrahi yöntemle ya meme alınmadan sadece kanserli dokunun alınması ya da hastalığın evresine ve yayılımına bağlı olarak memenin tamamının alınmasıdır. Biyopsi sonuçlarına bağlı olarak koltukaltı lenf bezleri de gerekiyorsa temizlenmektedir.

- **Radyoterapi(Işın Tedavisi):** Radyoterapi, X-ışınlarının cerrahi operasyondan sonra ameliyat bölgesi iyileştikten sonra koltuk altı ve meme bölgesine belli aralıklarla uygulanır. Amaç kanserli dokunun tekrardan çoğalmasını engellemek ya da kalan kanser hücresinin yok edilmesini sağlayan bir tedavidir. Fakat radyasyonun hedef molekülü DNA olduğundan sağlıklı hücrede de hasar meydana gelebilmektedir.

- **Kemoterapi(ilaç tedavisi):** Kanser başka bir bölgeye veya organa yayılmışsa kanser hücresi ilaçla tedavi edilerek yok edilmeye çalışılır. Cerrahi operasyon sonrası farklı bölgelere yayılma yoksa bile tedbir amaçlı bir süre kemoterapi tedavisi alınır.

Kemoterapi ilaçlarının etkili olması için birkaç ilaç birlikte farklı kombinasyonlarda verilir. Bu ilaçlar ağızdan veya damardan alınır.

- **Hormon Tedavisi:** Bu tedavi de kanserin ilerleme ve yayılmasına neden olan hormonların etkisini azaltmak amaçlanır. Meme kanserini etkileyen hormonlar progesteron ve östrojendir. Kanser hücrelerinin sahip olabileceği hormon reseptöründen kaynaklı kanser ilerleme gösterebileceğinden bu tedavi meme kanserinde tercih edilir. Sonuç olarak iki hormonun meme kanseri hücrelerine ulaşması engellenir.

- **Kişiye Özel/ Hedefe Yönelik Tedavi:** Hastalık aynı olsa bile aynı ilaç her hasta da aynı etkiyi göstermeyebilir bu durumda da kişiye özel tedavi ve ilaç kullanımı ile daha etkili sonuçlar gözlemlenir. İlaçları ise daha etkili ve hedefe yönelik alabilmek için çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler kullanılır. Böylece kanserli bölgeye direkt olarak etki edilir.

2.3.Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseriyle ilişkilendirilen birçok risk faktörü bulunmaktadır. Bu faktörler arasında en belirgin olanı kadın olmaktır. Ayrıca, yüksek östrojen seviyelerine ulaşmak da önemli bir risk faktörüdür. Bu duruma sebep olan faktörler arasında erken adet görme, geç hamilelik, hiç doğum yapmamış olmak ve emzirmemiş olmak gibi durumlar yer alır. Ayrıca, östrojen içeren ilaçların uzun süreli kullanımı da meme kanseri riskini arttırmaktadır. Yaşlanmada kadın olmanın yanı sıra meme kanserine yakalanma riskini çok fazla arttırmaktadır. 2020 yılında yapılan bir araştırma sonucunda yaş ile meme kanseri riskinde değişiklikler 0-49 yaş aralığında %2, 50-59 yaş aralığında %2,3, 60-69 yaş aralığında %3,5 ve 70 yaş ve üzerinden sonra %6,7 olarak gözlemlenmiştir (Bernstein ve diğ., 1994).

Yaşam tarzı da meme kanseri riskini arttırabilmektedir. Örneğin sigara ve alkol kullanımı, yağlı beslenme ve obezite gibi faktörler de risk barındırır. Özellikle alkol kullanımının meme kanseri riskini %30'a kadar arttırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır; bu sebeple, alkol kullanımı diyetle ilişkili olan önemli risk faktörlerinden biridir. Obezite ise özellikle postmenopozal kadınlarda östrojen seviyesinde meydana gelen artıştan kaynaklı her bir birim vücut kitle indeksi artışıyla meme kanseri riski %2 oranında artmaktadır (Washbrook, 2006).

Meme kanseri riskine çevresel faktörlerin de etkisi vardır. Radyasyon maruziyeti, bu riski artırabilir. Deodorant kullanımının meme kanseriyle ilişkilendirilip ilişkilendirilmediği konusunda kesin kanıtlar olmamakla birlikte, bazı yayınlarda bu konuda spekülasyonlar bulunmaktadır. Bu durum, çevresel etmenlerin meme kanseri riski üzerindeki karmaşık etkilerini göstermektedir (Washbrook, 2006).

Meme kanseri, ailesinde bu hastalıkla ilişkili öyküsü bulunan kadınlarda daha fazla endişe yaratır. Birinci derece akrabalarından biri bu hastalığa yakalanmışsa, kişinin kendi meme kanseri riski yaklaşık olarak %80 artar. İki akrabasında öykü varsa bu risk üç katına, üç veya daha fazla akrabasında öykü varsa ise dört katına çıkar. Bu, genetik geçişin ve aile öyküsünün meme kanseri riskini artırdığının bir göstergesidir. BRCA-1 ve BRCA-2 mutasyonları, meme kanseri riskini önemli ölçüde artıran en belirgin genetik faktörlerdendir. Bu mutasyonlara sahip bireylerde, meme kanserine yakalanma riski hayatı boyunca %80 ila %85 arasında değişmektedir. Dolayısıyla, bu mutasyonlara sahip kişiler, meme kanseri olma açısından son derece yüksek bir risk altındadır (Washbrook, 2006) .

2.4.Meme Kanseri Tedavisindeki Güncel Yaklaşımlar

2.4.1. Nanopartiküller/Parçacıklar

Nanopartiküllerin biyolojik bir şekilde uygulanması, kanser teşhis ve tedavisinde yeni ufuklar açan hızla gelişen bir nanoteknoloji alanını oluşturmaktadır. Nano boyuttaki materyaller, hücre boyutundan bile daha küçük oldukları için hücrelerle kolayca etkileşime girebilirler. Bu nanopartiküller, ilaçların dolaşım süresini artırmanın yanı sıra antikanser etkinliğini artırabilir ve kanser lezyonlarını erken aşamalarda tespit etmeye yardımcı olabilir. Nanoyapıların tek bir kanser hücresine girebilmesi, görüntüleme tekniklerinin sınırlarını genişletir. Örneğin, meme kanseri teşhisi için tipik olarak 1.000.000 tümör hücresinin varlığı gereklidir. Ancak nanoteknoloji sayesinde, 100'den az tümör hücresinin varlığında bile

meme kanseri teşhisi konulabilir. Bu, hastalıkların erken teşhis edilmesi ve etkili bir şekilde tedavi edilmesi açısından önemli bir adımdır (Oylar ve Tekin, 2011)

2.4.2. Genetik parmak izi/fingerprint ve gen terapi

Meme kanseri sistemik nüksünün tespiti, tümör hücresi belirteçlerinin evrensel olarak tanımlanmaması nedeniyle sınırlıdır. Ancak bir hastanın meme kanseri hücrelerine özgü genetik değişiklikleri tespit eden bir testin, etkili bir kanser belirteci sağlayabileceği düşünülmektedir**.** Son yıllarda, kişiye özel ve hedefe yönelik kanser tedavisinin bir sonraki aşaması olarak, kanser hücrelerinin genetik özelliklerini belirleyen "genetik parmak izi/fingerprint" ve tümörün ilerlemesinde rol oynayan "sürücü/driver mutasyon" genlerini tanımlama üzerine araştırmalar artmıştır. Bu doğrultuda, sürücü mutasyonlarını hedefleyen ilaçlarla özelleştirilmiş tedaviler geliştirilerek genetik mutasyonların tedavi edilmesi potansiyeli ortaya konmuştur**.**

Genler, DNA üzerinde sıralı şekilde bulunup hücre döngüsüyle beraber metabolik işlevleri kodladıkları proteinler sayesinde kontrol eden en küçük kalıtsal birimlerdir. Genlerin mutasyonlara uğraması veya epigenetik değişikliklere maruz kalması durumunda, genlerin fiziksel yapısında değişme olmasa da ürettikleri proteinlerin işlevi ve yapısı etkilenebildiğinden hücre metabolizması ve döngüsü bozulabilmektedir. Bu yüzden, gen terapisi yöntemleriyle işlevi bozuk, eksik veya aşırı olan genlerin düzeltilmesi, kanser de dahil olmak üzere çoğu hastalığın tedavisinde artan bir şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel gen terapisi yöntemlerinde, genler hücrelere farklı yollarla taşınır. Bu taşıma süreci, laboratuvar koşullarında (*ex vivo*) hücrelerin dışında yapılabildiği gibi, canlı hücrelere doğrudan (*in vivo*) uygulanarak da gerçekleştirilebilir. Kanser tedavisinde ise hedef, daha hızlı ve etkili bir şekilde kanser hücrelerini öldürmektir, böylece tekrarlayan transfüzyon ihtiyacı azalır (Onur Baykara, 2016)

2.4.3. Sinyal yolakları

Hücrelerin hayatta kalması ve proliferasyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan PI3K/Akt/mTOR yolunun, Başta meme kanseri olmakla birlikte çeşitli kanser türlerinde etkili olduğu düşünülmektedir.

PI3K/Akt yolundaki PIK3CA, AKT1, AKT2 ve PTEN gibi genler, meme kanserlerinde %70'ten fazlasında mutasyona uğrayarak aktif hale gelmektedir.
Ayrıca, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun anormal aktivasyonunun, HER2 aşırı eksprese eden endokrin ve trastuzumab tedavisinde meme kanserinde direnç gelişiminde etkili olmaktadır. Belirtilen sinyal yolunun inhibitörlerinin, dirençli hücrelerde trastuzumab ile birlikte kullanılmasıyla antikanser aktivitede artış olabileceği belirtilmiştir. Dolayısıyla, PI3K/Akt/mTOR yolağını hedef olarak belirleyen çeşitli stratejilerin meme kanseri tedavisinde önemli potansiyel taşıdığı vurgulanmaktadır.

PI3K/Akt yolundaki PIK3CA, AKT1, AKT2 ve PTEN gibi temel genler, meme kanserlerinin %70'inden fazlasından mutasyona uğrayarak aktif olmaktadır. Ayrıca, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun normal olmayan aktivasyonunun, HER2 aşırı eksprese eden meme kanserinde endokrin ve trastuzumab direncinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu sinyal yolunun inhibitörlerinin, dirençli hücrelerde trastuzumab ile kombinasyonunun antikanser aktiviteyi daha etkin hale getirebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, PI3K/Akt/mTOR yolunu hedefleyen farklı stratejilerin meme kanseri tedavisinde önemli olduğu vurgulanmıştır (Tserga et al., 2016).

Başka bir tedavi stratejisi, çeşitli sinyal yolları veya reseptör aileleri içinde bulunan reseptör tirozin kinazlarının inhibisyonuna dayanmaktadır. Bu koşullarda hedef alınan tirozin kinazlardan biri HER ailesidir. Özellikle HER2/HER3 heterodimerlerinin farklı olan heterodimerlere veya homodimerlere kıyasla daha aktif olduğu ve bu koşulların trastuzumab ilacında dirence neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle HER ailesi reseptörlerinin geniş kapsamlı inhibisyonu, tek başına trastuzumab kullanımından çok daha güçlü bir antikanser etki sağlayabilmektedir (Sert & Tüylü Küçükkılınç, 2022).

3. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER VE KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI

3.1.İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaçlar oral yoldan veya damardan alındığında etken madde belirlenen sürede hedef bölgeye ulaşmadan parçalanabilir, farklı dokulara zarar verebilir veya toksik düzeye ulaşabilir (Reza Rezaie ve diğ., 2018). İlacı oral yolla veya damardan aldıktan sonra oluşabilecek yan etkilere ya da farklı dokulara da etki etmesine engel olamayız fakat ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak vücuda alınan ilaçlarda etken madde hedef dokuya etki eder, yan etkiler azalır, toksik düzeyin altında etki gösterir. Kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler sayesinde ilaçların yarılanma ömrü uzayarak ilaç alımı da azalmaktadır. Yapılan çalışmalara göre çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Şekil 3.1).

3.1.1. Lipozomlar

Lipozomlar hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşiklerin kapsüle edilmesi için polar lipitlerden oluşan iki katmanlı küresel kesecikleridir. Fosfolipit yapısında olduklarından hücre zarına benzerlik göstererek etkin ilaç taşıyıcı sistem halindedirler (Taylor ve diğ., 2005). Lipozomların biyo-uyumlu, biyo-bozunur ve toksik etkisinin olmaması hem suda hem de yağda çözünebilen ilaç etken maddelerinin taşınabilmesine ek olarak kapsüllenmiş maddeyi istenildiği zaman salması lipozomları tercih edilen bir taşıyıcı sistem haline getirmiştir (Alavi ve diğ., 2017).

3.1.2. Dendrimerler

Bir çekirdek ve çekirdek dışında simetrik dallanma gösteren dış kabuğunda fonksiyonel grup taşıyan polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Dış kabukta çok fazla dallanma gösterdiğinden uç kısımlarına veya dallanma gösteren yapı aralarına çok iyi ilaç hapsedileceğinden kontrollü ilerleyen ilaç salımı çalışmaları ve hedefe yönelik ilerleme gerçekleşir. Sahip olduğu dallanmalar ile farklı fonksiyonel grup taşımaları dendrimerlere sahip olacağı özellikler bakımından çeşitlilik kazandırır (Karabulut ve diğ., 2015).

3.1.3. Miseller

Morfolojik olarak hidrofobik çekirdek ve hidrofilik polimer zincirli küresel şekildedirler. Çözünürlüğü düşük olan ilaç etken maddeleri bile çözünebilecek düzeye getirdiğinden biyoyararlanım gösterir. Vücutta gerekli etken maddeyi toplayana kadar kalabilme özelliğine sahip olan bir ilaç taşıyıcı sistem olan miseller kendilerine özgü ligandlara bağlanarak etki göstermektedirler (Sezgin ve diğ., 1974).

3.1.4. Polimerik Nanopartiküller

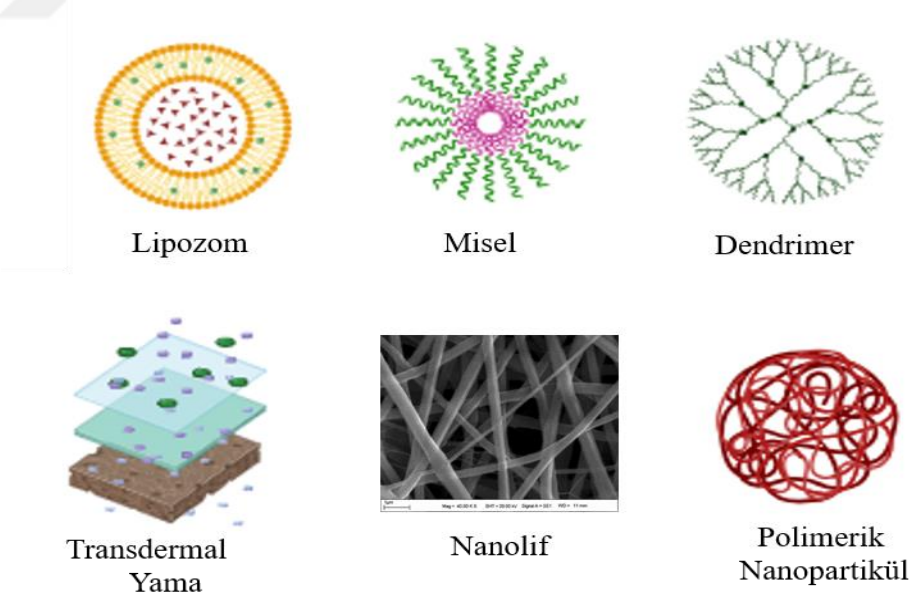
10-100 nm boyutlarında olan kolloidal özellik gösterip yapısal olarak nanoküreler ve nanokapsüller olarak ikiye ayrılırlar. Nanoküreler, ilacın homojen dağılımına yardımcı olan polimerik matriksten oluşurken nanokapsüller, yağlı iç çekirdeğin polimerik bir yapıyla kaplandığı sistemlerdir. İlacı hapsetme özelliğine sahip olan polimerik nanopartiküller ile ilaç taşıyıcı sistemler sayesinde hedefe yönelik ve kontrollü olarak etken madde salınır. Ayrıca polimerik nanopartiküllerin üretim yolları basit ve kolay olduğundan tercih edilir. Biyobozunur özellikte olarak parçalandığında toksik etki göstermezler (Marangoz, n.d.).

3.1.5. Nanolifler

Elektroeğirme yöntemiyle üretilen nanoliflerin çaplarının ayarlanabilmesi, geniş bir yüzey alanına sahip olmaları, gözenekli yapıları, esnek ve dayanıklı mekanik özelliklere sahip olmaları açısından hem ilaç salımı çalışmalarında hem de doku mühendisliğinde sıkça kullanılmaktadır. İlaç salım çalışmalarında biyo-uyumluluk göstererek deriyi taklit edebilme özelliği açısından organizmaya kolay uyum sağlanabilmektedir. Özellikle kolay uygulanabilirliği, ucuz ve tekrarlanabilir özelliğe sahip olmaları cerrahi operasyon sonrası kemoterapi tedavisinde kullanılabilecek bir sistem olarak görülmektedir (Sunar ve Hasçiçek, 2017).

3.1.6. Transdermal yamalar

Transdermal yamalar, hastalıklı deriye lokal terapötik etkiler (topikal dağıtım) sağlamak ve ilaçların sistemik dolaşıma salınmasını kolaylaştırmak amacıyla cilt üzerinden ilaç uygulamasına olan ilgiyi artırmıştır. Deri, bir ilaç salım yolu olarak kullanıldığında, mide tahrişi, pH ve boşalma hızı etkileri gibi sorunlardan kaçınma ve bu şekilde ilacın biyoyararlanımını artırma gibi diğer birçok ilaç uygulama yöntemine göre önemli avantajlar sunar. Sağlam deriye uygulandığında ilacı/ilaçları önceden belirlenmiş ve tekrarlanabilir bir oranda deri portalından sistemik dolaşıma uzun bir süre boyunca salan dozaj formları vardır (Prausnitz ve diğ., 2004). Ayrıca, oral tedaviye kıyasla, plazma konsantrasyonlarındaki dalgalanmaları en aza indirerek sistemik yan etki riskini azaltma, ilacın uygulama yerinde sürekli salınımını sağlama, cihaz veya formülasyonun çıkarılmasıyla tedavinin hızla durdurulabilmesi, ilaçların plazma seviyelerindeki dalgalanmaların azaltılması ve enjeksiyonlarla ilişkili ağrının önlenmesi gibi ek faydalar sağlar. Transdermal uygulama ayrıca sistemik dolaşıma ani ve yüksek miktarda ilaç girişini engellemektedir (Nandi ve Mondal, 2022).



Şekil 3. 2. İlaç taşıyıcı sistemler

3.2. Kontrollü İlaç Salımı

Genel olarak ilaç alımı kapsül veya tablet formdaki ilaçların oral yolla veya enjeksiyon şeklindedir. Bu yöntemler aşırı doz ve sık ilaç alım tekrarına neden olmaktadır. Kontrollü ilaç salımında ise vücudun istenen bölgesine etkin madde salınır ve uzun süre salım hızını ve dozaj miktarının ayarlanabildiği sistemlerdir. Bu sistemler sayesinde ilaç biyolojik çevreye daha az maruz kalır, toksisitesi ve yan etkileri azaltılmış olur. Kontrollü salım sistemlerinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak polimerler kullanılarak etkin ve hedefe yönelik tedavi gerçekleşir. Kullanılan taşıyıcı sistemler sayesinde dış etkilerden az etkilenir, toksisitesi azaltılır ve istenilen sürede istenilen miktarda ilaç salımı etkileri kontrol edilir (Adepu ve diğ., n.d.).

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin çok fazla avantajları olmakla beraber dezavantajları da vardır. Kontrollü salım sistemlerinde ilacın doku veya hücrelere hedeflenebilmesi sayesinde yan etkiler azaltılır ve dozaj miktarı ve ilaç alımı hastaya göre yani kişiye özel belirlenebilmektedir. Hedef bölgede salınan ilaç miktarı belli olduğundan İlaç kaybı ortadan kalkar. Kanda veya hücrelerde ilaç düzeyinin tedavi edebilir düzeyde olarak belirli bir zaman içinde tekrarlanabilen ve tahmin edilen salım hızları bakımından avantajlı bir yöntemdir. Dezavantajları arasında ise tedavi sırasında oluşabilecek bir sorunda tedavinin kesilmesi gerekirse hemen kesmek mümkün olmaz özellikle de implantlar sadece cerrahi bir yöntemle çıkartılabilir. Bu sistemlerde kullanılabilecek ilaç taşıyıcı olarak kullanılan polimer veya parçalanma ürünü toksik olabilir veya biyouyumlu özellik göstermeyebilir seçilen taşıyıcı materyali doğru seçmek gerekir. Düşük dozlarda etken maddelerin kullanılması avantaj gibi görünse de hastanın dozlanmayı unutması durumunda, klasik ilaç dozlanmalarıyla karşılaştırıldığında tedavi edici etkinin çok daha azalması söz konusu olabilmektedir Her ilacın kontrollü salım sistemi yapılamaz buna ek olarak hazırlama yöntemi farklı ilaçlarda farklılık göstermektedir ve hazırlanan formülasyonun birçok bileşenden oluşan kompleks bir yapısının bulunması sebebiyle stabilizasyon sorunları ortaya çıkabilmektedir. Örneğin geç veya erken salınmaya başlayabilir (Ritschel, 1989).

3.2.1. İlaç salım yolları

Tercih edilen ilaç salım yolları ilacın terapotik etkisini etkiler. İlacın tüm vucüda etki etmesinden ziyade sadece istenilen bölgeye etki etmesini ve yan etkilerinin azalmasını sağlamak için en etkili yol seçilmesi gerekeceğinden farklı ilaç salım yolları vardır.

3.2.1.1. Oral yolla salım

Oral yolla verilen ilaçlar, sindirim sistemi tarafından emilerek kana karışır ve hedeflenen etkiyi gösterir. Bu yöntem, kolay uygulanabilirliği ve hasta uyumunu artırması nedeniyle tercih edilmektedir. Oral yolla salımda pH 'a bağlı olarak mide pH'ında çözünemeyen fakat ince bağırsağın yüksek pH'a sahip olması ile ince bağırsakta çözünebilecek, emülsiyonlar, süspansiyonlar ya da kaplamalar gibi ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Ancak peptit ve protein ilaçlar gastrik ortamın pH'sı ve proteolitik enzimlerin varlığında sindirilmesi sebebiyle problemler oluşacağından etkinlik düşüktür. Bu nedenle peptit ve proteinlerin oral biyoyararlanımlarının etkinliği kimyasal modifikasyon, absorbsiyon artırıcı maddelerin eklenmesi, proteaz inhibitörlerinin formülasyona eklenmesi ve uygun ilaç taşıyıcı sistemlerin seçilmesi gibi çeşitli yaklaşımlar geliştirilmektedir. Farklı bir çözüm yolu kalın bağırsakta sindirim enzimleri çok az bulunduğundan ilaçların mid eve incebağırsaktaki oluşabilecek sindirimin önüne geçecek ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesidir. Oral yolla salımda meydana gelebilecek bir diğer dezavantaj ise etken madde hedef bölgeye gitmeden salınmaya başlayabilir bu da etkinliği azaltmış olur (Soudry-Kochavi ve diğ., n.d.).

3.2.1.2. Akciğerlere salım

Solunum yolu kullanılarak alınan ilaçlar, uzun yıllardan beri astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi durumların tedavisinde ilk akla gelen yöntemler arasında bulunmaktadır. Akciğere yönelik ilaç tedavilerinde, etkin tedavi için en önemli unsur ilacın dozu olduğundan etki edecek bölgenin çok iyi belirlenmesi gerekir. Hedef bölgenin akciğer olduğu ve o bölgede salınacak ilaçlar sıkışma, sedimantasyon ve difüzyon yolu ile yerleşebilmektedir. Taşıyıcı sistemlerin partikül boyutlarının 1 μm'nin altında olmaması gerekir çünkü bu boyuttaki sistemler alveollere rahat bir şekilde ulaşmasına rağmen alveollere yerleşemediklerinden nefes alıp verirken atılırlar. Alveollere yerleşmesini istediğimiz partiküllerin 2-5 μm partikül büyüklüğünde olması gerekmektedir. Akciğerlerin

alveollere sahip olması, yüzey alanının geniş olarak ince doku tabakasına sahip olması ve proteolitik enzimler bulundurması sebebiyle ilaç salımında uygun bir yol olarak görülmektedir.

3.2.1.3.Transdermal yolla salım

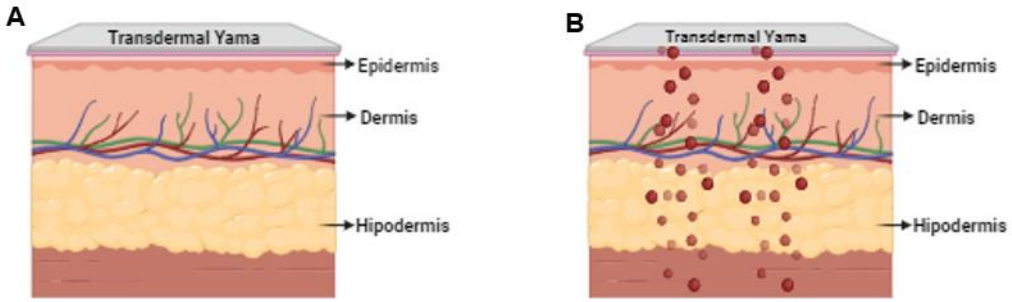
Transdermal ilaç uygulamaları deri üzerine doğrudan uygulandığından deri üzerindeki ilaç dağıtım yollarının bilinmesi gerekmektedir. İlaç molekülleri deri yoluyla 3 şekilde vücuda nüfus eder. Bunlar ter kanalları, kıl kökleri, yağ bezleri ya da doğrudan stratum corneumdur. Stratum corneum cildin en dış tabakasıdır ve ölü hücrelerden oluşan keratinle dolu büyük, düz, çok yüzlü plaka benzeri zarflardan oluşan, epidermisin en dış tabakasına verilen isimdir. Bu katman emilimde önemli bir rol oynayarak, yabancı maddeler için bariyer görevi görmektedir. Bununla beraber kan damarları ve dentritik hücrelerin varlığı sayesinde ilaçların deriden geçişi için alternatif yollar olarak kullanılabilmektedir. Bundan dolayı, ilaç dağıtımı için büyük önem taşır ve aynı zamanda ilacın emilimini gerçekleştirerek vasküler sisteme giriş için istenen ortamı sağlar. Geleneksel topikal ilaç uygulamaları ve transdermal yamalar, ilaçları bu şekilde serbest bırakır (Singh ve diğ., 2013)

Transdermal yamalar deriye yapışkanlar vasıtasıyla yapıştırılan ve deriden spesifik dozlarda ve kademeli olarak kan dolaşımına ilaç salımı için özelleşmiş sistemlerdir (Şekil 3.2). İlk transdermal yama 1981 yılında FDA tarafından onaylanmış olup günümüzdeki uygulamaları kardivasküler hastalıklar için klonidin ve nitrogliserin, kronik ağrı için fentanil, sigarayı bırakmaya yardımcı olmak için nikotin bantları olarak bilinmektedir. Ancak çeşitli hastalıkların tedavisi için farklı bileşenlere sahip transdermal yamalar geliştirilmeye devam edilmektedir. Transdermal yamalar ilacın kontrollü ve sürekli salımını sağlamakta ve biyolojik yarılanma ömrü kısa olan ilaçların sürekli girişine izin vermektedir. Sistemik dolaşıma direkt giren ilaçlarda ilgili dokuya düşük dozun ulaşması ve metabolize olmaları transdermal yamaların avantajlarını arttırmaktadır. Ayrıca transdermal sistemler oral yolla verilen ilaçların sindirim sistemi ve karaciğere olumsuz etkilerini azaltmaktadır. Günlük alınması gereken doz sayısını haftada birkaç keze düşürmesinden dolayı pratik bir yöntemdir. Bu avantajlarının yanı sıra bazı transdermal sistemlerde dezavantajlar da mevcuttur. Bunlar transdermal yamaların uygulandığı alanda lokal tahriş ihtimali, ödem, kaşıntı veya alerjik reaksiyonlar olarak sıralanabilmektedir.

