T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KOMBİNE ANTİRETROVİRAL İLAÇ İÇEREN VAJİNAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

SİNEM SAAR

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2024


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

KOMBİNE ANTİRETROVİRAL İLAÇ İÇEREN VAJİNAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Sinem SAAR

DOKTORA TEZİ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2024

ETİK BEYAN

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

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

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

Sinem SAAR
10/07/2024

KOMBİNE ANTİRETROVİRAL İLAÇ İÇEREN VAJİNAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO – İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Sinem SAAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2024

ÖZET

Tez çalışmasının amacı HIV/AIDS profilaksisi ve tedavisinde kullanılmak üzere kombine antiretroviral ilaçlar olan Tenofovir Disoproksil Fumarat (TDF) ve emtrisitabin (FTC) içeren, kontrollü salım yapan, mukoadezif özellikte ve vajinal uygulama için uygun mekanik özelliklere sahip vajinal nanolif formülasyonlarının geliştirilmesi, in-vitro, ex-vivo ve in-vivo değerlendirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda nanolif formülasyonların çözelti karakterizasyon çalışmaları viskozite, yüzey gerilimi ve iletkenlik değerleri incelenmiş ve elektroçekim yöntemi ile nanolifler ve tabakalı nanolifler başarılı bir şekilde üretilmiştir. Hazırlanan nanoliflerin diferansiyel taramalı kalorimetre, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi ve X-ışını kırınımı analizleri sonucunda formülasyon bileşenleri arasında geçimsizlik olmadığı tespit edilmiştir. Nanoliflerin morfolojik özellikleri SEM ile incelenmiş ve lif yapıları homojen, boncuksuz ve poröz bir yapıdadır. Nanolifler etkin maddelerin yükleme etkinliği %71-101 arasında bulunmuştur. Gerilme direnci ve kopma uzaması gibi özellikleri incelenen nanoliflerin vajinal uygulama için uygun mekanik yapıda olduğu gözlenmiştir. Nanoliflerin hidrofilik özellikleri destekleyecek şekilde temas açıları 90°'den küçük bulunmuştur. BET analizi ile spesifik yüzey alanı belirlenmiştir. Mukoadezif özellikleri incelenen nanolifler arasında en iyi üç formülasyon belirlenmiştir. Franz difüzyon hücrelerinde yapılan in-vitro permeabilite çalışmalarında kontrollü salım özelliği en iyi olan formülasyonların tabakalı nanolifler olduğu belirlenmiştir. İn-vitro değerlendirmeler sonucunda vajinal uygulama için özellikleri en uygun olan üç nanolif formülasyonunda USP sepet yöntemi ile in-vitro salım çalışması, ex-vivo permeabilite çalışması ve ex-vivo alıkonma çalışmaları yapılmıştır. İn-vivo çalışmalar ile kombine etkin madde içeren nanoliflerin Yeni Zelanda tipi dişi tavşanlara vajinal uygulama sonrasında farmakokinetik parametreler hesaplanarak, biyokimyasal ve histolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Bu tez çalışmasında HIV'in vajinal yoldan bulaşını önlemek için lokal olarak kullanılan etkili ve güvenilir bir ilaç formülasyonu geliştirme yolunda potansiyele sahip nanolif formülasyonları geliştirilmiştir.

Bilim Kodu : 1020
Anahtar Kelimeler : HIV, AIDS, Tenofovir Disproksil Fumarat, Emtrisitabin, Nanolif, Vajinal ilaç sistemleri
Sayfa Adedi : 366
Danışman : Prof. Dr. Fatma Nur TUĞCU DEMİRÖZ

DEVELOPMENT AND IN VITRO – IN VIVO EVALUATION OF VAGINAL FORMULATIONS CONTAINING COMBINED ANTIRETROVIRAL DRUGS

(Ph. D. Thesis)

Sinem SAAR

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2024

ABSTRACT

The aim of the thesis study is to develop controlled-release vaginal nanofiber formulations containing combined antiretroviral drugs Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) and emtricitabine (FTC) for use in HIV/AIDS prophylaxis and treatment, with mucoadhesive properties and mechanical properties suitable for vaginal application, in-vitro, ex-vivo and in-vivo evaluation. For this purpose, solution characterization studies of nanofiber formulations examined viscosity, surface tension and conductivity values, and nanofibers and layered nanofibers were successfully produced by electrospinning method. As a result of differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectrometry and X-ray diffraction analyzes of the prepared nanofibers, it was determined that there was no incompatibility between the formulation components. The morphological properties of the nanofibers were examined by SEM and the fiber structures appeared homogeneous, bead-free and porous. The loading efficiency of active substances in nanofibers was found to be between 71-101%. It was observed that the nanofibers, whose tensile strength and elongation at break were examined, had a mechanical structure suitable for vaginal application. Contact angles of the nanofibers were found to be smaller than 90°, which would support the hydrophilic properties. Specific surface area was determined by BET analysis. Among the nanofibers whose mucoadhesive properties were examined, the three optimum formulations were determined. In in vitro permeability studies conducted with Franz diffusion cells, it was determined that the formulations with controlled release properties were layered nanofibers. As a result of in-vitro evaluations, in-vitro release study, ex-vivo permeability study and ex-vivo retention studies were carried out with the USP basket method on the optimum nanofiber formulations with the most suitable properties for vaginal application. Pharmacokinetic parameters were determined by applying nanofibers to New Zealand type female rabbits, biochemical and histological evaluations were carried out. In this thesis, it was concluded that TDF and FTC loaded nanofibers produced by electrospinning method are an effective and safe drug formulation used locally to prevent vaginal transmission of HIV.

Science Code	:	1020
Key Words	:	HIV, AIDS, Tenofovir Disproksil Fumarat, Emtricitabine, Nanofiber, Vaginal drug delivery
Page Number	:	366
Supervisor	:	Prof. Dr. Fatma Nur TUĞCU DEMİRÖZ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her konuda yol gösteren, yardımları ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, ilgisini, desteğini, sabrını ve deneyimlerini asla esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Fatma Nur TUĞCU DEMİRÖZ'e, fikirleri ve duruşuyla örnek aldığım, geleceğime önemli dokunuşlar yapan çok sevdiğim değerli hocam Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK'e, tez izleme komitemde yer alarak bilimsel katkılarıyla tezime yön veren değerli hocalarım Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ ve Prof. Dr. Erem BİLENSOY'a, tez dönemi boyunca her türlü yardımıma koşan tanıdığım en harika insanlardan biri olan Doç. Dr. Serdar TORT'a, doktora eğitimime katkıları için başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Sevgi TAKKA olmak üzere çok değerli hocalarım Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN, Prof. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER, Prof. Dr. Tuba İNCEÇAYIR, Doç. Dr. Başaran MUTLU AĞARDAN, Dr. Öğr. Üyesi Tahir Emre YALÇIN ve Dr. Öğr. Üyesi Duygu YILMAZ USTA'ya, dostlukları ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Burcu TİMUR ve Arş. Gör. Ceren YETGİN'e, çok sevdiğim canım oda arkadaşım Arş. Gör Şeyma EDİSAN'a, canım arkadaşlarım Av. Büşra KÜÇÜKTAŞ ve Av. Büşra BOZBIYIK'a, destekleri ile her zaman yanımda olan arkadaşlarım Uzm. Ecz. Zehra DİK, Uzm. Ecz. Güler KESKİN, Dr. Kadir KESKİN, Dr. Ecz. Özlem KRAL, laboratuvarda çalışmayı keyifli hale getiren hocalarım Dr. Ecz. Mehmet BİRER ve Dr. Ecz. Yasin TURANLI'ya, beraber çalışmaktan her zaman mutlu olduğum Arş. Gör. Emre TUNÇEL ve Arş. Gör. Adnan Altuğ KARA'ya, doktoraya birlikte başladığım arkadaşlarım Arş. Gör. Ayşegül YILDIZ ve Arş. Gör. Seval OLĞAÇ'a, çalışmalarıma her zaman yardımları ile destek olan Ecz. Aysel YILMAZ, Arş. Gör. İlayda BİÇİCİ başta olmak üzere bölümdeki tüm arkadaşlarıma, bölüm sekreterimiz Fatma ÇELİK'e, in vivo çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ayşe DEMİREL'e, HPLC çalışmalarına katkı sağlayan Öğr. Gör. Ayhan AYSAL'a, biyokimyasal analizlerimde tecrübelerinden yararlandığım Prof. Dr. Şule ÇOŞKUN CEVHER'e, histoloji çalışmalarında yardımcı olan Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN'a ve çalışmamızı 02/2020-17 kodlu BAP projesi ile destekleyen üniversiteme çok teşekkür ediyorum.

Tüm hayatım boyunca desteklerini yanımda hissettiğim, varlıklarından ve yanımda olmalarından güç aldığım canım annem Hatice SAAR'a ve canım babam Ali SAAR'a, canım kardeşlerim Arif Samet SAAR ve Abdullah SAAR ile eşi Havva SAAR'a, canım babannem/dedem Fatma-Abdullah SAAR'a ve canım annennem/dedem Vahide-Mustafa KILIÇASLAN'a ve çok sevdiğim canım kedim PAŞA'ya herşey için çok çok çok teşekkür ederim. Sizleri çok seviyorum. Herşey için minnettarım. İyi ki varsınız…

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ xv

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xxi

RESİMLERİN LİSTESİ xxix

SİMGELER VE KISALTMALAR xxxi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Vajinanın Yapısal Özellikleri 3

