



Nebivolol içeren lipozom formülasyonlarının geliştirilmesi ve oral yoldan hedeflendirilmesi

Proje No: 29675

Normal Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Melike Sessevmez

Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

Prof.Dr. Erdal Cevher,
İstanbul Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Dr.Öğr.Üyesi Genada Sinani,
Altınbaş Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Doktora Öğrencisi Tilbe Çevikelli,
İstanbul Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Doktora Öğrencisi Aybige Ertürk,
İstanbul Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Doktora Öğrencisi Deniz Morina
İstanbul Üniversitesi/Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Haziran 2020

İSTANBUL

TEŞEKKÜR: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29675.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TABLolar LİSTESİ	1
ŞEKİLLER LİSTESİ	2
KISALTMALAR LİSTESİ:	3
ÖZET	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ	6
2. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3. BULGULAR	11
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	17
5. DİĞER BİLGİLER	19

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Farklı lipozom formülasyonlarının içeriği ile partikül boyutu ($\text{nm} \pm \text{SD}$) ve partikül boyut dağılımı (PDI) değerleri.....	12
Tablo 2: Pluronik (Plu) kaplı olan ve olmayan NB'lu lipozom formülasyonlarının içeriği.....	12
Tablo 3: Pluronik (Plu) kaplı olan ve olmayan NB'lu lipozom formülasyonlarının hazırlandıktan sonra partikül boyutu ($\text{nm} \pm \text{SD}$), partikül boyut dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli ($\text{mV} \pm \text{SD}$) değerleri ile dört haftalık fiziksel stabilite değerleri ($n=3$).....	12
Tablo 4: Farklı lipit:kitosan molar oranlarında hazırlanan lipozom formülasyonlarının içeriği ile boyut, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları.....	12
Tablo 5: Hazırlanan kitosan kaplı lipozom formülasyonlarının boyut, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları ile $+4^\circ\text{C}$ 'de 4 haftalık fiziksel stabilite verileri ($n=3$).....	13

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Lipozom formülasyonlarının SIF ve SGF ortamlarında zamana bağlı olarak boyut değişimleri (n=3).....	13
Şekil 2: Nebivolol içeren lipozom formülasyonlarında a) müsin ilavesinden sonra 550 nm'de türbidite değişimi b) partikül boyutu (nm $\pm$ SD) c) zeta potansiyel (mV $\pm$ SD) değerleri.....	14
Şekil 3: Nebivolol hidroklorürün 220 nm'de kalibrasyon eğrisi (n=3).....	15
Şekil 4: Nebivolol içeren lipozom formülasyonlarının (DPPC/Chol/SA, DPPC/Chol/SA + Pluronic, DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1) enkapsülasyon etkinliği.....	15
Şekil 5: 37°C'de Nebivolol'un (NB) lipozom formülasyonlarından (a) DPPC/Chol/SA (b) DPPC/Chol/SA + Pluronic (c) DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 pH 6,8'de <i>in vitro</i> salımı.....	16
Şekil 6: Nebivolol içeren a) DPPC/Chol/DCP + Chi-2:1 b) DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 ve c) DPPC/Chol/SA + Pluronic lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri.....	17
Şekil 7: Lipozom formülasyonlarının Caco-2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi.....	17

KISALTMALAR LİSTESİ:

ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BCS	Biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde
Caco-2	İnsan kolorektal adenokarsinoma
Chi	Kitosan
Chol	Kolesterol
DCP	Disetil fosfat
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
FBS	Fetal Sığır Serumı
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
GI	Gastrointestinal
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NB	Nebivolol
NO	Nitrik Oksit
P-gp	P-glikoproteini
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PDI	Polidispersite İndeksi
Plu	Pluronik F127
SA	Strearil amin
SGF	Simüle Mide Sıvısı
SIF	Simüle Barsak Sıvısı
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu

1. PROJE ÖZET BİLGİLERİ: Türkçe Özet ve İngilizce “Abstract” şeklinde hazırlanmalıdır. Projedeki faaliyetlerin kısa özetini içermeli ve 500 kelimeyi geçmemelidir.

Türkçe Özet:

Hipertansiyon, arter damarlarda kan basıncının yükselmesine sebep olan kronik bir hastalıktır. Nebivolol, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış üçüncü kuşak bir beta-adrenerjik reseptör blokeridir. Nitrik oksit sağlayarak endotel dokunun genişlemesini ve kan basıncının düşmesini sağlar. Nebivolol, biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde suda çözünürlüğü az olan (BCS) sınıf II ilaç grubunda yer almakta olup oral yoldan kullanılan nebivolol karaciğerde ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve bu durumda nebivololün biyoyararlanım sorunu göstermenise sebep olur.

İlacı ilk geçiş etkisinden korumak ve çözünürlük problemini aşmak amacıyla, yeni taşıyıcı sistemlerin kullanılması ilaç dozunu ve doz sıklığını azaltmak için iyi bir çözüm olabilir. Lipozomlar fosfolipitlerden oluşan veziküller olup ilaçların oral biyoyararlanımını arttırmak için yaygın olarak araştırılan taşıyıcı sistemlerdir. Biyoyararlanımı, yüklenen ilacını çözünürlüğü artırarak ve ilacı hapsedip gastrointestinal boşlukta parçalanmaktan koruyarak arttırmaktadır. İlacın oral yoldan absorpsiyonu için mukus bariyerinden geçmesini kolaylaştırmak ve arttırmak amacıyla yüzeyi mukoadesif özelliği gösteren polimerler ile yaygın olarak kaplanmaktadır.

Bu çalışma kapsamında düşük biyoyararlanım gösteren nebivololün mukus tabakasından penetrasyonunu arttırmak üzere pozitif (stearil amin-SA) veya negatif yüklü (disetil fosfat-DCP) lipozom formülasyonları 1,2-dipalmitoil-snglisero-3-fosfokolin (DPPC) ve kolesterol (chol) kullanılarak hazırlanmış ve yüzeyleri Pluronik F127 veya kitosan ile kaplanmıştır. Nebivolol yüklü lipozomların yüzeyi kitosan ve Pluronik F127 ile modifiye edilerek ilacın GI sistemdeki fizyolojik şartlardan korunması ve kontrollü salımı sağlanarak biyoyararlanımının artırılması amaçlanmıştır. Lipozom formülasyonlarının film hidrasyon yöntemiyle hazırlanması sonrasında optimizasyon, karakterizasyon, fiziksel stabilite çalışmaları ile lipozomların müsin etkileşim çalışmaları yapılmıştır. Seçilen optimize lipozom formülasyonlarıyla (DPPC/Chol/SA, DPPC/Chol/SA + Pluronic ve DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1) enkapsülasyon, *in vitro* salım ve sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan lipozom formülasyonların hepsi pozitif yüke sahip olup partikül boyutları ise polimer ile kaplı lipozomların kaplı olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur (Örneğin; DPPC/Chol/SA'nın partikül boyutu $154,1 \pm 3,4$ nm iken DPPC/Chol/SA+Plu'in $196,9 \pm 0,7$). Seçilen formülasyonlar dört hafta boyunca stabil kalabilmiş ayrıca simüle mide sıvısı (SGF) ve simüle barsak sıvısı (SIF) gibi ortamlarda stabilitelerini koruyabilmişlerdir. Müsin ile etkileşim çalışmasında ise tüm lipozom formülasyonları müsin ile etkileşim göstermiş olup DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 formülasyonu en yüksek etkileşimi göstermiştir. Aynı zamanda, üretilen bu lipozom formülasyonları ile yüksek enkapsülasyon etkinliği (%44,69 ile %91,72 arasında) elde edilebilmiştir. Yapılan sistotoksiste sonucunda tüm formülasyonlar %45'in üzerinde hücre canlılığı göstermiştir.

Tüm bu çalışmalar sonucunda optimize, stabil ve düşük toksisite nebivolol içeren lipozom formülasyonları geliştirilmiş olup bu formülasyonlar hipertansiyon tedavisinde kullanılan nebivololün alternatif tedavisinde ve hastaya daha etkin bir tedavi sunulmasında büyük potansiyele sahiptir.

Anahtar kelimeler: nebivolol, antihipertansif, lipozom, biyoyararlanım

Yabancı Dilde Özet:

Hypertension is a chronic disease that causes high blood pressure in the arteries. Nebivolol is a third-generation beta-adrenergic receptor blocker approved by U.S. Food and Drug Administration (FDA). It enables the endothelial tissue to expand and blood pressure to drop through the induction of nitric oxide. Nebivolol is a class II drug according to the biopharmaceutical classification system (BCS) with low aqueous solubility. Nebivolol administered by the oral route undergoes first-pass metabolism in the liver, which decreases its bioavailability.

In order to overcome the solubility problem and protect the drug from the first pass effect, the encapsulation of drug in nanocarriers can be a good strategy to reduce the dose, dose frequency and side effects. Liposomes are vesicles consisting of phospholipids widely used to enhance the oral bioavailability of drugs by increasing the solubility of drug. Moreover, encapsulation of drugs in liposomes protects the drug from the harsh environment in the gastrointestinal system. The coating of nanocarriers with mucoadhesive polymers such as chitosan and pluronic can increase the oral absorption of the drug which must pass through the mucous barrier for absorption to occur.

In this study, liposomal formulations using 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and cholesterol (chol) with positively charged (stearyl amine-SA) or negatively charged (disethyl phosphate-DCP) were prepared by film hydration method. To increase the mucoadhesiveness of the system, liposomes were coated with chitosan (chi) and pluronic F127 (plu). mucoadhesive polymers. Optimization, characterization, physical stability studies and mucin interaction studies of liposomes were performed. Encapsulation, *in vitro* release and cytotoxicity studies of optimized liposome formulations (DPPC / Chol / SA, DPPC / Chol / SA + Pluronic and DPPC / Chol / DCP + Chi-3: 1) were done.

The results showed that all prepared liposome formulations had a positive charge and the particle size of polymer coated liposome formulations were higher than uncoated liposomes e.g. particle size of DPPC / Chol / SA was 154.1 ± 3.4 nm while particle size of DPPC / Chol / SA + Plu was 196.9 ± 0.7 nm). All formulations could remain stable for four week. The stability was maintained in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF). In the interaction study with mucin, all liposome formulations interacted with mucin and the DPPC / Chol / DCP + Chi-3: 1 formulation showed the highest interaction. Also, high encapsulation efficiency (between 44.69% and 91.72%) was achieved with these liposome formulations. The result of cytotoxicity, studies in Caco-2 cells showed cell viability was above 45% for all formulations.