Ayrıca transdermal yamalardan salınacak ilacın molekül ağırlığının 4.500 Da ile sınırlı olması ve iyonik ilaçların kullanılamaması kullanımlarını sınırlamaktadır (Mahammad ve

dığ.,2022.). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında bir transdermal yamada olması gereken bileşenler ve özellikleri aşağıda verilmiştir;

- Polimerik matris: İlaç salımını kontrol eden transdermal yamaların omurgasını oluşturmaktadır. Polimer seçimi istenilen fonksiyonel özelliklere göre seçilmekte olup aynı zamanda seçilen polimerlerin kimyasal olarak inert olması, yüksek biyouyumluluğa sahip olması, belirli mekanik dayanıklılığa sahip olması ve düşük maliyetli olması gerekmektedir.
- İlaç: Transdermal yamalar uygun farmakolojik, fiziksel ve kimyasal yapıya sahip ilaçlar için son derece ilgi çekici bir yöntem olmuştur. Transdermal yamalar yoğun ilk geçiş metabolizmasına uğrayan, terapötik doz aralığı sınırlı ve yarı ömrü kısa olan ilaçların salımına katkı sağlamaktadır. Antikanser ilaçlar ve hormonal bozuklukların tedavisinde kullanılan ilaçlar bu gruba örnek verilebilir.
- Geçirgenlik arttırıcılar: İlacın daha yüksek terapötik seviyelerine ulaşmak için stratum corneum'un gerçirgenliğini arttırmakla görevlidirler. Bunlar 3 sınıfta toplanmaktadır; lipofilik çözücüler, yüzey aktif maddeler ve iki bileşenli sistemler.
- Koruyucu Tabaka: Depolama sırasında yamayı korumakla görevlidir. Bu katman kullanımdan önce çıkarılır.
- Yapıştırıcılar: İlacın daha yüksek terapötik seviyelere ulaşması için stratum corneum ile etkileşimi arttırır.
- Sırt tabakası: Yüksek esnekliğe sahip olmalıdır.
- Plastikleştiriciler, çözücüler ve diğer yardımcı maddeler: Çevresel koşullara karşı dayanıklılığı arttırır (Aggarval ve diğ., 2009).



Şekil 3.2. Transdermal yamanın deriye uygulanması ve ilacın yayılımı

3.2.1.4.Diğer salım yolları

Klinik kullanımda olan veya üzerinde aktif olarak çalışılan çeşitli polimer bazlı sistemler, belirli vücut bölgelerine yerleştirilebilir veya deri yoluyla implante edilebilir. Polimer sistemlerinin kullanıldığı alanlardan biri de gözdür. Ocusert adlı bir kontrollü salım sisteminde pilokarpin iki etilen-vinil asetat kopolimer membran arasına yerleştirilmektedir. Membranların kalınlığı kontrol edilerek, 1 haftalık bir süre için 20 veya 40 saat boyunca pilokarpin salım hızları gözlenmektedir. Bir hasta 28 göz damlası almak yerine Ocusert sistemini haftada bir kez rahatlıkla kullanabilir .

Buna ek olarak, ilacın yavaş ve sabit bir hızda verilmesi sayesinde, çift görme gibi göz damlalarıyla ilişkili yan etkilerin çoğu önemli ölçüde azaltılır. Gebelikten korunma amaçlı olarak geliştirilen vajinal ilaç salan sistemler, genellikle 6 ay boyunca kullanılır ve belirli periyotlarda bir hafta ara verilir. Son yıllarda, vajinaya doğrudan yerleştirilen polimerik ve biyobozunur salım cihazları ise antikor salımını sağlayarak hem gebeliği önlemekte hem de cinsel yolla bulaşan hastalıklara karşı koruma sağlamaktadır. Önemi giderek artan başka bir alan da aşı salınımıdır. Laktik/glikolik asit kopolimerleri veya tirozin gibi adjuvanlar içeren parçalanabilir polimerler gibi parçalanabilir polimerler içinde bir aşı kapsüllenerek, antijen tek bir enjeksiyondan bir yıldan fazla bir süre boyunca yavaşça salınabilir. Bu tür yaklaşımlar, ihtiyaç duyulabilecek enjeksiyon sayısını azaltabilir ve bazen daha yüksek antikor titreleri sağlayabilir.

3.3. İlaç Salım Mekanizmaları

3.3.1. Difüzyon kontrollü sistemler

Difüzyon kontrollü salım sistemlerinde, ilaç rezervuarı genellikle biyouyumlu bir polimerle kaplanır. Bu polimer, ilacın çevre dokulara kontrollü bir şekilde salınmasını sağlar. Polimerik yapı, ilaç moleküllerinin yavaş ve kontrollü bir şekilde dışarı difüze olmasına olanak tanır. İlaç konsantrasyonunun yüksek olduğu bölgeden, çevredeki düşük konsantrasyonlu alana doğru bir geçiş gerçekleşir. Bu konsantrasyon farkı, ilacın salım hızını belirleyen en önemli faktördür. Bu tür sistemler, ilaç salım hızının ve süresinin hassas bir şekilde kontrol edilmesini mümkün kılar. Difüzyon kontrollü salım sistemlerinin avantajları arasında, ilacın hedef bölgeye sürekli ve düzenli bir şekilde ulaşması, yan etkilerin azaltılması ve hasta uyumunun artırılması yer almaktadır.

2 farklı difüzyon kontrollü sistemler mevcuttur. Membran ve matriks sistemler olarak ayrılırlar (Peppas ve Narasimhan 2014).

3.3.1.1.Membran (rezervuar) sistemler

İlaç etken maddesi, membran sistemlerinde genellikle şişen veya şişmeyen bir polimerle çevrili bir rezervuara (depo) hapsedilir. İlaç ilk önce membran içerisinde çözünür daha sonrasında yoğunluğa bağlı olarak çok yoğun olan ortamdan yoğunluğu az olan ortama doğru membran dışına difüzyon ile ilaç salınır. Eğer ki membran yapısı gözenekli ise ilaç membran içerisinde etkileşime girmeden gözeneklerden difüze olarak membranın dışına salım gerçekleşir. Bu sistemlerdeki en önemli avantaj serbest salım hızına kolaylıkla ulaşabilmesidir. Membran sistemler, genellikle film, kapsül veya mikrokapsül gibi çeşitli yapılar halinde tasarlanabilir. Bu sistemler vücut içinde parçalanmadıkları için ilaç salımı tamamlandıktan sonra cerrahi müdahale gerekebilir.Bunun yanı sıra insülin gibi büyük moleküllerde iyi bir sistem olarak tercih edilmez çünkü yırtılma ve çatlak meydana gelebileceğinden etken madde istenilen zamandan daha hızlı salım yapabilir bu da çeşitli yan etkilere neden olur. Bu sistemlerdeki en önemli avantaj serbest salım hızına kolaylıkla ulaşabilmesidir (Brannon-Peppas,1997).

3.3.1.2.Matriks (monolitik) sistemler

Matriks sistemlerde, etken madde genellikle katı bir polimer içinde çözünmüş ve dağılmış halde bulunur. Salımın kontrol edilmesinde matriks, homojen (gözeneksiz) veya heterojen (gözenekli) yapıda olabilir. Heterojen (gözenekli) matrikslerin hazırlanması ise genellikle hidrofil maddelerin matriks polimerine eklenmesiyle gerçekleştirilir.Homojen (gözeneksiz) matriks ise etkin madde tek bir özelliğe sahip matriksin içine geçer, buradan basit difüzyon işlemiyle salım gerçekleşir (Higuchi ve diğ., 1963). Matriks materyali olarak polietilen, poliamit, poli(vinil asetat), etil selüloz, polisiloksan, akrilat ve metakrilat polimer ve kopolimerleri, etilen-vinil asetat kopolimeri, poli(vinil klorür) gibi polimerler kullanılmaktadır (Gürsoy ve diğ., 1989)

3.3.2. Çözünme kontrollü sistemler

Çözünme kontrollü sistemler de salım hızı yavaş olan ilaç etken maddeleri, kendiliğinden kontrollü/sürekli salınım yapıyormuş gibi davranış göstermektedir. Genel olarak suda hızlı çözünen maddelerin, çözünme hızındaki etkiyi yavaşlatarak salımın kontrollü hazırlanması imkansıza yakındır. Bu durumda ya ilaç etken maddeyi daha hidrofobik bir forma getirmek gerekir veya hidrofobik bir maddeyle etken madde kaplanarak çözünme özelliği kontrol edilebilir. İdeal bir şekilde salım hızını sabit ilerletebilmek için, çözünme de kullanılan yüzey alanı sabit kalmalıdır. Çözünme işlemi difüzyon-tabaka kontrollü ilerleyen bir sistemdir. Etkin maddenin çözünme hızının kontrolünü ise polimer kaplı yüzey ile çözünme ortamı arasında meydana gelen sıvı film tabakası tarafından kontrol edilir. Bu tarz sistemlere örnek olarak, vücut içerisine implante edilen veya deri üzerine hazırlanan rezervuar sistemin yapıştırılması ile kullanılabilirler. Deri üzerine yapıştırılan sistemlere transdermal sistemler adı verilir ve bu sistemlerde, ilaç deriden belli bir süre zarfında vücuda salınıp dolaşım sistemine katılmaktadır (Hoffman, 2012)

3.3.3. Su-Geçiş kontrollü sistemler

İlaç salımdaki hızın cihaz içerisine su girişi hızının cihaz içerisine su girişi ile control sağlanan sistemler ‘su geçiş kontrollü sistemler’ olarak adlandırılır. Bu tür cihazlar osmotik veya şişebilen sistemler olarak tasarlanabilirler. Ozmotik sistemlerde, ilaç lazerle çalışan bir delikten pompalanır. Sistemi çevreleyen yarı geçirgen zar, suyun sisteme girmesini sağlarken, ilaç miktarının korunmasına olanak tanır. Bu özellik sayesinde etki süresi artırılabilir.

İlacın oluşturduğu osmoz nedeniyle su sistemlere taşınır ve sistemdeki hacimsel artış ilacı dışarı pompalar. Polimer, ilacın etkisini artırmak ve kontrollü bir şekilde salınmasını sağlamak için kullanılır. Ayrıca, polimerin hidrofilik özelliği sayesinde ilaç daha hızlı çözünerek etkisini gösterir Bu süreç, ilacın kontrollü bir şekilde salınımını sağlar. Su matrisinin şişmesi, polimerin yapısının değişmesine ve ilacın serbest bırakılmasına olanak tanır. Bu sayede, ilaç molekülleri vücuda daha hızlı ve etkili bir şekilde ulaşabilir (Efe, 2010).

3.3.4. Ayarlanabilir sistemler

Ayarlanabilen sistemler genel olatak dışarıdan bir etkiyle veya kendi kendine ayarlanabilen olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Dışarıdan ayarlanabilen sistemlerde, ultrason veya manyetik alan gibi yöntemler kullanılabilir. Örneğin, polimer matris içine manyetik alan sağlayabilecek küçük küreler bırakılarak dışarıdan bir manyetik etki uygulanırsa ilaç difüzyon yolu ile salınır. Ultrason ise biyobozunabilir polimerlere uygulandığında, ilaç salımına etki için bozunma hızı arttırılabilir. Kendi kendine ayarlanabilen sistemler ise substrat-duyarlı veya çevre-duyarlı olarak geliştirilebilir. Substrat-duyarlı sistemlerde, belirlenen bir dış molecule karşı ilaç salami başlatılır. Çevre-duyarlı sistemler ise dış ortam koşulları, örneğin sıcaklık veya pH değişiklikleri gibi faktörlere yanıt olarak ilaç salınımı gerçekleşir. Örneğin, pH duyarlı polimerler sayesinde mide için zararlı olan ilaçlar bağırsakta salınabilir veya düşük pH koşullarında ağızda parçalanmadan mideye ulaşıp burada ilacın salınımı gerçekleşebilir (Ilmain ve diğ., 1991).

3.3.5. Kimyasal-kontrollü sistemler

Kimyasal kontrollü sistemlerde ilaç salımı, genellikle polimer matris içinde bulunan ilaç molekülleri ile matris içindeki kimyasal reaksiyonlar sonucunda gerçekleşir. Bu reaksiyonlar, ilacın belirli bir hızda veya belirli koşullarda serbest bırakılmasını sağlayacak şekilde tasarlanabilir. Polimerin bozunma süresi çeşitli parametrelerin etkisine bağlı olarak hesaplanır. Biyobozunur özelliğe sahip ilaç ve polimer arasındaki bağlardan yararlanarak kontrollü bir salım olayı gerçekleştirilebilir (Siepmann ve diğ., 2012).

3.3.6. Vücutta aşınan sistemler

Biyolojik olarak aşınabilir sistemlerde, ilaç başlangıçta polimer içine dağıtılır; ancak matris sistemlerinden ayrılan özellik olarak, vücut içinde polimer zamanla aşınarak belirli bir süre sonra azalır ve sonunda tamamen yok olur. Bu özelliği sayesinde bu tür implantlar cerrahi müdahale gerektirmeden doğal olarak vücut tarafından emilir. Polimer matrisin yavaş aşınması durumunda ilaç salımı genellikle difüzyon kontrollü olarak gerçekleşir, ancak aşınma kontrollü ilaç salımında difüzyon polimer aşınmasına göre daha kontrollü bir hızda ilerler.

3.3.6.1.Zincire takılı sistemler

Bu sistemlerde, bir polimer zincire kimyasal olarak bağlanmış ilaç, hidrolitik veya enzimatik olarak aradaki bağın parçalanması sonucu ilaç serbest bırakılarak ilaç salami tamamlanır ve polimer vücutta bozunarak uzaklaşır. Bu tür polimer-ilaç bileşikleri, zehirlenme oranını azaltmak, tedavide etkinlik sağlamak veya ilacın istenilen hedef bölgeye ulaşması amacıyla kısa süreli uygulamalarda kullanılmaktadır. Zincire takılı sistemleri diğer kontrollü salım sistemleri ile karşılaştırıldığında önemli avantajları görülmektedir. Örneğin, sistemde ilaç miktarının fazla olması ile geleneksel taşıyıcı sistemlerde polimer miktarının fazla bulunmasından dolayı ekonomik açıdan avantajlı kabul edilebilmektedir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1.Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Biyolojik aktivite ve yapısal analiz çalışmaları için gerekli olan PCL, TA, span 80, tiazol blue tetrazolyum bromür (MTT), penisilin-streptomisin, DMEM, DMSO Sigma'dan; trietilamin, sodyum dihidrojen fosfat(NaH_2PO_4), sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), Merck'ten; amonyak Atabay Kimya'dan; kloroform, formik asit Isolab'dan; fosforik asit, asetonitril Honeywell'den; Ribosiklib Cayman Chemical'dan; fetal sığır serumu (FBS) Gibco'dan; MCF-7 ve L-929 hücreleri ATCC'den temin edilmiştir. Tüm kimyasallar ekstra saflaştırma adımı uygulanmadan direkt olarak kullanılmıştır.

4.2.Çalışmada kullanılan araç-gereçler

Sentezlenen mikrobiyal CS MALDI-7090 model cihaz kullanılarak MALDI TOF kütle spektrometresi ile karakterize edilmiştir. Transdermal yamaların yapısal karakterizasyonu için Perkin Elmer UATR Two model FTIR kullanılmıştır. Çalışma kapsamında termal analizler Shimadzu 60 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ve Shimadzu 50 Termogravimetrik Analizör (TGA) ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sırasında FTIR ölçümleri 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ve ATR yüzey tarama sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Termal analizlerde ısıtma hızı TGA ve DSC için 10 °C/dk olarak ayarlanmış olup numunelerdeki kütle kaybı değerleri TGA ile ve camsı geçiş sıcaklıkları (Tg) DSC ile belirlenmiştir. Örnek miktarı ise TGA'da ~10 mg, DSC analizlerinde ~5 mg olarak ayarlanmıştır. Emülsiyon yönteminde kullanılmak üzere LABTron HZ1-A SET model homojenizatör 25000 rpm'de kullanılmıştır. Nanofiber üretimi için İnovensa NS1 model elektrospining cihazı kullanılmıştır. İlaç salım ölçümü için Agilent Technologies 1220 LC model HPLC cihazı kullanılmıştır. Yapıştırma testi analizleri MTS E42 model universal test cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür çalışmaları ve ilaç salım çalışmaları Biotek Eon marka Elisa mikroplate okuyucu ile gerçekleştirilmiştir. Yine *in vitro* biyouyumluluk çalışmalarında Nüve marka CO_2 inkübatörü, Chemocell marka UV biyogüvenlik kabini, Olympus CKX41 invert/floresan mikroskop kullanılmıştır. Genel istatistikler GraphPad Prism 8 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.Mikrobiyal kondroitin sülfat üretimi

Çalışma kapsamında, transdermal yama için kullanılan CS mikrobiyal olarak sentezlenmiştir. Kondroitin sentezinden sorumlu olan *kfoA, kfoC, kfoF* genlerini ve *Vitreoscilla* hemoglobin genini *(vgb)* taşıyan pETM6-PACF-pUC8:15 plazmidinin transforme edilmesiyle oluşturulan rekombinant E. coli suşu ile kondroitin sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın saflaştırma aşamasında pETM6-PACF plazmidinin kullanıldığı çalışmadaki yöntem takip edilmiştir. Yöntem, sıvı LB-amp besiyerlerinde üretilen bakteri biyokütlesinin toplanmasıyla başlayarak birkaç çökeltme aşamasına ve son olarak liyafilizatörde kurutma yapılmıştır. Daha sonrasında, elde edilen mikrobiyal kondroitine sülfatlama işlemi yapılmıştır. Ticari kondroitin sülfatlarda (CS), GalNAc tortularının neredeyse tamamı 4 ya da 6 konumunda sülfatlandığı ve 6-pozisyonunda sülfat oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir fakat yapılan işlem ile tüm GalNAc tortularının 6. pozisyonundaki hidroksil gruplarının sülfatlanıp, uygun bir şekilde 4. pozisyondaki hidroksil tortularını koruyan bir yapı elde edilmiştir.

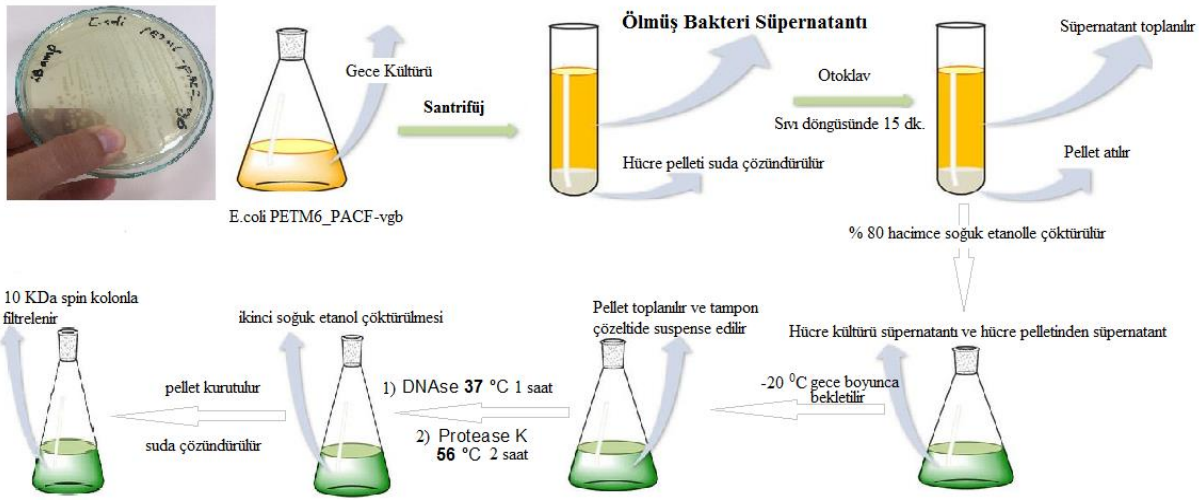
4.3.1. Mikrobiyal kondroitin üretimi

Mikrobiyal kondroitin üretimi için Şekil 4.1'de görüldüğü gibi oluşturulan rekombinant bakteri suşundan Luria bertani broth (LB) sıvı besiyerine ekim yapılarak 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra rekombinant bakteri kültürü 9000 rpm'de- 5 dakika süre ile santrifüj edilip elde edilen hücre peleti suda (yaklaşık 50 ml kadar) yeniden süspanse edildikten sonra 15 dakika süre ile otoklav edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatan farklı santrifüj tüplerine aktarılarak çözünmez materyalin uzaklaştırılması için ayrıca santrifüj edilmiştir. Elde edilen yeni süpernatanlar ayrı tüplere aktarılıp süpernatan 1 şeklinde etiketlenmiştir. Otoklavdan çıkan örnekler santrifüj edilecek ve süpernatanları ayrı tüplere aktarılıp süpernatan 2 şeklinde etiketlenmiştir. Süpernatan 1 ve süpernatan 2'lerin üzerine alkol hacmi % 80 olacak şekilde saf etanol eklenip çöktürme yapılıp alkol ilavesinin ardından örnekler -20 °C'lik dondurucuya konularak çöktürme işlemi sürdürülmüştür. Çöktürme işlemi sonunda numuneler santrifüj edilerek elde edilen peletler toplanmış ve parçalama tamponunda (yaklaşık 1 ml) yeniden süspanse edilmiştir. Numunelerin üzerine DNAse eklenerek (yaklaşık 1 µl) örnek 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine Protease K eklenip (yaklaşık 2.5 mg) 56°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra alkol hacmi % 80 olacak şekilde 2. bir alkol çöktürmesi

yapılmıştır ve peletler toplanıp saf suda (yaklaşık 1 ml) çözülerek spin kolonla filtreleme yapılmıştır. Filtrelemeden sonra geriye kalan kısım vakumla liyofilize edilmiştir.

4.3.2. Kondroitin sülfatlama işlemi

Elde edilen mikrobiyal kondroitinin 4-6 gramı 80-120 ml sulu DMF (Dimetil Formamid) içinde çözülüp solüsyon 0- 5 ºC'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra solüsyona 12-15 gram piridin sülfotrioksit eklenmiştir. Solüsyonun oda sıcaklığına ulaşması beklenmiş ve 400-800 ml NaCI'lü doymuş aseton ilave edilerek çöktürme işlemi yapılmıştır. Karışım filtrelenerek katı kısım 200-400 ml demineralize suda çözülüp elde edilen çözelti 1 N NaOH ile nötralize edilmiştir. Nötralizasyon sağlandıktan sonra çözelti 30-50ºC'ye kadar ısıtılmış ve 0.2-0.3 N 60 ml NaOH eklenmiştir. Bu sıcaklıkta 1-3 saat tutulan ve daha sonra oda sıcaklığı düzeyine gelmesi beklenen ve 1 N HCI asit ile nötralize edilmiştir. Çözelti 10 µS'den küçük geçirgenlik iletkenliğine sahip bir zar aracılığı ile filtrelendikten sonra vakum altında liyofilize edilerek kurutulmuştur. Hazırlanan mikrobiyal kondroitin sülfat yapısının analizi, 400-50000 m/z aralığında tarama yapılarak MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) kütle spektrometrisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

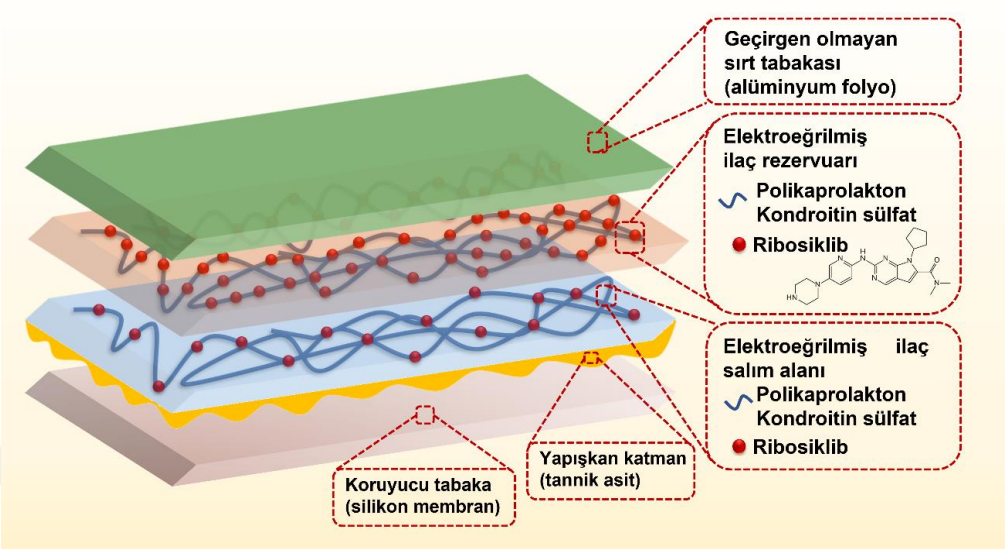


Şekil 4.1. Kondroitin üretimi

4.4.Transdermal yamaların hazırlanması ve karakterizasyonu

Çalışma kapsamında hazırlanan Ribosiklib içeren transdermal yamalar 5 katmandan oluşturulmuştur (Şekil 4.2). Bu katmanlar sırasıyla geçirgen olmayan sırt tabakası, elektroeğrilmiş polimerlerden oluşan ilaç rezervuarı katmanı, elektroeğrilmiş ilaç salım katmanı, yapışkan tabaka ve koruyucu katmanlardır.