2.1.1. Anatomisi ve fizyolojik özellikleri 3

2.1.2. Vajinal sıvı ve servikal mukus 4

2.1.3. Vajinal flora ve pH 5

2.1.4. Vajinal mukoadezyon 6

2.2. Vajinal İlaç Uygulaması 9

2.2.1. Vajinal uygulanan ilaçların farmakolojik grupları 9

2.2.2. Vajinal ilaç absorpsiyonu 11

2.2.3. Vajinal ilaç verilişinin avantajları ve dezavantajları 12

2.2.4. Vajinal ürünlerin kabul edilebilirliği 14

2.3. Cinsel Yolla Bulaşan Enfeksiyonlar (CYBE) 15

2.3.1. İnsan immun yetmezlik virüsü (HIV) 17

2.4. Vajinal Uygulanan İlaç Şekilleri 36

2.4.1. Vajinal yarı katı sistemler 37

Sayfa

2.4.2. Vajinal supozituvarlar/pesariler/ovüller/globüller 38
2.4.3. Vajinal filmler 38
2.4.4. Vajinal tabletler 39
2.4.5. Vajinal halkalar 39
2.4.6. 3D baskı ilaç şekilleri 39
2.4.7. Nano ilaç taşıyıcı sistemler 41
2.5. Nanolif İlaç Taşıyıcı Sistemler 43
2.5.1. Nanolif üretim yöntemleri 45
2.5.2. Elektroçekim yöntemi 45
2.5.3. Elektroçekim yöntemine etki eden parametreler 54
2.5.4. Elektroçekim yönteminde scale-up 57
2.5.5. Nanolif formülasyonlarının karakterizasyon 58
2.5.6. Nanoliflerin vajinal kullanımları 59
2.5.7. Nanoliflerin diğer kullanım alanları 60
2.6. Kullanılan Polimerlerin Özellikleri 63
2.7. Kullanılan Etken Maddelerin Özellikleri 65
2.7.1. Tenofovir disoproksil fumarat (TDF) 66
2.7.2. Emtrisitabin (FTC) 69
3. GEREÇ VE YÖNTEM 75
3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler 76
3.1.1. Kullanılan cihazlar 76
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler 77
3.1.3. Kullanılan yazılımlar 78
3.1.4. Kullanılan çözeltiler 78
3.2. Etkin Maddelerin Karakterizasyon Çalışmaları 79
3.2.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre analizi 79

Sayfa

3.2.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometre analizi..... 79

3.2.3. X-Ray difraktometre (XRD) analizi..... 80

3.3. TDF ve FTC Miktar Tayini Yöntemi ve Yöntem Validasyonu..... 80

3.3.1. Doğrusallık..... 83

3.3.2. Doğruluk ve geri elde..... 84

3.3.3. Kesinlik..... 84

3.3.4. Seçicilik..... 85

3.3.5. Stabilite çalışmaları..... 85

3.3.6. Duyarlılık ve saptama sınırı..... 85

3.4. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları..... 86

3.4.1. DSC analizleri..... 86

3.4.2. FTIR analizi..... 87

3.5. Vajinal Nanolif Formülasyonlarının Tasarlanması..... 87

3.5.1. PVA ile yapılan önformülasyon çalışmaları..... 87

3.5.2. Deneysel tasarım ile PVA nanolif üretiminin değerlendirilmesi..... 89

3.5.3. PVA bazlı mukoadezif nanolif geliştirme çalışmaları..... 91

3.5.4. Zein içeren nanolif formülasyonlarının hazırlanması..... 92

3.5.5. PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonları..... 95

3.5.6. Tabakalı nanolif formülasyonlarının geliştirilmesi..... 96

3.6. Elektroçekim İşleminde Kullanılacak Polimer Karışımlarının Çözelti Karakterizasyonu..... 96

3.6.1. Etkin madde/polimer karışımlarının iletkenlik ölçümlerinin yapılması..... 97

3.6.2. Etkin madde/polimer karışımlarının yüzey gerilimi ölçümlerinin yapılması..... 98

3.6.3. Etkin madde/polimer karışımlarının viskozite ölçümlerinin yapılması..... 99

3.7. Nanolif Formülasyonlarının Elektroçekim Yöntemi ile Üretimi..... 100

3.7.1. PVA içeren formülasyonların elektroçekim yöntemi ile üretimi..... 102

Sayfa

3.7.2. Deneysel tasarım ile geliştirilen nanoliflerin elektroçekim yöntemi ile üretimi 102

3.7.3. PVA bazlı mukoadezif nanoliflerin elektroçekim yöntemi ile üretimi 103

3.7.4. Zein içeren nanolif formülasyonların elektroçekim yöntemi ile üretimi 104

3.7.5. PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonların elektroçekim yöntemi ile üretimi 106

3.7.6. Tabakalı nanolif formülasyonlarının elektroçekim yöntemi ile üretimi 106

3.8. Nanolif Formülasyonlarında Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları 107

3.8.1. Nanolif formülasyonlarının DSC ile karakterizasyonu 107

3.8.2. Nanolif formülasyonlarının FTIR ile karakterizasyonu 107

3.8.3. Nanolif formülasyonlarının XRD ile karakterizasyonu 108

3.9. Nanolif Formülasyonlarının In Vitro Karakterizasyon Çalışmaları 108

3.9.1. Nanolif formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi 108

3.9.2. Nanolif formülasyonlarında etkin madde yükleme etkinliğinin belirlenmesi 110

3.9.3. Nanolif formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi 111

3.9.4. Nanolif formülasyonlarının temas açılarının ölçülmesi 111

3.9.5. Nanoliflerin BET ile yüzey alanı analizi 112

3.9.6. Franz difüzyon hücresinde yapılan in vitro salım çalışmaları 113

3.9.7. USP sepet yöntemi ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları 114

3.10. Nanolif Formülasyonlarında Yapılan Ex-vivo Çalışmalar 116

3.10.1. Ex-vivo permeabilite çalışmaları 116

3.10.2. Ex vivo alıkonma çalışmaları 116

3.10.3. Ex-vivo mukoadezyon çalışmaları 117

3.10.4. Stabilite çalışamaları 119

3.11. İn-Vivo Deneyler 119

Sayfa

3.11.1. Analiz metodu geliştirilmesi 121

3.11.2. Farmakokinetik çalışmalar 125

3.11.3. Biyokimyasal ve immunolojik çalışmalar 128

3.11.4. Histopatolojik değerlendirmeler 129

3.12. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler 130

4. BULGULAR 131

4.1. Etkin Maddelerin Karakteristik Özellikleri 131

4.1.1. DSC analizleri 131

4.1.2. FT-IR analizleri 132

4.1.3. XRD analizleri 134

4.2. TDF ve FTC için HPLC ile Yapılan Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 137

4.2.1. Doğrusallık 138

4.2.2. Doğruluk ve geri elde 139

4.2.3. Kesinlik 140

4.2.4. Seçicilik 142

4.2.5. Duyarlılık ve saptama sınırı 146

4.2.6. Stabilite çalışmaları 147

4.3. Etkin Madde ve Polimerlerin Geçimlilik Çalışmaları 148

4.3.1. DSC analizleri 148

4.3.2. FTIR analizleri 151

4.4. Elektroçekim İşleminde Kullanılacak Polimer Karışımlarının Çözelti Karakterizasyonu 156

4.4.1. PVA önformülasyon çalışmalarında çözelti özellikleri 156

4.4.2. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri 157

4.4.3. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri 159

Sayfa

4.4.4. Zein içeren nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri 161

4.4.5. PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri 163

4.4.6. Tabakalı nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri 164

4.5. Nanolif Formülasyonlarının Üretimi 165

4.6. Nanolif Formülasyonlarının Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları 165

4.6.1. Nanolif formülasyonlarının DSC ile karakterizasyonu 165

4.6.2. Nanolif formülasyonlarının FTIR ile karakterizasyon 168

4.6.3. Nanolif formülasyonlarının XRD ile karakterizasyonu 170

4.7. Nanolif Formülasyonlarının In vitro Karakterizasyon Çalışmaları 172

4.7.1. Nanolif formülasyonlarının morfolojik özellikleri 172

4.7.2. Nanolif formülasyonlarında etkin madde yükleme etkinliğinin belirlenmesi 185

4.7.3. Nanolif formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi 186

4.7.4. Nanolif formülasyonlarının temas açılarının ölçülmesi 194

4.7.5. Nanoliflerin BET ile yüzey alanı analizi 197

4.7.6. Franz difüzyon hücresinde yapılan in vitro salım çalışmaları 201

4.7.7. USP sepet yöntemi ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları ve salım kinetiklerine göre değerlendirmeler 209

4.8. Nanolif Formülasyonlarında Yapılan Ex-vivo Çalışmalar 214

4.8.1. Ex-vivo permeabilite çalışmaları 214

4.8.2. Ex vivo alıkonma çalışmaları 216

4.8.3. Ex-vivo mukoadezyon çalışmaları 217

4.9. Stabilite Çalışmaları 221

4.10. İn-Vivo Deneyler 222

4.10.1. Analiz metot geliştirilmesi 223

4.10.2. Farmakokinetik çalışmalar 243

4.10.3. Biyokimyasal ve immunolojik çalışmalar 255

Sayfa

4.10.4. Histopatolojik değerlendirmeler 259

5. TARTIŞMA..... 269

5.1. Etkin Maddelerin Karakteristik Özellikleri..... 270

5.1.1. DSC analizleri..... 270

5.1.2. FTIR analizleri..... 271

5.1.3. XRD analizleri..... 272

5.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu..... 273

5.3. TDF ve FTC ve Kullanılan Polimerlerin Geçimlilik Çalışmaları..... 275

5.3.1. DSC analizleri..... 276

5.3.2. FTIR analizleri..... 277

5.4. Elektroçekim İşleminde Kullanılacak Polimer Karışımlarının Çözelt Karakterizasyonu..... 280

5.4.1. Etkin madde/polimer karışımlarının iletkenlik ölçümleri..... 281

5.4.2. Etkin madde/polimer karışımlarının yüzey gerilimi ölçümleri..... 283

5.4.3. Etkin madde/polimer karışımlarının viskozite ölçümlerinin yapılması... 285

5.5. Vajinal Nanolif Formülasyonlarının Üretimi..... 286

5.6. Nanolif Formülasyonlarının Yapısal Karakterizasyonu..... 290

5.6.1. DSC ile geçimlilik çalışmaları..... 290

5.6.2. FTIR ile geçimlilik çalışmaları..... 292

5.6.3. XRD ile yapısal karakterizasyon çalışmaları..... 293

5.7. Nanolif Formülasyonlarının İn vitro Karakterizasyon..... 294

5.7.1. Nanolif formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi..... 294

5.7.2. Nanolif formülasyonlarının etkin madde içeriğinin belirlenmesi..... 296

5.7.3. Nanolif formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi..... 296

5.7.4. Nanolif formülasyonlarının temas açılarının ölçülmesi..... 297

5.7.5. Nanoliflerin BET ile yüzey alanı analizi..... 298

Sayfa

5.7.6. İn vitro permeabilite çalışmaları 298

5.7.7. Nanolif formülasyonlarının in vitro çözünme hızı çalışmaları ve salım kinetiklerinin belirlenmesi 299

5.8. Nanolif Formülasyonlarında Yapılan Ex-vivo Çalışmalar..... 300

5.8.1. Ex-vivo permeabilite çalışmaları 301

5.8.2. Ex vivo alıkonma çalışmaları..... 301

5.8.3. Ex-vivo mukoadezyon çalışmaları..... 302

5.9. Stabilite Çalışmaları..... 303

5.10. İn-Vivo Deneyler 303

5.10.1. Analiz yöntemi..... 303

5.10.2. Farmakokinetik çalışmalar..... 305

5.10.3. Biyokimyasal ve immunolojik çalışmalar..... 309

5.10.4. Histopatolojik değerlendirmeler 313

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 317

KAYNAKLAR 321

EKLER..... 359

EK 1. Etik Kurul Onayı..... 360

ÖZGEÇMİŞ 363

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Vajinal mukozanın karakteristik özellikleri 5