Nebivolol loaded liposomal formulations with good stability and minimal toxicity were developed as a potential formulation for alternative more effective treatment of hypertension.

Keywords: nebivolol, antihypertensive, liposome, bioavailability

2. LİTERATÜRDEKİ GELİŞMELER: Proje konusunda proje teklifi sırasında kullanılmış ve kabul edildikten sonraki dönem içinde dünya literatüründe gerçekleşen yenilikler ve çıkmış olan makaleler konusunda bilgi verilmeli, eğilimler ve proje konusu ile ilgili gelişmeler bu bölümde irdelenmelidir.

Oral yoldan ilaç uygulanması çok kullanılan ve en yüksek hasta uyuncu gösteren ilaç uygulama yolu olarak kabul edilmektedir. Ağrısız ve rahat olması, genelde başka bir sağlık personeli gerektirmemesi, maliyeti düşük, doz sıklığı ve kontrolünün kolay olması bu yolun tercih edilme nedenlerindendir (Mei ve ark., 2013). Bu avantajlara rağmen, oral yoldan verilen ilaçlar, parenteral yolla verilen ilaçlara göre doğrudan sistemik dolaşıma geçmediğinden terapötik etkisini göstermek için ilk önce gastrointestinal (GI) sistemden emilip kana geçmeleri gerekmektedir.

Gastrointestinal sistem 300-400 m²'ye kadar oldukça yüksek bir absorpsiyon alanına sahiptir. İnsan bağırsak epitelinde bulunan villuslar ilaçların emilimini arttırmaktadır. Fakat, ilaca bağlı fizikokimyasal özellikler, dozaj formunun özellikleri ve GI sistemdeki fizyolojik bariyerler ilaçların geçişini etkilemektedir (Mrsny, 2012). Örneğin, suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların biyoyararlanımı düşüktür. İlaç emiliminin gerçekleşebilmesi için, ilacın GI sistemde önce çözünmesi sonra çeşitli fizyolojik/biyolojik bariyerlerden geçmesi gerekmektedir. Ayrıca, ilaç asidik mide ortamında stabil kalmalıdır. Buna ilaveten, ilaç epitel hücreleri kaplayan mukus tabakasından geçebilmelidir. Genellikle, ilacın lipofilitesi arttıkça, mukus tabakasından difüzyonu daha yavaş olmaktadır (Amidon ve ark., 1995; Dahan ve ark., 2009). İlaçların GI membranlardan geçiş effluks pompası olarak adlandırılan bir mekanizma ile sınırlandırılmaktadır. Hücre membranlarında bulunan P-glikoproteini (P-gp) ilacın hücreden dışarı atılmasına neden olabilmektedir. Bunların yanında, karaciğerde ilk geçiş metabolizması olarak bilinen mekanizma ilacın sistemik dolaşıma geçen konsantrasyonunun düşmesine neden olmaktadır (Hetal ve ark., 2010; Thanki ve ark., 2013). Fizyolojik faktörleri ve ilacın fizyokimyasal özellikleri yanında, ilaç dozaj şeklinin özellikleri de ilacın biyoyararlanımı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Kana ulaşan ilaçların biyoyararlanımı yeni taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesiyle artırılabilir (Ashford, 2013).

Nanoteknoloji, gastrointestinal sistemden emilimi arttırmak için umut verici fırsatlar sunmaktadır (Bhardwaj ve ark., 2005). Özellikle, düşük çözünürlük gösteren ilaç molekülleri oral yoldan uygulandığında etki gösterebilmeleri için ulaşması gereken terapötik doza kolay ulaşamaz (Wang ve ark., 2012; Khadka ve ark., 2014). Son yıllarda nano boyuttaki farklı ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı, hidrofobik ilaçların oral biyoyararlanımlarının artırılması için yukarıda bahsedilen bariyerlerin aşılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır (Zhang ve ark., 2013). Ayrıca, ilaçların fizyolojik ve enzimatik bariyerlerden korunması ve bu bariyerlerin aşılması için önerilen çeşitli nanoteknolojik yaklaşımların çoğu, ilacın midedeki asit ortamına ve enzimlerin etkisine karşı koruma sağlayabilen partiküler taşıyıcılara yüklenmesine dayanmaktadır. Nanotaşıyıcı sistemlerin etkinliği fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir: örneğin taşıyıcının boyutu, yükü ve formülasyonlarında kullanılan maddeler (Pan ve ark., 2002; Wang ve ark., 2004; Wang ve Zhang, 2012; Yang ve ark., 2011). Modern ilaç taşıyıcı sistemleri olarak bilinen ve lipitlerden oluşan lipozomlar, küçük moleküllü ilaçların ve biyofarmasötiklerin oral biyoyararlanımını arttırmak için yaygın olarak araştırılmaktadır.

Lipozomlar lipit tabakalardan oluşan partiküler sistemlerdir. Konvansiyonel lipozomların kullanımı ile insülin gibi peptit yapıdaki ilaçların bağırsak enzimlerinden korunduğu gösterilmiştir (Kisel ve ark., 2001). Bu potansiyellerine rağmen, lipozomlar asidik mide ortamında ve pankreatik lipaz varlığında parçalanabilmektedir (Iwagana ve ark., 1997; Parmentier ve ark., 2011). Böylece, lipozom içindeki ilaçlar korunmasız hale gelmektedir. Bu nedenle, lipozomların GI sistemde stabilitelerini arttırmak için çeşitli yaklaşımlar araştırılmıştır. Bu yaklaşımlar içerisinde polimer kaplı lipozomların geliştirilmesi başta gelmektedir (Okada ve ark., 1998). Yapılan başka bir çalışmada lipozomların tiyollenmiş kitosan ile kaplanması mukus penetrasyonunu ve ilaç emilimini arttırmış. Ayrıca, efflux pompasının etkin bir şekilde inhibisyonunu sağlanmıştır. Bunların yanı sıra, bu lipozomlar gastrointestinal ortamda yüksek stabilite göstermiştir (Gradauer ve ark., 2013).

Yeni ilaç taşıyıcı sistemleri düşük çözünürlük ve düşük biyoyararlanım gösteren antihipertansif ilaçların terapötik etkinliğinin artırılması ve uzatılmış ilaç salımını sağlaması açısından dikkat çekmektedir (Vikas ve ark., 2011; Prisant ve Elliot, 2003). Günümüzde kullanılan antihipertansif ilaçların farmakolojik grupları ACE inhibitörleri, kalsiyum kanal blokerleri, anjiyotensin antagonistleri, santral sempatomimetikler, diüretikler, alfa adrenereklik blokerler, beta adrenereklik blokerler ve vazodilatörlerdir. Bu grupların bir çoğu düşük biyoyararlanım, kısa yarılanma ömrü ve düşük permeabilite gibi dezavantajlarına sahiptir (Vikas ve ark., 2011; Prisant ve Elliot, 2003). Antihipertansif ilaçların uygulanmasında doz sıklığının azaltılması, biyoyararlanımın artırılması ve yan etkilerinin azaltılması için yeni taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır (Vikas ve ark., 2011; Prisant ve Elliot, 2003).

Bütün bu sorunların aşılmasında nanoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler iyi bir alternatif oluşturmaktadır. (Prisant ve ark., 1992). Nebivolol, nitrik oksit (NO) aracılığı ile sistemik vazodilatasyon sağlayan selektif beta-1 bloker grubunda yeni üçüncü nesil antihipertansif bir ilaçtır. Diğer antihipertansif ilaçlara kıyasla oldukça etkili bir ilaç olup kan basıncının kontrolünü sağlamaktadır. Ancak, plazma yarı ömrünün kısa (2 saat) ve biyoyararlanımının düşük olması (<% 40) sık doz kullanımını gerektirmektedir. Nebivololun düşük biyoyararlanım göstermesi, düşük çözünürlüğüne ve yüksek ilk geçiş metabolizmasına bağlıdır (Hanif ve ark., 2017). Dolayısıyla, etkili bir tedavi için ilacın çözünürlüğünün artırılması ve ilk geçiş etkisinin azaltılması gerekmektedir.

Üstündağ-Okur ve ark. nebivolol yüklü katı lipit nanopartikülleri hazırlamış ve yüzeylerini kitosan oligosakkarit laktat ve polietilen glikol stearat ile kaplamıştır. Polietilen glikol stearat ile kaplı formülasyonun piyasadaki nebivolol preparatına göre daha iyi geçiş gösterdiğini ve düşük çözünürlük gösteren ilaçlar için umut verici bir taşıyıcı sistem olduğunu göstermiştir (Üstündağ-Okur ve ark., 2016).

Bu çalışmada, düşük biyoyararlanım gösteren nebivololun mukus tabakasından penetrasyonunu arttırmak üzere pozitif (stearil amin-SA) veya negatif yüklü (disetil fosfat-DCP) lipozom formülasyonları 1,2-dipalmitoil-snglisero-3-fosfokolin (DPPC) ve kolesterol (chol) kullanılarak hazırlanmış ve yüzeyleri Pluronic F127 veya kitosan ile kaplanmıştır. Nebivolol yüklü lipozomların yüzeyi kitosan ve Pluronic F127 ile modifiye edilerek ilacın GI sistemdeki fizyolojik şartlardan korunması ve kontrollü salımı sağlanarak biyoyararlanımının artırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, lipozom formülasyonlarının film hidrasyon yöntemiyle hazırlanması sonrasında optimizasyon, karakterizasyon, fiziksel stabilite çalışmaları ile lipozomların münasip etkişim çalışmaları yapılmıştır. Seçilen optimize lipozom formülasyonlarıyla (DPPC/Chol/SA, DPPC/Chol/SA + Pluronic ve DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 enkapsülasyon, *in vitro* salım ve sitotoksite çalışmaları yapılmıştır. Tüm bu çalışmalar sonucunda optimize, stabil ve düşük toksisite nebivolol içeren lipozom formülasyonları geliştirilmiş olup hipertansiyon tedavisinde kullanılan nebivololün hastaya verilmesinde umut verici bir alternatif olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Mei, L., Zhang, Z., Zhao, L., Huang, L., Yang, X. L., Tang, J., & Feng, S. S. (2013). Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(6), 880-890.

Mrsny, R. J. (2012). Oral drug delivery research in Europe. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 247-253.

Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical research*, 12(3), 413-420.

Dahan, A., Miller, J. M., & Amidon, G. L. (2009). Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS journal*, 11(4), 740-746.

Hetal, T., Bindesh, P., & Sneha, T. (2010). A review on techniques for oral bioavailability enhancement of drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4(3), 033.

Thanki, K., Gangwal, R. P., Sangamwar, A. T., & Jain, S. (2013). Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. *Journal of controlled release*, 170(1), 15-40.