Geçirgen olmayan sırt tabakası olarak alüminyum folyo ve koruyucu tabaka olarak silikon membran kullanılmıştır. Transdermal yama üretiminde kullanılan CS mikrobiyal olarak üretilmiştir.



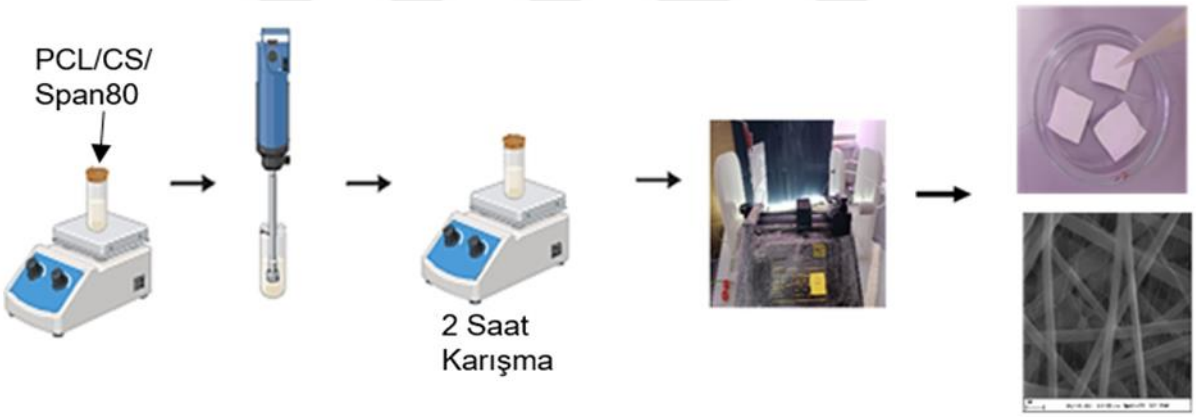
Şekil 4.2. Hazırlanacak transdermal yama dizaynı

4.4.1. Elektroeğrilmiş ilaç rezervuarının üretilmesi

Elektroeğrilmiş ilaç rezervuar katmanının üretilmesi için PCL ve CS karışımı alüminyum folyo üzerine elektroeğrilmiştir. Bu kapsamda, öncelikle PCL kloroform karışımında çözündürülerek oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra, kloroform/formik asit ile çözünen CS üzerine Span 80 eklenmiş ve homojenizatörden geçirilmiştir. Bu karışım, PCL üzerine eklenmiş ve 2 saat daha oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Burada PCL konsantrasyonu %10 olup sabit tutularak CS konsantrasyonu %1, %2, %4 olacak şekilde 3 farklı ilaç rezervuar katmanı elektroeğirme cihazı kullanılarak 20 kV'da, 20 cm mesafeden akış hızı 0,5 ml/saat olacak şekilde ayarlanan optimum koşulda yamalar üretilmiştir. Daha sonrasında belirli konsantrasyonlarda PBS/asetonitrilden hazırlanmış 200mg olacak şekilde Ribosiklib çözeltileri 3 farklı yama üzerine emdirilmiştir.

4.4.2. Elektroeğrilmiş ilaç salım katmanının üretilmesi

Elektroeğrilmiş ilaç salım katmanının üretilmesi için PCL/CS karışımı alüminyum folyo üzerine elektroeğrilmiştir. Bu kapsamda, öncelikle PCL kloroform karışımında çözündürülerek oda sıcaklığında 12 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra, kloroform/formik asit ile çözünen CS üzerine Span 80 eklenmiş ve homojenizatörden geçirilmiştir. Burada PCL konsantrasyonu %10 olup sabit tutularak CS konsantrasyonu %1, %2, %4 olacak şekilde 3 farklı ilaç salım katmanı elektroeğirme cihazı kullanılarak 20 kV'da, 20 cm mesafeden akış hızı 0,5 ml/saat olacak şekilde ayarlanan optimum koşulda yamalar üretilmiştir. Daha sonrasında belirli konsantrasyonlarda PBS/asetonitrilden hazırlanmış 100mg Ribosiklib olacak şekilde, ilaç rezervuar katmanında bulunan Ribosiklib miktarının yarısı oranında olacak şekilde 3 farklı yama üzerine emdirilmiştir (Şekil 4.3). Çalışmada üretilen transdermal yama sistemiyle alınan Ribosiklib'in dozu azaltılabilmektedir.



Şekil 4.3. Rezervuar ve İlaç salım katmanı üretilmesinin şematik gösterimi

4.4.3. Yapışkan katmanın üretimi

Yapışkan katman üretimi için birçok çalışmada yapıştırıcı özelliği nedeniyle tercih edilen TA kullanılmıştır. Öncelikle TA %15 (m/v) olacak şekilde saf suda çözündürülmüş ve elektroeğrilmiş ilaç salım katmanı bu TA solüsyonuna daldırılmıştır. 15 dk inkübasyondan sonra fazla TA saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bu katman 37 °C'lik inkübatörde 5 saat boyunca kurutulmuştur. Son olarak koruyucu katman olarak koruyucu membran kullanılarak üretilen yamalar deneylerde kullanılana kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.5.Transdermal yamaların yapısal, termal ve morfolojik karakterizasyonu

Hazırlanan transdermal yamaların her basamaktaki yapısal karakterizasyonları oda sıcaklığında FTIR analizi ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Termal bozunma eğrileri termogravimetrik analiz (TGA) ve camsı geçiş sıcaklıkları (Tg) ise diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) teknikleri ile belirlenmiştir. TGA ve DSC analizi 10 °C/dk hızla ve sırasıyla 25-600 °C ve -40-100 °C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir. Belirlenen 3 farklı transdermal yamaların morfolojileri ve çap hesaplamaları için SEM analizi yapılmıştır. Polimerlerin fiber çapları Image J programıyla gerçekleştirilmiştir.

4.6.Transdermal yamaların biyokimyasal karakterizasyonları

Transdermal yamaların biyokimyasal karakterizasyonu için ilaç tutma etkinliği, şişme derecesi, yama kalınlıkları, katlama dayanıklılığı, ağırlık homojenliği, çekme mukavemeti, soyulma direncinin belirlenmesi ve *in vitro* ilaç salım etkinliği çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. Transdermal yamaların şişme derecesinin belirlenmesi

Hazırlanan transdermal yamaların tamamen kuruyup kırılgan olmaması ve solvent difüzyonunu ölçmek için hazırlanan farklı içerikteki yamalara şişme testi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda önceden tartılan yama örnekleri %20 etanol içeren pH 6.8 olan fosfat tamponuna daldırılarak 2, 4, 6, 8, 10 ve 24. saatlerde çıkarılmış ve bir pamuk yardımıyla hafifçe kurulandıktan sonra tekrar tartılmıştır. Şişme derecesi aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{Şişme Derecesi} = \frac{\text{Ws} - \text{Wd}}{\text{Ws}} \text{x} 100$$

Burada Ws belirli bir süre tampon çözeltide kalarak şişmiş matların, Wd ise kuru matların ağırlığını simgelemektedir.

4.6.2. Transdermal yama kalınlıklarının belirlenmesi

Transdermal yamaların taşıyacakları ilaç miktarı açısından kalınlıklarının hesaplanması gerekmektedir. Yamaların kalınlıklarının belirlenmesi için bir dijital mikrometre ile 3 farklı bölgeden kalınlık ölçülerek ortalama kalınlık hesaplanmıştır.

4.6.3. Transdermal yamaların katlama dayanıklılığı

Transdermal yamalarının dayanıklılığını tespit etmek için 3 tekrarlı olacak şekilde her bir yama olabildiğince aynı nokta üzerinden katlanmış ve tamamen deforme olana ya da kırılana kadar katlamaya devam edilmiştir.

4.6.4. Ağırlık homojenliği

Transdermal yamaların ağırlık homojenliği testi için önceden 40 °C'de 4 saat kuruttuktan sonra 3 farklı yerden 1 cm^2 'lik kesitler alınarak tartılmıştır. Ortalama değerler alınıp standart sapma düzeyi hesaplanmıştır.

4.6.5. Transdermal yamaların soyulma direncinin belirlenmesi

Transdermal yamaların soyulma direnci Ren ve ark., tarafından rapor edilen 180° soyulma direnci metoduyla gerçekleştirilmiştir. Test için öncelikle Şekil 7'de görüldüğü gibi 2*20 cm^2 uzunluğunda transdermal yama parçası kesilmiş ve 10 cm'lik kısmı bir alüminyum plakanın üzerine hafif basınç uygulanarak yapıştırılmıştır. Daha sonra alüminyum plaka MTS marka mekanik test analizörünün alt kısmına sabitlenmiştir. Cihazın üst tarafındaki çekme aparatı yamaya tutturularak 180° yukarı doğru 300 mm/dk hızla çekilmiştir. Yamaların çekme test grafikleri kPa cinsinden verilmiştir.

4.6.6. Transdermal yamaların ilaç tutma verimliliği

Hazırlanan transdermal yamalar için hem ilaç rezervuarı hem de ilaç salım alanı için ayrı ayrı olmak üzere ilaç tutma verimliliği çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle hazırlanan elektroeğrilmiş matlar yaklaşık 2*2 cm^2 oranında kesilerek 0.02 ile 0.06 gr aralığında tartılmıştır.

Daha sonraüzerine belirlenen konsantrasyonda PBS/asetonitril ile hazırlanan Ribosiklib emdirildikten sonra yamalar 2/1 oranında kloroform/formik asit karışımında çözündürülmüştür. Daha sonra karışım diyaliz membranına bırakılarak 24 saat sonra salınan Ribociclib miktarı HPLC cihazında ölçülmüştür. HPLC analizinde C18 kolonu (25cm×4.6mm, 5µm; başlıklı silika) kullanılmıştır. Mobil faz olarak 25 mM potasyum fosfat tamponu ve asetonitrilin 60:40 v/v'lik karışımı kullanılıp ve 276 nm'de ölçüm alınmıştır. İlaç verimi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{İlaç Verimliliği} = \frac{\text{Salınan ilaç miktarı}}{\text{Eklenen ilaç miktarı}} \text{x} 100$$

4.6.7. Transdermal yamaların *in vitro* ilaç salım düzeylerinin belirlenmesi

Ribosiklib içeren ilaç rezervuar katmanı ve ilaç salım katmanı için ayrı ayrı PBS ve asetonitril karışımındaki *in vitro* ilaç salım düzeyleri belirlenmiştir. Salım için öncelikle pH 7.4 PBS tamponu hazırlanmış ve belirlenen oranlarda asetonitril eklenerek 4 cm^2 olacak şekilde kesilen yamaların ağırlığına bağlı olarak belirlenen miktarda ilaç emdirilmiştir. 5 saat sonunda ilaçlı yamalar 14 ml çözelti içine bırakılmıştır. Daha sonra belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 ve 48 saat) yamaların bulunduğu çözeltiden 40 µl örnek alınarak üzerine PBS/asetonitril karışımından eklenmiştir. Salım 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Alınan örnekler HPLC sisteminde 276 nm dalga boyunda 0.8 dk/ml akış hızında tayin edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlara karşı zaman grafiği çizilerek % ilaç salım düzeyi belirlenmiştir.

4.7.Transdermal yamaların *in vitro* etkinliğinin belirlenmesi

Hazırlanan transdermal yamaların *in vitro* biyouyumlulukları ve *in vitro* antikanser aktiviteleri ile deri difüzyonu testleri gerçekleştirilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 8 programı ile yapılmıştır.

4.7.1. Transdermal yamaların *in vitro* biyouyumluluklarının belirlenmesi

Hazırlanan transdermal yamaların *in vitro* biyouyumluluklarını değerlendirmek için çalışmanın bu basamağında L-929 (mus musculus cinsi fare fibroblast) hücreleri üzerindeki indirek sitotoksisiteleri, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolyl blue (MTT) testi ile belirlenmiştir.

Deney protokolü ISO-10993-5 ‘‘Biological Evaluation of Medical Devices’’ standartlarına göre hazırlanmıştır. Yöntemin temeli tetrazolyum tuzu olan MTT sarı renkli olup, yaşayan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz enzimine spesifik olarak bağlanmaktadır. Bağlanma miktarına bağlı olarak canlı hücre oranı spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Hazırlanan ilaçsız matlardan 0.1 g tartıldıktan sonra ön ve arka yüzü ayrı ayrı 1 saat UV ile steril edilerek 72 saat süreyle DMEM hücre medyumunda inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra medyum matlardan ayrılarak önceden inkübe edilmiş (24 saat) L929 hücreleri 96 kuyucuklu platelere ekilmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda MTT protokolüne göre 550 nm’de mikroplate okuyucu ile okuma yapılarak sonuçlar % canlılık olarak verilmiştir. Ayrıca ekstraktların üzerinde kültürlenen hücrelerin fotoğrafları Olympus CKX41 marka invert/floresan mikroskop vasıtasıyla görüntülenmiştir.

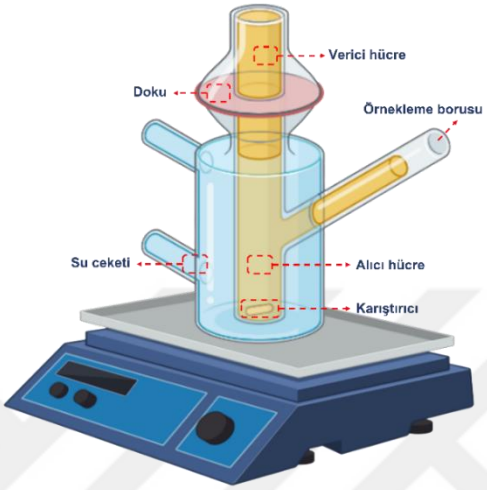
4.7.2. Transdermal yamaların *in vitro* antikanser aktivitesinin belirlenmesi

Ribosiklib ilacının transdermal yama içinde *in vitro* etkinliğini koruyup korumadığını belirlemek için yamaların ilaç salımı sonucunda *in vitro* antikanser aktivitesi belirlenmiştir. Bu kapsamda öncelikle hazırlanan ilaçlı yamalar 0.1 g tartıldıktan sonra ön ve arka yüzü ayrı ayrı 1 saat UV ile steril edilerek 48 saat boyunca DMEM hücre medyumunda 37 °C’lik CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Daha sonra medyum matlardan ayrılarak önceden inkübe edilmiş (24 saat) MCF-7 (meme kanseri) hücreleri 96 kuyucuklu platelere ekilmiştir. 24 saat inkübasyonun sonunda MTT protokolüne göre 550 nm’de mikroplate okuyucu ile okuma yapılarak sonuçlar % canlılık olarak verilmiştir. Yamalarda bulunan Ribosiklib’in antikanser aktivitesi aynı konsantrasyonda hazırlanacak Ribosiklib çözeltileri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca ekstraktların üzerinde kültürlenen hücrelerin fotoğrafları Olympus CKX41 marka invert/floresan mikroskop vasıtasıyla görüntülenmiştir.

4.7.3. *İn vitro* difüzyon testi

Ribosiklib ilacının deri geçirgenliğini *in vitro* olarak test etmek için Franz difüzyon hücresi kullanılmıştır. Test için rat karın derisi kullanılmış ve 5 adet rattan toplam 20 parça deri alınmıştır. Alınan deri örnekleri 0.32 M izotonikte hazırlanmış amonyum hidroksitte 45 dk bekletilerek kıl, yağ ve deri altı dokuların çıkarılması sağlanmıştır. Daha sonra deriler salinde yıkanarak, pH 7.4 fosfat tamponunda 1 saat boyunca dengelenmiştir. Temizlenmiş deri Şekil 4.4‘te gösterilen verici hücrenin alt kısmına yerleştirilecektir. Daha sonra transdermal yama temizlenmiş ve kurutulmuş deri üzerinde yerleştirilerek parafilm ile

kaplanacaktır. Sistem bir karıştırıcı üzerine yerleştirilerek 300 rpm'de karışmaya bırakılacaktır. Sıcaklık 37 °C olarak ayarlanacaktır. Belirli zaman aralıklarında (0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 ve 48 saat) 2 ml örnek alınacaktır. Yerine 2 ml solüsyon eklenerek sıvı miktarı sabit tutulacaktır. Alınan örnekler başlık 3.1'de belirtildiği HPLC sisteminde tayin edilecektir. Belirlenen konsantrasyonlardan % geçirgenliğe karşı zaman grafiği çizilecektir.



Şekil 4.4. Franz difüzyon hücresi dizaynı

4.8.İstatistiksel analizler

İn vitro çalışmalar için tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 8 programı "one way anova" testi ile gerçekleştirilmiş olup sonuçlarda $p<0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Veriler aritmetik ortalama±standart sapma olarak gösterilmiştir.

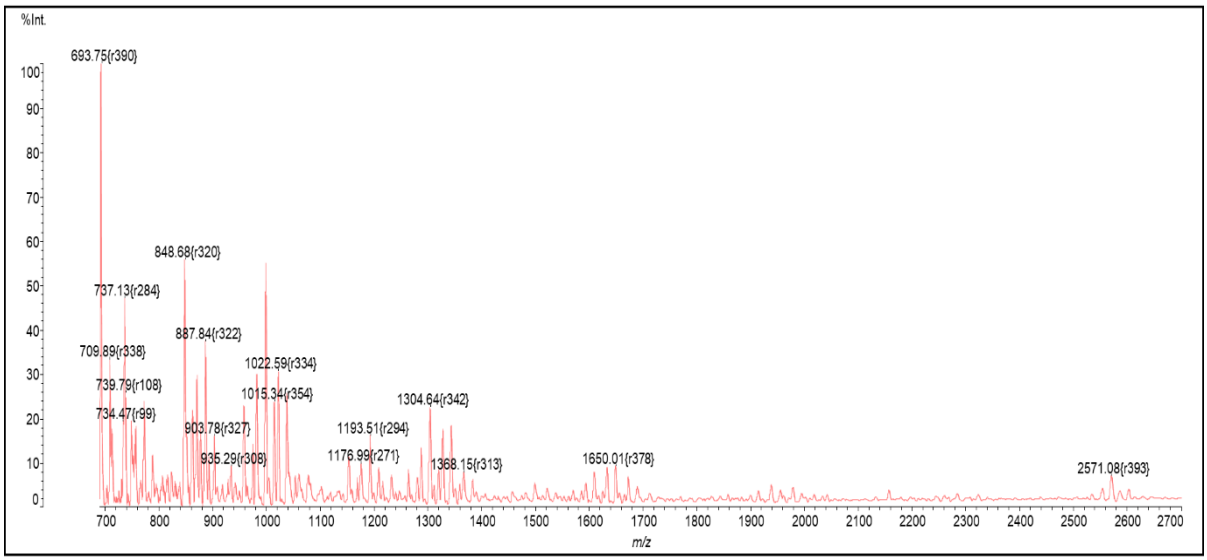
5. BULGULAR

Çalışma kapsamında mikrobiyal CS ve PCL bazlı nanofiber transdermal yamalar üretilerek, yapısal ve biyokimyasal karakterizasyonları ve *in vitro* etkinlik analizleri gerçekleştirilmiştir. PCL/CS içerikli yama üretimi Span 80 kullanılarak elektroeğirme yöntemiyle hazırlanmıştır. Daha sonra yamalara farklı oranlarda Ribosiklib emdirilmiştir. Mikrobiyal CS'nin yapısal analizi MALDI TOF kütle spektromoteresi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen yamalara yapısal ve temel karakterizasyonu öncelikle FTIR, TGA, DSC ile gerçekleştirilmiş olup yüzey özellikleri SEM ile incelenmiştir. Hazırlanan ilaçlı yamaların ilaç tutma etkinliği, şişme derecesi, yama kalınlıkları, katlama dayanıklılığı, ağırlık homojenliği, çekme mukavemeti, soyulma direncinin belirlenmesi, ilaç tutma verimi ve *in vitro* ilaç salım etkinliği gibi biyokimyasal karakterizasyonları da incelenmiştir. Sentezlenen yamaların ilaç salım düzeyine bakarak 3 farklı PCL/CS formülasyonu seçilerek belirlenen çalışmalara ek olarak yamaların biyouyumluluk ve antikanser özellikleri de analiz edilmiştir. *İn vitro* difüzyon testi ile rat karın derisi kullanılarak ilacın deri geçirgenliği belirlenmiştir. Yamaların dizaynı 5 katman olarak belirlenmiş ve transdermal yamada geçirgen olmayan sırt tabakası, ilaç rezervuar katmanı, ilaç salım katmanı, TA ile yapışkan katman ve koruyucu tabaka şeklinde son halini almıştır. Seçilen 3 farklı formülasyonun yapısal, termal, biyokimyasal karakterizasyonu ile *in vitro* etkinliğinin belirlenmesi deney sonuçları aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

5.1. Mikrobiyal kondroitin sülfat yapısının karakterizasyonu

Çalışmada sentezlenen mikrobiyal CS Şekil 5.1'de görülen MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile yapısal olarak analiz edilmiştir. Grafik, kütle-yük oranı (m/z) ile iyonların yoğunluğunu (% Int) göstermektedir. Spektrumdaki tekrarlanan diziler CS'nin polimerik veya oligosakkarit yapısının bir göstergesidir. Kromotogramdaki en yüksek pikler 693.75-734.47 m/z'deki diziyi oluşturan pikler olup molekülde hidrolizlenmiş CS olduğunu göstermektedir. İkinci dizi 848.68-935.29 m/z arasında görülmekte olup molekülün dimer formu ya da Na gibi iyonların bağlanması olarak yorumlanabilir.

Aynı şekilde 1015.34, 1176.99, 1304.64 ve 1650.0 m/z civarındaki pikler daha yüksek molekül ağırlıklı oligomerik yapı dizisine ve bunların farklı iyonlarla yaptıkları bileşiklere işaret etmektedir. Genel olarak 500-1700 m/z aralığında yoğun bir pik dağılımı görülmekte olup bu durum, aralığın CS'nin karakteristik parçalanma ürünlerini içerdiğini gösterir. Son olarak CS'nin moleküler ağırlığını gösteren 2571.08 m/z'de görülen pik molekülde nispeten düşük oranda görülmektedir.



Şekil 5. 3. Mikrobiyal CS'nin MALDI TOF kromotogramı

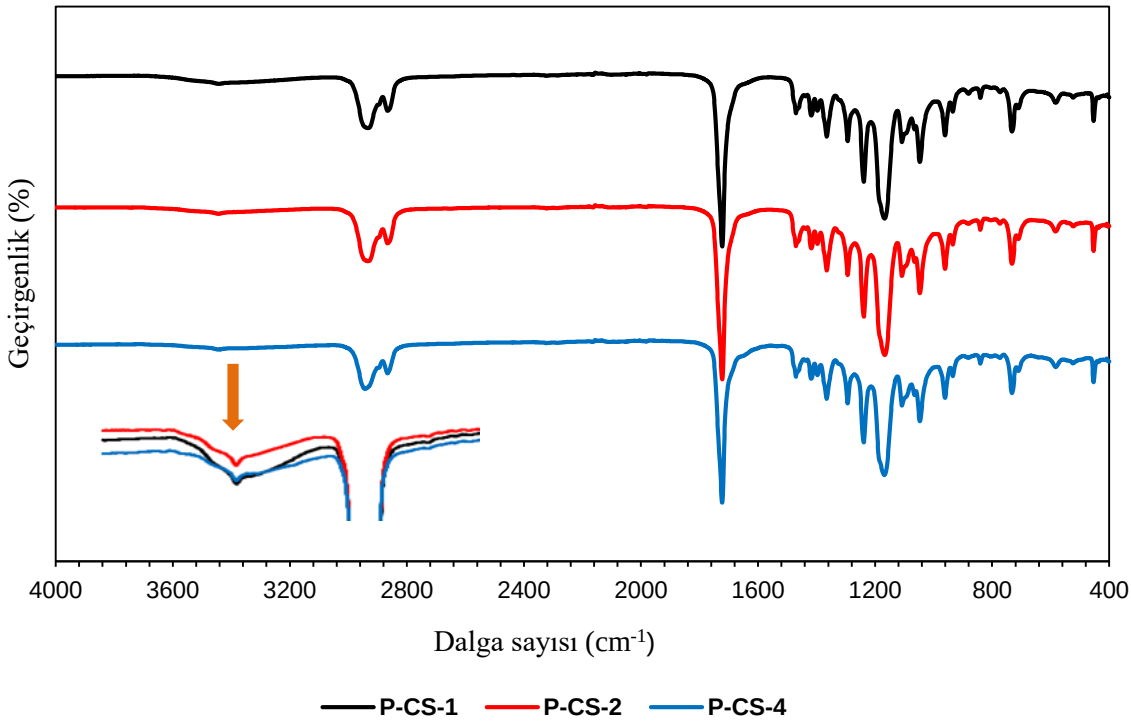
5.2.Transdermal yamaların hazırlanması yapısal, termal ve morfolojik karakterizasyonları

Çalışmada kullanılan PCL hidrofobik bir polimer olup elektroeğrilmiş yapılarda vazgeçilmez bir ajandır. CS ise hidrofiliktir ve suda çok iyi çözünme özelliğine sahiptir. PCL/CS içeren fiber çözeltisi hazırlamak yapılarından dolayı zor olacağından emülgatör ile homojen karışması sağlanarak elektrospinning için uygun çözelti haline getirilmiştir. Elektrospining için uygun olan koşullar sağlandıktan sonra CS miktarı farklı olan 3 farklı yama hazırlanmıştır. Bu yama formülasyonları optimizasyonlar yapıldıktan sonra hem rezervuar hem de ilaç salım katmanı olarak kullanılmıştır. Hazırlanan yamaların ilaçlı ve ilaçsız olacak şekilde yapısal karakterizasyonları FTIR ile, termal karakterizasyonlar ise TGA, DSC ve DTA ile gerçekleştirilmiştir. Morfolojileri ve çap hesaplamaları için SEM analizi yapılmıştır.