Çizelge 2.2. Vajinal uygulanan ilaçların farmakolojik gruplarına örnekler 11

Çizelge 2.3. Klinikte kullanılan antiretroviral ilaçların sınıflandırılması 23

Çizelge 2.4. Vajinal olarak uygulanan mikrobisit formülasyonları 34

Çizelge 2.5. Vajinal ilaç verilişinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler 40

Çizelge 2.6. Vajinal ilaç verilişinde kullanılan nano-ilaç taşıyıcı sistemler 42

Çizelge 2.7. Farklı elektroçekim yöntemleri ile nanolif üretimi 53

Çizelge 2.8. Vajinal uygulamalar için geliştirilen nanolif formülasyonları 60

Çizelge 2.9. Nanoliflerin diğer alanlardaki uygulamaları 62

Çizelge 2.10. İlaç taşıyıcı olarak yaygın olarak kullanılan mukoadezif polimerler 63

Çizelge 2.11. TDF ve FTC ticari ürünlerde kombine kullanımı 69

Çizelge 2.12. TDF ve FTC ile geliştirilen vajinal çalışmalar 73

Çizelge 3.1. Simüle vajinal sıvı (SVS) içeriği (pH 4.2) 78

Çizelge 3.2. TDF'nin HPLC ile miktar tayini yöntem koşulları 82

Çizelge 3.3. FTC'nin HPLC ile miktar tayini yöntem koşulları 82

Çizelge 3.4. FTC'nin gradient akış yöntemi ile geliştirilen metodu 83

Çizelge 3.5. Farklı PVA tipleri ile hazırlanan çözelti karışımları 89

Çizelge 3.6. Hedeflenen vajinal formülasyonların özellikleri 90

Çizelge 3.7. Deneysel tasarımla geliştirilen nanolif formülasyonlarında kullanılan parametreler 90

Çizelge 3.8. Nanolif formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik belirlenen DoE tasarım parametreleri 91

Çizelge 3.9. Mukoadezif nanolif formülasyonlarının içeriği 92

Çizelge 3.10. TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının içeriği ve solvan sistemi 92

Çizelge 3.11. Zein ile geliştirilen nanolif formülasyonlarının içeriği 94

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.12. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının içeriği 95

Çizelge 3.13. TDF ve FTC yüklü PLGA bazlı formülasyonların içeriği ve formülasyon kodları 95

Çizelge 3.14. TDF ve FTC yüklü tabakalı nanolif formülasyonların içeriği ve formülasyon kodları 96

Çizelge 3.15. PVA nanoliflerinin üretiminde kullanılan proses parametreleri 102

Çizelge 3.16. Deneysel tasarım ile geliştirilen PVA nanoliflerinin üretiminde kullanılan proses parametreleri 103

Çizelge 3.17. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri 103

Çizelge 3.18. TDF ve FTC içeren mukoadezif PVA bazlı nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri 104

Çizelge 3.19. Zein içeren nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri 105

Çizelge 3.20. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri 106

Çizelge 3.21. TDF ve FTC yüklü PLGA bazlı formülasyonların üretim parametreleri 106

Çizelge 3.22. Nanolif formülasyonlarından ilaç salım verilerinin analizi için kullanılan kinetik modeller 115

Çizelge 3.23. In-vivo çalışmalarda uygulama yapılan deney grupları 120

Çizelge 3.24. İn-vivo çalışmaların analizine yönelik çalışma koşulları 124

Çizelge 4.1. TDF'nin XRD analizinden elde edilen kristalografik veriler 135

Çizelge 4.2. Emtrisitabinin XRD analizinden elde edilen kristalografik veriler 136

Çizelge 4.3. TDF'nin SVS içerisindeki doğruluk ve yüzde geri (%) elde bulguları 139

Çizelge 4.4. FTC'nin SVS içerisindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizi sonuçları 140

Çizelge 4.5. TDF'nin SVS içindeki deney içi kesinlik bulguları 141

Çizelge 4.6. FTC'nin SVS içindeki deney içi kesinlik bulguları 141

Çizelge 4.7. TDF'nin SVS içindeki deneyler arası kesinlik bulguları 142

Çizelge 4.8. FTC'nin SVS içindeki deneyler arası kesinlik bulguları 142

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.9. PVA önformülasyon çalışmaları ile geliştirilen polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları 157

Çizelge 4.10. PVA ile yapılan tasarım formülasyonlara yönelik geliştirilen polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları 158

Çizelge 4.11. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonların polimer çözeltilerinin karakterizasyonu 159

Çizelge 4.12. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarından seçilen optimum formülasyonlarla üretilen TDF ve FTC yüklü polimer çözeltilerinin karakterizasyonu 160

Çizelge 4.13. Zein ile hazırlanan polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları 162

Çizelge 4.14. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları 163

Çizelge 4.15. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı karışım formülasyonların polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları 163

Çizelge 4.16. TDF ve FTC yüklü PLGA ile üretilen katlı lif formülasyonların çözelti karakterizasyonu 165

Çizelge 4.17. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanoliflerinin lif çapları ve porozite değerleri 182

Çizelge 4.18. PVA temelli mukoadezif polimer içeren nanolif formülasyonların lif çapları ve porozite değerleri 183

Çizelge 4.19. TDF ve FTC içeren PVA temelli kombine mukoadezif polimer içeren nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri 184

Çizelge 4.20. Zein bazlı nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri 184

Çizelge 4.21. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri 185

Çizelge 4.22. PLGA bazlı nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri 185

Çizelge 4.23. Tabakalı PLGA nanolif formülasyonunun lif çapı ve porozite değerleri 185

Çizelge 4.24. TDF ve FTC yükleme etkinliği 186

Çizelge 4.25. Farklı PVA tipleri ile geliştirilen nanolif formülasyonlarının karakterizasyon sonuçları 186

Çizelge 4.26. Deneysel tasarım ile belirlenen formülasyonların karakterizasyon sonuçları 187

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.27. PVA nanolif formülasyonlarının işlem parametrelerinin gerilme direnci üzerine etkisinin varyans analizi ile incelenmesi 187

Çizelge 4.28. PVA nanolif formülasyonlarının işlem parametrelerinin kopma uzaması üzerine etkisinin varyans analizi ile incelenmesi 189

Çizelge 4.29. Mukoadezif nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu 190

Çizelge 4.30. TDF ve FTC içeren mukoadezif nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu 191

Çizelge 4.31. Zein bazlı nanolif formülasyonlarının karakterizasyonu 192

Çizelge 4.32. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının karakterizasyonu 193

Çizelge 4.33. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı katlı nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu 193

Çizelge 4.34. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı katlı nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu 193

Çizelge 4.35. PVA önformülasyon nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri .. 194

Çizelge 4.36. Zein bazlı nanolif formülasyonlarının temas açısı karakterizasyonu 195

Çizelge 4.37. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri 196

Çizelge 4.38. PLGA ile hazırlanan karışım nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri 196

Çizelge 4.39. Nanolif formülasyonlarının çok noktalı BET analizi sonuçları 197

Çizelge 4.40. Franz difüzyon hücresi ile salım çalışması yapılan formülasyonların 8. Saat ve 24. saatte % yığılmalı çıkan miktarları 208

Çizelge 4.41. Sepet yöntemi ile çözünme hızı çalışması ile yapılan formülasyonların 8. Saat ve 24. saatte % yığılmalı çıkan miktarları 211

Çizelge 4.42. TDF'nin nanolif formülasyonların farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları 212

Çizelge 4.43. FTC'nin nanolif formülasyonların farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları 213

Çizelge 4.44. Ex-vivo permeabilite çalışmaları sonucunda formülasyonların 8. saat ve 24. saatte yığılmalı % geçen miktarları 216

Çizelge 4.45. Etkin maddelerin geçişinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen akı ve permeabilite katsayısı değerleri 216

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.46. Önformülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonların mukoadezyon işi sonuçları 218

Çizelge 4.47. Tasarım ile hazırlanan PVA nanolif formülasyonların mukoadezyon işi sonuçları 218

Çizelge 4.48. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları 219

Çizelge 4.49. TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları 219

Çizelge 4.50. TDF ve FTC içeren zein bazlı formülasyonlardan seçilen optimum formülasyonların mukoadezyon sonuçları 220

Çizelge 4.51. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu 220

Çizelge 4.52. PLGA bazlı formülasyonlardan mukoadezyon sonuçları 220

Çizelge 4.53.F4-TF nanolif formülasyonuna ait stabilite sonuçları 221

Çizelge 4.54. M2-TF nanolif formülasyonuna ait stabilite sonuçları 221

Çizelge 4.55.S1-TF nanolif formülasyonuna ait stabilite sonuçları 222

Çizelge 4.56. Çoklu Reaksiyon Takibi, MRM geçişleri ve voltaj değerleri 223

Çizelge 4.57. FTC'nin gün içi kesinlik sonuçları 237

Çizelge 4.58. TDF'nin gün içi kesinlik sonuçları 238

Çizelge 4.59. FTC'nin günler arası kesinlik sonuçları 238

Çizelge 4.60. TDF'nin günler arası kesinlik sonuçları 238

Çizelge 4.61. Uygulanan nanolif ve ticari ürün sonucunda elde edilen TDF'nin Trapez yöntemi ile hesaplanan C_{max}, t_{max} ve AUC değerleri 252

Çizelge 4.62. Uygulanan nanolif ve ticari ürün sonucunda elde edilen FTC'nin Trapez yöntemi ile hesaplanan C_{max}, t_{max} ve AUC değerleri 252

Çizelge 4.63. İn-vivo çalışmalarda TDF'ye ait farmakokinetik parametreler 253

Çizelge 4.64. İn-vivo çalışmalarda FTC'ye ait farmakokinetik parametreler 253

Çizelge 4.65. Vajinal dokuda TDF ve FTC miktarları 255

Çizelge 4.66. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri 255

Çizelge 4.67. Karaciğer dokusu GSH düzeyleri 256

Çizelge 4.68. Karaciğer dokusu NOx düzeyleri 256

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.69. Böbrek dokusu MDA düzeyleri 257