Aulton, M. E., & Taylor, K. Aulton's *Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines*. 2013: Churchill Livingstone, 315-333.

Bhardwaj, V., Hariharan, S., Bala, I., Lamprecht, A., Kumar, N., Panchagnula, R., & Ravi Kumar, M. N. V. (2005). Pharmaceutical aspects of polymeric nanoparticles for oral drug delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1(3), 235-258.

Wang, X. Q., & Zhang, Q. (2012). pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2), 219-229.

Khadka, P., Ro, J., Kim, H., Kim, I., Kim, J. T., Kim, H., ... & Lee, J. (2014). Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 304-316.

Zhang, L., Wang, S., Zhang, M., & Sun, J. (2013). Nanocarriers for oral drug delivery. *Journal of Drug Targeting*, 21(6), 515-527.

Pan, Y., Li, Y. J., Zhao, H. Y., Zheng, J. M., Xu, H., Wei, G., & Hao, J. S. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International journal of pharmaceutics*, 249(1-2), 139-147.

Wang, X. Q., Dai, J. D., Chen, Z., Zhang, T., Xia, G. M., Nagai, T., & Zhang, Q. (2004). Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A-loaded pH-sensitive nanoparticles for oral administration. *Journal of controlled release*, 97(3), 421-429.

Wang, X. Q., & Zhang, Q. (2012). pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2), 219-229.

Yang, R., Gao, R., Li, F., He, H., & Tang, X. (2011). The influence of lipid characteristics on the formation, in vitro release, and in vivo absorption of protein-loaded SLN prepared by the double emulsion process. *Drug development and industrial pharmacy*, 37(2), 139-148.

Kisel, M. A., Kulik, L. N., Tsybovsky, I. S., Vlasov, A. P., Vorob'Yov, M. S., Kholodova, E. A., & Zabarovskaya, Z. V. (2001). Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *International journal of pharmaceutics*, 216(1-2), 105-114.

Iwanaga, K., Ono, S., Narioka, K., Morimoto, K., Kakemi, M., Yamashita, S., ... & Oku, N. (1997). Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: improvement of stability of insulin in GI tract. *International journal of pharmaceutics*, 157(1), 73-80.

Parmentier, J., Becker, M. M., Heintz, U., & Fricker, G. (2011). Stability of liposomes containing bioenhancers and tetraether lipids in simulated gastro-intestinal fluids. *International journal of pharmaceutics*, 405(1-2), 210-217.

Okada, J., Cohen, S., & Langer, R. S. (1998). *U.S. Patent No. 5,762,904*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Niu, M., Lu, Y., Hovgaard, L., & Wu, W. (2011). Liposomes containing glycocholate as potential oral insulin delivery systems: preparation, in vitro characterization, and improved protection against enzymatic degradation. *International journal of nanomedicine*, 6, 1155.

Gradauer, K., Dünnhaupt, S., Vonach, C., Szöllösi, H., Pali-Schöll, I., Mangge, H., ... & Prassl, R. (2013). Thiomers-coated liposomes harbor permeation enhancing and efflux pump inhibitory properties. *Journal of controlled release*, 165(3), 207-215.

Vikas, K., Arvind, S., Ashish, S., Gourav, J., & Vipasha, D. (2011). Recent Advances In Ndds (Novel Drug Delivery System) For Delivery Of Anti-Hypertensive Drugs. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(1).

Prisant, L. M., & Elliott, W. J. (2003). Drug delivery systems for treatment of systemic hypertension. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(11), 931-940.

Prisant, L. M., Bottini, B., DiPiro, J. T., & Carr, A. A. (1992). Novel drug-delivery systems for hypertension. *The American Journal of Medicine*, 93(2), S45-S55.

Hanif, M., Khan, H. U., Afzal, S., Mahmood, A., Maheen, S., Afzal, K., ... & Abbas, N. (2017). Sustained release biodegradable solid lipid microparticles: Formulation, evaluation and statistical optimization by response surface methodology. *Acta Pharmaceutica*, 67(4), 441-461.

Üstündağ-Okur, N., Yurdasiper, A., Gündoğdu, E., & Homan Gökçe, E. (2016). Modification of solid lipid nanoparticles loaded with nebivolol hydrochloride for improvement of oral bioavailability in treatment of hypertension: polyethylene glycol versus chitosan oligosaccharide lactate. *Journal of microencapsulation*, 33(1), 30-42.

3. TEKNİK BÖLÜM:

Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma ve Sonuç bölümlerinden oluşur. Sonuç bölümünün önerileri de kapsamı gerekmektedir.

3.1. Gereç ve Yöntem: Projede öngörülen iş paketleri özelinde faaliyetler ele alınmalı

3.1.1. İş Paketleri: Proje teklifinde önerilmiş olan iş paketleri sırasıyla ele alınmalı ve proje takvimi ile karşılaştırılmalı olarak gerçekleştirilen faaliyetler rapor edilmelidir. Verilen bilgilerde iş paketlerinde gerçekleştirilmiş olan faaliyetler detay olarak belirtilmelidir.

Gereçler

Nebivolol hidroklorür (NB), Sandoz Inc, Türkiye tarafından hediye edilmiştir. Disetil fosfat (DCP) ve kolesterol (Chol) Sigma, (Almanya)'dan temin edilmiştir. Pluronic F-127 BASF'tan satın alınmıştır 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) Bachem AG'den ve kitosan (9 cP) Primex (İzlanda) temin edilmiştir. 1-oktadesilamin, %98 (stearil amin, SA) Alfa Aesar GmbH&Co (ABD)'den temin edilmiştir. Kullanılan diğer kimyasallar analitik düzeydeydi.

Yöntemler

1. Lipozomların Hazırlanması

Lipozomlar film hidrasyon yöntemine göre hazırlanmıştır. Kısaca, lipozom oluşturmak için fosfolipid yapıdaki 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) ve stabilizan özellikteki kolesterol maddesinin belli oranlarda kullanılmıştır ayrıca disteillfosfat veya stearilamin ile etken madde nebivolol hidroklorür, kloroform:metanol (3:1) karışımı içinde çözündürüldükten sonra evaporasyon cihazında düşük basınç altında 175 rpm ve 53°C'de organik çözücüler uçurulmuştur. Oluşan film tabaka 8 mL, 45 °C PBS pH 7.4 ile 30 dakika boyunca 55 °C'de hidrate edilmiştir. Oluşan lipozom süspansiyonu 3 dakika boyunca vortekslenmiştir. Vorteks işleminden sonra formülasyonlar sonike edilerek boyut değişimi ölçülmüştür. Sonikasyonun ardından formülasyonlar ekstrüzyon işlemine (LipoFast LF 50, Avestin, UK) tabi tutulmuştur. 0.8 µm, 0.4 µm ve 0.2 µm'lik polikarbon filtreler kullanılarak ekstrüde edilen formülasyonların son boyut ve zeta potansiyelleri belirlenmiştir.

2. Lipozomların Kitosan ile kaplanması

Kitosan kaplı lipozomları elde edebilmek için öncesinde lipozom formülasyonları yukarıda anlatıldığı gibi negatif yüklü DCP kullanılarak elde edilmiştir. Sonrasında, %1 (v/v) asetik asit içeren çözelti hazırlanmış ve kitosan içerisinde çözündürülmüştür. Farklı molar lipid:kitosan oranlarında kitosan çözeltisi lipozom formülasyonuna manyetik karıştırıcıda damla damla ilave edilmiştir. Manyetik karıştırıcıda karıştırma işlemi 400 rpm de oda sıcaklığında 1 saat boyunca devam etmiştir ve daha sonra formülasyon inkübasyon için bir gece buzdolabında tutulmuştur.

3. Lipozomların Pluronic F-127 ile kaplanması

Pluronic F127 kaplı lipozomların eldesi için Pluronic F127 diğer tüm bileşenler ve pozitif yüklü stearil amin (SA) ile birlikte organik çözücü karışımı içerisinde çözölmüştür. Diğer tüm işlemler lipozomların hazırlanması kısmında belirtildiği gibidir.

4. Nebivolol miktar tayini

Nebivolol miktar tayini HPLC'de 220 nm dalga boyunda SPD 10A UV marka dedektör kullanılarak yapılmıştır. Ayırma, partikül boyutu 5 mm olan C18 kolonda (İntersil ODS-3 C18, 250 x 4.6 mm) gerçekleştirilmiş olup mobil faz olarak metanol:su (80:20 h/h) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk ve kolon sıcaklığı 25 °C, enjeksiyon hacmi 20 µl olarak ayarlanmıştır.

Nebivolol için stok çözeltisi 10 mg Nebivolol, 10 mL metanol'ün içinde çözülerek elde edilmiştir. Farklı konsantrasyondaki örnekler (2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL) stok çözeltisinin mobil faz ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Örnekler 0.22 µm membran filtresinden geçirilmiştir.

5. Lipozomların Karakterizasyonu

5.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli Ölçümü

Elde edilen tüm lipozom formülasyonlarının partikül boyutu ve boyut dağılımı Dinamik Işık Saçılımı (DLS) metodu ile tayin edilmiş olup zeta potansiyelleri ise elektroforetik mobilitelerinin ölçümüne dayalı yöntem ile belirlenmiştir (Malvern Zetasizer Nano-ZS, İngiltere). Her numunenin ölçümü üç kere tekrarlanmıştır.

5.2. Lipozom Formülasyonlarının Enkapsülasyon Etkiniği

Nebivolol içeren DPPC/Chol/SA, DPPC/Chol/SA+Plu ve DPPC/Chol/DCP+Chi içeren lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerinin tayini indirekt yöntemle göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre her bir lipozom dispersiyon örneğinden 1,5 mL alınarak eppendorf tüplere konulmuştur. 15000 rpm de 2 saat santrifüj edildikten sonra üstte kalan sıvı ayrılarak HPLC’de analiz edilmiştir (n=3). Lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri aşağıdaki formülasyona göre hesaplanmıştır:

$$EE (\%) = (\text{toplam neбиволol miktarı} - \text{serbest neбиволol miktarı}) / \text{toplam neбиволol miktarı} \times 100$$

5.3. Lipozom Formülasyonlarının Transmisyon Elektron Mikroskobu-TEM Görüntüleri

Polimer kaplı veya kaplı olmayan neбиволol içeren lipozom formülasyonlarının morfolojisi transmisyon elektron mikroskobunda (TEM- Jeol JEM-2100 Electron Microscope Tokyo-Japan) analiz edilmiştir. Bakır kaplı karbon gridin üstüne örnekler distile su ile dilüe edilerek konulmuştur. Sonrasında örnekler, 1 damla %2 (a/h) fosfotungustik asit konularak boyanmış olup boyanın fazlası filtre kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Son olarak da örnekler TEM altında incelenip fotoğraflanmadan önce kurutulmuştur.