Transdermal yamaların biyokimyasal karakterizasyonları için ilaç tutma verimliliği, ilaç salım düzeyi, şişme derecesi, yama kalınlıkları, katlama dayanıklılığı, ağırlık homojenliği, çekme mukavemeti, soyulma direncinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.2.1. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 transdermal yamalarının yapısal karakterizasyonları

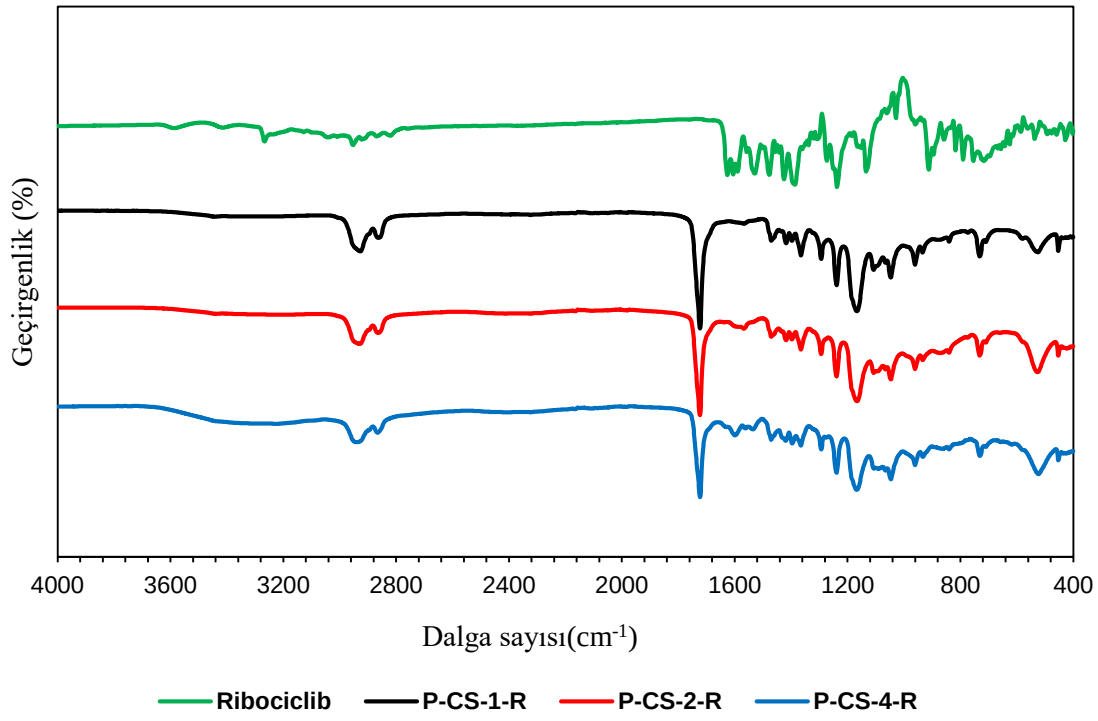
Çalışma kapsamında elektroeğirme işleminde kullanılan PCL ve CS polimerleri biyouyumluluğu ile bilinen polimerlerdir. Şekil 5.2'de Ribosiklib içermeyen 3 farklı transdermal yama formülasyonunun spektrumları görülmektedir. Yamalar PCL/CS'nin fiziksel kompozit karışımı olması sebebiyle bu polimerlere ait spesifik piklerin görülmesi beklenmektedir. Grafikte siyah ile gösterilen spektrumdan maviye doğru sırasıyla CS miktarı artmaktadır. Spektrumda 3500-3100 cm^{-1} aralığında hidroksil (OH) ve amin (NH) gruplarına ait gerilme titreşimlerini gösteren geniş bir bant bulunmaktadır. Bu bant CS'ye ait olup yama formülasyonlarında CS PCL'nin sırasıyla %1, %2 ve %4 oranında olduğu için bu bant FTIR spektrumunda çok net görülmemektedir. Yine 2950-2850 cm^{-1} aralığında metilen gruplarına (CH_2) ait simetrik ve asimetrik gerilme titreşimleri gözlemlenmekte olup bu pikler PCL nin karakteristik pikleridir. ~1150 cm^{-1}'de görülen C-O-C pikleri PCL ve CS'nin yapısındaki karakteristik pikler olup CS için aril veya alkil zincirlerinde ve sülfat gruplarında bulunan C-O-C bağlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir (Azizi ve diğ., 2018). Ayrıca yaklaşık 1726 cm^{-1}'de bulunan karbonil gerilmesi de PCL'ye spesifiktir ve bu pik literatürle uyum içinde görülmektedir. CS'ye ait 1614 cm^{-1}'de görülmesi gereken karboksilat pikleri kompozitin CS içeriğinin düşük olması sebebiyle net olarak görülmemektedir. Öte yandan 1200-1250 cm^{-1}'de görülen pik CS'deki spesifik S=O gerilmesinin varlığını net olarak göstermektedir. Ayrıca ~1240 cm^{-1} (asimetrik COC gerilmesi), ~1190 cm^{-1} (OC-O gerilmesi), 1170 cm^{-1} (simetrik COC gerilmesi) ve 1294 cm^{-1} (kristal fazda C-O ve C-C gerilmesi)'de görülen gerilme pikleri PCL'nin varlığını ispatlamaktadır. Spektrumlar genel olarak incelendiğinde artan CS oranının bariz pik farkları oluşturmadığını görmekteyiz. Bunun temel sebebi, yamalarda mikrobiyal CS'nin PCL'ye oranla çok daha düşük oranda bulunmasından kaynaklanmaktadır (Ali ve diğ., 2014; Galus ve diğ., 2016).



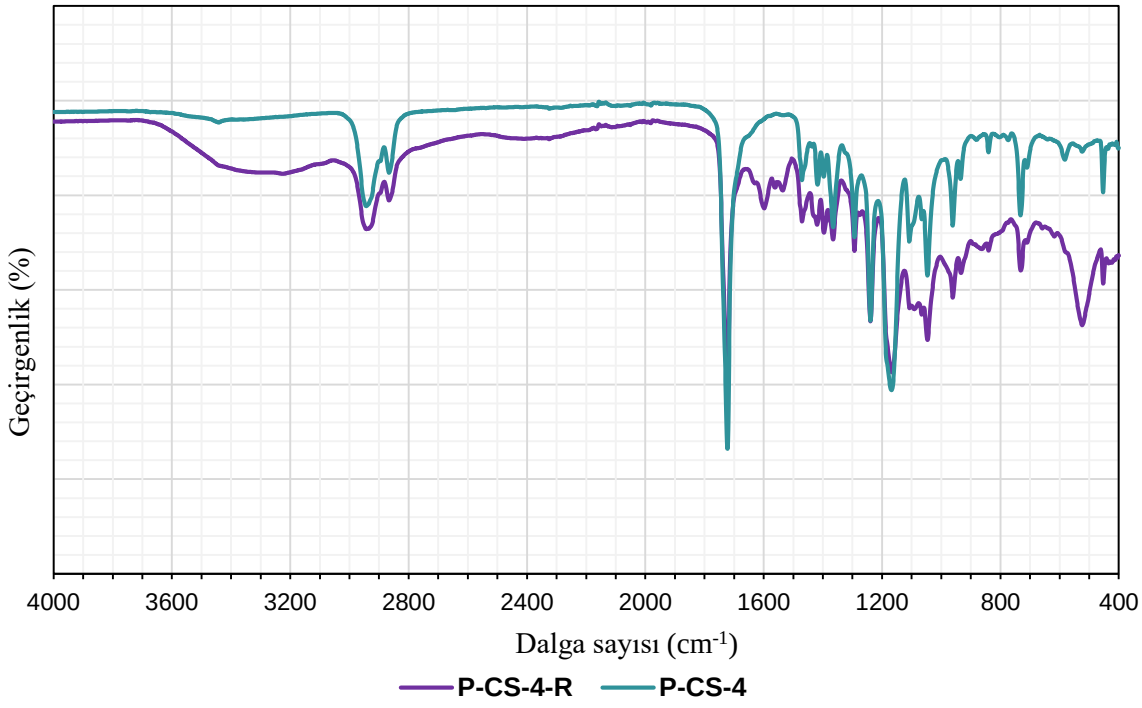
Şekil 5. 4. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 transdermal yamaların FTIR spektrumları

5.2.2. P-CS-1-R, P-CS-2-R, P-CS-4-R transdermal yamalarının FTIR sonuçları

Transdermal yama üretiminde hazırlanan PCL/CS rezervuar ve ilaç salım katmanı formülasyonların sırasıyla 200 mg/cm^2 ve 100 mg/cm^2 olacak şekilde Ribosiklib yüklenmiş olup bu formülasyonların FTIR sonuçları Şekil 5.3'te gösterilmektedir. Ayrıca Ribosiklib yüklenmiş ve yüklenmemiş P-CS-4 formülasyonları için çakıştırmalı spektrum da Şekil 5.4'te görülmektedir. Spektrumlara bakıldığında, öncelikle Ribosiklib katılmış P-CS-4-R polimerine ait spektrumda 3600-3100 cm^{-1} aralığında NH gruplarına ait geniş bir bant görülmekte olup bu, ilacın yapıya başarılı bir şekilde dahil olduğunun en büyük göstergesidir. Ayrıca 1610-1550 cm^{-1} aralığında gelen gerilme bandı amid I ve amid II bantlarına aittir ve Ribosiklib içeren polimerlerde içermeyenlere kıyasla belirgin olarak daha büyük gözlenmiştir. Bu pikler ile Ribosiklib'in yapıya başarılı bir şekilde dahil olduğu görülmektedir. İlaç içeren yamalara bakıldığında yine ilaç içermeyenlere benzer polimerlere ait pikler görülmekte ve polimerler arasında bariz pik farkı göze çarpmamaktadır. Bunun sebebi aynı şekilde CS oranının PCL'ye kıyasla daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır.



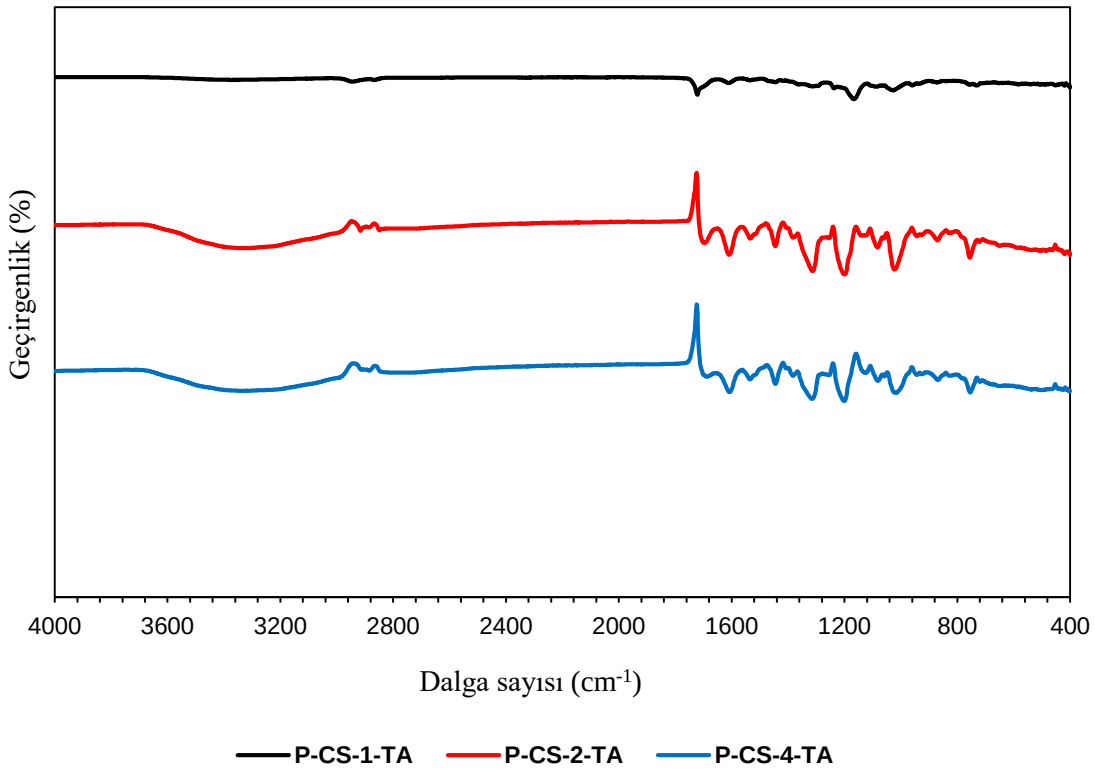
Şekil 5. 5. P-CS-1-R, P-CS-2-R, P-CS-4-R ve Ribosiklib'in FTIR spektrumları



Şekil 5. 6. P-CS-4-R ve P-CS-4'e ait FTIR spektrumları

5.2.3. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA, P-CS-4-TA transdermal yamalarının FTIR sonuçları

Çalışma kapsamında hazırlanan PCL/CS ilaç salım katmanı formülasyonlarının üzerine TA kaplanmış olup bu formülasyonların FTIR sonuçları Şekil 5.5'te gösterilmektedir. Spektrumlara bakıldığında, öncelikle TA kaplanmış P-CS-TA polimerine ait spektrumda 3600-3100 cm^{-1} aralığında OH gruplarına ait geniş bir bant görülmekte olup bu, TA'nın yapıya başarılı bir şekilde dahil olduğunun en büyük göstergesidir.

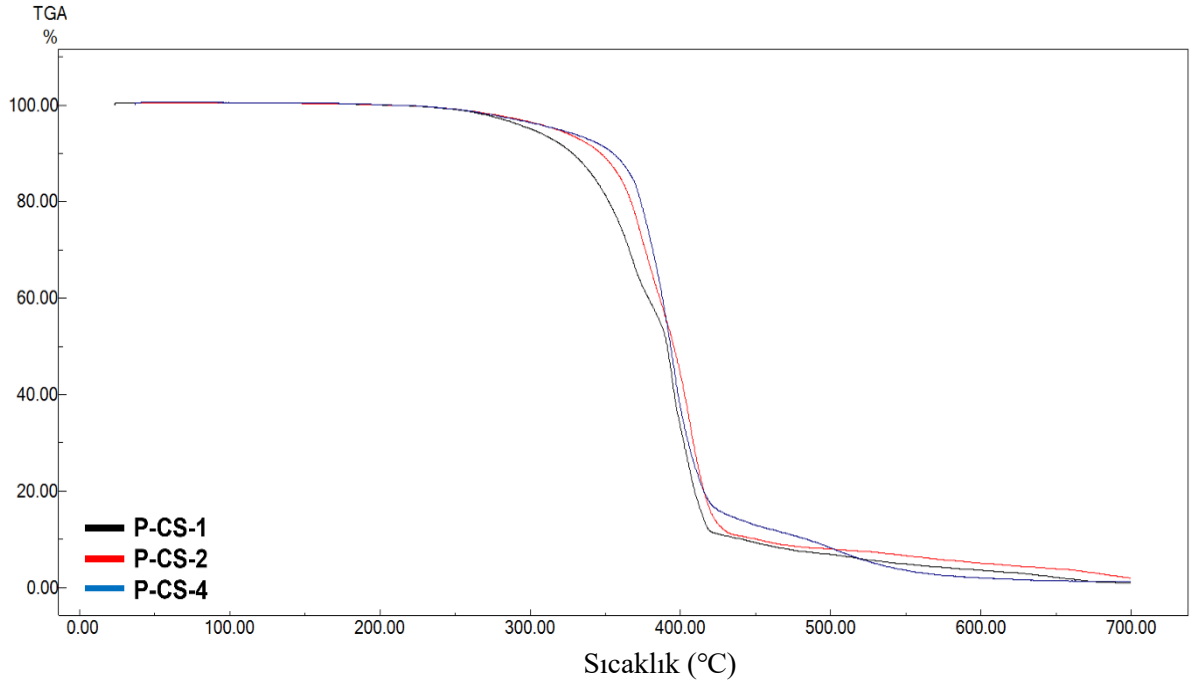


Şekil 5.7. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA'ya ait FTIR spectrumları

5.2.4. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 transdermal yamalarının termal karakterizasyonları

Üretilen transdermal yama formülasyonların termal karakterizasyonlarını yapmak için TGA, DTA ve DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Transdermal yamalar için termal kararlılık dolaylı olarak raf ömrünün nispeten uzun olması anlamına geldiğinden polimerlerin kararlı olması kritik öneme sahiptir. Sentezi gerçekleştirilen polimer yapılarının termal kararlılıklarındaki değişimi en iyi ortaya koyan teknik TGA tekniğidir. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yapılarına ait TGA termogramı Şekil 5.6'da görülmektedir.

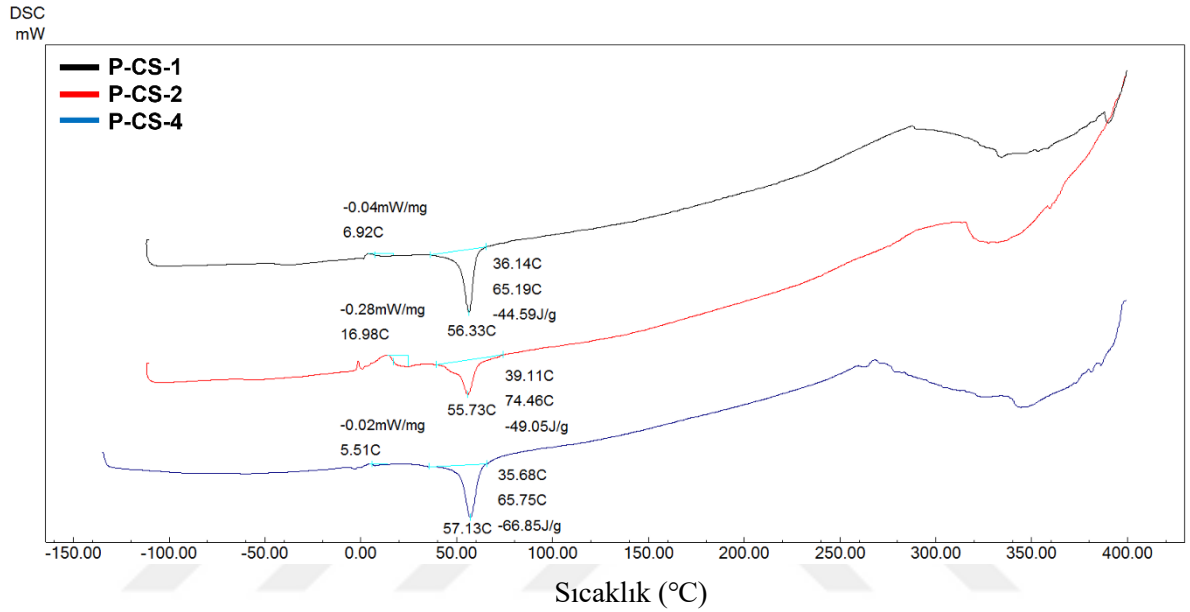
İlk degredasyon 290 °C civarında gerçekleşmekte olup polimerlerdeki yumuşak segmentlere ait bozulmayı temsil etmektedir. Bu degredasyon stabil bir şekilde ~380 °C'ye kadar devam etmektedir. İkinci bozunma ~380-420 °C arasında görülmektedir ve polimerlerdeki sert segmentlere ait bozunmayı temsil etmektedir. Ayrıca termogramlarda göze çarpan bir fark da CS oranının arttıkça bozunmanın nispeten azalmasıdır. Bu da CS'nin yapıya dahil olmasının termal stabiliteyi yükselttiği anlamına gelmektedir. Ayrıca ~600 °C'deki kül verimleri %10'un altında görülmüştür.



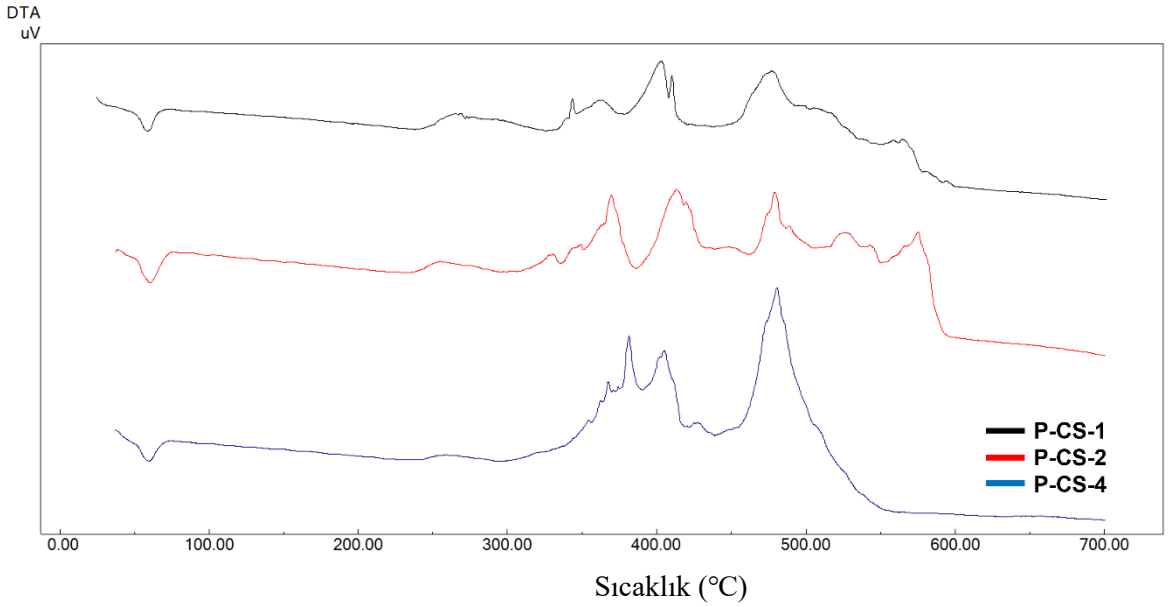
Şekil 5.8. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4'e ait TGA termogramları

P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yapılarına ait DSC ve DTA termogramları sırasıyla Şekil 5.7 ve Şekil 5.8'de verilmiştir. DSC termogramında polimerlerin Tg (termal geçiş sıcaklığı) değerleri ölçülmüş olup bu değer genellikle amorf polimerlerin yumuşak veya sert yapıda olmasını ve dolayısıyla fleksibiliteyi tayin eder. Yamaların fleksibl yapıda olması deri hareketleri uyum sağlaması açısından önem arz etmektedir. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 polimerlerinin Tg değerleri sırasıyla 6.92, 16.98 ve 5.51 °C olarak ölçülmüştür. Bu değerler nispeten polimerlerin oda sıcaklığında yumuşak olduğunun göstergesidir. Polimerlerin özellikle PCL'den kaynaklı Tm değerleri de sırasıyla 56.33, 55.73 ve 57.13 °C olarak ölçülmüştür. Polimerler arasında anlamlı bir Tg ve Tm farkı da görülmemiştir.

Polimerlerin DTA termogramlarına bakıldığında tamamen TGA değerlerini desteklediği görülmektedir. Genel olarak polimerler arasında büyük farklar görülmemekle birlikte P-CS-4 polimerinin 230-300 °C arasındaki bozunmasının diğer polimerlere nazaran geç başladığı görülmekte bu da TGA da yorumlandığı gibi artan CS'nin termal stabiliteyi arttırdığını göstermektedir. Ayrıca TGA'da görülmeyen 50-100 °C arasında görülen endotermik pikler muhtemelen polimerlerdeki küçük miktarlardaki nemin uzaklaşmasını göstermektedir.



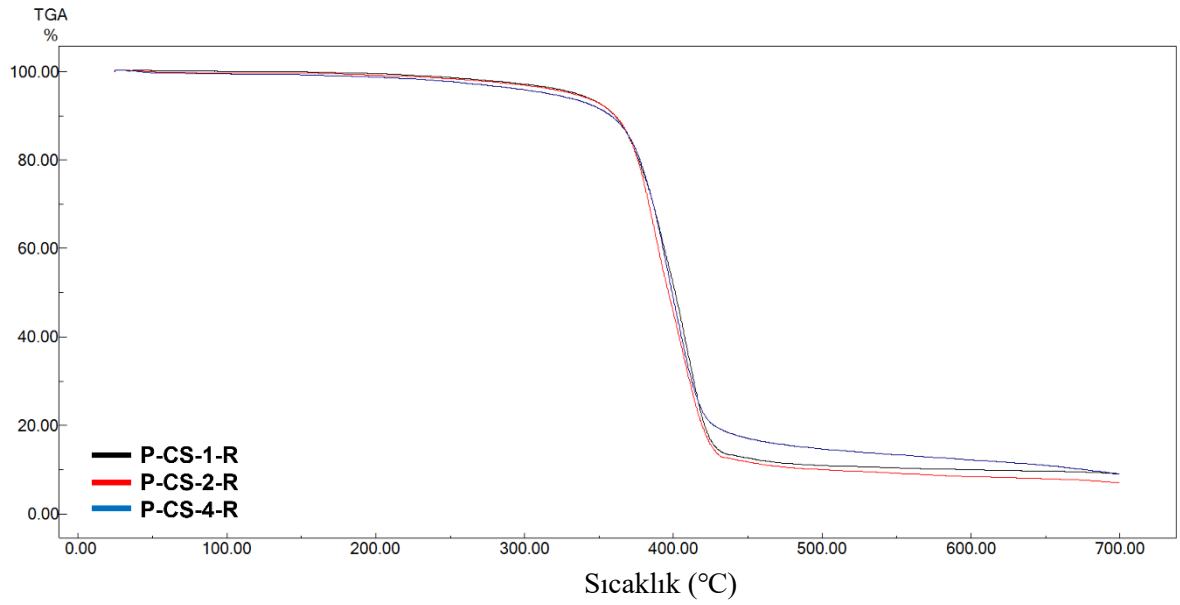
Şekil 5.9. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4'e ait DSC termogramları



Şekil 5.10. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4'e ait DTA termogramları

5.2.5. P-CS-1-R, P-CS-2-R, P-CS-4-R transdermal yamalarının termal karakterizasyonları

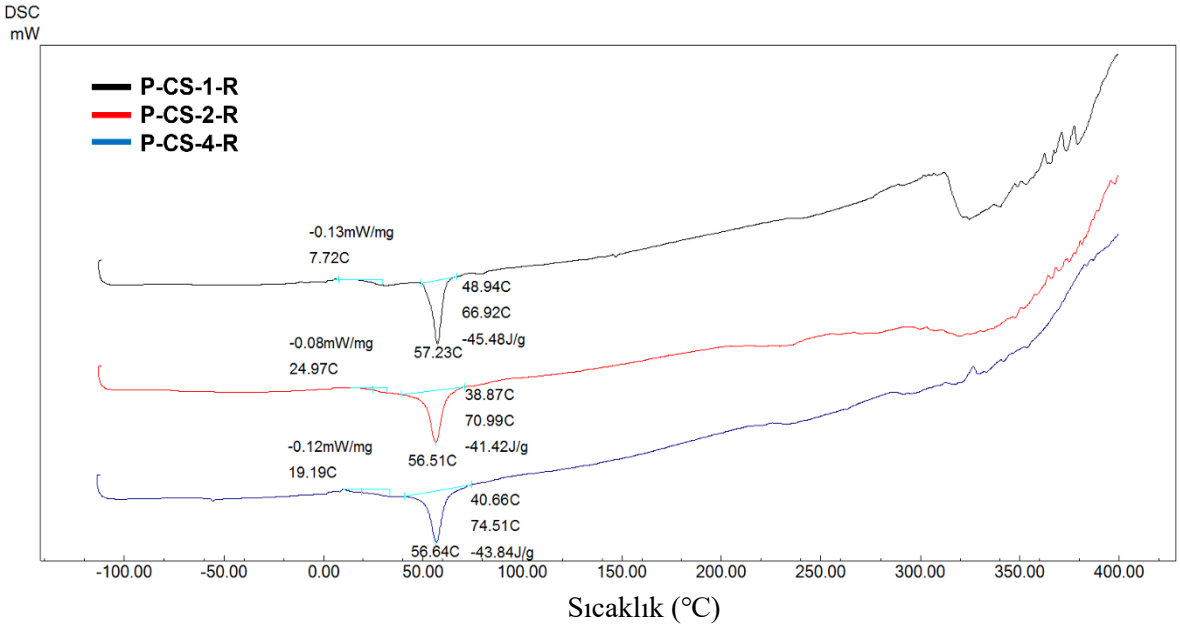
Ribosiklib içeren P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R yapılarına ait TGA termogramı Şekil 5.9'da görülmektedir. Yapıda nem bulunmadığı için genellikle 90 °C civarında gerçekleşen dramatik kütle kaybı polimerlerde görülmemiştir. İlk degradasyon 350 °C civarında görülmekte olup bu sert segment bozunmasına işaret etmektedir. Yumuşak segment bozunması ilaç içeren polimerlerde net olarak gözlemlenememiştir. Bu bozulma ~420 °C'ye kadar devam etmiştir. Polimerler arasında dikkate değer bir fark görülmemekle beraber yamalara Ribosiklib dahil edilmesiyle termal kararlılığın arttığı söylenebilir. Ayrıca ilaç içermeyen polimerlere kıyasla nispeten yüksek görülen kül miktarı Ribosiklib'in eser düzeyde inorganik madde içerdiğinin göstergesi olabilir.