Çizelge 4.70. Böbrek dokusu GSH düzeyleri 257

Çizelge 4.71. Böbrek dokusu NOx düzeyleri 258

Çizelge 4.72. Vajina dokusu MDA düzeyleri 258

Çizelge 4.73. Vajina dokusu GSH düzeyleri 259

Çizelge 4.74. Vajina dokusu NOx düzeyleri 259

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Kadın üreme sistemi ve vajinal mukozanın şematik diyagramı 4

Şekil 2.2. Cinsel yolla bulaşan hastalıkların türleri ve belirtileri 17

Şekil 2.3. Mikrobisit geliştirmede nanoteknoloji tabanlı sistemlerin potansiyel etki mekanizmaları 19

Şekil 2.4. a.) Koruyucu tedavi b) Maruziyet öncesi tedavi 26

Şekil 2.5. Mikrobisit formülasyonlarının taşıması gereken özellikler 32

Şekil 2.6. Vajinaya uygulanan ilaçların farmasötik ilaç şekilleri 37

Şekil 2.7. Vajinal enfeksiyonların topikal tedavisi için önerilen nano ilaç taşıyıcı sistemler 41

Şekil 2.8. Nanoliflerin farklı kullanım alanları 43

Şekil 2.9. Nanolif üretim yöntemleri 45

Şekil 2.10. Artan elektrik alanının etkisi altında polivinilpirolidon damlacığının üç aşamalı deformasyonunu gösteren dijital görüntüler 47

Şekil 2.11. Nanoliflere ilaç yükleme yöntemlerinin şeması 49

Şekil 2.12. Elektroçekim yönteminin şematik gösterimi 50

Şekil 2.13. Farklı elektroçekim nanoliflerinin şematik gösterimi 51

Şekil 2.14. Elektroçekim yöntemini etkileyen parametreler 54

Şekil 2.15. Elektroçekim için kullanılan başlıca ilaç yükleme teknikleri ve toplayıcı türleri 57

Şekil 2.16. TDF'nin kimyasal yapısı 67

Şekil 2.17. FTC'nin kimyasal yapısı 70

Şekil 4.1. TDF'nin DSC termogramı 131

Şekil 4.2. FTC'nin DSC termogramı 132

Şekil 4.3. TDF'nın FT-IR spektrumu 132

Şekil 4.4. FTC'nın FT-IR spektrumu 133

Şekil 4.5. TDF'ye ait XRD difraktogramı 134

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.6. FTC'ye ait XRD difraktogramı 136

Şekil 4.7. TDF'nin UV Spektrumu 137

Şekil 4.8. FTC'nin UV Spektrumu 137

Şekil 4.9. SVS içindeki TDF konsantrasyon-alan kalibrasyon doğrusu 138

Şekil 4.10. SVS içindeki FTC konsantrasyon-alan kalibrasyon doğrusu 139

Şekil 4.11. SVS'nın TDF analizi için kullanılan yöntem ile HPLC analizi ile elde edilen pikler 143

Şekil 4.12. Simüle vajinal sıvı içinde TDF analizi ile elde edilen pik 143

Şekil 4.13. TDF ait yöntemle simüle vajinal sıvı içinde FTC analizi ile elde edilen pik 143

Şekil 4.14. TDF'ye ait yöntem kullanılarak formülasyondaki polimerlerin analizi ile elde edilen pikler 144

Şekil 4.15. Simüle vajinal sıvının FTC analiz yöntemi ile HPLC analizinde elde edilen pikler 145

Şekil 4.16. Simüle vajinal sıvı içinde FTC analizi ile elde edilen pik 145

Şekil 4.17. FTC analizine ait yöntemle simüle vajinal sıvı içinde TDF analizi ile elde edilen pik 145

Şekil 4.18. FTC'ne ait yöntem kullanılarak formülasyondaki polimerlerin analizi ile elde edilen pikler 146

Şekil 4.19. TDF'nin SVS içindeki kararlılık sonuçları 147

Şekil 4.20. FTC'nin SVS içindeki kararlılık sonuçları 148

Şekil 4.21. TDF, FTC, PVA, PEO, PVA-PEO, PVA-TDF-FTC ve PEO-TDF-FTC tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı 149

Şekil 4.22. TDF, FTC, Zein, PVP, Zein-PVP ve Zein-PVP-TDF-FTC'nin tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı 149

Şekil 4.23. TDF, FTC, PLGA, PEO, PLGA-PEO, PLGA-TDF-FTC ve PEO-TDF-FTC tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı 150

Şekil 4.24. TDF, FTC, PLGA, PVA, PLGA-PVA, PLGA-TDF-FTC ve PVA-TDF-FTC'nin tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı 150

Şekil 4.25. PVA'nın FT-IR spektrumu 151

Şekil 4.26. PLGA'nın FT-IR spektrumu 152

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.27. Zeinin FT-IR spektrumu 152

Şekil 4.28. PVP'nin FT-IR spektrumu 153

Şekil 4.29. PEO'nin FT-IR spektrumu 154

Şekil 4.30. TDF, FTC, PVA, PEO ve PVA'nın tekli ve 1:1 oranında karışımlarının FTIR spektrumu 154

Şekil 4.31. TDF, FTC, Zein, PVP ve PEO'nun tekli ve 1:1 oranında karışımlarının IR spektrumu 155

Şekil 4.32. TDF, FTC, PLGA ve PEO'nun tekli ve 1:1 oranında karışımlarının IR spektrumu 155

Şekil 4.33. TDF, FTC, PVA ve PLGA'nın tekli ve 1:1 oranında karışımlarının IR spektrumu 156

Şekil 4.34. PVA önformülasyon çalışmaları için geliştirilen polimer çözeltilerinin çözelti karakterizasyon sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi 157

Şekil 4.35. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolifleri için geliştirilen polimer özeltilerinin karakterizasyon çalışmalarının istatistiksel değerlendirilmesi 158

Şekil 4.36. Mukoadezif PVA-bazlı nanolifler için geliştirilen polimer çözeltilerinin ölçüm sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi 160

Şekil 4.37. TDF ve FTC yüklü mukoadezif PVA-bazlı nanolifler için geliştirilen polimer çözeltilerinin ölçüm sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi 161

Şekil 4.38. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı karışım formülasyonların çözelti karakterizasyon sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi 164

Şekil 4.39. PVA polimerleri (Polyviol 13/140 (PVA-K), Polyviol 26/140 (PVA-O) ve Polyviol 40/140 (PVA-B)), and PVA nanolif formülasyonlarının (P2-P5-P8) DSC termogramı 165

Şekil 4.40. TDF, FTC, PVA, PEO ve F4-TF (in vivo E Grubu) formülasyonunun DSC termogramı 166

Şekil 4.41. TDF, FTC, Zein ve K7-TF nanolif formülasyonlarının DSC termogramı ... 166

Şekil 4.42. TDF, FTC, PLGA, PEO ve M2-TF (in vivo F Grubu) formülasyonunun DSC termogramı 167

Şekil 4.43. TDF, FTC, PLGA, PVA ve S1-TF (in vivo D Grubu) formülasyonunun DSC termogramı 167

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.44. PVA polimerleri (Polyviol 13/140 (PVA-K), Polyviol 26/140 (PVA-O) ve Polyviol 40/140 (PVA-B)), and PVA nanolif formülasyonlarının (P2-P5-P8) FTIR spektrumu 168

Şekil 4.45. TDF, FTC, PVA, PEO ve F4-TF (in vivo E Grubu) formülasyonunun FTIR spektrumu 168

Şekil 4.46. TDF, FTC, Zein ve K7-TF nanolif formülasyonlarının FTIR spektrumu 169

Şekil 4.47. TDF, FTC, PLGA, PVA ve M2-TF (in vivo F grubu) nanolif formülasyonlarının FTIR spektrumu 169

Şekil 4.48. TDF, FTC, PLGA, PVA ve S1-TF (in vivo D grubu) nanolif formülasyonlarının IR spektrumu 170

Şekil 4.49. TDF, FTC, PVA, PEO ve F4-TF (in vivo E Grubu) formülasyonunun XRD difraktogramları 170

Şekil 4.50. TDF, FTC, PLGA, PEO ve M2-TF (in vivo F Grubu) formülasyonunun XRD difraktogramları 171

Şekil 4.51. TDF, FTC, PLGA, PVA ve S1-TF (in vivo D Grubu) formülasyonunun XRD difraktogramları 171

Şekil 4.52. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanoliflerinin lif çapları ve porozite değerlerinin istatistiksel değeerlendirilmesi 183

Şekil 4.53. PVA nanolif formülasyonunda gerilme direnci üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği 188

Şekil 4.54. PVA nanolif formülasyonunda gerilme direnci üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği 188

Şekil 4.55. PVA nanolif formülasyonunda kopma uzaması üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği 189

Şekil 4.56. PVA nanolif formülasyonunda kopma uzaması üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği 190

Şekil 4.57. F4-TF, M2-TF ve S1-TF spesifik yüzey alanı değerleri 197

Şekil 4.58. F4-TF formülasyonunun por çapı genişliği – kümülatif por hacmi grafiği 198

Şekil 4.59. F4-TF formülasyonunun adsorpsiyon-dezorpsiyon izotermi 198

Şekil 4.60. M2-TF formülasyonunun por çapı genişliği – kümülatif por hacmi grafiği 199

Şekil 4.61. M2-TF formülasyonunun adsorpsiyon-dezorpsiyon izotermi 199

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.62. S1-TF formülasyonunun por çapı genişliği – kümülatif por hacmi grafiği 200

Şekil 4.63. S1-TF formülasyonunun adsorpsiyon-dezorpsiyon izotermi 200

Şekil 4.64. F1-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 201

Şekil 4.65. F2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 202

Şekil 4.66. F4-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 202

Şekil 4.67. Z2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 203

Şekil 4.68. ZK7-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 203

Şekil 4.69. ZK8-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 204

Şekil 4.70. ZK9-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 204

Şekil 4.71. ZK10-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 205

Şekil 4.72. M1-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 205

Şekil 4.73. M2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 206

Şekil 4.74. S1-TF (in vivo D grubu) nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 206

Şekil 4.75. S2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 207

Şekil 4.76. S3-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 207

Şekil 4.77. S4-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri 208

Şekil 4.78. F4-TF formülasyonundan TDF ve FTC'nin in vitro çözünme hızı profili 209

Şekil 4.79. M2-TF formülasyonundan TDF ve FTC'nin in vitro çözünme hızı profili 210

Şekil 4.80. S1-TF formülasyonundan TDF ve FTC'nin in vitro çözünme hızı profili 210

Şekil 4.81. F4-TF nanolif formülasyonundan inek vajinal dokusundan permeabilite profili 214