6. Lipozom formülasyonlarının fiziksel stabiliteilerinin belirlenmesi

Lipozom formülasyonlarının fiziksel stabilite çalışmalarları 2-8°C’de dört hafta boyunca, farklı zaman aralıklarında boyut ve boyut dağılımı ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

7. Lipozom formülasyonlarının SGF ve SIF içinde stabiliteilerinin belirlenmesi

Lipozom formülasyonlarının gastrointestinal kanal içerisindeki stabiliteilerini ve polimer kaplamalarının koruyucu etkilerini değerlendirmek için simüle mide sıvısı (SGF, pH 1,2) ve simüle barsak sıvısı (SIF, pH 6,8) olan ortamlarda lipozom formülasyonları belli süre bekletilmiş belli zaman noktalarında boyut ölçümleri yapılmıştır (n=3).

8. Lipozom Formülasyonlarının *In Vitro* Salımları

15.000 rpm’de 2 saat santrifüj edilen neбиволol içeren lipozom dispersiyonlarından elde edilen çökeltiliye 1,5 mL fosfat tamponu (pH 6,8) ilave edilmiş olup 24 saat boyunca belli zaman noktalarında (1., 2., 4, 6., 8. ve 24. saat) 0,75 mL örnek alınıp HPLC’de analiz edilmiştir. Alınan örneğin yerine aynı hacimde fosfat tamponu (pH 6,8) konulmuştur.

9. Lipozom Formülasyonlarının Müsin ile Etkileşim Çalışması

Lipozomlar ile müsinin etkileşim çalışması Klemetsrud ve ark. (2018) yaptığı çalışma temel alınarak küçük farklarla gerçekleştirilmiştir. Kısaca, müsin (2 mg/mL) ve lipozom formülasyonları karıştırılmış ve 37 ° C’de 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında tüm karışımların absorpsiyon değerleri 550 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülmüştür. PBS (pH 6,8) şahit çözelti olarak kullanılmıştır. Müsin-lipozom etkileşiminin turbiditede oluşturduğu değişimin yanı sıra boyut ve zeta potansiyelinde yarattığı değişimler belirlenmiştir.

10. Hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında, insan beyaz ırk kolon adenokarsinomasından elde edilen Caco-2 hücre hattı kullanılmıştır. Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinoma, HTB-37) hücre dizisi Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC, USA)’den temin edildi. Caco-2 hücrelerinin devamlılığı %20 Fetal Sığır Serum (FBS) ve %1 antibiyotik içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) besiyerinde 5% CO2 inkübatörde 37°C’de sağlandı. Hücreler 104 hücre/100 µL/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikropalakalara ekildikten sonra hücrelerin tutunması için 24 saat inkübe edildi. Böylece MTT sitotoksikite testi için gerekli Caco-2 hücreleri hazırlanmış oldu.

10. Sitotoksikite çalışmaları

Hazırlanan neбиволol içeren lipozom formülasyonlarının güvenilirliğini değerlendirebilmek amacıyla Caco-2 hücre hattında sitotoksikite testi gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite testinde kullanılan bir tetrazolyum tuzu olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT), hücre içine alınır ve canlı hücreler tarafından mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile indirgenerek mor formazon kristalleri meydana getirir. MTT testi adı verilen bu yöntem ile hücre canlılığı test edilir.

Bu amaçla, hücreler hazırlanan lipozom formülasyonlarının 1/5 oranında besiyeri ile seyreltilmesiyle hazırlanan farklı konsantrasyonları ile 4 saat inkübe edildi. DMEM-F12, 30:70 su:DMEM-F12 ve 1% sodyum dodesil sülfat (SDS) sırasıyla büyüme (pozitif), solvent ve negatif kontrol olarak kullanıldı. 24 saat maruziyetin ardından kuyucuklara 20µL MTT (5 mg/mL, fosfat tamponu (PBS) içinde) eklendi ve 3 saat 37°C’de inkübe edildi. Besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve formazan kristallerinin homojen mavi-mor renk oluşturması için 100µL DMSO eklenerek 5 dakika orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Optik dansiteler 590 nm’de (670 nm referans) mikropalaka okuyuculu spektrofotometrede (Epoch) absorpsiyon değerleri okundu

ve meydana gelen % hücre canlılığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = [(A - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$$

A: 590 nm'de örneklerin absorbansı

Ab: Kuyucuk içinde hücreler olmadan besiyerine ait absorbans, arkaplan absorbansı

Ac: Pozitif kontrolün absorbansı

12. İstatistik Analizleri

Deneylerden elde edilen verilerin istatistiksel analizi ANOVA tek yönlü varyans analizi ile yapılmıştır.

3.2. Bulgular: Proje teklifinde belirtilmiş olan iş paketleri kapsamında yürütülen faaliyetler sıralaması ile elde edilen bulgular verilmelidir. Elde edilen bulgular gerekiyorsa tablo ve grafik olarak verilmelidir. Varsa istatistik sonuçlar, ara çıktıları ifade edilmelidir.

1. Lipozomların fizikokimyasal karakterizasyon çalışmalarının sonuçları

a) Polimer ile kaplanmamış lipozom formülasyonlarının optimizasyon çalışması

Lipozom oluşturmak için farklı molar oranlarda DPPC ve kolesterol konulmuştur. Ayrıca lipozom formülasyonlarının içeriğine farklı yüzey yükleri kazandıracak DCP (negatif yük) ve SA (pozitif yük) kullanılmıştır. Bu kapsamda hazırlanan lipozom formülasyonlarına ait içerik, partikül boyutu ve PDI verileri Tablo 1'de verilmiştir. NB'lu DPPC/Chol/SA lipozom formülasyonu hem tek başına bir formülasyon hem de pozitif yüklü olduğu için pluronik kaplamalı lipozom formülasyonu için kullanılmıştır. NB'lu DPPC/Chol/DCP formülasyonu ise sadece kitosan kaplamalı lipozom formülasyonunu elde etmede kullanılmıştır. Her bir ölçüm üç kez tekrarlanmıştır (n=3).

Tablo 1. Farklı lipozom formülasyonlarının içeriği ile partikül boyutu (nm±SD) ve partikül boyut dağılımı (PDI) değerleri

Formülasyon	DPPC-Chol Molar oranları	DCP mg/mL	NB mg/mL	SA mg/mL	Partikül boyutu (nm±SD)	PDI
NB'suz DPPC/Chol/DCP	3:1	1,25	-	-	161,7±1,5	0,128
DPPC/Chol/DCP	3:1	1,25	0,375	-	146,6±1,6	0,097
NB'suz DPPC/Chol/SA	3:1	-	-	0,25	188,8±1,4	0,105
DPPC/Chol/SA	3:1	-	0,375	0,25	154,1±3,4	0,104

DPPC: 1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-fosfatidilkolin; Chol: Kolesterol; DCP: Dişetil fosfat; SA: Steril amin; NB: Nebivolol; PDI: polidispersite indeksi

b) Pluronic ile kaplanan lipozom formülasyonlarının optimizasyon çalışması

Pluronic kaplı veya kaplamasız NB'lu lipozom formülasyonlarının içeriği Tablo 2'de belirtilmiştir. Tablo 3'de ise pluronic kaplı olan ve olmayan NB'lu lipozom formülasyonunun partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyel sonuçları belirtilmiştir.

Tablo 2. Pluronic F127 (Plu) kaplı olan ve olmayan NB'lu lipozom formülasyonlarının içeriği

Formülasyon	DPPC-Chol Molar oranları	NB mg/mL	SA mg/mL	Plu mg/mL
DPPC/Chol/SA	3:1	0,375	0,25	-
DPPC/Chol/SA+Plu	3:1	0,375	0,25	1,5

Tablo 3. Pluronik F127 (Plu) kaplı olan ve olmayan NB'lu lipozom formülasyonlarının hazırlandıktan sonra partikül boyutu (nm±SD), partikül boyut dağılımı (PDI) ve zeta potansiyeli (mV±SD) değerleri ile dört haftalık fiziksel stabilite değerleri (n=3)

Formülasyon	Hazırlandıktan Sonra			1. Hafta (+4°C)		4. Hafta (+4°C)	
	Partikül boyutu (nm±SD)	PDI	Zeta Potansiyel (mV±SD)	Partikül boyutu (nm±SD)	PDI	Partikül boyutu (nm±SD)	PDI
DPPC/Chol/SA	154,1±3,4	0,104	+32,8±1,3	168,5±3,0	0,106	170,8±3,4	0,118
DPPC/Chol/SA+Plu	196,9±0,7	0,237	+20,3±1,4	259,6±15,0	0,226	300,5±17,3	0,346

PDI: polidispersite indeksi

c) Kitosan Kaplı Lipozomun Hazırlanması ve Optimizasyon Çalışması

3:1 DPPC:kolesterol molar oranına sahip formülasyon kullanılarak negatif ya da pozitif yüklü formülasyonlar elde edilmiştir. Bu formülasyonların biri olan kitosan kaplı lipozomların bileşiminde kullanılan pozitif yüklü stearylamin (SA) çıkartılarak yerine disetil fosfat (DCP) eklenmiştir. Böylece, kaplamanın elektrostatik etkileşimle daha iyi yapılabilmesi için hazırlanan lipozomların bileşimi şu şekilde olmuştur:

Tablo 4. Farklı lipit:kitosan molar oranlarında hazırlanan lipozom formülasyonlarının içeriği ile boyut, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları

Formülasyon	Lipit-Kitosan m/m (kütlesel) oranı	DDPC--Chol Molar Oranları	DCP mg/mL	NB mg/mL
DPPC/Chol/DCP	1:0	3:1	0,5	0,375
DPPC/Chol/DCP + Chi-1:1	1:1	3:1	0,5	0,375
DPPC/Chol/DCP + Chi-2:1	2:1	3:1	0,5	0,375
DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1	3:1	3:1	0,5	0,375