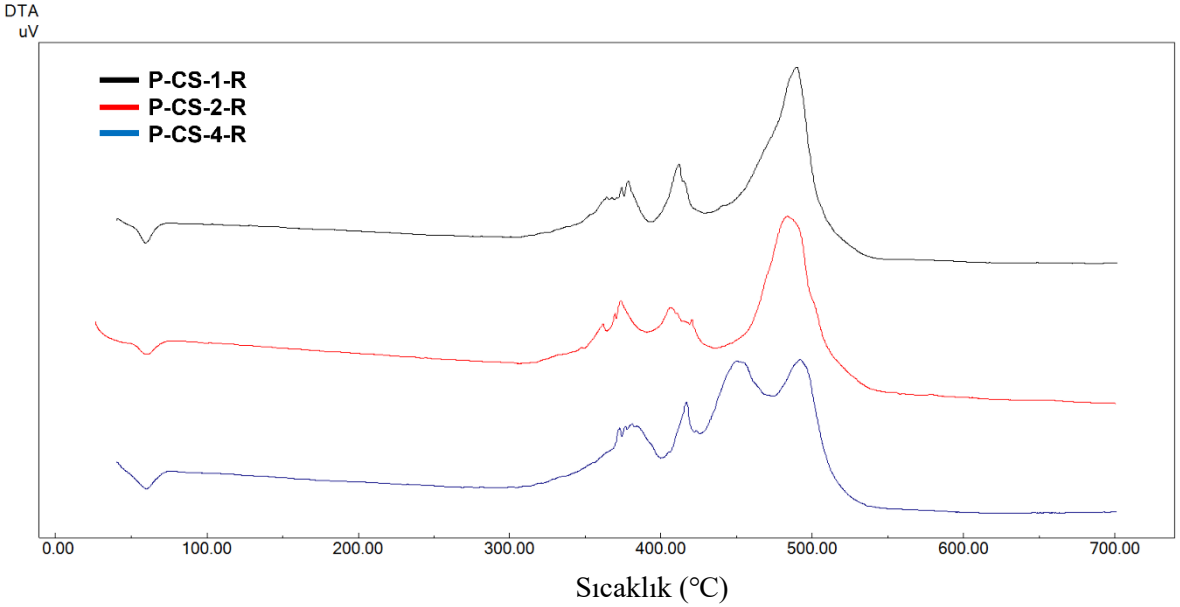
Şekil 5.11. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-R-4'ye ait TGA termogramları

Yine Ribosiklib içeren P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R polimerlerinin DSC ve DTA termogramları Şekil 5.10 ve Şekil 5.11'de görülmektedir. DSC termogramında görülen Tg değerleri sırasıyla 7.72, 24.97 ve 19.19 °C olarak ölçülmüştür. Değerler arasında anlamlı bir farkın olmaması polimerlerin benzer yapısından kaynaklanmaktadır. Ayrıca Ribosiklib yapısının polimerin ortalama Tg değerini ve dolayısıyla fleksibiletisini etkilemediği görülmüştür. Son olarak polimerlerin Tm değerleri sırasıyla 57.23, 56.51 ve 56.64 °C olarak ölçülmüştür.

Polimerlerin DTA termogramlarına bakıldığında bozunmanın TGA'da olduğu gibi ilaçsız analoglarına göre azaldığı ve polimerlerin genel olarak daha kararlı hale geldikleri görülmektedir. Aynı şekilde TGA'da görülemeyen 50-100 °C arasındaki küçük pikin az miktardaki nemin uzaklaşmasına ait olduğu düşünülmektedir. İkinci degradasyon 320 °C'de görülmek olup bu sıcaklığa kadar herhangi bir bozulma görülmemektedir. İlaçsız polimerlerin aksine Ribosiklib içeren polimerlerde termal kararlılık görünür bir şekilde artmıştır.



Şekil 5.12. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-R-4'ye ait DSC termogramları



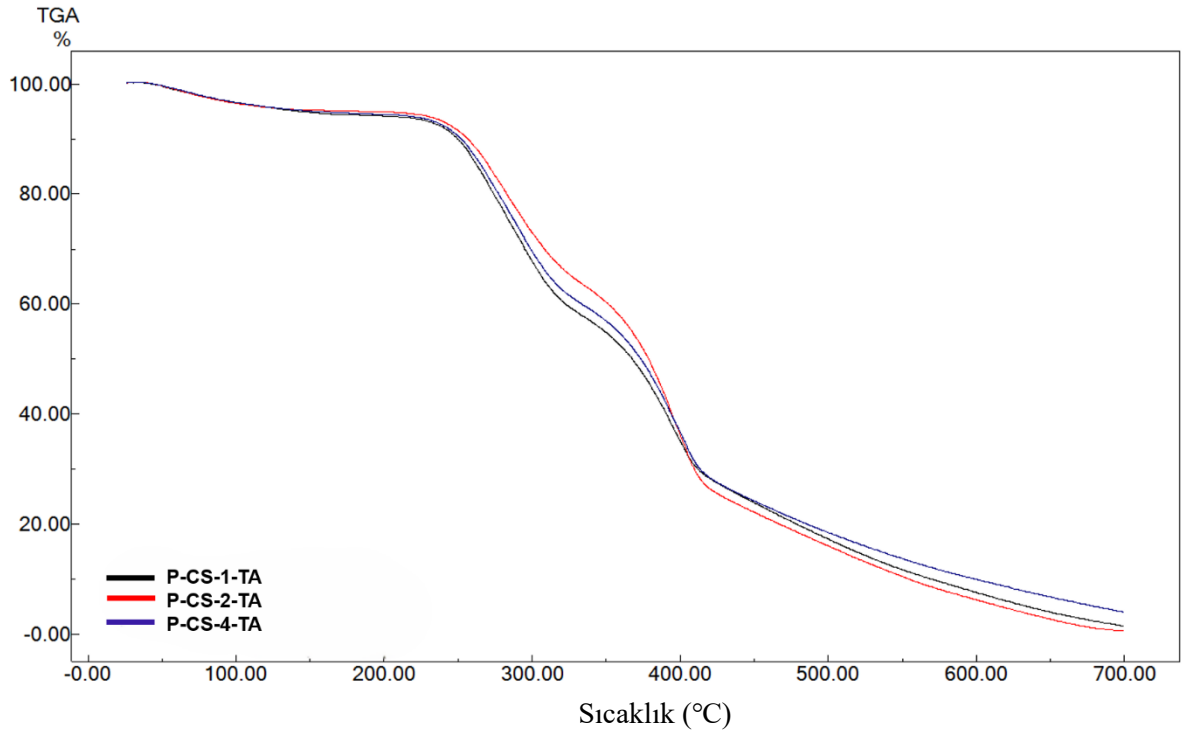
Şekil 5.13. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-R-4'ye ait DTA termogramları

5.2.6. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA transdermal yamalarının termal karakterizasyonları

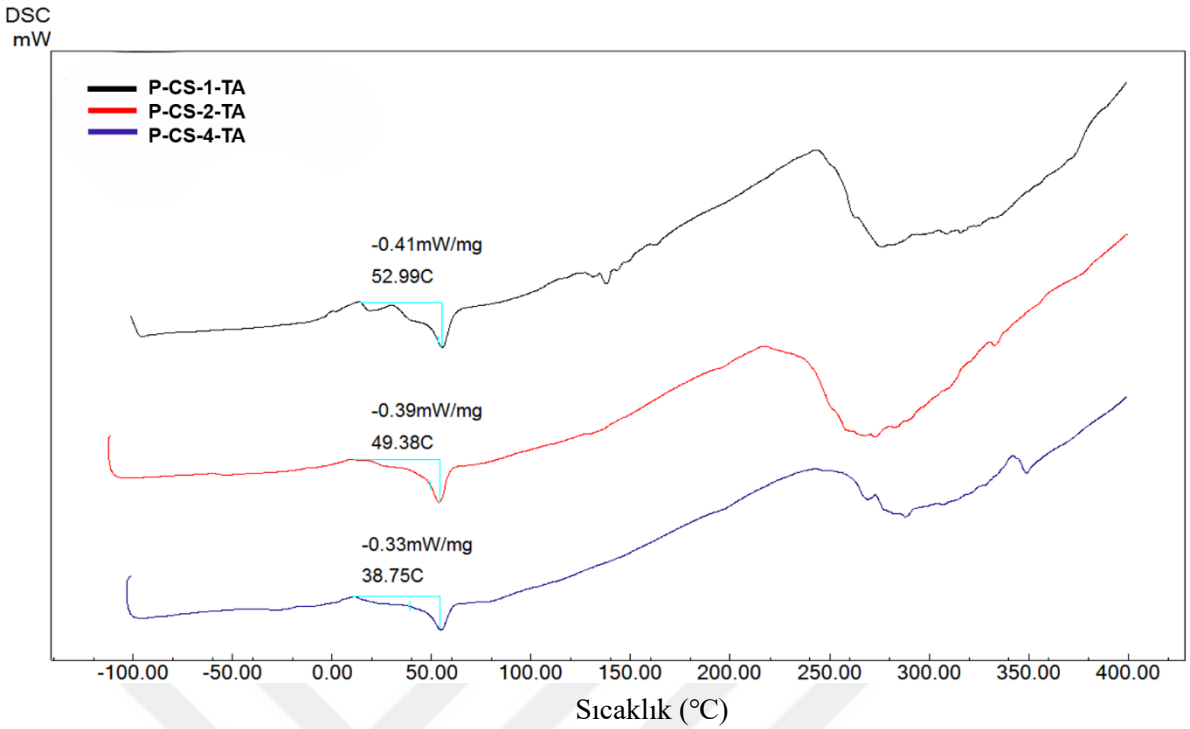
P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA yapılarına ait TGA termogramı Şekil 5.12'de görülmektedir. İlk degredasyon 150 °C civarında gerçekleşmekte olup polimerlerdeki nem kaybını temsil etmektedir. İkinci bozunma 260 °C'de görülmektedir ve polimerlerdeki yumuşak segmentlere ait bozunmayı temsil etmektedir. Son bozulma piki ise 400°C civarındaki sert segmentlere ait bozunmadır.

P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA yapılarına ait DSC ve DTA termogramları sırasıyla Şekil 5.13 ve Şekil 5.14'de verilmiştir. DSC termogramında polimerlerin Tg (termal geçiş sıcaklığı) değerleri ölçülmüş olup bu değer genellikle amorf polimerlerin yumuşak veya sert yapıda olmasını ve dolayısıyla fleksibiliteyi tayin eder. Yamaların fleksibl yapıda olması deri hareketleri uyum sağlaması açısından önem arz etmektedir. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 polimerlerinin Tm değerleri sırasıyla 52.99, 49.38 ve 38.75°C olarak ölçülmüştür. Polimerler arasında anlamlı bir Tg ve Tm farkı da görülmemiştir.

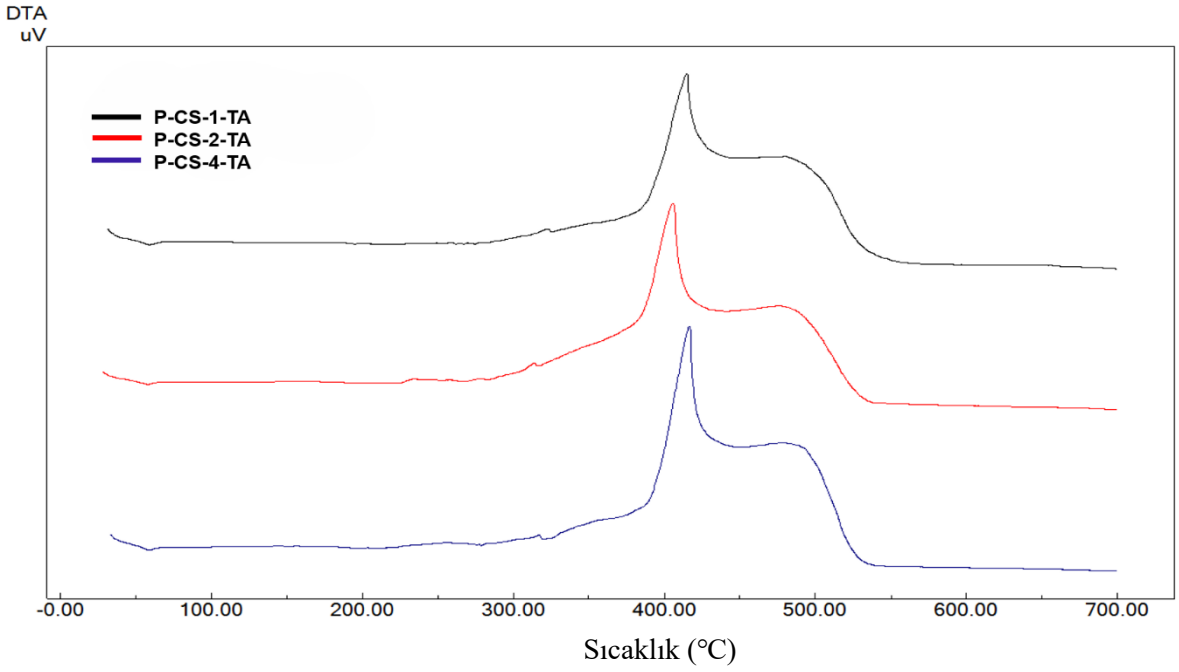
Polimerlerin DTA termogramlarına bakıldığında tamamen TGA değerlerini desteklediği görülmektedir. Genel olarak polimerler arasında büyük farklar görülmemiştir.



Şekil 5.14. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA'ya ait TGA termogramları



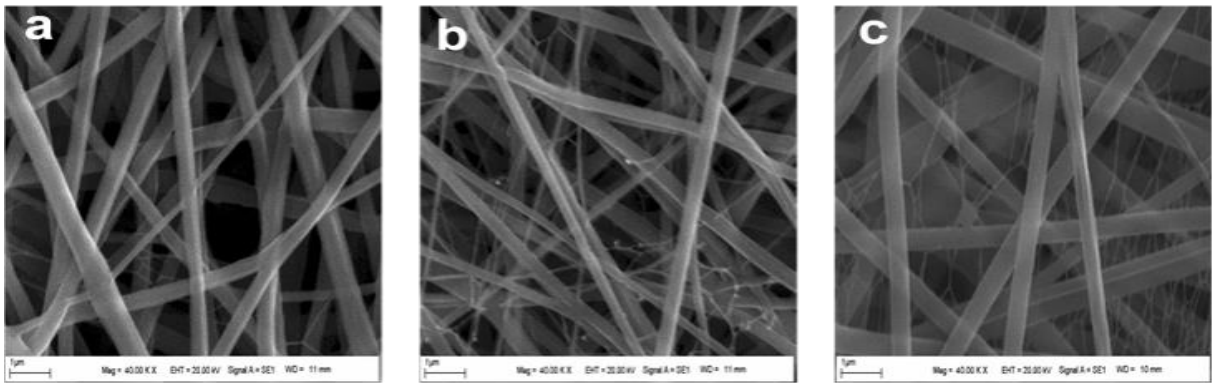
Şekil 5.15. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-R-TA'ya ait DSC termogramları



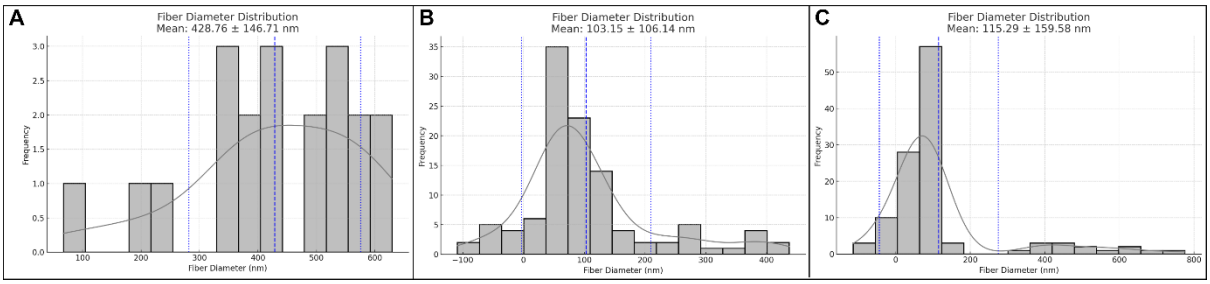
Şekil 5.14. P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-R-TA'ye ait DTA termogramları

5.2.7. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 transdermal yamalarının SEM analiz sonuçları

Transdermal yamaların hazırlanmasında elektrospinning metodunun kullanılması daha geniş yüzey alanı sağlayarak yamaların derideki oksijen geçirgenliğinin daha yüksek sağlanması ve ilaç salım düzeyinin arttırılması sebebiyledir. Bu nedenle polimerlerin fiber morfolojilerini incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.15'de P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 polimerlerine ait SEM görüntüleri görülmektedir. Görüntülere bakıldığında CS miktarının artmasıyla fiberler arasındaki homojenlik azalmaktadır. Düşük CS içeriği daha düzgün ve homojen fiberler oluştururken, yüksek CS içeriği fiberlerin birleşmesine ve yığınlaşmasına yol açmaktadır. Ayrıca CS miktarının artmasıyla fiberlerin yüzey pürüzlülüğü artmakta ve düzensizlikler ortaya çıkmaktadır. Son olarak artan CS oarnı yer yer fiber kalınlaşmasına yol açsa da genel olarak fiberlerin inceldiği görülmektedir. Bu değerleri sayısal olarak analiz edebilmek için Image J programıyla fiber çapları ve homojenitesi ölçülmüş ve Şekil 5.16'da gösterilmiştir. Fiberlerin ortalama çapları P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 polimerleri için sırasıyla 428.76±146.71, 103.15±106.14 ve 115.29±159.58 nm olarak ölçülmüştür. Sonuçlara göre artan CS oranı ile birlikte fiber kalınlığının dramatik bir şekilde azaldığı göze çarpmaktadır. Bunun temel sebebinin CS'nin düşük molekül ağırlığına sahip olması sebebiyle polimer yoğunluğunu düşürmesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Şekil 5.15B ve Şekil 5.15C'de bariz bir şekilde çok ince fiberlerin ayrıca oluştuğu ve homojenitenin bozulduğu gözlemlenmektedir. Fiber çaplarının CS oranı ile standart sapmalarının artmasının ve Şekil 5.16B ve Şekil 5.16C'deki homojen dağılımın bozulmasının sebebi budur.



Şekil 5.15. Transdermal yamaların SEM görüntüleri; **a)** P-CS-1 yamasına ait, **b)** P-CS-2 yamasına ait ve **c)** P-CS-4 yamasına ait SEM görüntüsü



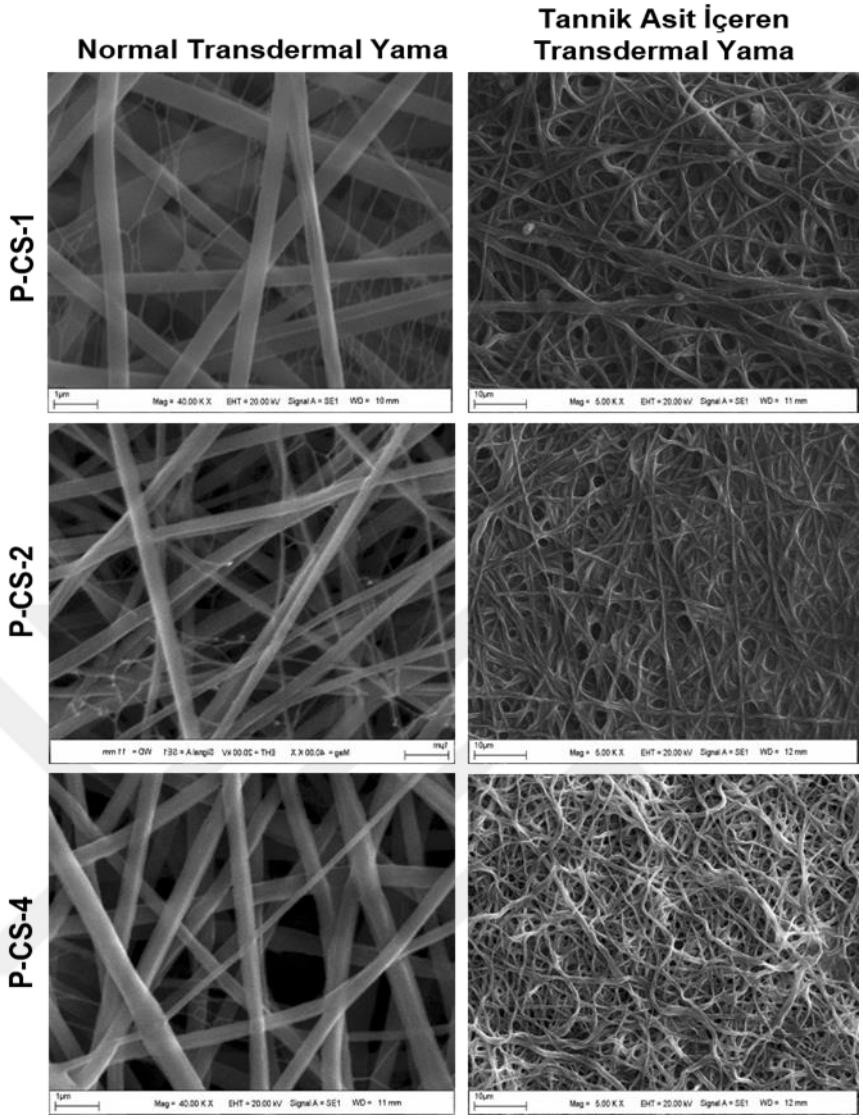
Şekil 5.16. Transdermal yamaların ortalama fiber çapları ve dağılımı

Hazırlanan transdermal yamalara yapışkan form kazandırmak için %15'lik TA solüsyonu ile muamele edilmişlerdir. TA doğal bir polifenol olup çeşitli yapışkanlık ve bağlanma özelliklerine sahip olduğundan bu işlem için uygun bir bileşen olarak seçilmiştir. Belirlenen oranda TA ile kaplanan yamalar, 15 dakika polimerler ile inkübe edildikten sonra çıkarılmış ve ardından alüminyum bir plaka üzerine yerleştirilmiştir. Alüminyum plakada, yamalara biraz kuvvet uygulandıktan sonra güçlü bir yapışma kuvvetine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Özellikle deri üzerinde yapılan testlerde yamaların yapışkanlık özelliklerinin Şekil 5.17'de gösterildiği gibi oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, yamaların klinik kullanım için uygun olduğunu ve deri üzerinde etkili bir yapışma sağladığını göstermektedir.

Yamaların yapışkan katmanlarının morfolojisindeki değişiklikleri gözlemlemek için Şekil 5.18'de görüldüğü gibi SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere TA katmanının yüzey morfolojisinde önemli değişikliklere neden olduğu, fiber görüntüsünün nispeten azaldığı ancak yine de gözenekli yapının korunduğu görülmektedir. Polimerler arasında kaplama ile büyük morfolojik değişikliklerin olmadığı görülmüştür.



Şekil 5.17. TA ile kaplı yamanın deri üzerine yapışması



Şekil 5.18. TA içeren ve TA içermeyen yamaların SEM görüntüleri

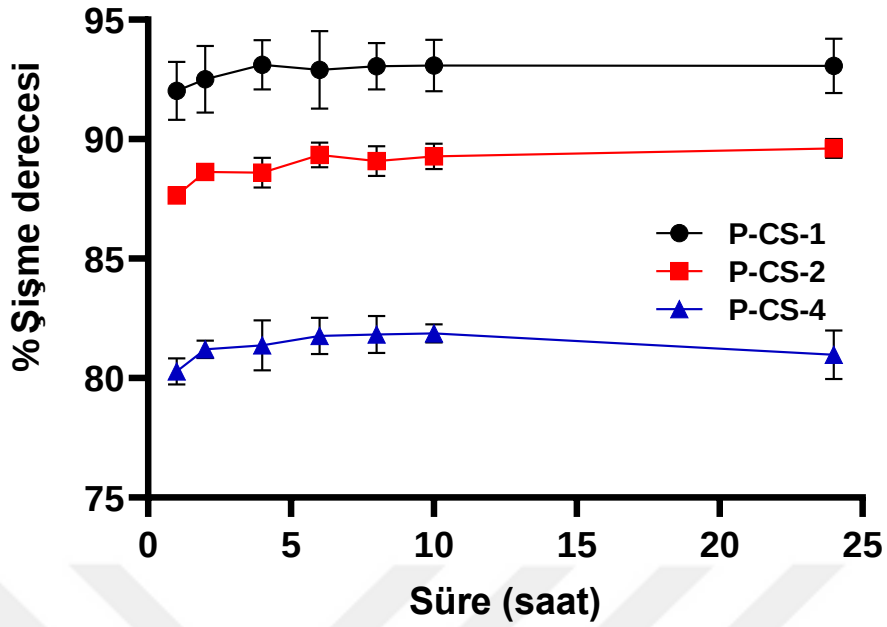
5.3.Transdermal yamaların biyokimyasal karakterizasyonları

Hazırlanan transdermal yama formülasyonlarına çeşitli biyokimyasal analizler yapılmıştır. Yamalara öncelikle şişme derecesi, yama kalınlıklarının belirlenmesi, katlama dayanıklılığı, ağırlık homojenliği ve soyulma direncinin belirlenmesi testleri gerçekleştirildikten sonra ilaç tutma verimliliği ve *in vitro* ilaç salım düzeylerinin belirlenmesi testleri yapılmıştır. Tüm testler ayrıntılı olarak aşağıdaki başlıklarda anlatılmıştır.