Şekil 4.82. M2-TF nanolif formülasyonundan inek vajinal dokusundan permeabilite profili 215

Şekil 4.83. S1-TF nanolif formülasyonundan inek vajinal dokusundan permeabilite profili 215

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.84. F4-TF Nanolif formülasyonu vajinal alıkonma çalışma sonuçları 216

Şekil 4.85. M2-TF Nanolif formülasyonundan vajinal alıkonma çalışma sonuçları 217

Şekil 4.86. TDF ana iyon spektrumu 224

Şekil 4.87. TDF analizinde fragmentor voltaj spektrumu..... 224

Şekil 4.88. TDF parçalanma iyonları spektrumları..... 225

Şekil 4.89. TDF 270 iyonu için parçalanma enerjisi 226

Şekil 4.90. TDF 288 iyonu için parçalanma enerjisi 226

Şekil 4.91. TDF 176 iyonu için parçalanma enerjisi 227

Şekil 4.92. FTC Ana iyon spektrumu 227

Şekil 4.93. FTC Fragmentor voltaj spektrumu 228

Şekil 4.94. FTC parçalanma iyonları spektrumu 228

Şekil 4.95. FTC 130 iyonu için parçalanma enerjisi..... 229

Şekil 4.96. FTC 113 iyonu için parçalanma enerjisi..... 229

Şekil 4.97. Ornidazol Ana iyon spektrumu..... 230

Şekil 4.98. Ornidazol Fragmentor voltaj spektrumu,..... 230

Şekil 4.99. Ornidazol parçalanma iyonları spektrumu..... 231

Şekil 4.100. Ornidazol 128 iyonu için parçalanma enerjisi değeri 231

Şekil 4.101. Ornidazol 82 iyonu için parçalanma enerjisi 232

Şekil 4.102. Etkin madde karışımlarının izokratik kromatogramları 232

Şekil 4.103. Uygulanan akış metodu ile elde edilen kromatogramlar 233

Şekil 4.104. TDF'nin LC-MSMS ile geliştirilen metodla elde edilen kalibrasyon doğrusu..... 234

Şekil 4.105. FTC'nin LC-MSMS ile geliştirilen metodla elde edilen kalibrasyon doğrusu..... 234

Şekil 4.106. Spike analizi ile elde edilen kromatogramdaki internal standart..... 235

Şekil 4.107. Madde standartlarının karışımı ile elde edilen TDF geçişleri 235

Şekil 4.108. Madde standartlarının karışımı ile elde edilen FTC geçişleri..... 236

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.109. TDF ve FTC için gün için doğruluk ve kesinlik kromatogramı 237

Şekil 4.110. TDF için en düşük miktar saptama sınırı sonuçları 239

Şekil 4.111. FTC için en düşük miktar saptama sınırı sonuçları 240

Şekil 4.112. Matris etkisi sonuçları..... 241

Şekil 4.113. Carry over analiz sonuçları 241

Şekil 4.114. TDF için carry over analiz sonuçları 242

Şekil 4.115. FTC için carry over analiz sonuçları 242

Şekil 4.116. Ornidazol için carry over analiz sonuçları..... 243

Şekil 4.117. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili 243

Şekil 4.118. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 244

Şekil 4.119. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili 244

Şekil 4.120. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu- zaman profili..... 245

Şekil 4.121. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 245

Şekil 4.122. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 246

Şekil 4.123. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 246

Şekil 4.124. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 247

Şekil 4.125. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 247

Şekil 4.126. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 248

Şekil 4.127. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 248

Şekil 4.128. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili..... 249

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.129. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili 249

Şekil 4.130. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili 250

Şekil 4.131. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu- zaman profili 250

Şekil 4.132. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu- zaman profili 251

Şekil 4.133. C, D, E ve F gruplarının ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili 251

Şekil 4.134. C, D, E ve F gruplarının ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili 252

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Vajinal uygulamada kullanılan aplikatörlere örnekler 31

Resim 2.2. Elektroçekim jet oluşumunun aşamaları..... 47

Resim 3.1. UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi 81

Resim 3.2. İletkenlik ölçüm cihazı 98

Resim 3.3. Yüzey gerilimi ölçüm cihazı..... 99

Resim 3.4. Viskozite ölçüm cihazı, rotasyonel viskometre..... 100

Resim 3.5. Elektroçekim işleminin gerçekleştirildiği cihaz 101

Resim 3.6. SEM analizlerinde kullanılan cihaz..... 109

Resim 3.7. Nanoliflerin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan cihaz ve analiz sonucunda elde edilen grafik..... 111

Resim 3.8. Temas açısı ölçüm cihazı..... 112

Resim 3.9. İn vitro permeabilite çalışmalarında kullanılan Franz difüzyon hücresi 113

Resim 3.10. Nanolifler ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışmalarının gerçekleştirildiği çözünme hızı cihazı 114

Resim 3.11. Salım çalışmaları kullanılan liflerin görünümü 115

Resim 3.12. 3D olarak tasarlanan platform 117

Resim 3.13. Mukoadezyon çalışmalarında kullanılan aparat 118

Resim 3.14. Uygulama sırasında kullanılan aplikatör 121

Resim 3.15. Tavşanlara formülasyonların uygulanması..... 126

Resim 3.16. Tavşanlara formülasyonlarının uygulanması sonrası hafif anestezi altında bekletilmeleri 127

Resim 3.17. Tavşanlarda çıkarılan vajinal dokunun görünümü 127

Resim 3.18. Tavşanlardan çıkarılan dokular..... 128

Resim 4.1. P3, P6 ve P9 formülasyonuna ait liflerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri..... 173

Resim 4.2. Tasarım ile geliştirilen PVA nanoliflerinin SEM görüntüleri 174

Resim **Sayfa**

Resim 4.3. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri..... 175

Resim 4.4. TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri..... 176

Resim 4.5. Zein nanoliflerinin SEM görüntüleri 176

Resim 4.6. Zein-PEO WSR 205 nanoliflerinin SEM görüntüleri..... 177

Resim 4.7. Zein-PEO WSR 205 nanoliflerinin SEM görüntüleri..... 178

Resim 4.8. Zein-PVP bazlı nanoliflerinin SEM görüntüleri ve lif çapı dağılımları 179

Resim 4.9. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanoliflerinin SEM görüntüleri ve lif çapı dağılımları..... 180

Resim 4.10. PLGA karışım nanoliflerinin SEM görüntüleri ve lif çapı dağılımları..... 181

Resim 4.11. S1-TF nanolif formülasyonunun üst tabakasının SEM görüntüsü 181

Resim 4.12. Tabakalı PLGA nanoliflerinin tabakalarının SEM görüntüleri 182

Resim 4.13. Alıkonma çalışması 1. saat (A) ve 10. saat (B) görüntüleri..... 217

Resim 4.14. A grubu vajina dokusunun genel görüntüsü 260

Resim 4.15. A grubu vajina histolojik değerlendirilmesi 261

Resim 4.16. C grubu vajina histolojik değerlendirilmesi 262

Resim 4.17. C grubunun vajinal histolojik incelenmesi 263

Resim 4.18. D grubunun vajinal histolojik incelenmesi..... 264

Resim 4.19. D grubunun vajinal histolojik incelenmesi..... 265

Resim 4.20. E grubunun vajinal histolojik incelenmesi 266

Resim 4.21. E grubunun vajinal histolojik incelenmesi 267

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ACN	Asetonitril
ART	Antiretroviral tedavi
AUC	Plazma konsantrasyonu zaman eğrisi altında kalan alan
$AUC_{0-\infty}$	Sıfırdan sonsuza plazma zaman eğrisi altında kalan alan
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
BN	Bağıl nem
BSA	Bovin serum albümin
Cl	Klirens
C_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu
CYP	Sitokrom enzim ailesi
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
R^2	Determinasyon katsayısı
t_{maks}	Maksimum plazma konsantrasyonu için geçen süre
λ_{maks}	Maksimum absorbans dalga boyu

Kısaltmalar	Açıklamalar
dk	Dakika
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTC	Emtrisitabin
HAART	Yüksek aktiviteli antiRetroviral tedavi
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IC50	Yarı inhibisyon konsantrasyonu
LOD	Duyarlılık sınırı
LOQ	Saptama sınırı
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NRTI	Nükleosit revers transkriptaz inhibitörleri
Ort	Ortalama
PBS	Fosfat tamponu
QbD	Tasarımla kalite
s	Saat
sn	Saniye
SS	Standart sapma
TDF	Tenofovir disoproksil fumarat
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TFV	Tenofovir
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu (AIDS) hastalığı, insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) kaynaklı bir bağışıklık sistemi problemidir. HIV, vücudun savunmasında rol oynayan önemli hücreleri yok ederek bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olmaktadır. HIV virüsü küresel olarak yayılmaya devam etmekte olup, dünyada olduğu gibi ülkemiz için de büyük bir halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalık özellikle kadınlar, homoseksüel bireyler, göçmenler ve yoksullar arasında giderek artmaktadır.

DSÖ verilerine göre, HIV şu ana kadar yaklaşık 40,4 milyon kişinin hayatına mal olmuş ve küresel çapta tüm ülkelerde yayılmaya devam ederek önemli bir küresel halk sağlığı sorunu olmaya devam eden bir hastalıktır. 2022'de yaklaşık 630.000 kişi HIV ile ilişkili nedenlerden hayatını kaybetmiş ve 1,3 milyon kişide HIV bulaşı gerçekleşmiştir. HIV enfeksiyonunun tedavisi yoktur ancak, fırsatçı enfeksiyonlar da dahil olmak üzere etkili HIV önleme, teşhis, tedavi ve bakım hizmetlerine erişim sayesinde HIV enfeksiyonu, HIV ile yaşayan insanların uzun ve sağlıklı yaşamlar sürmesine olanak tanıyan, yönetilebilir bir kronik sağlık sorunu haline gelmiştir.

HIV öncesi koruyucu tedavi (PrEP), HIV enfeksiyonunun önlenmesi için Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen biyomedikal uygulamaları içermektedir. Gilead Sciences İlaç Tic. Ltd. Şirketinin geliştirdiği Tenofovir Disoproksil Fumarat (TDF) ile Emtrisitabin (FTC) içeren Truvada® film kaplı tablet tedavi programına uyulması ile HIV negatif bireylerin HIV ile enfekte olmasını engellenerek, etkili ve maliyet açısından uygun bir koruma önlemi sağlamaktadır. Günlük olarak oral uygulanan rejime uyulmaması HIV'e karşı korumanın başarısızlığın ana nedeni olarak gösterildiği belirtilmiştir. Ayrıca, koruyucu ilaç düzeyine ulaşmanın yavaş olması ve ilacın kesilmesini takiben ilaç düzeyinin hızlı düşüşü ilacın etkinliğini önlemektedir.