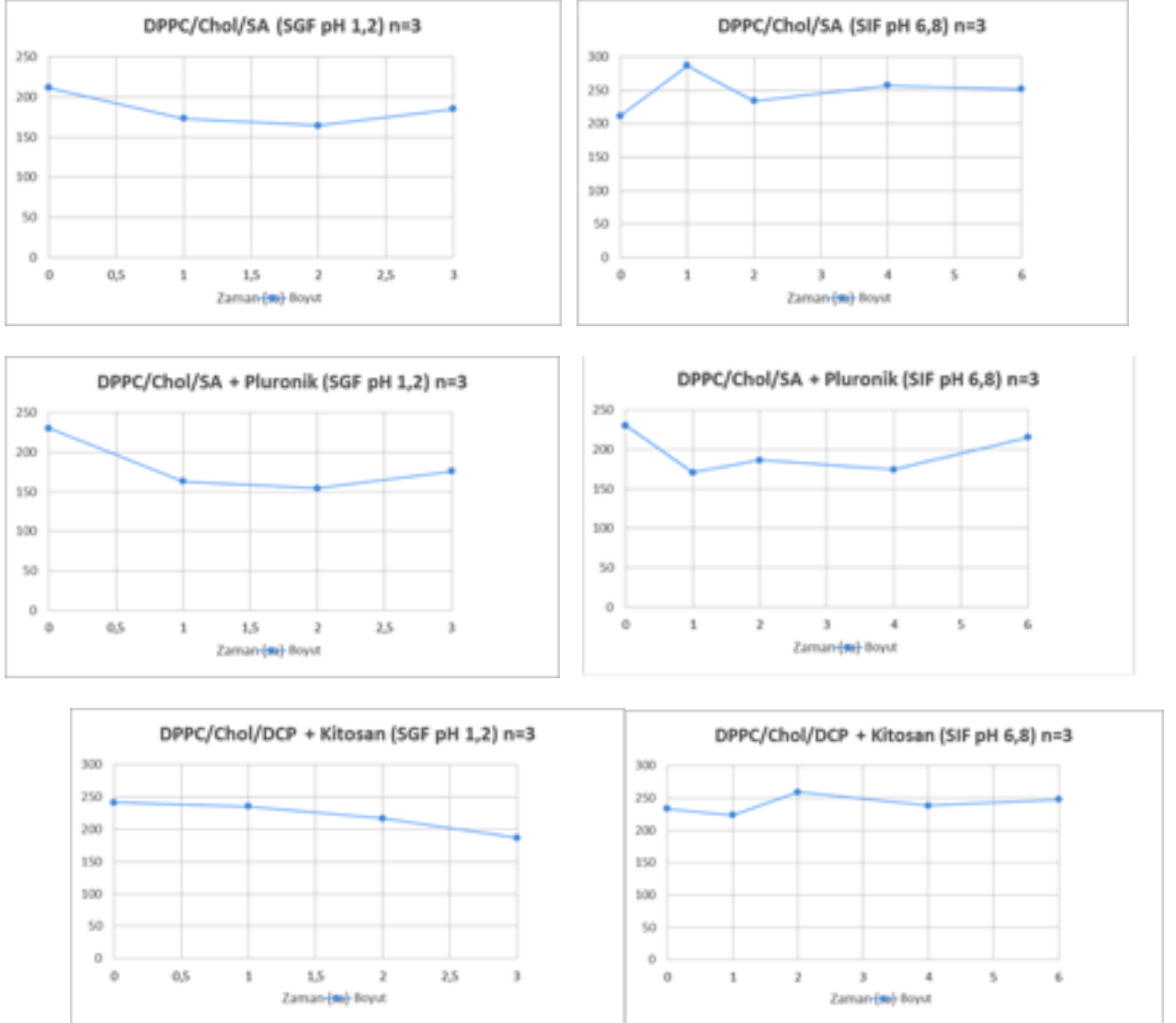
Chol: Kolesterol DPPC: 1,2-dipalmitol-sn-glycero-3-fosfatidilkolin; DCP: Disetil fosfat; SA: Steril amin; NB: Nebivolol

Tablo 5. Hazırlanan kitosan kaplı lipozom formülasyonlarının boyut, PDI ve zeta potansiyeli sonuçları ile +4 °C'de 4 haftalık fiziksel stabilite verileri (n=3)

Formülasyon	Hazırladıktan sonra			1. Hafta (+4 °C)		4. Hafta (+4 °C)	
	Partikül boyutu (nm±SD)	PDI	Zeta Potansiyel (mV±SD)	Partikül boyutu (nm±SD)	PDI	Partikül boyutu (nm±SD)	PDI
DPPC/Chol/DCP	146,6 ± 1,6	0,097	-14,6 ± 1,1	155,9 ± 1,1	0,115	194,6 ± 18,6	0,243
DPPC/Chol/DCP + Chi-1:1	241,4 ± 9,9	0,181	+43 ± 2,6	211,7 ± 4,6	0,153	306,9 ± 12,5	0,279
DPPC/Chol/DCP + Chi-2:1	246,3 ± 7,2	0,190	+42,4 ± 2,4	229,9 ± 2,4	0,253	282,5 ± 4,6	0,179
DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1	253,1 ± 5,6	0,181	+41 ± 2,7	258,5 ± 3,0	0,160	327,7 ± 6,4	0,169

d) Lipozom Formülasyonların Simüle Edilen Gastrointestinal Sıvıların (SIF ve SGF) İçindeki Stabilitesi

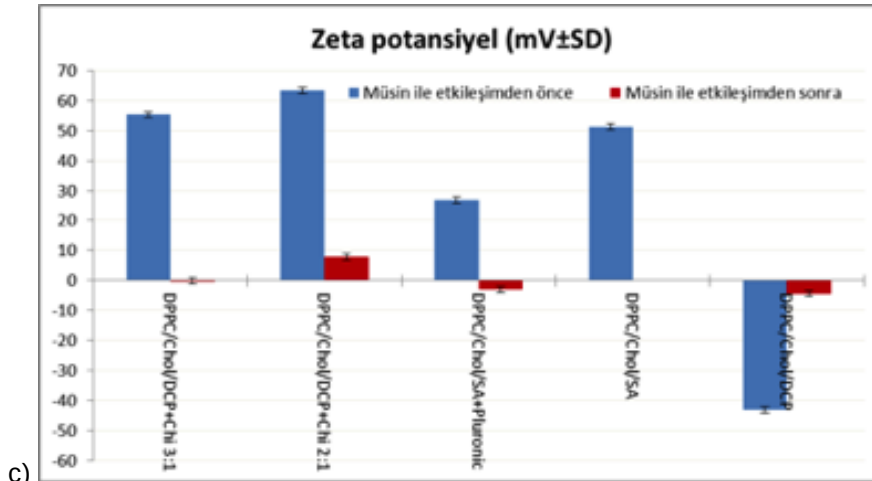
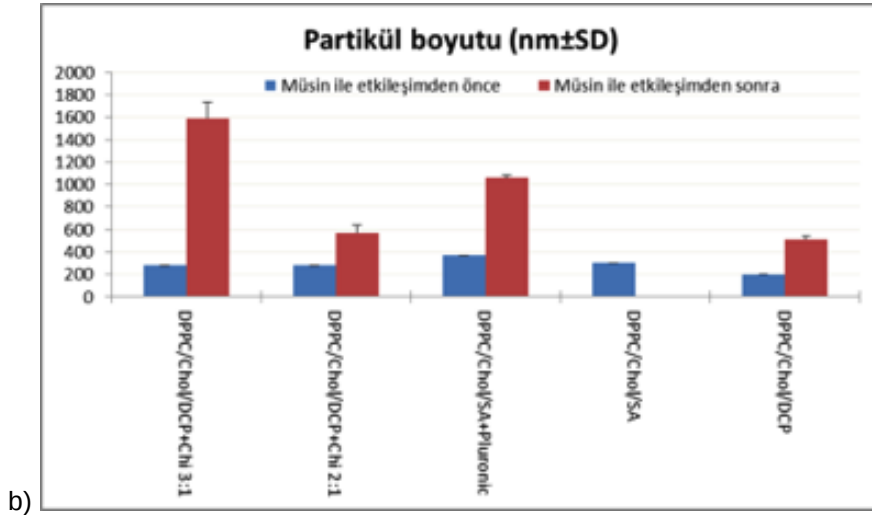
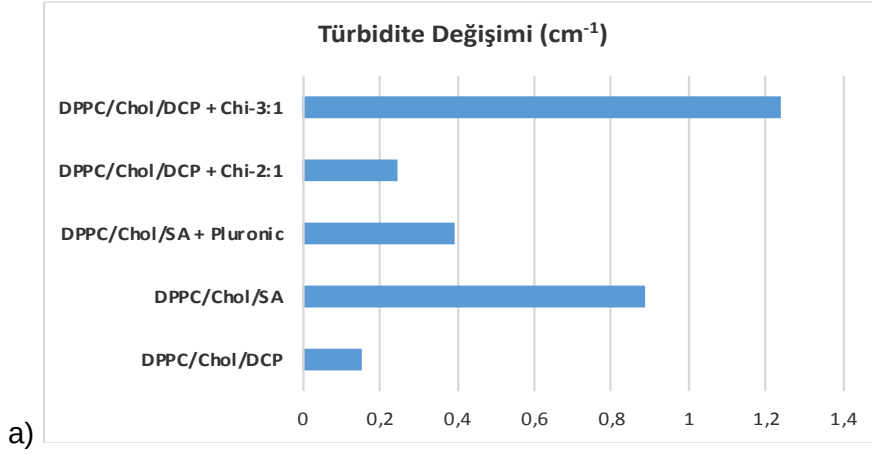
Hazırlanan lipozomların mide (simüle mide sıvısı-SGF) ve bağırsak (simüle barsak sıvısı-SIF) ortamında zamana bağlı boyut ölçümleri Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Lipozom formülasyonlarının SIF ve SGF ortamlarında zamana bağlı olarak boyut değişimleri (n=3)

2. Lipozom Formülasyonlarının Müsin ile Etkileşim Çalışması

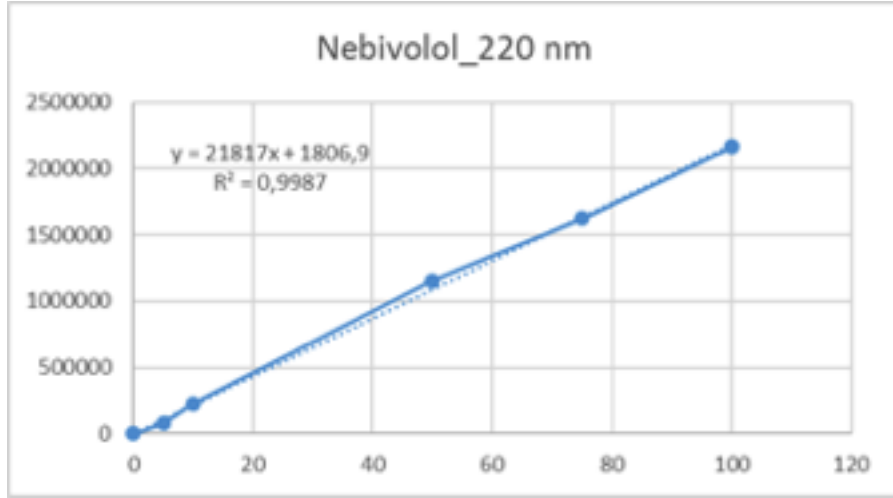
Lipozom formülasyonlarının müsin etkileşimi sonrası türbidite, partikül boyutu ve zeta potansiyel değerlendirilinde meydana getirdikleri değişiklikler Şekil 6'da yer almaktadır.