5.3.1. Transdermal yamaların şişme derecesinin belirlenmesi

Transdermal yamaların şişme kapasitesi, yamanın etkinliği ve ilaç salım hızı açısından kritik bir parametredir. Şişme kapasitesi, yamanın içindeki polimer matrisin şişerek ilacın kontrollü bir şekilde salınmasını sağlar ve ilaç moleküllerinin difüzyon yoluyla cilde geçişini düzenler. Ayrıca, şişme hızı ve miktarı ilacın salım kinetiğini doğrudan etkiler ve daha kontrollü, uzun süreli bir ilaç salımı sağlayabilir. Şişme kapasitesi yamanın ciltle daha iyi temas etmesini ve yapışmasını sağlarken yamaya esneklik kazandırarak cilt hareketleriyle daha uyumlu hale getirir ve kullanım süresi boyunca cilde daha iyi yapışmasını sağlar. Bu özellik sayesinde cillte oluşabilcek tahriş ve hassasiyet engellenmiş olur. Ayrıca yüksek şişme kapasitesine sahip polimerler daha fazla miktarda ilacı bünyesinde tutabilir ve böylece transdermal yamanın daha uzun süre etkili olmasını sağlar. Şişen polimer ilacın cilt yoluyla emilimini artırarak biyoyararlanımı iyileştirir ve cilt yüzeyinde nemli bir bariyer oluşturarak cildin nem dengesini korur. Öte yandan yüksek şişme kapasitesi ilacın bozunmasını hızlandırabilir. Bu nedenle, transdermal yama formülasyonlarında şişme kapasitesinin optimize edilmesi yamanın genel performansı açısından büyük önem taşır.

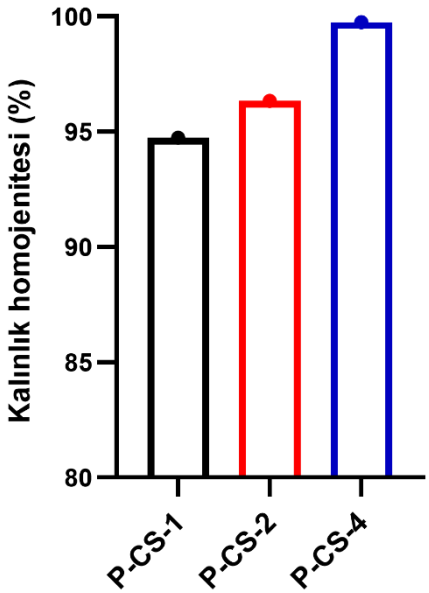
Çalışma kapsamında yama formülasyonların şişme dereceleri %20 etanol içeren pH 6.8 fosfat tampon çözeltisi ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre, Şekil 5.19'da gösterildiği üzere üç farklı formülasyonun da şişme oranlarının %80'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Şekilde CS miktarının en az olduğu P-CS-1 formülasyonunun diğer iki formülasyona kıyasla daha fazla şişme kapasitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun temel sebebi mikrobiyal CS'nin nispeten düşük molekül ağırlıklı olması sebebiyle şişmenin azalması olarak yorumlanabilir. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 formülasyonlarının maksimum şişme derecelerine 5. saatten sonra ulaşılmıştır ve bu değerler sırasıyla % 93.12, 89.61 ve 81.87 olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.19. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 polimerlerinin şişme dereceleri

5.3.2. Transdermal yamaların yama kalınlıklarının belirlenmesi

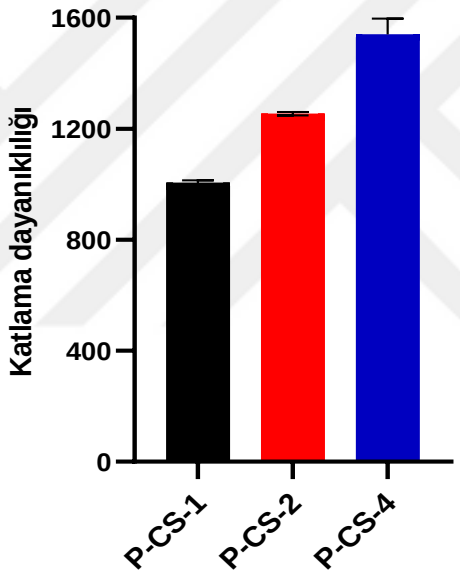
Fiber üretimi sonrasında yamaların kalınlıkları bir mikrometre ile dikkatlice üç farklı bölgeden ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda, Şekil 5.20'de görüldüğü üzere yamaların kalınlık homojenliği %95-%100 arasında olup bu oran standardizasyonun sağlanması için önemlidir.



Şekil 5.20. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait % kalınlık homojeniteleri

5.3.3. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 yamalarının katlama dayanıklılığı

Hazırlanan transdermal yamaların katlama dayanıklılıkları ölçülmüştür. Bir yamanın minimum 250 kere katlanabilmesi literatürde standardizasyon açısından yeterli görülmektedir. Yapılan testlerde katlama dayanıklılıklarının P-CS-1 yamasında 1006 olduğu görülürken P-CS-4 yamasında ortalama 1540 arasında görülmesi formülasyonların oldukça yüksek fiziksel mukavemete sahip olduğu söylenebilir (Şekil 5.21). Yapılan testler sonucunda, CS miktarının artmasıyla birlikte yamaların dayanıklılığının da arttığı ve bozulma süresinin geciktiği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin CS miktarına bağlı değil yama kalınlığının artmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Yamaların deforme oldukları görüntüler Şekil 5.22'de gösterilmiştir.



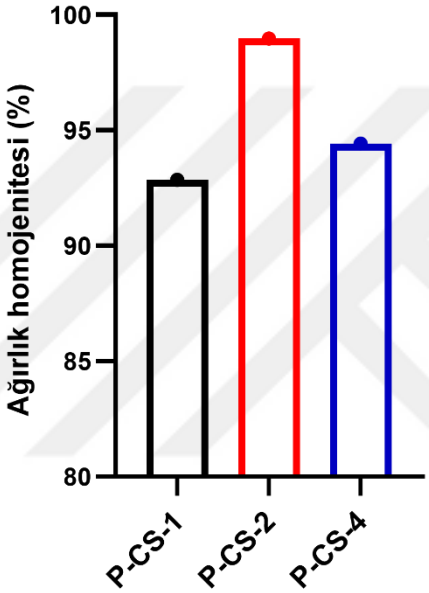
Şekil 5.21. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait katlama dayanıklılığı sonuçları



Şekil 5.22. P-CS-1(a), P-CS-2(b), P-CS-4(c) katlama sonrası yamalarının deformasyonları

5.3.4. P-CS-1, P-CS-2, P-CS-4 yamalarının ağırlık homojenliği

Transdermal yamaların ağırlık homojenliği her bir yamanın aynı miktarda ilaç ve polimer içermesini sağlar. Bu da doğru ve tutarlı dozajlama için gereklidir. Çalışma kapsamında hazırlanan transdermal yamaların ağırlık homojeniteleri Şekil 5.23'de görülmektedir. Test üç tekrarlı çalışılmış olup 2*2 cm^2'lik kesilen yamaların ağırlıkları ölçülmüştür. Buna göre ilgili alana karşılık gelen ağırlıklar 0.025-0.065 g arasında ölçülmüştür. Ölçülen ağırlıkların % homojenite değerleri %92-99 arasında çıkmıştır. Bu da hazırlanan yamaların oldukça homojen ağırlık dağılımına sahip olduklarını göstermektedir.

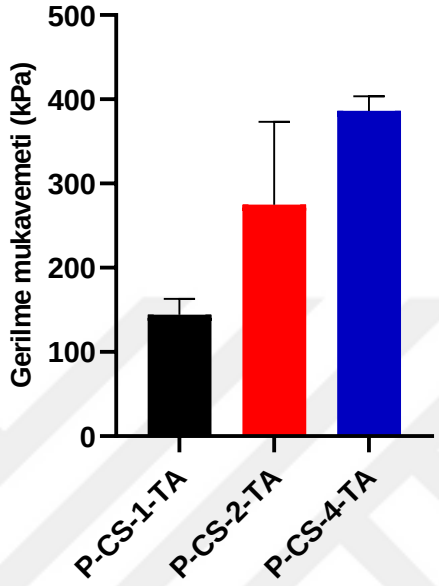


Şekil 5.23. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait % ağırlık homojeniteleri

5.3.5. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait soyulma direnci sonuçları

Transdermal yamalar deri üzerine uygulanan ilaç taşıyıcı polimerlerdir. Bu yamalar ilaçları deri vasıtasıyla sistemik dolaşıma iletirler ve bu nedenle yamaların deri yüzeyine sağlam bir şekilde yapışması gerekir. Yamalar cilt dokusuna stabil ve güçlü bir şekilde yapışmazsa öngörülen optimum ilaç dozunun salımı sekteye uğrar ve yamanın yerinden oynaması enfeksiyon riskine de sebep olabilir. Bu kapsamda mekanik test analizörü ile %15 TA ile kaplanmış yamaların yapışma mukavemeti değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarının yapışma mukavemetleri sırasıyla 144.11±46.87, 274.78±170.81 ve 386.29±29.78 kPa olarak ölçülmüştür (Şekil 5.24). 3 transdermal yamada da aynı oranda TA ile kaplanmış olmasına rağmen CS miktarı arttıkça yapışma

mukavemetinin de arttığı gözlenmiştir. Ancak gruplar arasında istatistiki bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Yine de CS oranına bağlı olarak artan yapışma mukavemetinin sebebi CS'nin içerdiği hidroksil ve amin polar gruplarından kaynaklı TA kaplamasını daha yüksek oranda tutması ve böylece yapışkanlığın artması olabilir.



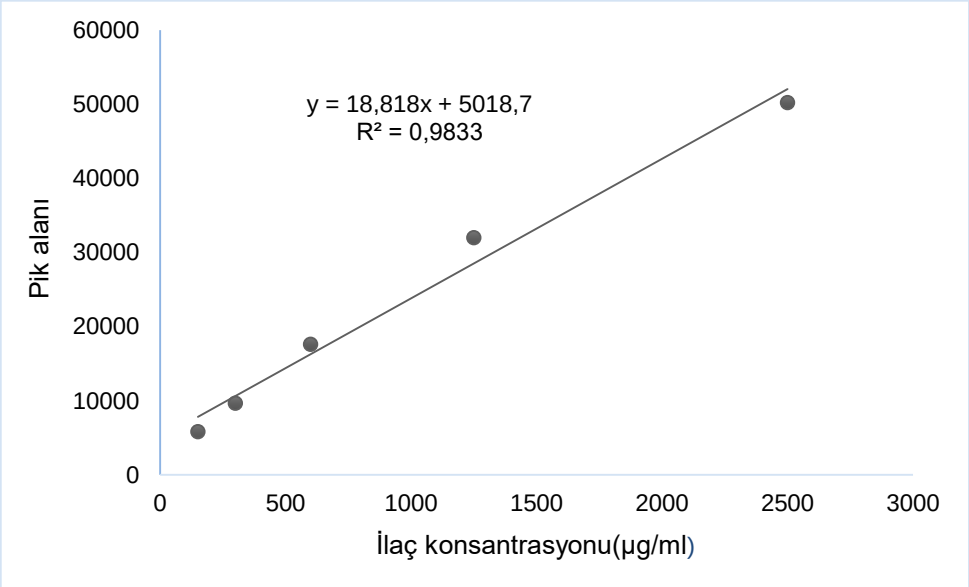
Şekil 5.24. Soyulma direnci analizi sonucunda kPa değerleri

5.3.6. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR, P-CS-4-RR transdermal yamalarına ait ilaç tutma verimliliği

Hazırlanan transdermal yamaların Ribosiklib ilacı için uygun bir yama olup olmadığını belirlemek için ilaç tutma verimliliği testi gerçekleştirilmiştir. Bu test için öncelikle Ribosiklib'in ölçüm metodolojisi belirlenmiş olup 276 nm dalga boyunda dakikada 0,8 ml akış hızı ile HPLC analizinde C18 kolonu kullanılarak ölçümler yapılmıştır. HPLC yöntemi, özellikle ilaç analizlerinde yaygın olarak tercih edilen bir tekniktir çünkü yüksek doğruluk ve hassasiyet sağlar. Analizde kullanılan mobil faz %60 potasyum fosfat tamponu ve %40 asetonitrilden oluşmaktadır. Bu oranlar, Ribosiklib etken maddesinin uygun şekilde ayrılmasını ve tespit edilmesini sağlamak için optimize edilmiştir.

Bu kapsamda öncelikle Ribosiklib etken maddesinin kalibrasyon grafiğini oluşturmak amacıyla farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler (0.15, 0.3, 0.6, 1.25 ve 2.5 mg/ml) hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyona karşılık gelen pik alanları belirlenmiş ve bu veriler kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen kalibrasyon grafiği (Şekil 5.25)

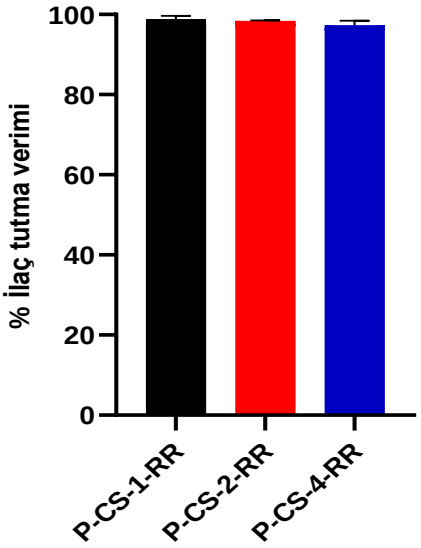
Ribosiklib'in farklı konsantrasyonlarının pik alanları ile doğrusal bir ilişki gösterdiğini ve HPLC yönteminin Ribosiklib'i doğru bir şekilde ölçebilme yeteneğini göstermektedir.



Şekil 5.25. Ribosiklib'in kalibrasyon grafiği

Ribosiklib'in ölçüm optimizasyonu yapıldıktan sonra yamaların ilaç tutma kapasitesini test etmek için rezervuar ve ilaç salım katmanlarına ilaç tutma verimliliği analizi gerçekleştirilmiştir. Rezervuarın sonuçlarına bakıldığında tüm yamalarda ilaç tutma verimi %97'nin üzerinde görülmüş olup gruplar arasında anlamlı bir fark çıkmamıştır (Şekil 5.26). Bu yüksek verim hazırlanan transdermal yamaların ilacı etkili bir şekilde tutabildiğini göstermektedir.

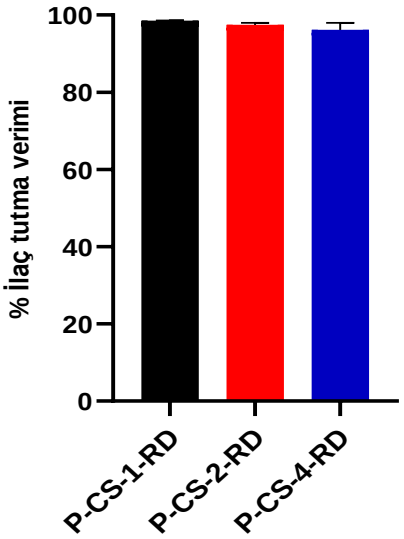
Yüksek hapsetme verimi, bu yamaların kontrollü ilaç salımı için uygun olduğunu ve tedavi süreçlerinde önemli sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 5.26. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR ve P-CS-4-RR transdermal yamalarına ait % ilaç tutma verimliliği sonuçları

5.3.7. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarının ilaç tutma verimliliği

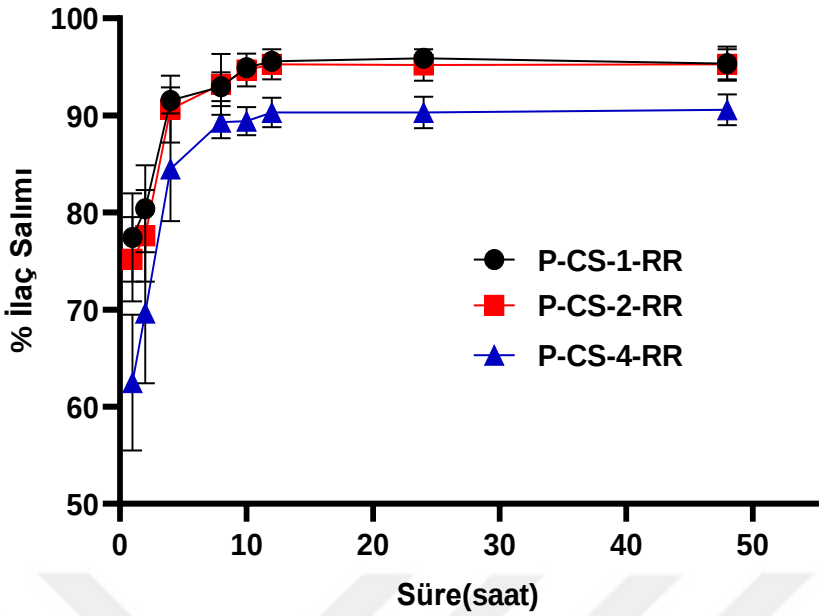
İlaç salım katmanının etkinliğini değerlendirmek amacıyla bu yamalara ilaç emdirildikten sonra HPLC kullanılarak yamaların içerisindeki yüzde ilaç miktarı belirlenmiştir. Yapılan ölçümler ve analizler sonucunda Şekil 5.27'de de görüldüğü üzere hazırlanan yamaların ortalama %96'nın üzerinde bir ilaç tutma verimine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu yüksek verimlilik, transdermal yamaların ilacı etkili bir şekilde hapsedebildiğini ve kontrollü bir salım sağlayabildiğini göstermektedir. Reda ve ark. yaptığı benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçların literatüre uygun olduğu görülmektedir.



Şekil 5.27. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarına ait % ilaç tutma verimliliği

5.3.8. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR ve P-CS-4-RR transdermal yamalarına ait *in vitro* ilaç salımı düzeylerinin belirlenmesi

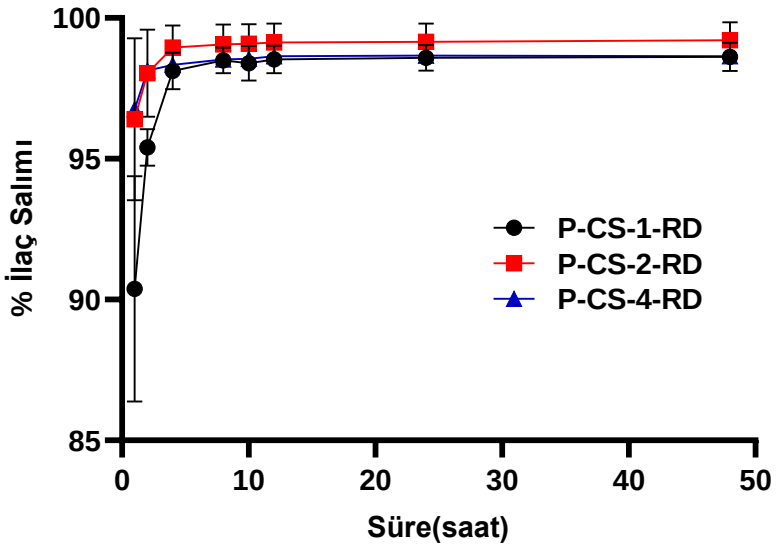
Hazırlanan üç farklı transdermal yamanın rezervuar ve ilaç salım katmanı kısımlarına Ribosiklib salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle rezervuar katmanının ilaç salım profili incelenmiş olup yamalardaki Ribosiklib ilacının günlük alım dozu göz önünde bulundurulmuştur ve rezervuar katmanı için yüklenen ilaç miktarı %8.33 olarak belirlenmiştir. HPLC ile yapılan ilaç salım deneyleri ilaç tutma verimi deneyleri ile aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 1, 2, 4, 8, 10, 12, 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde alınan örneklerle gerçekleştirilmiş ve pik alanları belirlenmiştir. İlaç rezervuar katmanındaki CS miktarının salım özelliklerine ve yama yapısındaki değişikliklere etkisi incelenmiştir. Düşük CS konsantrasyonuna sahip olan P-CS-1-RR yamasındaki ilaç salımı 12 saatte yaklaşık %94 civarındayken, yüksek CS içeren P-CS-4-RR yamasındaki ilaç salım düzeyi ortalama %90 olarak ölçülmüştür. CS miktarı arttıkça Şekil 5.28'de görüldüğü üzere ilaç salımında bir düşüş gözlemlenmiştir.



Şekil 5.28. P-CS-1-RR, P-CS-2-RR, P-CS-4-RR transdermal yamalarına ait % ilaç salım grafiği

5.3.9. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarına ait *in vitro* ilaç salımı düzeylerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında, rezervuar ile aynı koşullarda ilaç salım katmanına da *in vitro* ilaç salım düzeyi testi gerçekleştirilmiş ve aynı koşullarda Ribosiklib analizi yapılmıştır. Sonuçlara göre tüm yamalar 10. saatte maksimum ilaç salım verimine ulaşmışlar ve en az %90 salım göstermişlerdir (Şekil 5.29). P-CS-2-RD örneği %99 oranı ile en yüksek ilaç salım oranına sahip olsa da diğer gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$).

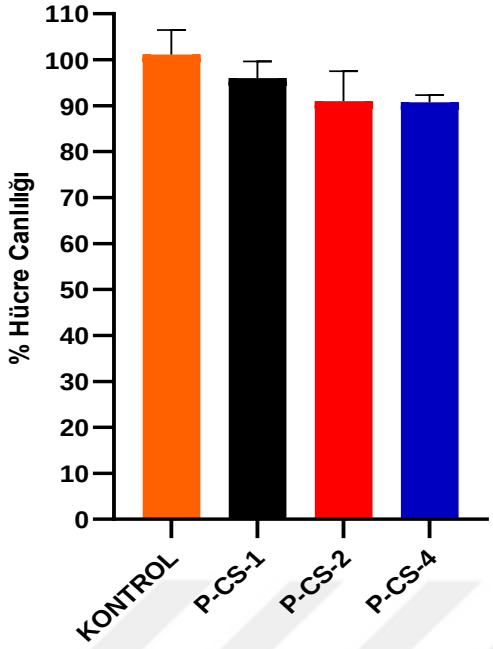


Şekil 5.29. P-CS-1-RD, P-CS-2-RD ve P-CS-4-RD transdermal yamalarına ait % ilaç salım grafiği

5.4.Transdermal Yamaların *İn Vitro* Etkinliğinin Belirlenmesi

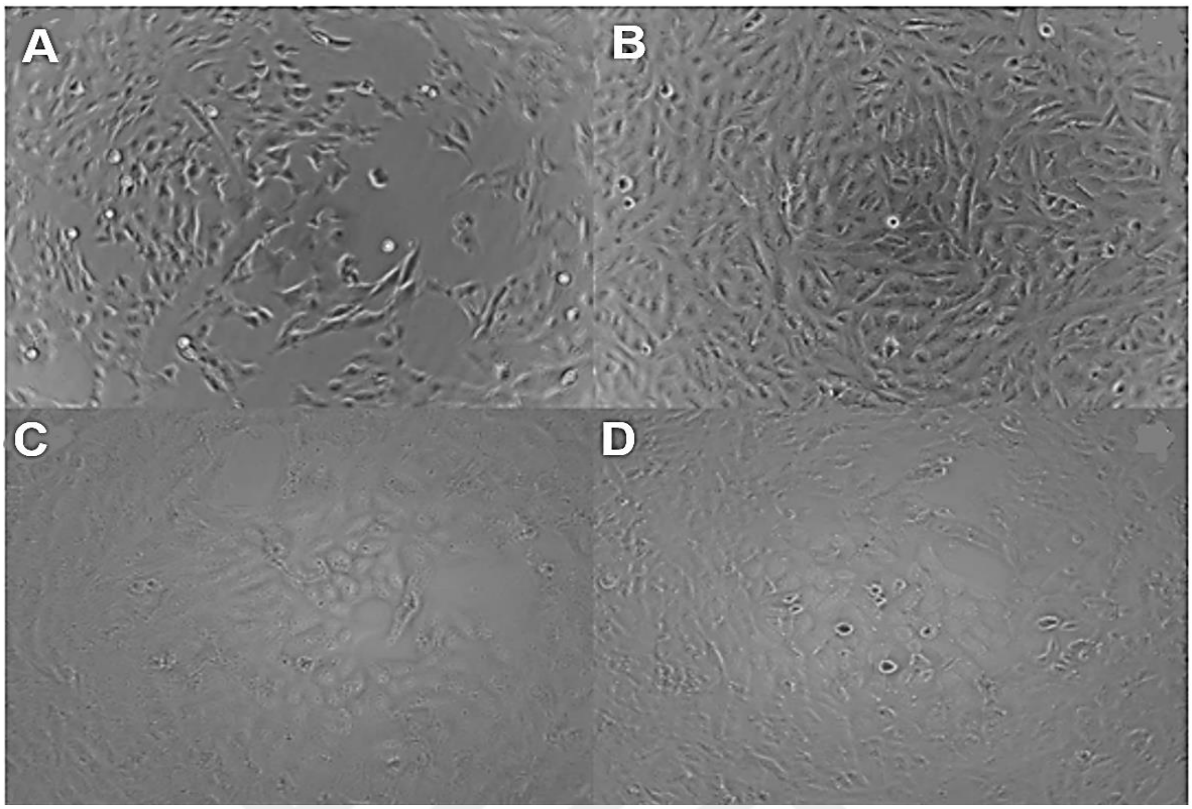
5.4.1. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 transdermal yamaların *in vitro* biyouyumluluklarının belirlenmesi

Biyouyumlu materyaller ciltle temas ettiğinde toksik etkiler göstermeden ve tahriş, alerjik reaksiyonlar veya enfeksiyon riskleri yaratmadan deri dokusuna uyum sağlar. Bu, hasta güvenliği için temel olup ciltte yanma, kaşıntı ve kızarıklık gibi yan etkilerin önlenmesini sağlar. Sonuç olarak, biyouyumluluk, transdermal yamaların tasarımı ve üretiminde dikkate alınması gereken temel bir faktördür. Hazırlanan transdermal yamaların toksik etkilerini değerlendirmek ve biyouyumlu özelliklerini belirlemek amacıyla fare fibroblast hücre hattı olan L-929 hücreleri ile indirekt sitotoksisite testi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlara göre Şekil 5.30'da görüldüğü üzere %1 CS içeren yamanın L-929 hücrelerindeki hücre canlılığının %95 olduğu görülürken, %4 CS içeren yamanın hücre canlılığının %90 olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlarda düzenli bir azalış olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel bir fark yoktur ($p > 0.05$). ASTM standartlarına göre tüm transdermal yama formülasyonlarının grade 1 düzeyinde biyouyumluluğa sahiptir. Bu da tasarlanan transdermal yamaların deri dokusunda güvenli bir şekilde kullanılabileceği anlamına gelmektedir.