Tez kapsamında geliştirilen nanolif formülasyonları vajinal yoldan uygulanarak HIV/AIDS profilaksisi ve tedavisinde oral uygulamada gözlenen problemlerin üstesinden gelmesi amaçlanmıştır. Vajinal uygulama ile vajinal mukozada bulunan duyarlı hücrelerin HIV tarafından hedef alınmasının önlenmesini sağlayacaktır. Tez çalışmasında kombine TDF ve FTC içeren nanolif formülasyonları vajinal yoldan HIV bulaşını önlemek ve tedavi etmek

için seçilmiştir. Bu kapsamda TDF ve FTC içeren kontrollü salım sağlayan, mukoadezif vajinal nanolif formülasyonları geliştirilmiş ve in vitro ex vivo karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. FDA tarafından onaylanmış HIV/AIDS proflaksisi ve tedavisinde kullanılan iki etkin madde olan TDF ve FTC'yi kombine şekilde içeren vajinal nanolif formülasyonları elektroçekim yöntemi ile geliştirilmiştir. Nanoliflerin geliştirilmesi amacıyla kritik parametreler tasarımla kalite (QbD) yaklaşımı kullanılarak belirlenmiştir. Formülasyon çalışmalarında doğal, biyouyumlu, biyoparçalanabilir, kolay işlenebilir polimerler kullanılmış ve istenilen özelliklere sahip vajinal yolla uygulanan mukoadezif nanolifler üretilmiştir. Geliştirilen formülasyonların vajinaya uygunluklarının değerlendirilmesi için nanoliflerde etkin maddelerin yükleme kapasitesi, lif çapları, iletkenlik, porozite, temas açısı, yüzey analizi, spesifik yüzey alanı, mekanik ve morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Vajinal nanolif formülasyonlarında yapılan in vitro ve ex vivo çalışmalar ile in vivo çalışmalarda kuallanılmak üzere en uygun nanolif formülasyonu belirlenmiştir. İn vitro salım çalışmaları, in vitro permeabilite çalışmaları, ex vivo permeabilite çalışmaları, ex vivo alıkonma çalışmaları (inek vajinal dokusunda alıkonma), ex vivo mukoadezyon çalışmaları (inek vajinal dokusunda mukoadezyon) ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. Seçilen optimum formülasyonlar Yeni Zelanda tipi tavşanlarda in vivo olarak vajinal yoldan uygulanmış ve farmakokinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tavşanlar uygulamadan 24 saat sonra sakrifiye edilerek karaciğer, böbrek ve vajinal dokuları alınmış ve bu dokularda histolojik ve biyokimyasal parametreler incelenmiştir.

TDF ve FTC içeren, hasta uyuncu yüksek, kolay uygulanabilir, günün istenilen saati uygulamaya uygun, kontrollü salım yapan ve uygulama sıklığı az olan vajinal nanolif formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonunun, kadınlara kolay uygulanan tedavi olanağı sağlayacağı ve bu konuda yaşanan eksiklikleri gidereceği düşünülmektedir. Çalışmamız kombine antiretroviral (ARV) ilaç içermesi, farklı nanolif formülasyonlarının karşılaştırılması ve vajinal uygulamadaki farmakokinetik, biyokimyasal ve histolojik parametrelerin değerlendirilmesi ile özgün bir çalışmadır. Çalışmamız sonucunda elde edilen bilgiler, tüm dünyadaki kadınlarda HIV/AIDS tedavi etkinliğinin artırılmasında kullanılacak stratejilerde yol gösterici olacaktır. Vajinal nanolifler, HIV bulaşının önlenmesi amacıyla kullanıcının isteklerine uygun olarak tasarlanabilmeleri, sızıntı yapmamaları, kalıntı bırakmaması ve farklı şekillerde tasarlanabilmesi gibi avantajları ile vajinal uygulanan dozaj şekillerine iyi bir alternatif sunmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vajinanın Yapısal Özellikleri

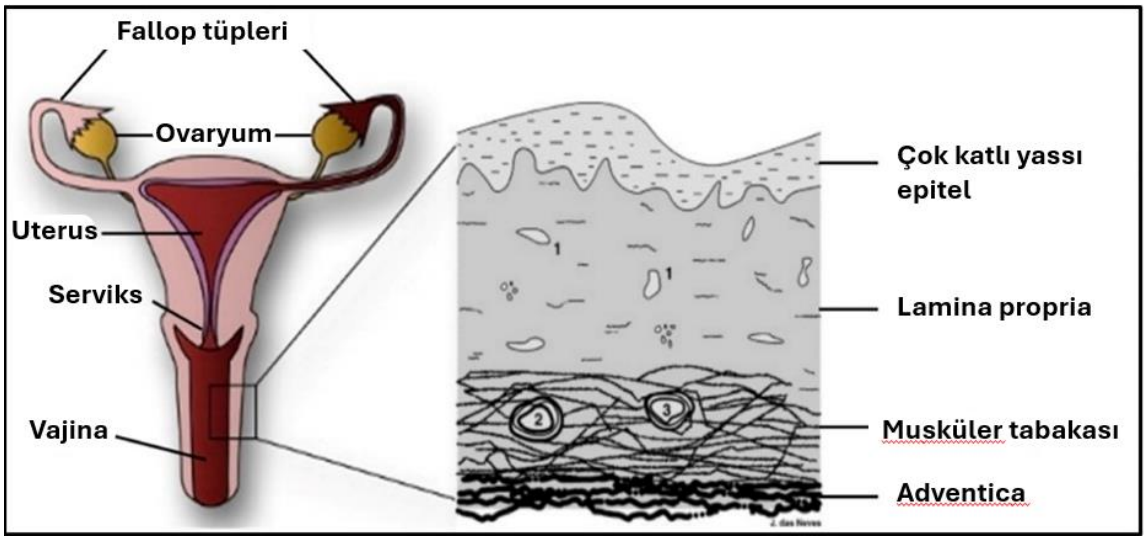
2.1.1. Anatomisi ve fizyolojik özellikleri

Kadın dış genital organı, hem idrar yolu hem de üreme sisteminden oluşmaktadır ve bu yapıların tamamı vulva olarak ifade edilmektedir (Nguyen ve Duong, 2019). Vulva, kadın dış cinsel organını oluşturan yapıların tümünü tanımlayan bir terimdir. Vulvanın bileşenleri mons pubis, labia majora, labia minör, klitoris, vestibüler bulblar, vulva vestibül, Bartholin bezleri, Skene bezleri, üretra ve vajinal açıklıktır.

Üretra ve mesane arasında yer alan vajina, sinirler ve mukus tabakası içermektedir. Kadın üreme sisteminin çok önemli bir bileşeni olan vajina, embriyogenez sırasında Müllerian kanalından gelişen, serviksi içeriden ve vestibülü dışarıda birbirine bağlayan fibromüsküler yapıda bir organdır (Tomomi Sato, 2018). Vajina, vulva vestibül yoluyla dış yüzeye uzanır ve vajinal açıklık üretra açıklığının arkasında bulunmaktadır.

Vajina, cinsel işlev, doğum, bağışıklık, menstrüasyon ve üreme dahil olmak üzere birçok işlevi olan kadına özgü bir organdır. Cinsel ilişki sırasında vajina, spermin servikse çıkıp uterus ve fallop tüplerine doğru ilerlemesinden önce meninin toplanacağı bir rezervuar görevi görmektedir. Ayrıca vajinanın kadınların genital kanaldan aylık kanamasında çıkış yolu görevi de bulunmaktadır (Nguyen ve Duong, 2019).

Ön ve arka vajinal duvarların uzunluğu sırasıyla 63 ± 9 ve 98 ± 18 mm'dir ve toplam vajinal yüzey alanı yaklaşık 72 ± 21 cm^2'dir (Z. Yang ve diğerleri, 2024). Vajina dört farklı histolojik katmandan oluşur. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi yüzeysel katman, fiziksel ve biyokimyasal bir bariyer görevi gören çok katmanlı skuamöz epiteldir. Vajina, keratinize olmayan, çok katmanlı, skuamöz epitel ile kaplıdır (Occhino, Trabuco, Heisler, Klingele ve Gebhart, 2011). İkinci katman ise kollajen ve elastinden oluşan lamina propriadır. Üçüncü katman kas tabakasıdır ve en dıştaki katman büyük bir vasküler pleksus içeren areolar bağ dokusudur.



Şekil 2.1. Kadın üreme sistemi ve vajinal mukozanın şematik diyagramı (Z. Yang ve diğerleri, 2024)

2.1.2. Vajinal sıvı ve servikal mukus

Vajina yapısında, salgı bezi olmayan bir organdır (Z. Yang ve diğerleri, 2024). Vajinal sekresyonlar esas olarak Bartholin ve Skene bezlerindeki salgılar, vajinal duvar transüdasyonu, eksfoliye olmuş vajinal epitel hücreleri, servikal mukus, endometriyal ve tubal sıvı, lökositlerden veya kalıntı idrardan oluşmaktadır (Osmałek ve diğerleri, 2021). Vajinal sıvıların bileşimi, hacmi ve reolojik özellikleri yaş, menstüral döngüsünün aşaması ve cinsel uyarılmadan etkilenmektedir (Vanić ve Škalko-Basnet, 2013).

Üreme çağındaki kadınlarda 3-4 g/4 saat sıvı üretilirken menopoz sonrası kadınlarda bu üretim sıvı hacminin yarısına kadar düşmektedir (Leyva-Gómez ve diğerleri, 2018). Östrojen ve cinsel uyarılma vajinal sıvı salgısını artırmaktadır. Servikal mukus, vajinal akıntının önemli bir bileşenidir. Servikovajinal mukus, kadınlarda hayati fizyolojik roller oynar ve su (%90-95), inorganik ve organik tuzlar, iyonlar, müsinler, proteinler, makromoleküller, üre ve yağ asitlerinden (laktik ve asetik asitler), uterus, serviks ve vajinanın epitel hücrelerinden oluşmaktadır (Subi, Nandhakumar ve Vasanthi, 2024; Vermani ve Garg, 2000). Müsinler, daha spesifik olarak makromoleküller, servikal mukusun viskoelastisitesinden sorumludur. Mukus tabakası mikroorganizmaların yapışmasını engelleyebilir ve bakterilerin temizlenmesine aracılık edebilir, bu nedenle “ilk savunma hattı” olarak tanımlanmaktadır (Çizelge 2.1).