Şekil 2. Nebivolol içeren lipozom formülasyonlarında a) müsin ilavesinden sonra 550 nm'de türbidite değişimi b) partikül boyutu (nm ± SD) c) zeta potansiyel (mV ± SD) değerleri

3. Nebivolol Miktar Tayini Yöntemi

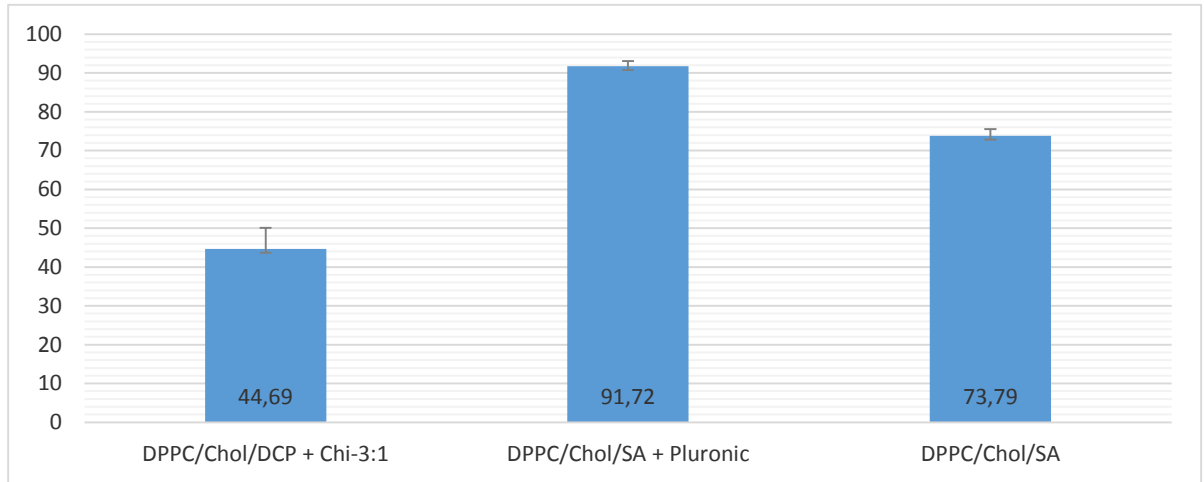
Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nebivolol çözeltisinin kalibrasyon eğrisi Şekil 2'de gösterilmiştir. Pik alanı ile nebivolol konsantrasyonları doğrusal olup korelasyon sabiti 0,9987 olarak bulunmuştur.



Şekil 3. Nebivolol hidroklorürün 220 nm'de kalibrasyon eğrisi (n=3)

4. Lipozom Formülasyonlarının Enkapsülasyon Etkinliği

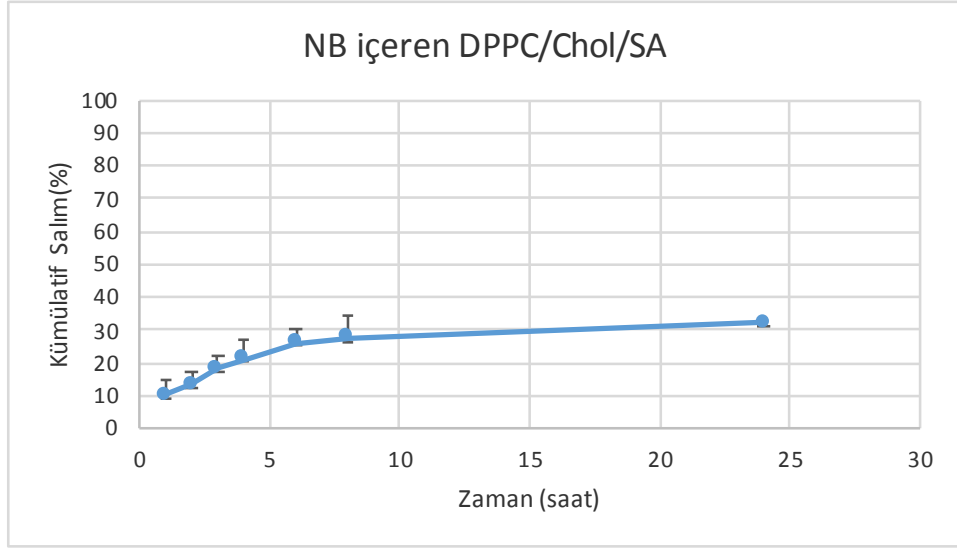
Analizi yapılan lipozom formülasyonlarının sonuçlar Şekil 3'de gösterilmiştir.



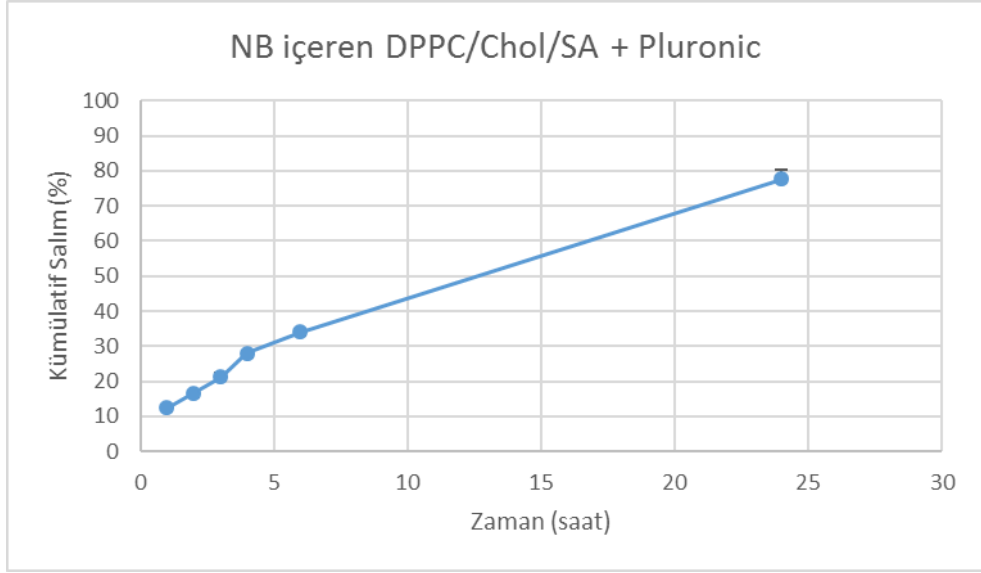
Şekil 4. Nebivolol içeren lipozom formülasyonlarının (DPPC/Chol/SA, DPPC/Chol/SA + Pluronic, DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1) enkapsülasyon etkinliği (%)

5. Lipozom Formülasyonlarının *İn Vitro* Salımları

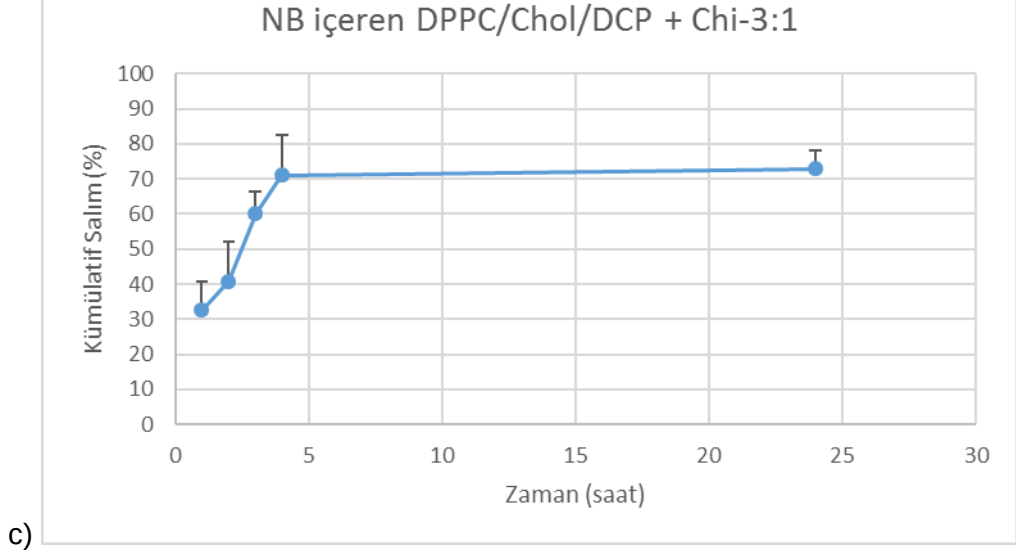
Lipozom formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmalarına ait veriler Şekil 5'te gösterilmiştir.



a)



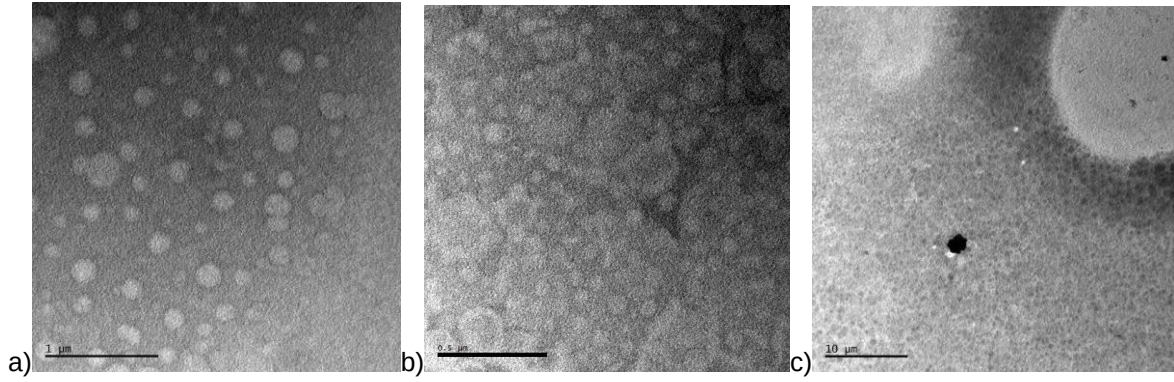
b)