Şekil 5.30. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yamalarına ait % hücre canlılığı sonuçları

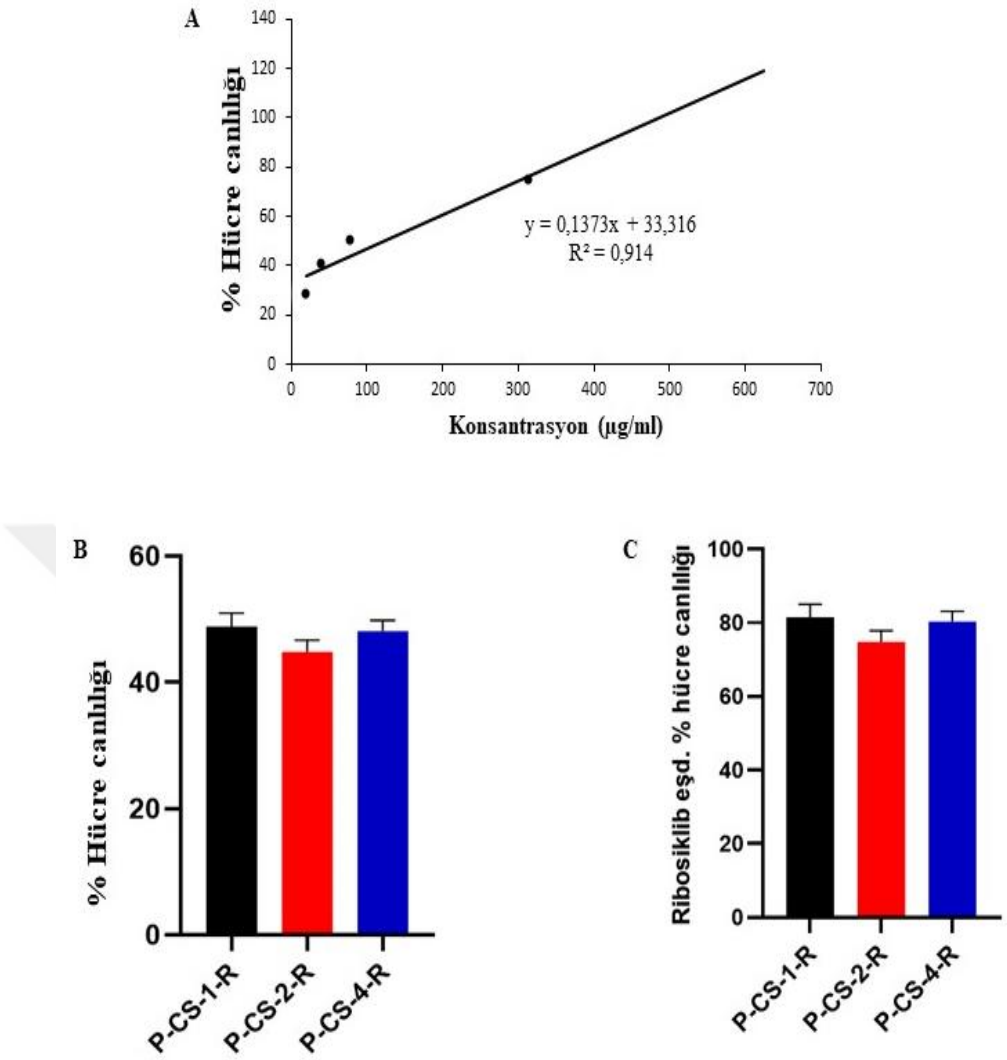
P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 bileşenlerinin L-929 hücre morfolojisinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 5.31'de gösterilmektedir. Görsellerden de anlaşılacağı üzere, bu bileşenler hücre şekillerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamış ve hücre canlılığının devam ettiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar transdermal yamalarının hücreler üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığını ve biyouyumlu olduklarını göstermektedir.



Şekil 5.31. Transdermal yamaların L-929 hücreleri üzerindeki morfolojik etkileri; A) Kontrol, B) P-CS-1, C) P-CS-2 ve D) P-CS-4 transdermal yama grupları

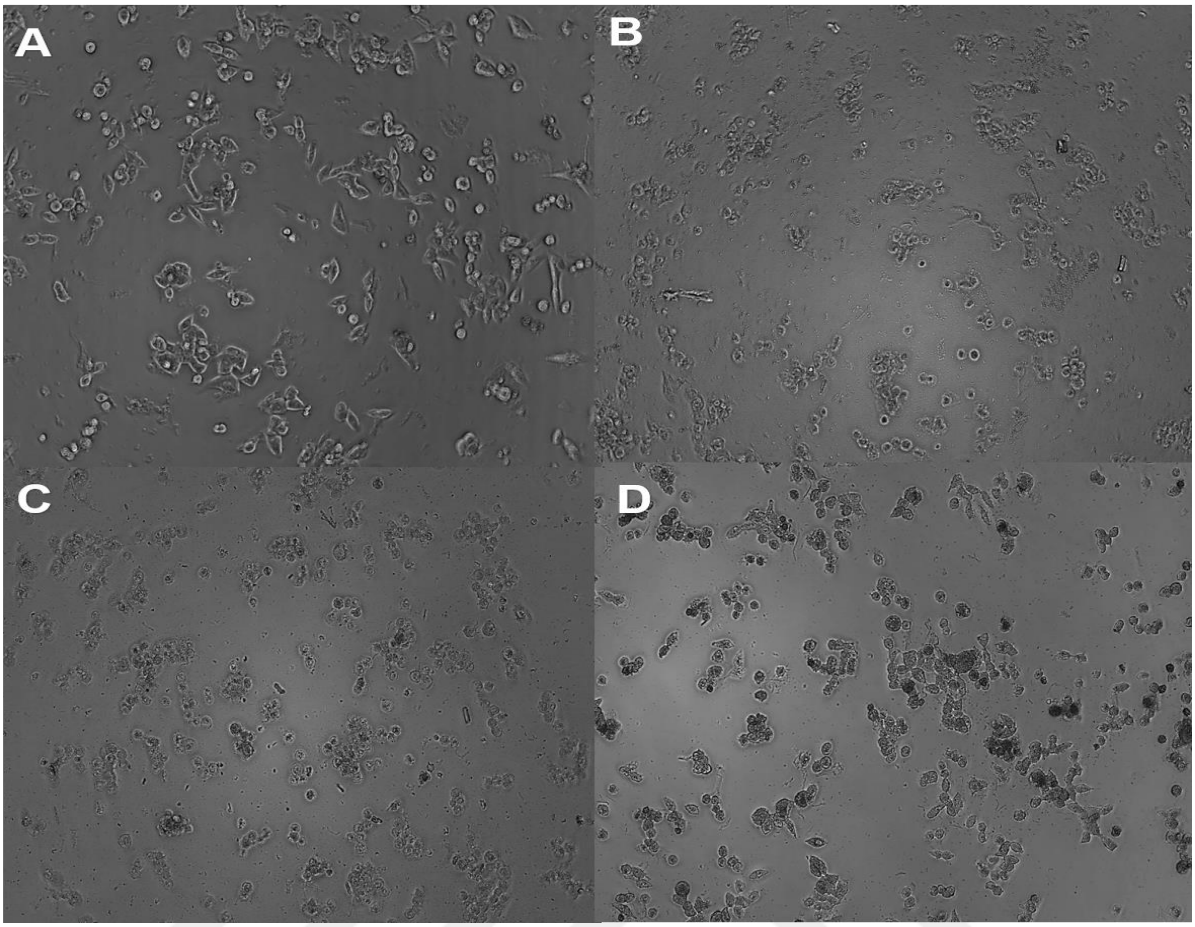
5.4.2. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 transdermal yamalarına ait *in vitro* antikanser aktivitesinin belirlenmesi

Hazırlanan transdermal yamaların *in vitro* antikanser özelliklerini belirlemek amacıyla MCF-7 hücre hattı kullanılarak MTT testi gerçekleştirilmiştir. Bu test, hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendirmek ve hücre canlılığını belirlemek için yaygın bir yöntemdir. Ribosiklib içeren üç farklı transdermal yama bileşeni öncelikle 48 saat boyunca DMEM besiyerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra bu besiyeri önceden platelere ekilmiş hücrelere eklenmiştir. Transdermal yamaların içerdiği ilaç miktarı ile aynı oranda olacak şekilde standart Ribosiklib kontrol olarak kullanılmıştır. Şekil 5.32'da sunulan sonuçlara göre tüm yamalarda %93-94 aralığında antikanser etki gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar incelenen transdermal yama bileşenlerinin MCF-7 hücrelerinde belirgin bir antikanser etkiye sahip olduğunu ve standart Ribosiklib'e kıyasla bir aktivite kaybı olmadığını göstermektedir.



Şekil 5.32. A) Ribosiklib**, B)** P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R yamalarına ait % hücre canlılığı **C)** Ribosiklibe eşdeğer % hücre canlılığı

Hücrelere verilen Ribosiklib içerikli transdermal yamaların hücre canlılığını azaltmasının yanı sıra, Şekil 5.33'te optik mikroskop altında elde edilen görüntüler incelendiğinde hücre morfolojilerinde belirgin değişikliklerin olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, yamalara maruz kalan hücrelerin morfolojilerinde belirgin bozulmaların meydana geldiği görülmüştür. Sonuçlar yamaların içerdiği Ribosiklib'in hücreler üzerindeki etkisini ve hücrelerin çoğalıp büyümesini engelleyen özellikte olduğunu doğrulamaktadır. Bu bulgular Ribosiklib içeren transdermal yamaların potansiyel olarak kanser hücrelerinin morfolojisini etkileyerek hücre canlılığını azaltabileceğini ve bu şekilde antikanser etkisinin gösterebileceği belirlenmiştir.



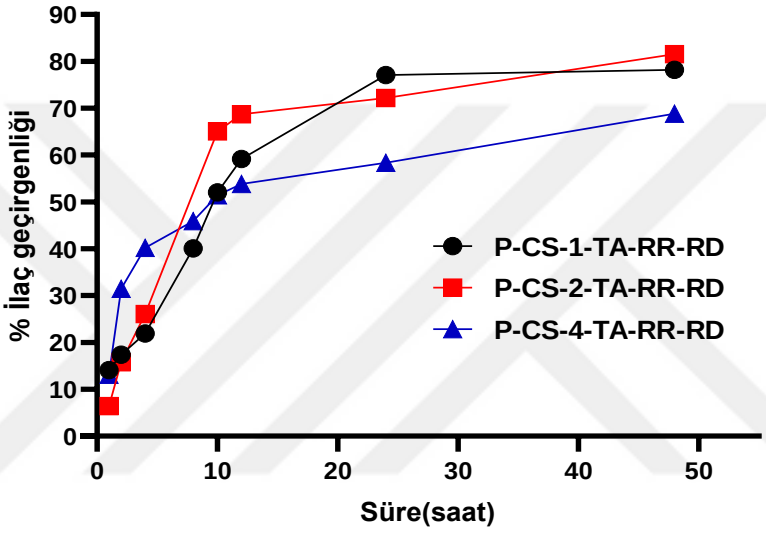
Şekil 5.33. Ribosiklib içerikli transdermal yamaların MCF-7 hücreleri üzerindeki morfolojik etkileri; A) Kontrol, B) P-CS-1-R, C) P-CS-2-R ve D) P-CS-4-R transdermal yama grupları

5.4.3. *İn vitro* difüzyon testi sonuçları

Çalışma kapsamında Ribosiklib ilacının deri geçirgenliğini *in vitro* olarak test etmek için Franz difüzyon hücresi kullanılmıştır (Şekil 5.34). Test için rezervuar ve ilaç salım katmanı birleştirilmiş ve TA ile kaplanmıştır. Daha sonra rat karın derisi kullanılarak Ribosiklib ilacının deri geçirgenliği analizi yapılmıştır. 0, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 24 ve 48. saatlerde ölçüm alınmış ve 48 saat sonunda maksimum geçirgenliğe ulaşılmış olup P-CS-1-TA-RR-RD formulasyonu için %78, P-CS-2-TA-RR-RD formulasyonu için %81 ve P-CS-4-TA-RR-RD formulasyonu için ise %68 maksimum geçirgenlik değerlerine ulaşılmıştır (Şekil 5.35). Genel olarak CS oranı arttıkça azalan bir ilaç geçirgenliği görülmesine rağmen istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).



Şekil 5.34. *İn vitro* difüzyon çalışmasının şematik gösterimi



Şekil 5.35. P-CS-1-TA-RR-RD, P-CS-2-TA-RR-RD ve P-CS-4-TA-RR-RD transdermal yamalarına ait % ilaç geçirgenliği

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Transdermal yamalar ilaçların doğrudan deri yoluyla sistemik dolaşıma salımını sağlayan ve düzenli ilaç salımı gereken tedavilerde tercih edilen ileri bir ilaç uygulama formudur. Bu yamalar dozaj stabilitesi ve dolayısıyla hastanın yaşam kalitesini arttırmayı hedefler. Bu sayede ilaç büyük dolaşıma katılmayacağı ve lokal bir bölgede salınacağı için nispeten düşük dozlarda ilaç kullanılabilir ve böylece toksik düzeye ulaşmaz ve terapotik seviyede kalır. Bu kapsamda meme kanseri tedavisinde kullanılan Ribosiklib ilacının transdermal salımı için elektroeğirme yöntemiyle üretilen 5 katmanlı yamalar hazırlanmıştır. Yamalar PCL/CS polimer kompozitleri ile emülgatör olarak Span 80 kullanılarak oluşturulmuş ve elektroeğirme yöntemiyle yüzey alanı arttırılmıştır. Ayrıca TA ile kaplama yapılarak yamaların deri yüzeyine kuvvetli bir şekilde yapışması sağlanmış ve böylece optimum ilaç salımı elde edilebilmiştir.

Literatürde PCL ve CS temelli Ribosiklib içeren transdermal yama bulunmamaktadır ve Ribosiklib içeren sadece 2 adet transdermal yama çalışması mevcuttur. İlk çalışma Sharma ve arkadaşlarının yaptığı bir mikroiğne sisteminden oluşan hyaluronik asit/polivinil alkol/polivinil pirolidon (HA–PVA–PVP) karışımını içeren transdermal yama çalışması olup çalışma Ribosiklib'in lokal salımını amaçlamaktadır (Sharma ve diğ., 2022). Bu sayede mikroiğne sistemi ile deri geçişinin ve ilaç salım süresini 6 kata kadar arttığını ve CD44 ile etkileşime girmesine izin verdiğini belirlemişlerdir. İkinci çalışmada ise Makeen ve ark. topikal olarak yolla ilaç salımı için Ribosiklib'in pirinç kepeği yağı ile bir nanoemuljel formülasyonunu hazırlayarak salım çalışmalarına bakmışlardır (Makeen ve Albratty, 2024). Bu iki çalışmada hazırlanan formülasyonlar kompleks yollarla hazırlandığından üretimi ve optimizasyonu zordur. Çalışmada hazırlanan transdermal yamalar hazırlanması kolay, düşük maliyetli, biyouyumlu ve uygulaması basit sistemlerdir.

Hazırlanan PCL ve CS içerikli yamaların öncelikle yapısal termal ve morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır. Hazırlanan mikrobiyal CS'nin molekül ağırlığı MALDI TOF analiziyle belirlenmiştir. Üç farklı CS konsantrasyonu ile P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 formülasyonları hazırlanmış ve ilk olarak FTIR ile karakterize edilmiştir. FTIR spektrumunda görülen 3500-3100 cm^{-1} aralığında görülen CS'ye spesifik olan OH ve NH gruplarına ait gerilme titreşimleri Ali ve ark. tarafından yapılan çalışmada da doğrulanmıştır (Ali ve diğ., 2014). Ayrıca 1726 cm^{-1}'de bulunan karbonil gerilmesi de PCL'ye spesifik olup Azizi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumludur (Azizi ve diğ., 2018). Son olarak CS'ye spesifik S=O gerilmesinin varlığı Galus ve ark. tarafından doğrulanmıştır (Galus ve

diğ., 2016). Transdermal yamalara Ribosiklib dahil edildiği zaman özellikle 3600-3100 cm^{-1} aralığındaki amid gruplarına ait gerilme titreşiminin artması P-CS-R formulasyonlarının başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermiştir. Çalışma kapsamında hazırlanan PCL/CS ilaç salım katmanı formülasyonlarının üzerine TA kaplanmış olup bu formülasyonların FTIR sonuçlarına bakıldığında P-CS-TA polimerine ait spektrumda 3600-3100 cm^{-1} aralığında OH gruplarına ait geniş bir bant görülmektedir. Liu ve ark. yaptığı çalışmada yara iyileşmesinde hazırladıkları hidrojellerin yapışma kuvvetini arttırmak amacıyla kullanılan TA'nın da kaplama sonucunda da 3600-3100 cm^{-1} aralığında görülmüştür (Liu ve diğ., 2018). Böylece kaplamanın yapıldığı literatüre bakıldığında doğrulanmıştır.

Transdermal yamaların vücut sıcaklığındaki termal stabilitesi malzemenin biyolojik ortamda nasıl davrandığını anlamak için önemlidir. Termal analiz teknikleri malzemenin belirli sıcaklık aralıklarında fiziksel ve kimyasal değişikliklerini incelemeye olanak tanır. Bu bağlamda DSC, TGA ve DTA gibi yöntemler, malzemenin erime noktası, cam geçiş sıcaklığı, kristalizasyon davranışı ve bozunma sıcaklığı gibi özelliklerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Literatürde PCL ve CS içeren transdermal yama olmamakla birlikte hazırlanan P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yapılarına ait TGA termogramlarında ilk degredasyon 290 °C civarında gerçekleşmekte olup polimerlerdeki yumuşak segmentlere ait bozulmayı temsil etmektedir. Bu degradasyon süreci ~380 °C'ye kadar devam etmektedir. Ravikumar ve ark. hazırladığı PCL/PEG içerikli transdermal yamaların TGA sonuçlarında da ~380 °C'de bozunma gerçekleşmiştir (Ravikumar ve diğ., 2018). Literatüre bakıldığında sert segment bozunmasını temsil eden bozunma eğrisi olduğu doğrulanmıştır.

P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 yapılarına ait DSC termogramlarına bakıldığında, Tm değerlerinin sırasıyla 56.33, 55.73 ve 57.13 °C olarak ölçüldüğü tespit edilmiştir. Su 2019 yılında yaptığı çalışmada, PCL ve polietilen oksit kullanarak hazırlanan yara örtü malzemesinin Tm değerleri 61.60 °C, 61.66 °C, 61.17 °C ve 55.29 °C olarak belirlenmiştir. Polietilen oksit kullanımı Tm değerlerinde çok fazla bir fark oluşturmamıştır. DSC termogramında polimerlerin Tg değerleri de ölçülmüş olup bu değerler genellikle amorf polimerlerin esnek veya sert yapıda olup olmadığını ve dolayısıyla esnekliğini belirler. Yamaların esnek yapıda olması, deri hareketlerine uyum sağlaması açısından önemlidir. P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 polimerlerinin Tg değerleri sırasıyla 6.92, 16.98 ve 5.51 °C olarak belirlenmiştir. Bu değerler polimerlerin oda sıcaklığında yumuşak bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

Polimerlerin DTA termogramlarına bakıldığında, TGA değerlerini tamamen desteklediği görülmektedir. Genel olarak polimerler arasında büyük farklar

gözlemlenmemekle birlikte, P-CS-4 polimerinin 230-300 °C arasındaki bozunmasının diğer polimerlere kıyasla daha geç başladığı görülmektedir. Bu durum, TGA analizinde yorumlandığı gibi, artan CS miktarının termal stabiliteyi arttırdığını göstermektedir.

Literatürde Ribosiklib içeren 1 tane transdermal yama olmakla beraber termal karakterizasyon hakkında sonuç bulunmamaktadır. P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R yamalarına ait TGA termogramında ilk degradasyon 350 °C civarında görülmekte olup bu sert segment bozunmasına işaret etmektedir. İlaç içeren polimerlerde yumuşak segment bozunması net olarak gözlemlenememiştir ve bu bozunma yaklaşık 420 °C'ye kadar devam etmiştir. Polimerler arasında dikkate değer bir fark bulunmamakla birlikte Ribosiklib'in dahil edilmesiyle termal kararlılığın arttığı söylenebilir. Ayrıca ilaç içermeyen polimerlere kıyasla nispeten yüksek gözlemlenen kül miktarı Ribosiklib'in eser düzeyde inorganik madde içerdiğinin bir göstergesi olabilir.

Yine Ribosiklib içeren P-CS-1-R, P-CS-2-R ve P-CS-4-R polimerlerinin DSC termogramlarına bakıldığında Tg değerleri sırasıyla 7.72, 24.97 ve 19.19 °C olarak ölçülmüştür. Değerler arasında anlamlı bir farkın olmaması polimerlerin benzer yapısından kaynaklanmaktadır. Ayrıca Ribosiklib yapısının polimerin ortalama Tg değerini ve dolayısıyla fleksibiletisini etkilemediği görülmüştür. Son olarak polimerlerin Tm değerleri sırasıyla 57.23, 56.51 ve 56.64 °C olarak ölçülmüştür.

Polimerlerin DTA termogramlarına bakıldığında, ilaçsız yamalara göre bozunmanın azaldığı ve polimerlerin genel olarak daha kararlı hale geldikleri görülmektedir. TGA'da gözlemlenemeyen 50-100 °C arasındaki küçük pik, az miktardaki nemin uzaklaşmasına işaret etmektedir. İkinci degradasyon 320 °C'de ortaya çıkmakta olup, bu sıcaklığa kadar herhangi bir bozulma görülmemektedir. Ribosiklib içeren polimerlerde, ilaçsız polimerlere kıyasla termal kararlılığın belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

P-CS-1-TA, P-CS-2-TA ve P-CS-4-TA yapılarına ait TGA, DSC ve DTA sonuçlarına bakıldığında TGA da ilk degredasyon 150 °C civarında gerçekleşmekte olup polimerlerdeki nem kaybını temsil etmektedir. İkinci bozunma 260 °C'de görülmektedir ve polimerlerdeki yumuşak segmentlere ait bozunmayı temsil etmektedir. Son bozulma piki ise 400 °C civarındaki sert segmentlere ait bozunmadır. DSC termogramında P-CS-1, P-CS-2 ve P-CS-4 polimerlerinin Tm değerleri sırasıyla 52.99, 49.38 ve 38.75°C olarak ölçülmüştür. Son olarak DTA termogramlarına bakıldığında tamamen TGA değerlerini desteklediği görülmektedir. Genel olarak polimerler arasında büyük farklar görülmemiştir.

Hazırlanan transdermal yamaların fiber morfolojileri SEM analizi ile belirlenmiş ve fiber çapları 428.76±146.71, 103.15±106.14 ve 115.29±159.58 nm olarak ölçülmüştür. Sonuçlara göre artan CS oranı fiber çapını düşürmüş ve fiber homojenliğini bozmuştur. Bunun temel sebebi CS'nin düşük molekül ağırlığına sahip olmasıyla transdermal yamalardaki azalan polimer yoğunluğudur. Öte yandan CS'nin içerdiği hidrofilik gruplar sebebiyle polimer daha yapışkan hale gelmiştir. Literatürde Ravikumar ve ark. tetrahidro kurkumin ilacı ile PCL ve PEG kullanarak nanofiber hazırlamışlar ve ortalama çapı yaklaşık 400 nm bulmuşlardır (Ravikumar ve diğ., 2018). Kataria ve arkadaşları PVA ve sodyum alijinat bazlı elektroeğrilmiş nanofiber hazırlamışlar ve ortalama fiber çapını 300-400 nm aralığında bulmuşlardır (Kataria ve diğ., 2014). Ayrıca literatürde farklı çalışmalarda farklı fiber çaplarına sahip elektroeğrilmiş transdermal yama çalışmaları mevcuttur. Formulasyonlarımızın nanofiber çapları literatürle benzer bulunmuştur.

Transdermal yamaların belirlenen sürede ilaç salabilmesi için deriye yapışmayı sağlayacak ve ilaç salımı boyunca bozulmadan kalacak maddelere ihtiyaç vardır. Bu yapışkanlığı sağlamak için TA kullanılarak etkin bir yapışma sağlanmıştır. TA kaplaması ile birlikte polimer yüzeyindeki fiber morfolojilerinin belirli bir oranda bozulduğu gözlemlenmiştir. Ancak ilaç salımı polimer katmanları boyunca gerçekleşeceği için üst katmanlardaki fiberlerin zarar görmemiş olması ilaç salımının etkilenmediğini öngörmemize olanak sağlamıştır.

Transdermal yamaların şişme kapasitesi, yamanın etkinliği ve ilaç salım hızı açısından oldukça önemlidir. Şişme kapasitesi, yamanın içindeki polimer matrisin şişerek ilacın kontrollü bir şekilde salınmasını sağlar. Çalışmada hazırlanan yamalar %81-93 şişme kapasitesine sahip olmuştur. CS miktarının artması ile şişmenin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmediği görülmüştür. Bunun temel sebebi CS konsantrasyonunun ve molekül ağırlığının PCL'ye kıyasla düşük olmasıdır. Ravikumar ve ark. yaptığı çalışmada PCL/PEG bileşenli yamalarının % şişme derecesini yaklaşık %100 olarak ölçmüştür (Ravikumar ve diğ., 2018). Bu yüksek şişme kapasitesi, PEG'nin hidrofilik yapısından kaynaklanmaktadır ve yamaların yüksek su tutma kapasitesini göstermektedir. Monica ve ark. çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırladığı ketoprofen içerikli transdermal yamaların en yüksek şişme yüzdesini %65 olarak belirlemişlerdir (Rao ve diğ., 2019). Hazırlanan transdermal yamaların şişme kapasitesi literatürle uyumlu görülmüştür.