Eksojen mikropların kolonizasyonuna karşı vajinal savunma mekanizmalarından birisi de vajinal sıvıda epitel hücrelerden türetilen antimikrobiyal proteinlerdir (Valore, Park, Igreti ve Ganz, 2002). Defensinler, salgı lökosit proteaz inhibitörleri, kalprotektin, lizozim, laktoferrin ve elafin, vajinanın doğuştan gelen bağışıklığında etkili rolleri olan antimikrobiyal peptitlerdir ve vajinanın patojenik ajanlara karşı korunmasında önemli rol oynamaktadırlar (Madanchi, Shoushtari, Kashani ve Sardari, 2020). Bu proteinler doğrudan antimikrobiyal etkiye sahiptir ve konakçıyı patojenlere karşı savunabilir, bazıları ise inflamatuar hücrelerin dikkatini enfeksiyon bölgesine yönlendiren kemotaktik ajan olarak etki ederler.

Çizelge 2.1. Vajinal mukozanın karakteristik özellikleri

Karakteristik Özellik	Vajinal Doku
Uzunluğu	9–12 cm
Yüzey alanı	65–165 cm2
Epitel Tabakası	Çok katlı yassı
Mukus pH	4–5
Mukusun pH tamponlama kapasitesi	Düşük
Mukus hacmi	0,5–1 mL
Mukustaki müsin konsantrasyonu	%1–2

2.1.3. Vajinal flora ve pH

Vajinal mikrobiyota fizyolojik koşulları düzenlemektedir ve herhangi bir değişim durumunda vajinal sağlığı bozularak vajinal enfeksiyonlara ve hastalıklara yol açmaktadır (Subi ve diğerleri, 2024). Vajinal mikrobiyom, hamilelik, menstural döngü, antibiyotikler, hormonlar, kontraseptif preparatlar (oral ve topikal) gibi bazı ilaçlar, ayrıca diyet, stres ve cinsel yolla bulaşan hastalıklara bağlı olarak değişen dinamik ve hassas bir mikroçevredir. Lactobacillus cinsine ait bakteriler tarafından üretilen laktik asit sayesinde vajina asidik bir pH'ya sahip olur. Laktobasiller vajinanın asidik pH'sını (yaklaşık 3,5-5,0) korumaya yarayan laktik asit ve hidrojen peroksit üretmektedir. Bu asidik ortam vajinal enfeksiyonlara karşı koruma sağlar. Normal, sağlıklı bir mikrobiyota, L. crispatus, L. gasseri, L. iners ve L. jensenii dahil olmak üzere çeşitli Lactobacillus türleri tarafından kontrol edilir. Laktobasiller besin maddeleri için vajinada bulunan diğer bakterilerle rekabet eder ve laktik asit salgılayarak çevreyi diğer bakteri ve patojenlere karşı yaşanmaz hale getirir. Bu pH'da,

cinsel yolla bulaşan hastalıklara neden olan bir dizi organizma ve spermler etkisiz hale gelmektedir (Zaneveld ve diğerleri, 2002).

Vajinanın asidik pH'sı patojenlerin çoğalmasına karşı koruyucu bir faktör olarak kabul edilir ve Lactobacillus türlerinin büyümesi için uygundur; dolayısıyla sağlıklı vajinal flora dengesinin hem mekanizması hem de ürünüdür (Leyva-Gómez ve diğerleri, 2018). Vajinadaki fizyolojik asitlik düzeyi değiştiğinde mikrofloraya ait bir veya daha fazla mikroorganizma üremesi artabilir (Perioli, Ambrogi, Pagano, Massetti ve Rossi, 2011). Üremeleri sırasında metabolik bir atık madde üretilir ve bu da vajinal zarlarda iltihaplanma ve tahrişe neden olur. Bu durum, vajinal mikrobiyal ortamın bozulmasına ve vajinal enfeksiyonlara yol açabilir ve bu da cinsel yolla bulaşan hastalıklarının riskini artırmaktadır. Vajinal pH, mikrobiyal patojenlerin neden olduğu olası enfeksiyonların bir göstergesi olarak değişmektedir.

Vajinal epitelin glikojen içeriği siklus boyunca artma veya azalma eğilimi göstermektedir (C. Valenta, 2005). Döngü boyunca östrojen miktarına göre değişmektedir. Menopoz öncesi ve devam eden menopoz döneminde östrojen üretimi azaldıkça vajinal glikojen içeriğinde azalma olmaktadır. Asidofilik organizmaların baskınlıkları azalır ve çeşitli mikroorganizmalar çoğalır.

Ramsey ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada vajinal pH'nın, ilaç taşıyıcı sistemlerinin etkinliğini etkileyen önemli bir parametre olduğu gösterilmiştir (Ramsey, Ogburn Jr, Harris, Heise ve Ramin, 2002). Servikal olgunlaşma/doğum indüksiyonu için hazırlanan dinoproston içeren jelin vajinal pH'dan nasıl etkilendiği incelemişlerdir. Vajinal pH ile doğumun genel ilerlemesi arasında anlamlı bir ters ilişki olduğunu gösterilmiştir. Çalışmada, yüksek vajinal pH'a (>4,5) sahip kadınların, düşük pH'a (≤4,5) sahip kadınlara kıyasla vajinal doğum süreleri anlamlı derecede daha kısa bulunmuştur. Jelin etkinliğinin vajinanın pH'ı ile önemli ölçüde ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

2.1.4. Vajinal mukoadezyon

Biyoadezyon herhangi bir biyolojik ve sentetik yüzey arasındaki yapışmayı tanımlayan genel terimdir. Mukoadezyon ise bir mukoza zarının sentetik bir yüzey ile özel etkileşimini tanımlayan spesifik bir terimdir (Chickering ve Mathiowitz, 1999) Mukoadezyon, sentetik

veya doğal bir polimerin biyolojik dokuya bağlanma yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Cevher, Sensoy, Taha ve Araman, 2008). Oral, bukkal, vajinal, rektal veya oküler uygulama gibi farklı ilaç uygulama yolları için mukoadezif sistemler geliştirilmiştir. Kremler, köpükler, vajinal supozituvarlar ve jeller gibi geleneksel vajinal dağıtım sistemleri aslında uygulama bölgesinde yalnızca kısa bir süre kalır ve etkili ilaç seviyelerinin elde edilmesi için tekrarlanan uygulamalara ihtiyaç duyulur. İlacın uygulama yerinde kalış süresini uzatan mukoadezif formülasyonun uygulanması bu sorunların çoğunu çözerek iyi bir hasta uyumu sunmaktadır.

Mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları: (Pandey, Pal, Singh ve Gupta, 2023)

- Biyoyararlanım: Aktif bileşiklerin kalış sürelerini uzatarak ve ilacın istenilen bölgede salımını kontrol ederek biyoyararlanım arttırabilir. Dozaj formu ile mukoza arasında yakın temas sağlanır ve bunun sonucunda uygulanan dokuda yüksek ilaç geçişi gerçekleşir.
- Hedefleme: Dozaj formunun belirli bir bölgede lokalizasyonu sağlamaktadır.
- Etkinin Hızlı Başlaması: Mukozal membranlardan verilen ilaçlar, karaciğerde meydana gelen ilk geçiş metabolizmasını atlayarak doğrudan kan dolaşımına geçer.
- İnvaziv Olmayan Uygulama: Mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemler tipik olarak invaziv değildir ve uygulanması kolaydır; bu da onları tabletleri yutmakta zorluk çeken veya diğer uygulama yollarını engelleyen başka tıbbi rahatsızlıkları olan hastalar için ideal getirir.

Vajinal ilaç verilişinde kullanılan çok çeşitli dozaj formları olmasına rağmen, vajinadaki mukus ve epitel gibi çeşitli biyolojik bariyerler nedeniyle zayıf ilaç emilimi önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu engellerin üstesinden gelmek ve vajinaya uygulanan ilaçların emilimini arttırmak için mukoadezif özelliğe sahip vajinal ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Xie ve diğerleri, 2023).

Formülasyon bileşenleri ile vajinal mukus ve mukoza tabakası ile etkileşimin artırılması amaçlanmaktadır. Mukusun en önemli unsurları, yüksek derecede glikosilasyon ortaya çıkaran, suda çözünebilen glikoproteinler olan müsinlerdir. Müsin alt birimleri disülfit köprüleriyle bağlanır ve büyük üç boyutlu jel yapıları oluşturmaktadır. Mukoadezif

formülasyonların bileşenleri, hidrojen bağları, van der Waals veya elektrostatik etkileşimler yoluyla müsin ile etkileşime girmektedir.

Potansiyel olarak kullanılacak mukoadezif polimerlerin en önemli özelliği, hidroksil veya karboksil, sülfat ve amin grupları gibi çok sayıda fonksiyonel grupların bulunmasıdır (Osmałek ve diğerleri, 2021). Polimerlerin diğer özellikleri moleküldeki pozitif veya negatif yük içermesi, polimer ve müsin kafeslerinin iç içe geçmesini sağlayan zincir esnekliği ve formülasyonun mukoza üzerinde yayılmasını sağlayan yüzey özelliklerini içermesidir. Mukoadezif vajinal ilaç sistemler, sulu bir ortama yerleştirildiğinde hızla şişebilen ve dolayısıyla kontrollü bir ilaç salımı sergileyen mukoadezif polimerler kullanılarak geliştirilmiştir (Claudia Valenta, Kast, Harich ve Bernkop-Schnürch, 2001). Vajinal olarak en yaygın kullanılan mukoadezif polimerler sentetik poliakrilatlar, polikarbofil, kitosan, selüloz türevleri (hidroksietiselüloz, hidroksi-propilselüloz ve hidroksipropilmetilselüloz), hyaluronik asit türevleri, pektin, kitre, karragenan ve sodyum aljinattır (Acarturk, 2009; Berginc, Suljaković, Škalko-Basnet ve Kristl, 2014; Bilensoy, Abdur Rouf, Vural, Šen ve Atilla Hincal, 2006; Gavini, Sanna, Juliano, Bonferoni ve Giunchedi, 2002; Martínez-Pérez ve diğerleri, 2018; R. Mishra, Joshi ve Mehta, 2016; Teworte, Aleandri, Weber, Carone ve Luciani, 2023).