Şekil 5. 37°C'de Nebivolol'un (NB) lipozom formülasyonlarından (a) DPPC/Chol/SA (b) DPPC/Chol/SA + Pluronic (c) DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 pH 6,8'de *in vitro* salımı

6. Lipozom Formülasyonlarının Transmisyon Elektron Mikroskobu-TEM Görüntüleri

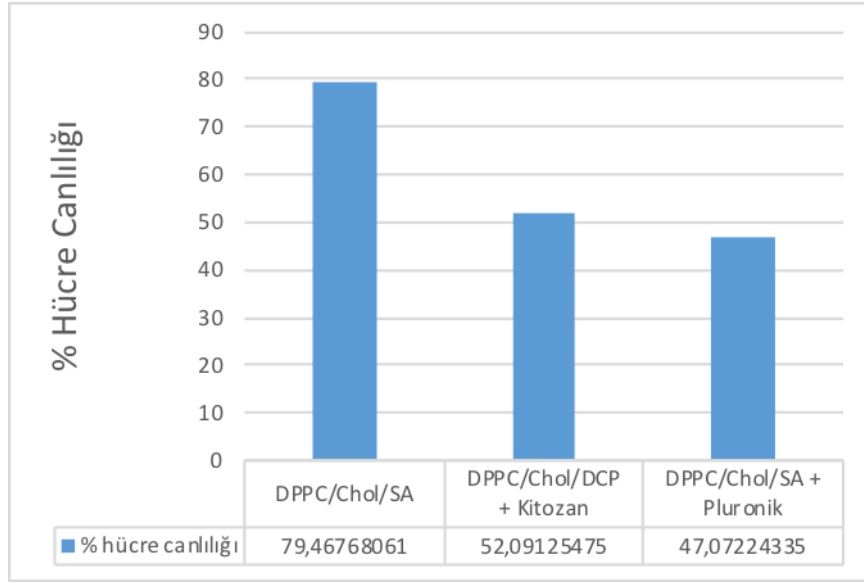
Şekil 5'te hazırlanan farklı lipozom formülasyonlarına Ait TEM görüntüleri görülmektedir.



Şekil 6. Nebivolol içeren a) DPPC/Chol/DCP + Chi-2:1 b) DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 ve c) DPPC/Chol/SA + Pluronic lipozom formülasyonlarının TEM görüntüleri

7. Hücre Kültürü ve MTT Sitotoksikite Çalışmaları

Şekil 7'de Lipozom formülasyonlarının Caco-2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi gösterilmiştir.



Şekil 7. Lipozom formülasyonlarının Caco-2 hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

3.3. Tartışma ve Sonuç: Projede elde edilen bulgular ve değerlendirmeleri sonucunda bir hüküm oluşturulmalı ve literatür verileri ile karşılaştırılmalıdır. Proje kapsamında varsa yöntemde gerekli görülen veya gerçekleştirilen değişiklikler gerekçeleri ile beraber bu bölümde ifade edilmeli ve sonucunda hedeflenen noktaya ulaşıp ulaşılmadığı hükmüne bağlanmalıdır.

Oral yoldan ilaç uygulanması en yüksek hasta uyuncu gösteren ilaç uygulama yolu olarak kabul edilmektedir. Fakat suda düşük çözünürlük gibi ilaca bağlı fizikokimyasal özellikler, dozaj formunun özellikleri ve GI sistemdeki fizyolojik bariyerler ilaçların biyoyararlanımı etkilemektedir (Mrsny, 2012). Yüksek biyoyararlanım elde edilmesi için ilaç gastrointestinal sistemde önce çözünmesi sonra çeşitli fizyolojik/biyolojik bariyerlerden geçmesi, asidik mide ortamında stabil kalması, epitel hücreleri kaplayan mukus tabakasından geçebilmesi gerekmektedir (Amidon ve ark., 1995; Dahan ve ark., 2009). Nanoteknolojik yaklaşımlarının kullanılması gastrointestinal sistemden emilimi arttırmak için umut verici fırsatlar sunmaktadır.

Lipit tabakalardan oluşan lipozomların kullanımı ile ilaçların bağırsak enzimlerinden korunduğu gösterilmiştir (Kisel ve ark., 2001). Bu yüzden, bu çalışmada düşük biyoyararlanım gösteren antihipertansif bir ilaç olan nebivololün kana geçişini arttırmak amacıyla lipozom formülasyonları hazırlanmış ve yüzeyleri mukoadhezif özelliği gösteren Pluronik F127 veya kitosan ile kaplanmıştır. Nebivolol yüklü lipozomların yüzeyi kitosan ve Pluronik F127 ile modifiye edilerek ilacın GI sistemdeki fizyolojik şartlardan korunması, mukus tabakasından penetrasyonunun ve kontrollü salımı sağlanarak biyoyararlanımının artırılması amaçlanmıştır. Lipozom formülasyonları farklı molar oranlarda DPPC ve kolesterol ve farklı yüzey yükleri kazandıracak DCP (negatif yük) ve SA (pozitif yük) kullanılarak hazırlanmıştır. Tablo 1.'de verilen nebivolol içeren ve içermeyen DPPC/Chol/SA ve DPPC/Chol/DCP olarak adlandırılan bu lipozom formülasyonlarının partikül boyutu ve PDI değerleri 146,6±1,6 ile 188,8±1,4 nm arasında olup partikül boyutu dağılımı, polidispersite ise 0,097 ile 0,128 arasında ölçülmüştür. Mukoadhezif polimer ile kaplanan formülasyonların fizikokimyasal özellikleri incelendiğinde Tablo 3'de görüldüğü üzere DPPC/Chol/SA+Plu (196,9±0,7 nm; PDI:0,237; +20,3±1,4 mV) DPPC/Chol/SA'e (154,1±3,4 nm; PDI:0,104; +32,8±1,3 mV) göre non-iyonik kopolimer sürfaktanı olan pluronik F-127 ile kaplanması nedeniyle daha yüksek partikül boyutu ve PDI ile daha düşük zeta potansiyeli göstermiştir. Lipozomların kaplanması onların fizikokimyasal özelliklerini etkilemektedir (Chen ve ark. 2013). Fiziksel stabilite çalışmasında, DPPC/Chol/SA+Plu partikül boyutu zaman içinde artış göstermesine rağmen agregasyon gözlenmemiştir. Bununla beraber, DPPC/Chol/SA'nin partikül boyutu dört hafta boyunca incelendiğinde çok az bir değişim göstermiştir.

Tablo 4'de verilen değerlerde hazırlanan lipozomlara ait boyut, PDI ve zeta potansiyeli değerleri

bulunmuş olup Tablo 5'de belirtilmiştir. DCP içeren lipozomlarla hazırlanan kitosan kaplı formülasyonların boyut ve PDI değerleri kaplamadan önceki değer ile karşılaştırıldığında artış göstermiştir. Zeta potansiyeli ise pozitif yüklü kitosan polimeri ile kaplama sonucunda eksi yükten artı yüke değişim göstermiştir. Bununla beraber koloidal stabilite açısından önem verilen $\geq \pm 30$ mV limitleri içinde zeta potansiyellerine sahip kitosan kaplı lipozom formülasyonları elde edilmiştir. Ayrıca, hazırlanan farklı kitosan formülasyonlarının belli süre bekletildiklerinde (+4 °C saklama koşulunda) stabil kalıp kalmadıklarını incelemek amacıyla belli zaman aralıklarında 1. hafta ve 4. hafta partikül boyutu ve PDI ölçümü alınmıştır (Tablo 5) (n=3). Sonuçlar incelendiğinde Chi-2:1 lipozom formülasyonu zamana bağlı olarak diğer kitosan kaplı lipozom formülasyonlarına göre hem boyut hem de zeta potansiyeli değerleri açısından daha az değişim göstermiş olmakla beraber tüm formülasyonlarda dört hafta boyunca agregasyon gözlenmemiş olup stabiliteyi korumuştur.

Simüle gastrointestinal sıvıların içinde lipozom formülasyonlarının partikül boyutu çok az bir değişim göstermiş olmakla beraber formülasyonlarda agregasyon gözlenmemiştir. Bu durum göstermektedir ki lipozom formülasyonları stabiliteyi üç saat boyunca her iki ortamda da (SGF pH:1,2 ve SIF pH:6,8) koruyabilmiş olup simüle edici gastrointestinal sıvıların lipozom formülasyonlarının yapısı üzerine yıkıcı bir etkisi yoktur.

Nebivolol içeren DPPC/Chol/SA, DPPC/Chol/SA + Pluronic ve DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 lipozom formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği sırayla 73,79%, 91,72% ve 44,69 % olarak hesaplanmıştır (Şekil 4). Literatürdeki çalışmalara baktığımızda, enkapsülasyon etkinliğinin formülasyonda kullanılan maddeler ve ilacın özelliklerine bağlı olarak değiştiğini görmekteyiz (Nii ve Ishii 2005).

Lipozom formülasyonlarının *in vitro* salım çalışmasından elde edilen sonuçlara göre 24. saatin sonunda DPPC/Chol/SA + Pluronic ve DPPC/Chol/DCP + Chi-3:1 formülasyonlarında %70'ten fazla etkin madde salımı gözlemlenmiştir (Şekil 5). Chen ve ark. (2013) Pluronic 127 veya kitosan içeren lipozom formülasyonlarından ilaç etkin madde salım profillerini incelediklerinde 24 saat sonunda ilaç salımı üzerinde polimer etkisinin az olduğunu rapor etmiştir.

Hazırlanan lipozom formülasyonlarının TEM kullanılarak yapılan şekilleri üzerindeki yüzölçümü çalışmaları (Şekil 6) küresel yapılardan oluştuğu ortaya konulmuştur.

Şekil 7'de görüldüğü üzere formülasyonlar arasında en düşük hücre canlılığını pluronik kaplı lipozom formülasyonu göstermiştir. Bu durumun nedeni pluronik maddesinin non iyonik sürfaktan yapısından olmasından kaynaklandığı ve hücre membran yapısına zar vermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Tagami ve ark. 2015). Formülasyonlar içerisinde en düşük % hücre canlılığına sahip olmasına rağmen %50 civarında bir değer göstermektedir. Kitosan ise genelde toksik etki göstermeyen, biyoyumlu ve biyoparçalanır bir polimer olarak bilinmektedir. Doza bağımlı ve modifikasyonlarına bağlı olarak toksisite gösterebilmektedir (Klemetsrud ve ark. 2018). Sonuçlara bakıldığında hücrelerin %50 sinden fazlasının hayatta kaldığı gözlenmiştir. Stearil amin içeren lipozomlarda ise en yüksek hücre canlılığı oranı elde edilmiş olup Caco-2 hücre hattı üzerine ihmal edilebilir bir sitotoksiteye sahip olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*, 12(3), 413-420.