Transdermal yamaların kalınlık homojenliği yamaların standardizasyonu için elzem olup ilacın cilde sabit bir hızla ve tutarlı bir şekilde salınmasını sağlar. Kalınlık farklılıkları ilacın salım hızını etkileyebilir ve bu da tedavinin etkinliğini azaltabilir. Ayrıca kalınlık

homojenliği her yamanın aynı miktarda ilaç içermesini ve aynı şekilde salınmasını sağlar ve böylece doz optimizasyonu yapılabilir. Homojen kalınlığa sahip yamalar cilde daha yüksek oranda temas eder ve daha sağlam bir şekilde yapışır ve bu da yamanın yerinden çıkma riskini azaltır. Hazırlanan yamanın kendi içinde kalınlık farkının %10'u geçmemesi beklenmektedir. Çalışmada hazırlanan yamaların kendi içlerinde kalınlık homojeniteleri ölçülmüş ve %95-100 arasında homojenlik değeri görülmüştür.

Transdermal yamaların katlama dayanıklılığı yamanın günlük kullanımı sırasında karşılaşabileceği mekanik streslere karşı dayanıklılığını ve işlevselliğini korumasını sağlar. İlaç salımının sürekliliği ve dozaj tutarlılığı, yamanın katlama sırasında yapısının bozulmamasıyla da sağlanır. Ayrıca katlama dayanıklılığı yamanın fiziksel dayanıklılığını ve uzun ömürlülüğünü artırır ve ürünün güvenilirliğini ve etkinliğini korur. Yapısal bütünlüğün korunması, ilacın kimyasal stabilitesini de destekler. Üretim süreçlerinde de yamanın dayanıklı olması kalite kontrolünü ve verimliliği artırır ve depolama ve nakliye sırasında ürün kaybını azaltır. Bu nedenle transdermal yamaların tasarımı ve üretiminde katlama dayanıklılığı dikkate alınmalı ve optimize edilmelidir. Hazırlanan PCL/CS içerikli yamaların katlama dayanıklılığı 1000-1540 tekrar arasında çıkmış olup CS miktarı arttıkça katlama dayanıklılığı artmıştır. Ancak sadece P-CS-1 ve P-CS-2 arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark vardır ($p<0.05$). Malaiya ve ark. alzheimer hastalığında kullanılmak üzere geliştirdikleri transdermal yamaların katlama dayanıklılığını yaklaşık 276 tekrar olarak belirlemişlerdir (Malaiya ve diğ., 2018). Başka bir çalışmada Talib ve ark. yaptığı çalışmada kitosan ve CS içerikli yamalar hazırlamışlar ve katlama dayanıklılığını 289 tekrar olarak belirlemişlerdir. Bu fark, hazırlanan yamaların nispeten kalın hazırlanmasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak literatürle kıyaslandığında yamaların çok daha yüksek katlama değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Talib ve diğ., 2021).

Transdermal yamaların ağırlık homojenliği her bir yamanın aynı miktarda ilaç ve polimer içermesini sağlar. Bu da doğru ve tutarlı dozajlama için gereklidir. Hazırlanan yamaların ağırlık homojeniteleri %92-99 aralığında çıkmıştır. Ravikumar ve ark. yaptığı çalışmada PCL ve PEG bileşenli yamaların ağırlık homojenitesinin %90 ve üzerinde olduğunu belirlemişlerdir (Ravikumar ve diğ., 2018). Talib ve ark. ise iyonik jelleşme yöntemi ile artemeter yüklü kitosan ve CS nanopartikülleri hazırlamış ve transdermal bir banda yüklemiştir. Yamaların %90 üzerinde ağırlık homojenitesi sağladığı gözlemlenmiştir (Talib ve diğ., 2021). Literatürden de görüldüğü üzere yamaların ağırlık homojenitesi oldukça yüksek çıkmış ve bu oran optimum ilaç salımı için yeterlidir.

Transdermal yamalar deri üzerine uygulanan ilaç taşıyıcı polimerlerdir. Bu yamalar ilaçları deri vasıtasıyla sistemik dolaşıma iletirler ve bu nedenle yamaların deri yüzeyine sağlam bir şekilde yapışması gerekir. Yamalar cilt dokusuna stabil ve güçlü bir şekilde yapışmazsa öngörülen optimum ilaç dozunun salımı sekteye uğrar ve yamanın yerinden oynaması enfeksiyon riskine de sebep olabilir. Hazırlanan transdermal yamaların yapışma mukavemetleri 144-386 kPa arasında ölçülmüştür. Artan CS miktarına bağlı olarak yapışma mukavemetinin de artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Farkın anlamlı olmamasının sebebi testin 3 tekrarlı çalışılması olabilir ve yüksek tekrarlarda farkın anlamlı hale gelmesi muhtemeldir. Bu farkın temel sebebi artan CS miktarı ile polimer yüzeyinde yüksek oranda polar hidroksil ve amin gruplarının bulunması ve böylece polar bir molekül olan TA'nın nispeten yüksek oranda bağlanması olabilir (Turan, 2016).

Transdermal yamaların ilaç tutma veriminin yüksek çıkması ilaç etkinliğinin arttırılması açısından büyük önem taşır. İlaç tutma verimi yüksek olan yamalar daha düşük dozlarda daha etkili tedavi sunarak toksisite risklerini minimize eder ve ilacın biyoyararlanımını artırır. Ayrıca ilaç tutma veriminin yüksek olması üretim maliyetlerinin düşürülmesini sağlar. Bu nedenle bu parametrenin optimum çıkması kritiktir. Hazırlanan ilaç salım ve rezervuar katmanlarının ilaç tutma verimi %95 ve üzerinde çıkmıştır. Öte yandan gruplar arasında istatistiki bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Ravikumar ve ark. tetrahidro kurkumin (THC) yüklü PCL/PEG kompozit nanofiber geliştirmişler ve transdermal yama olarak kullanmışlardır (Ravikumar ve diğ., 2018). Çalışmada ilaç tutma verimliliği %95 olarak ölçülmüştür. Diğer bir çalışmada Reda ve ark. ketoprofen yüklü nanofiberlerin ilaç tutma verimini maksimum %80 olarak ölçmüşlerdir (Reda ve diğ., 2017). Yapılan çalışmada Ribosiklib yüklü yamalarda hem rezervuar hem de ilaç salım katmanı için ölçülen değerler literatürdeki değerlerin üzerinde çıkmıştır.

Transdermal yama ilaç salımının yüksekliği tedavi etkinliğinin ve hasta konforunun artırılması açısından kritik bir öneme sahiptir. Yüksek ilaç salım oranı ilacın kan dolaşımına hızlı ve etkin bir şekilde geçmesini sağlayarak hedeflenen terapötik seviyelere daha hızlı ulaşılmasına olanak tanır. Bu özellikle akut hastalıkların tedavisinde hızlı yanıt gerektiren durumlar için önemlidir. Ayrıca kontrollü ve sürekli ilaç salımı plazma ilacı konsantrasyonlarının sabit tutulmasını ve ani dalgalanmaların önlenmesini sağlar. Bu da hem tedavi etkinliğini artırır hem de yan etki risklerini minimize eder. Ayrıca transdermal yama kullanımı gastrointestinal yan etkilerden kaçınmayı ve ilaçların ilk geçiş metabolizmasından korunmasını sağlayarak biyoyararlanımı artırır. Bu nedenle transdermal

yama ilaç salımının yüksekliği hem hasta uyumunu hem de tedavi sonuçlarını iyileştiren önemli bir parametredir. Kontrollü bir ilaç salımı için dozaj miktarı ve ilacın yarılanma ömrü iyi bilinmelidir. Yarılanma ömrü 6 saat olan Ribosiklib, PCL/CS bileşenli yamalar ile hem rezervuar hem de ilaç salım katmanında sırasıyla 10. ve 12. saate kadar artan oranlarda ilaç salımı göstermiş ve %95 oranında bir salıma ulaşılmıştır. Ancak her iki katmanda da gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Makeen ve ark. yaptığı çalışmada nanoemülsiyon formülasyonları ile Ribosiklib içerikli topikal formulasyonlar hazırlamış ve %76 oranında *in vitro* ilaç salımı gözlemlemişlerdir (Makeen ve Albratty, 2024). Talib ve ark. ise iyonik jelleşme yöntemi ile hazırladıkları artemeter yüklü kitosan ve CS nanopartikülleri hazırlamış ve transdermal bir banda yüklendikten sonra yapılan salım çalışmasında %94 oranında ilaç salımına ulaşmışlardır (Talib ve diğ., 2021). İlaç salım sonuçlarımız literatürle uyumlu görülmüştür.

Biyouyumlu materyaller ciltle temas ettiğinde toksik etkiler göstermeden ve tahriş, alerjik reaksiyonlar veya enfeksiyon riskleri yaratmadan deri dokusuna uyum sağlar. Bu, hasta güvenliği için temel olup ciltte yanma, kaşıntı ve kızarıklık gibi yan etkilerin önlenmesini sağlar. Sonuç olarak biyouyumluluk, transdermal yamaların tasarımı ve üretiminde dikkate alınması gereken temel bir faktördür. PCL/CS içerikli yamaların L-929 hücresi kullanılarak *in vitro* biyouyumluluk çalışmaları gerçekleştirilmiş ve %90-95 aralığında hücre canlılığı görülmüştür. Gruplar arasında herhangi bir anlamlı fark yoktur. Bu değerler ASTM standartlarına göre grade 1 düzeyinde biyouyumluluğa karşılık gelir ve hazırlanan malzemenin hem vücut içi hem de vücut dışında kullanılabilirliği anlamına gelir. Pezeshki-Modaress ve ark. yaptığı çalışmada PCL/CS/jelatin bazlı transdermal yama hazırlamış ve HDF (insan fibroblast hücresi) hücre hattı kullanarak DAPI boyaması ile malzemelerin biyouyumluluğunu araştırmıştır. Sonuçlara göre hazırlanan yamaların yüksek düzeyde biyouyumlu olduğunu raporlamışlardır (Pezeshki-Modaress ve diğ, 2022). Meghdadi ve ark. yaptıkları çalışmada PCL/CS bazlı nanofiberler hazırlamışlar ve mezenkimal kök hücrelerde yüksek düzeyde biyouyumluluk gözlemlemişlerdir (Meghdadi ve diğ., 2019). Literatürle kıyaslandığında hazırlanan transdermal yamaların benzer sonuçlara sahip olduğu ve yüksek düzeyde biyouyumlu olduğu gözlenmiştir.

Transdermal yamaların Ribosiklib etkinliğini test etmek için MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksisite çalışması yapılmıştır. Çalışmada kontrol olarak yamaların içerdiği oranda standart Ribosiklib kullanılmıştır. Yamaların MTT sonuçlarına bakıldığında üç yama da %93-94 aralığında sitotoksisite göstermiştir. Bu da yamalardaki ilacın standart ilaç ile aynı inhibisyon etkisine sahip olduğunu ve hazırlama esnasında herhangi bir aktivite kaybı

yaşanmadığını göstermektedir. Literatürde Sharma ve ark. Ribosiklib salımı için hyaluronik asit-Ribosiklib-transfersom bileşeni içeren mikroiğne dizisinden oluşan bir transdermal yama hazırlamışlar ve LA-7 (sıçan meme kanseri) hücre hattında %71 değerinde inhibisyon gözlemlemişlerdir (Sharma ve diğ., 2022).

Ex vivo cilt geçirgenliği çalışmaları, bir ilacın veya aktif bileşenin cilt bariyerini ne kadar geçebildiğini ve cilt tarafından ne kadar emildiğini öğrenmemize yardımcı olur. Çalışmada *ex vivo* geçirgenlik için *in vitro* difüzyon hücresinde rat derisi kullanılarak yapılmıştır ve hazırlanan formulasyonlarda %68-81 aralığında deri geçirgenliği bulunmuştur. Gruplar kendi içinde kıyaslandığında CS miktarı arttıkça genel olarak ilaç geçirgenliği artmış olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Makeen ve ark. yaptığı çalışmada Ribosiklib'in topikal salımı için nanoemüljel formulasyonları hazırlamışlar ve Franz difüzyon hücresi kullanarak ilacın deri geçirgenliğini test etmişlerdir. Kemirgen derisinden 218 -105 μg/cm² aralığında ilacın nüfuz ettiğini belirtmişlerdir (Makeen ve Albratty, 2024). Ravikumar ve ark. yaptığı çalışmada domuz derisi kullanarak Ribosiklib ilacının kümülatif salımını incelemişlerdir. Bu çalışmada, 24 saat boyunca yapılan gözlemler sonucunda Ribosiklib ilacının kümülatif salımının %95 olduğunu tespit etmişlerdir (Ravikumar ve diğ., 2018). Literatürdeki sonuçlarla kıyaslandığında rat derisi üzerinden yapılan ilaç salım kapasitemiz optimuma yakındır.

Tez kapsamında meme kanseri tedavisinde kullanılan Ribosiklib'in transdermal salımı için elektroeğirme yöntemiyle yenilikçi bir transdermal yama sistemi geliştirilmiştir. Bu transdermal yamalar ile daha düşük dozlarda ilaç kullanımıyla terapötik etkinliği artırılarak mevcut tedavi yöntemlerine göre önemli avantajlar sunulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

Açıkgöz, A., & Akal Yıldız, E. (2017). Meme Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri. Ergoterapi ve Rehabilitasyon Dergisi, 5(1), 45–56. https://doi.org/10.30720/ered.441784

Adepu, S., Molecules, S. R.-, & 2021, undefined. (n.d.). Controlled drug delivery systems: current status and future directions. Mdpi.ComS Adepu, S RamakrishnaMolecules, 2021•mdpi.Com. Retrieved June 25, 2024, from https://www.mdpi.com/1420-3049/26/19/5905

Aggarwal, G., & Dhawan, S. (2009). Development, fabrication and evaluation of transdermal drug delivery system - A review. In Pharmaceutical Reviews (Vol. 7, Issue 5).)

Ak, E., Nursing-Special, İ. Ç.-T. K. S., & 2019, undefined. (n.d.). Meme kanserinde sistemik tedaviler (kemoterapi, hormonoterapi, hedefe yönelik tedavi) ve hemşirelik bakımı. Turkiyeklinikleri.Com. Retrieved June 25, 2024, from https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-meme-kanserinde-sistemik-tedaviler-kemoterapi-hormonoterapi-hedefe-yonelik-tedavi-ve-hemsirelik-bakimi-84661.html

Alavi, M., Karimi, N., & Safaei, M. (2017). Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 7(1), 3–9. https://doi.org/10.15171/apb.2017.002

Ali, S., Khatri, Z., Oh, K. W., Kim, I. S., & Kim, S. H. (2014). Preparation and characterization of hybrid polycaprolactone/cellulose ultrafine fibers via electrospinning. Macromolecular Research, 22, 562-568.

Arslan, G., Önkol, T., & Özçelik, A. B. (2022). Siklin Bağımlı Kinaz 4/6 Ve İnhibitörleri. Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi, 193–208. https://doi.org/10.33483/jfpau.978763

Azizi, M., Azimzadeh, M., Afzali, M., Alafzadeh, M., & Mirhosseini, S. H. (2018). Characterization and optimization of using calendula offlcinalis extract in fabrication of polycaprolactone-gelatin electrospun nanofibers for wound dressing applications. Journal of advanced materials and processing, 6(2), 34-46.

Bernstein, L., Henderson, B. E., Hanisch, R., Sullivan-Halley, J., & Ross, R. K. (1994). Physical Exercise and Reduced Risk of Breast Cancer in Young Women. JNCI Journal of the National Cancer Institute, 86(18), 1403–1408. https://doi.org/10.1093/jnci/86.18.1403

Brannon-Peppas, L. (1997). Polymers in controlled drug delivery. Medical plastics and biomaterials magazine.

Breast cancer. (n.d.). Retrieved October 16, 2022, from https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer

Efe, H. (2010). 4-akrilomorfolin esaslı hidrojellerin sentezi ve ilaç salım kinetiğinin incelenmesi (Master's thesis, Marmara Universitesi (Turkey)

Galus, A., Mallet, J. M., Lembo, D., Cagno, V., Djabourov, M., Lortat-Jacob, H., & Bouchemal, K. (2016). Hexagonal-shaped chondroitin sulfate self-assemblies have exalted anti-HSV-2 activity. Carbohydrate polymers, 136, 113-120.

Gürsoy, A., Pişkin, E., Dortunç, B., & Peppas, N. A. (1989). Kontrollü ilaç serbestleştiren sistemler. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, (469/5).

Higuchi, T. J. J. O. P. S. (1963). Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. Journal of pharmaceutical sciences, 52(12), 1145-1149

Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. Advanced drug delivery reviews, 18-23.

Ilmain, F., Tanaka, T., & Kokufuta, E. (1991). Volume transition in a gel driven by hydrogen bonding. Nature, 349(6308), 400-401.

Karabulut, B., Kerimoglu, O., & Ugurlu, T. (2015). Dendrimers-Drug delivery systems. Journal of Marmara University Institute of Health Sciences, 1. https://doi.org/10.5455/musbed.20141015015453

Kataria, K., Gupta, A., Rath, G., Mathur, R. B., & Dhakate, S. R. (2014). In vivo wound healing performance of drug loaded electrospun composite nanofibers transdermal patch. International journal of pharmaceutics, 469(1), 102-110.

Kim, E. S. (2017). Abemaciclib: First Global Approval. Drugs, 77(18), 2063–2070. https://doi.org/10.1007/s40265-017-0840-z

Liu, B., Wang, Y., Miao, Y., Zhang, X., Fan, Z., Singh, G., ... & Xing, M. (2018). Hydrogen bonds autonomously powered gelatin methacrylate hydrogels with super-elasticity, self-heal and underwater self-adhesion for sutureless skin and stomach surgery and E-skin. *Biomaterials*, *171*, 83-96.

Mahammad, A., Mahapatra, S., … S. D.-U. J. O., & 2022, undefined. (n.d.). Pharmacological activities of anti-hypertensive drug delivery through a transdermal patch–a brief review. Ujpsr.InA Mahammad, SS Mahapatra, S Das, S Bahadurunıversal Journal Of Pharmaceutıcal Scıences And Research, 2022•ujpsr.In. Retrieved June 25, 2024, from http://ujpsr.in/index.php/journal/article/view/18

Makeen, H. A., ve Albratty, M. (2024). Fabrication and characterization of transdermal delivery of ribociclib nanoemulgel in breast cancer treatment. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1-28.

Malaiya, M. K., Jain, A., Pooja, H., Jain, A., & Jain, D. (2018). Controlled delivery of rivastigmine using transdermal patch for effective management of alzheimer's disease. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 45, 408-414.

Marangoz, Ö. (N.D.). Nano-İlaç Taşıyıcı Sistemler. Researchgate.Netö Marangozresearchgate.Net. Retrieved June 24, 2024, from https://www.researchgate.net/profile/Oguzhan-Yavuz-2/publication/361109154_Nano ilac_Tasiyici_Sistemler/links/629dd1f9a3fe3e3df862409d/Nano-ilac-Tasiyici-Sistemler.pdf

Meghdadi, M., Pezeshki-Modaress, M., Irani, S., Atyabi, S. M., & Zandi, M. (2019). Chondroitin sulfate immobilized PCL nanofibers enhance chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. International journal of biological macromolecules, 136, 616-624.

Nandi, S., & Mondal, S. (2022). Fabrication and Evaluation of Matrix Type Novel Transdermal Patch Loaded with Tramadol Hydrochloride. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 19(5), 572–582. https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2021.43678

Ömer Oylar, & İsmail Tekin. (2011). Kanserin Teşhis ve Tedavisinde Nanoteknolojinin Önemi. Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, 16(1).

Onur Baykara. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5(3).

Peppas, N. A., & Narasimhan, B. (2014). Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. Journal of Controlled Release, 190, 75-81.

Pezeshki-Modaress, M., Akbarzadeh, M., Ebrahimibagha, D., Zandi, M., Ghadimi, T., Sadeghi, A., & Rajabi, S. (2022). Fabrication and In Vitro Evaluation of A Chondroitin Sulphate-Polycaprolactone Composite Nanofibrous Scaffold for Potential Use in Dermal Tissue Engineering. Cell Journal (Yakhteh), 24(1), 36.

Prausnitz, M. R., Mitragotri, S., & Langer, R. (2004). Current status and future potential of transdermal drug delivery. Nature Reviews Drug Discovery, 3(2), 115–124. https://doi.org/10.1038/nrd1304

Rao, M. R., Sonavane, V., Kulkarni, S., Magar, M., Zope, A., & Karanjkar, P. (2019). Design of transdermal patch of ketoprofen by full factorial design for treatment of rheumatoid arthritis. Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 9(2), 197-205.

Ravikumar, R., Ganesh, M., Senthil, V., Ramesh, Y. V., Jakki, S. L., & Choi, E. Y. (2018). Tetrahydro curcumin loaded PCL-PEG electrospun transdermal nanofiber patch: Preparation, characterization, and in vitro diffusion evaluations. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 44, 342–348. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.01.016

Reda, R., Wen, M. M., & El-Kamel, A. (2017). Ketoprofen-loaded Eudragit electrospun nanofibers for the treatment of oral mucositis. International Journal of Nanomedicine, Volume 12, 2335–2351. https://doi.org/10.2147/IJN.S131253

Reza Rezaie, H., Esnaashary, M., Aref arjmand, A., & Öchsner, A. (2018). Nanotechnology in Drug Delivery Systems (pp. 43–51). https://doi.org/10.1007/978-981-10-0503-9_5

Ritschel, W. A. (1989). Biopharmaceutic and pharmacokinetic aspects in the design of controlled release peroral drug delivery systems. Drug Development and Industrial Pharmacy, 15(6–7), 1073–1103. https://doi.org/10.3109/03639048909043666

Samant, T. S., Yang, S., Miller, M., & Ji, Y. (2021). Pharmacokinetics of Ribociclib in Subjects With Hepatic Impairment. The Journal of Clinical Pharmacology, 61(8), 1001–1009. https://doi.org/10.1002/jcph.1825

Sert, P. İ., & Tüylü Küçükkılınç, Z. T. (2022). Meme Kanseri Tedavisindeki Güncel Yaklaşımlar. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy. https://doi.org/10.52794/hujpharm.959879

Sezgin, Z., Yüksel, N., & Baykara, T. (1974). İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Polimerik Misellerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu. Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi, 125–142. https://doi.org/10.1501/Eczfak_0000000201

Sharma, M., Mittapelly, N., Banala, V. T., Urandur, S., Gautam, S., Marwaha, D., Rai, N., Singh, N., Gupta, A., Mitra, K., & Mishra, P. R. (2022). Amalgamated Microneedle Array Bearing Ribociclib-Loaded Transfersomes Eradicates Breast Cancer via CD44 Targeting. Biomacromolecules, 23(3), 661–675. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01076

Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Advanced drug delivery reviews, 64, 163-174.

Singh, T. G., Dhiman, S., & Rehni, A. K. (2013). Formulation and evaluation of nanopharmaceuticals in drug delivery. Therapeutic Delivery Methods: A Concise Overview of Emerging Areas, 80–95. https://doi.org/10.4155/EBO.13.398

Soudry-Kochavi, L., Naraykin, N., … T. N.-J. of controlled, & 2015, undefined. (n.d.). Improved oral absorption of exenatide using an original nanoencapsulation and microencapsulation approach. ElsevierL Soudry-Kochavi, N Naraykin, T Nassar, S BenitaJournal of Controlled Release, 2015•Elsevier. Retrieved June 25, 2024, from https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365915301140

Sted, S. A., & 2004, undefined. (2004). Meme kanserinde erken tanı. Ttb.Org.TrS AydıntuğSted, 2004•ttb.Org.Tr. https://www.ttb.org.tr/STED/sted0604/m_kanser.pdf

Su, S. (2019). Elektroeğirme yöntemi ile biyouyumlu yara örtüsünün üretilmesi ve karakterizasyonu (Master's thesis, Marmara Universitesi (Turkey)).

Sunar, B. S., & Hasçiçek, C. (2017). Elektroeğrilmiş nanoliflerin ilaç taşıyıcı sistem olarak ve doku mühendisliğinde kullanımı. Marmara Pharmaceutical Journal, 21(3), 425-435.

Syed, Y. Y. (2017). Ribociclib: First Global Approval. Drugs, 77(7), 799–807. https://doi.org/10.1007/s40265-017-0742-0

Talib, S., Ahmed, N., Khan, D., Khan, G. M., & ur Rehman, A. (2021). Chitosan-chondroitin based artemether loaded nanoparticles for transdermal drug delivery system. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 61, 102281.

Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M., & Bruce, B. D. (2005). Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45(7–8), 587–605. https://doi.org/10.1080/10408390591001135

Tripathy, D., Bardia, A., & Sellers, W. R. (2017). Ribociclib (LEE011): Mechanism of Action and Clinical Impact of This Selective Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor in Various Solid Tumors. Clinical Cancer Research, 23(13), 3251–3262. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3157

Tserga, A., Chatziandreou, I., Michalopoulos, N. V., Patsouris, E., & Saetta, A. A. (2016). Mutation of genes of the PI3K/AKT pathway in breast cancer supports their potential importance as biomarker for breast cancer aggressiveness. Virchows Archiv, 469(1), 35–43. https://doi.org/10.1007/s00428-016-1938-5

Turan, K. (2016). Kompozit malzemelerde yapışma bağlantılarının mukavemeti üzerine yama fiber takviye açısı etkisi. Dicle Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Mühendislik Dergisi, 7(1), 129-138.

Washbrook, E. (2006). Risk factors and epidemiology of breast cancer. Women's Health Medicine, 3(1), 8–14. https://doi.org/10.1383/wohm.2006.3.1.8

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Nermin GÜNDÜZ

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans :** 2021, Atatürk Üniversitesi, Fen/ Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik
- **Yüksek Lisans :** 2024, İnönü Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya

ÇALIŞMA ALANLARI

- Hücre kültür
- Antikanser
- Genetik
- Biyouyumluluk
- Biyomalzeme
- İlaç Salımı

TEZDEN TÜRETİLEN BİLDİRİLER

Gunduz, N; Balcıoğlu, S; Ates, B.; (2023) Development of Ribociclib Loaded Polycaprolactone (PCL)/Chondroitin Sulfate (CS) Nanofiber as Transdermal Drug Delivery Systems. 5rd Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress

YAYINLAR

- Yagiz Erdemir Guler; Gündüz N; Ateş B ; Altundas A,; (2024) Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,2,3-Triazole-Benzimidazole Derivatives as Potential Anticancer Agents Against Breast (MCF-7) And Colon (HCT116) Cancer.

ÇALIŞMALER

- Mikrobiyal Kondroitin Sülfat Temelli Transdermal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin (TDDS) Elektroeğirme Yöntemi ile Ribosiklib İlacı İçin Geliştirilmesi ve İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması, TÜBİTAK

- Ribosiklibin İlacı İçin Elektroeğirme Yöntemi ile Transdermal İlaç Taşıyıcı Sistemlerin TDDS Geliştirilmesi İlaç Salım Kinetiği ve İn Vitro Etkinliğinin İncelenmesi (BAP)