Chen, D., Xia, D., Li, X., Zhu, Q., Yu, H., Zhu, C., & Gan, Y. (2013). Comparative study of Pluronic® F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats. *International journal of pharmaceutics*, 449(1-2), 1-9.

Dahan, A., Miller, J. M., & Amidon, G. L. (2009). Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *The AAPS journal*, 11(4), 740-746.

Kisel, M. A., Kulik, L. N., Tsybovsky, I. S., Vlasov, A. P., Vorob'Yov, M. S., Kholodova, E. A., & Zabarovskaya, Z. V. (2001). Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *International journal of pharmaceutics*, 216(1-2), 105-114.

Klemetsrud, T., Kjøniksen, A. L., Hiorth, M., Jacobsen, J., & Smistad, G. (2018). Polymer coated liposomes for use in the oral cavity—a study of the in vitro toxicity, effect on cell permeability and interaction with mucin. *Journal of liposome research*, 28(1), 62-73.

Mrsny, R. J. (2012). Oral drug delivery research in Europe. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 247-253.

Nii, T., & Ishii, F. (2005). Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. *International journal of pharmaceutics*, 298(1), 198-205.

Tagami, T., Kubota, M., & Ozeki, T. (2015). Effective remote loading of doxorubicin into DPPC/poloxamer 188 hybrid liposome to retain thermosensitive property and the assessment of carrier-based acute cytotoxicity for pulmonary administration. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(11), 3824-3832.

3.4. Yapılan Bilimsel Etkinlikler: Proje kapsamında bilimsel toplantı, tanıtım ve eğitim toplantıları düzenlenmiş ise bu bölümde takvimlendirerek sıralı bir şekilde verilmeli ve katılımcılar hakkında bilgi verilmelidir.

--

3.5. Darboğazlar ve çözüm önerileri: Takvim ve iş paketleri kapsamında karşılaşılan (varsa) olumsuzlukları ve/veya riskler ifade edilmeli, bu darboğazları gidermek için alınan önlemler ve gerçekleştirilen faaliyetler bu bölümde belirtilmelidir.

--

3.6. İş-Zaman Çizelgesi: Proje önerisinde oluşturulmuş olan iş zaman çizelgesi ele alınarak her bir iş paketinin tamamlama ve hedefe ulaşma durumları grafik olarak belirtilmelidir.

İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ

İş Paketi Adı/Tanımı	Projenin Dönem ve Ayları																							
	1. 6 aylık dönem						2. 6 aylık dönem						3. 6 aylık dönem						4. 6 aylık dönem					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
İş paketi 1: Malzemelerin temini	x	x	x																					
İş paketi 2: Lipozomların hazırlaması ve ilgili polimerlerle kaplanması			x	x	x	x	x	x																
İş paketi 3: Nebivolol Miktar tayini		x	x	x	x																			
İş paketi 4: Lipozomların karakterizasyon çalışmaları					x	x	x	x	x	x														
İş paketi 5: Lipozomların farklı ortamlardaki stabilitelerinin belirlenmesi									x	x	x	x												
İş paketi 6: İn vitro ilaç salım çalışmaları ve lipozomların mukoadesyon özelliklerinin belirlenmesi													x	x	x	x	x							
İş paketi 7: Hücre kültürü ve sitotoksosite çalışmaları														x	x	x	x	x						
İş paketi 8: İstatistiksel analizlerin yapılması																		x	x					

NOT: Tablodaki satırlar iş paketi sayısına ve ihtiyaca göre azaltılıp çoğaltılabilir. İş paketlerinin tamamlandığı ayları belirlemek için ayların karşılığına gelen gözleri koyu gri ile doldurunuz.

3.7. Proje Tamamlanma Tabloları: İş paketlerinde gerçekleştirilen faaliyetler göz önünde bulundurularak ilerleme tablosu oluşturulmalıdır. Bunun için genel değerlendirmede iş paketlerinin ne kadarının tamamlandığını ifade etmek için %... şeklinde tamamlandı şeklinde sayısal ifade kullanılmalıdır. İş paketlerinin hedefe ulaşma durumları irdelenmelidir.

İş Paketleri	Gerçekleşme oranı
İş paketi 1: Malzemelerin temini	%100
İş paketi 2: Lipozomların hazırlaması ve ilgili polimerlerle kaplanması	%100
İş paketi 3: Nebivolol Miktar tayini	%100
İş paketi 4: Lipozomların karakterizasyon çalışmaları	%100
İş paketi 5: Lipozomların farklı ortamlardaki stabilitelerinin belirlenmesi	%100
İş paketi 6: <i>In vitro</i> ilaç salım çalışmaları ve lipozomların mukoadezyon özelliklerinin belirlenmesi	%100
İş paketi 7: Hücre kültürü ve sitotoksite çalışmaları	%100
İş paketi 8: İstatiksel analizlerin yapılması	%100

3.8. Çalışma Planı Değişiklikleri: Proje Çalışma Takvimine Uygun Yürütülememişse veya iptal edilmiş, değişiklik yapılmış olan iş paketleri varsa Gerekçeleri ve yapılan değişikliklerin hedefine ulaşip ulaşmadığı iş paketleri bazında gerekçeleri açıklanmalıdır.

Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı mekan ve kullanılan inkübatörde meydana gelen kontaminasyon nedeni ile bu çalışmanın tamamlanması ve projenin kapatılabilmesi için ek süreye ihtiyaç duyulmuş ve proje uzatma almıştır. Kontaminasyon problemi giderildikten sonra iş paketi 7 kapsamında yer alan hücre kültürü ve sitotoksite çalışmaları tamamlanmıştır.

4. İDARİ BÖLÜM

4.1. Gelişme Dönem İçindeki Proje Yönetimi ile İlgili Gelişmeler, Risklerin Değerlendirilmesi ve Çözüm Önerileri: Proje kapsamında faaliyetlerin yürütülmesi sırasında idari olarak karşılaşılan sorunlar ele alınmalıdır. Proje işleyişi ile ilgili veya malzeme temininde yaşanan sıkıntılar ve nedenleri konusu bu bölümde ele alınmalıdır. Karşılaşılan problemler özelinde varsa çözüm önerileri ifade edilmelidir.

4.2. Personel Değişiklik Tablosu: Yürütücü değişikliği, yardımcı araştırmacı değişikliği veya eklenmesi gerekçeleri ile belirtilmelidir.

PROJE PERSONELİ DEĞİŞİKLİK TABLOSU					
T.C. Kimlik No.	Adı, Soyadı	Katılma Tarihi	Ayrılış Tarihi	Projedeki Görevi	Ayrılma/Katılma Nedeni

4.3. Proje ek süre ihtiyacının belirlenmesi: Proje işleyişi sırasında çıkan aksaklıklara bağlı olarak alınan ek süre ve gerekçeleri ayrıntılı olarak bu bölümde ifade edilmelidir. Hedefe ulaşmada katkısı vurgulanmalıdır.

Birinci 6 aylık ek süre talebi: Hücre kültürü çalışmalarının yapıldığı mekan ve kullanılan inkübatörde meydana gelen kontaminasyon nedeni ile bu çalışmanın tamamlanması ve projenin kapatılabilmesi için ek süreye ihtiyaç duyulmuş ve proje uzatma almıştır. Kontaminasyon problemi giderildikten sonra iş paketi 7 kapsamında yer alan hücre kültürü ve sitotoksosite çalışmaları tamamlanmıştır. İkinci 6 aylık ek süre talebi bazı *in vitro* çalışmaların tekrarlanması gerekliliğinden (*in vitro* salım ve enkapsülasyon etkinliği çalışmaları) ek süre talebinde bulunulmuş. Sonrasında bu testler başarı ile tamamlanmıştır.

5. MALİ BÖLÜM

5.1. Bütçe: Projede yapılan harcamalar ve bütçe durumu bu bölümde ele alınmalı ve bütçenin son hali tablo şeklinde verilmelidir.

Harcama Kalemi	Öngörölmüş Maliyet	Gerçekleşen Harcama	Kalan Bütçe
Demirbaş	6.130,78	8.263,41	-2.132,63
Bilgisayar ve Bilgisayar Parçası alımları			
Tüketime Yönelik Malzeme	23.868,98	21.589,24	+2.279,74
Kırtasiye Alımları ve Fotokopi			
Yolluk Yevmiye	10.000,00	0	+ 10,000,00
Hizmet Alımı			
Bakım Onarım			
Canlı Hayvan ve Yem Alımı			

5.2. Harcan(a)mayan Kalemlere İlişkin Açıklamalar: Projede öngörölmüş ama gerçekleşmemiş harcamaların neden gerçekleştirilemediği konusunda bilgi verilmelidir.

2020/1 no'lu toplantı sonucunda 23-03-2020 tarihinde Avusturya-Vienna da gerçekleşmesi planlanan 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology kongresine, "Preparation and Characterization of Nebivolol Loaded Pluronic F-127 Coated Liposomes for Oral Drug Delivery" başlıkla sunmayı planladığım poster ile katılım desteği talebinin 9.000,00 TL ile desteklenmesine oy birliği ile karar verilmiş olmasına rağmen Covid-19 salgını nedeni ile kongre iptal edilmiştir. Bu nedenle de katılım desteğini kullanabilmem mümkün olmamıştır.

5.4. Harcamalara İlişkin Zorluklar: Harcamalarda karşılaşılan sorunlar ve nedenleri ifade edilmeli ve varsa çözüm önerileri belirtilmelidir.

--

6. PROJE ÇIKTILARI ve EKLER

6.1 Dönem İçinde Yayımlanan ve Toplantılarda Sunulan Yayınlar/Bildiriler: Proje faaliyetleri sırasında yapılmış makale, kongre bildirisi, teknik rapor, patent başvurusu gibi ara çıktılar belirtilmeli ve künyeleri ile hem akademik veri yönetim sistemine proje atıf edilerek işlenmeli hem de bu bölümde listelenmelidir. Yapılmış makalelere alınmış atıflar var ise bu bölümde bunlar da gösterilmelidir.

Poster Sunumu: Çevikelli T, Turan A, Sessevmez M, Sinani G. Formulation and optimization of polymer coated liposomal carriers for the delivery of nebivolol, 19 th International Pharmaceutical Technology Symposium, Antalya-Türkiye, 17-19 Eylül 2018.