Mukoadezyon mekanizmasını açıklamak için çeşitli teoriler mevcuttur. Geliştirilen teorik modeller mukoadezif bağı oluşturan çeşitli etkileşimlerin yalnızca sınırlı bir kısmını açıklayabilmektedir:

Islatma Teorisi: Bu teori yüzeye yayılmak için yüzeye ilgi gösteren sıvı sistemlere uygulanır. Bu afinite, temas açısı gibi ölçüm teknikleri kullanılarak bulunabilir. Genel kural, temas açısı ne kadar düşük olursa afinitenin o kadar büyük olacağını belirtir. Yeterli yayılabilirliğin sağlanması için temas açısı sıfıra eşit veya sıfıra yakın olmalıdır. (Boddupalli, Mohammed, Nath ve Banji, 2010; Shaikh, Singh, Garland, Woolfson ve Donnelly, 2011). Yapıştırıcının alt tabakanın yüzeyindeki serbest hareketi, ara yüzeyde mevcut olan yüzey gerilimi etkilerinin üstesinden gelmesi gerektiği anlamına gelmektedir. Islatma teorisi temas açısını ve termodinamik yapışma işini hesaplamaktadır.

Difüzyon teorisi: Difüzyon teorisi, yarı kalıcı bir yapışkan bağ oluşturmak için hem polimer hem de müsin zincirlerinin yeterli derinliğe kadar iç içe geçmesini tanımlamaktadır

(Boddupalli ve diğerleri, 2010). Yapışma kuvveti, polimer zincirlerinin etkileşim derecesi ile artmaktadır. Bu penetrasyon hızı, mukoadezif zincirlerin difüzyon katsayısına, esnekliğine ve yapısına, hareketliliğine ve temas süresine bağlıdır. Etkili bir mukoadezif bağ üretmek için gereken iç içe geçme derinliği 0,2-0,5 μm aralığında olması gerekmektedir.

Adsorpsiyon teorisi: Mukoadezif sistem, van der Waals ve hidrojen bağları, elektrostatik çekim veya hidrofobik etkileşimler gibi ikincil kimyasal etkileşimler yoluyla adezyon sağlamaktadır (Carvalho, Bruschi, Evangelista ve Gremião, 2010; Tangri ve Madhav, 2011). Bu tür kuvvetler, adezyonda en önemli kuvvetler olarak kabul edilmiştir çünkü bireysel olarak zayıf olmalarına rağmen, çok sayıda etkileşim, yoğun bir yapışma sağlamaktadır.

Elektronik teorisi: Biyoadhezif materyalin ve hedef biyolojik materyalin farklı elektronik yüzey özelliklerine sahip olduğu varsayımına dayanmaktadır. Elektronik yapılardaki farklılık nedeniyle adezif polimerin mukus glikoprotein ağı ile teması ile arayüzde elektriksel çift tabaka oluşmaktadır (Khan, Mahamana ve Pal, 2014; Mohite, Patel, Kayande ve Thenge, 2021). İki yüzey birbiriyle temas ettiğinde, elektron transferi meydana gelir ve bunun sonucunda biyoadezif ve biyolojik yüzeyin arayüzünde çift kat elektrik yükü oluşmaktadır. Adezyon, çift tabaka boyunca çekici kuvvetler ve iki yüzeyin ara difüzyonu nedeniyle meydana gelmektedir.

2.2. Vajinal İlaç Uygulaması

1980'li ve 1990'lı yıllarda vajinal ilaç sistemleri geniş çapta ilgi görmüştür. Bugüne kadar vajinal ilaç verilişi için losyonlar, aerosoller, jeller, kremler, supozituvarlar, ovüller ve tabletler gibi çok sayıda topikal dozaj formu önerilmiştir. Vajinal yol ile ilaç uygulamada daha uzun kalış ve tedavi etkinliğinin artırılması için biyoadezif ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Vajinal ilaç uygulaması özellikle cinsel yolla bulaşan hastalıklara karşı korunmada kritik bir öneme sahiptir.

2.2.1. Vajinal uygulanan ilaçların farmakolojik grupları

Vajinal hastalıkların lokal tedavisi uzun yıllardır tercih edilmektedir ve son zamanlarda daha yüksek lokal ilaç konsantrasyonları elde edilmesi ve daha az ilaç etkileşimi ve

gastrointestinal sistem yan etkisine neden olmadığı için oral yaklaşımlara tercih edilmektedir (Palmeira-De-Oliveira, Palmeira-De-Oliveira ve Martinez-De-Oliveira, 2015).

Vajinal uygulama; antibakteriyel, antiprotozoal, antikanser antifungal, antiviral, spermisid, prostaglandin ve steroid gibi lokal olarak etkili ilaçların taşınmasına uygun bir bölgedir (El-Hammadi ve Arias, 2021). Vajinal ürünler tabletler, kapsüller, pesariler ve yarı katılar ticari olarak pazarlanmaktadır.

- Antimikrobiyal: Klorheksidin (Bigucci ve diğerleri, 2015), metronidazol(Tuğcu-Demiröz, Saar, Tort ve Acartürk, 2020), klindamisin, heksetidin (Frey Tirri, 2011), siprofloksasin, norfloksasin ve gentamisin
- Antifungal: Butakonazol, klotrimazol, flukonazol, ekonazol, fentikonazol, itrakonazol, nistatin, terkonazol, ketokonazol, tiokonazol (Ries, 1997; Satora ve diğerleri, 2023)
- Antiprotozoal: Tinidazol (Fernando ve diğerleri, 2019; Kale ve Ubgade, 2013)
- Antikanser: Paklitaksel, sisplatin, karboplatin (Xue Wang ve diğerleri, 2021)
- Prostaglandin: prostaglandin E_2, misoprostol (sentetik prostoglandin)
- Aşılar, Antijenler ve Gen Tedavisi: Human papilloma virüs, HIV (VanBenschoten ve Woodrow, 2021)
- İdrar tutamama durumunda kullanılan ilaçlar: Oksibütinin (Norton ve Brubaker, 2006; Tuğcu-Demiröz, Acartürk ve Erdoğan, 2013)
- Peptit ve Proteinler: İnsülin (Sabbagh, Muhamad, Niazmand, Dikshit ve Kim, 2022), gonadotropin salan hormon (Wen, Tseng ve Wang, 2006), salmon kalsitonin
- Steroidler: Progesteron (M. Roy ve diğerleri, 2020) ve estradiol (Santen, 2015)
- Spermisitler: Nonoksil-9 (Van Damme ve diğerleri, 2002)

Çizelge 2.2. Vajinal uygulanan ilaçların farmakolojik gruplarına örnekler

Farmakolojik Grup	İlaç	Dozaj Şekli	Hastalık	Referans
Antimikrobiyal	Klindamisin	İn-situ jel	Bakteriyel vajinozis	(P. Patel ve Patel, 2015)
Antiprotozoal	Tinidazol	İntravajinal polimerik matris	Trichomoniyaz	(Fernando ve diğerleri, 2019)
Prostaglandin	Prostaglandin E2	Pesari	Doğum indüksiyonu	(Majoko, Zwizwai, Nyström ve Lindmark, 2002)
Prostaglandin	Misoprostol	Jel	Servikal Olgunlaşma	(F. C.-K. Chen, Bergann, Kroße, Merholz ve David, 2008)
Antifungal	Mikonazol	Mikrosünger jel	Vajinal Kandiyazis	(Salah, Awad ve Makhlouf, 2018)
Antimikrobiyal	Metronidazol	Nanopartikül	Bakteriyel vajinoz	(Nayak ve diğerleri, 2024)
Antikanser	Paklitaksel	Katı lipit nanopartikül	Servikal Kanser	(Büyükköroğlu, Şenel, Başaran, Yenilmez ve Yazan, 2016)
Antikanser	Kamfoterisin	Nanopartikül	İntravajinal tümör	(Blum ve diğerleri, 2011)
Steroid	17β-estradiol	İntravajinal halka	Menapoz	(Woolfson, Elliott, Gilligan ve Passmore, 1999)
Aşı	Protein Ovalbumin	Vajinal disk	Model antijen	(Kuo-Haller, Cu, Blum, Appleton ve Saltzman, 2010)
Aşı	HIV-1	Polistiren nanoküre süspansiyonu	HIV bulaşı	(Kawamura ve diğerleri, 2002)
Antimikrobiyal	Benzidamin	İn-situ jel	Vajinit	(Tuğcu-demiröz, 2017)

2.2.2. Vajinal ilaç absorpsiyonu

Vajinal ilaç uygulaması intravajinal yol ile vajinal epitelyuma veya vajinal mukozadan transvajinal yol ile uterus ve sistemik dolaşıma olmak üzere iki şekilde gerçekleşir (N. Dobaria, Mashru ve Vadia, 2007). Vajinal ilaç taşıyıcı sistemler, lokal veya sistemik olarak etki etme yetenekleri açısından zayıf fizikokimyasal özelliklere sahip ilaçlar için umut verici ve potansiyel olarak önemli bir rol oynamaktadır. Sistemik ilaç uygulamasında, çeşitli biyolojik (anatomik faktörler, biyokimyasal ve mikroçevresel koşullar) ve fizikokimyasal zorluklar (suda zayıf çözünürlük, terapötik ilacın yüksek moleküler ağırlığı ve hedeflenen kontrollü ilaç salımına ulaşmadaki zorluk) ilaçların sistemik verilişini etkilemektedir (Subi ve diğerleri, 2024).

İlacın vajinal ilaç taşıyıcı sistemlerden emilmesi; ilacın vajinal lümen içinde çözünmesi ve membran penetrasyonu şeklinde gerçekleşmektedir. İlacın çözünmesini ve membran

taşınmasını etkileyen herhangi bir biyolojik faktör veya formülasyon faktörü, vajinal ilaç taşıyıcı sistemlerden emilim profilini etkilemektedir.

Diğer mukozal uygulama yolları gibi, vajinal yolla uygulanan ilaçlar:

- Hücreler boyunca konsantrasyona bağlı difüzyon yoluyla transselüler olarak,
- Sıkı bağlantıların aracılık ettiği paraselüler olarak
- Veziküler veya reseptör aracılı taşıma yoluyla emilmektedir (Hussain ve Ahsan, 2005).

Anatomik açıdan bakıldığında vajina geniş bir yüzey alanına ve yoğun bir kan damarına sahiptir. Vajinal duvarlarında yeterli sistemik dolaşıma yardımcı olan bir ağ bulunmaktadır. İç iliyak arter, orta rektal, uterin ve iç pudental arterlerden uzanan bir arter pleksusu vajinaya kan akışını sağlamaktadır ve vajinadan emilen ilaç venöz pleksus yoluyla dolaşıma geçerek daha sonra internal iliyak vene doğru hareket etmektedir (Subi ve diğerleri, 2024). Geniş yüzey alanı hem sekresyona hem de emilime yardımcı olan epitelyal mukozadaki rugae kıvrımlarından kaynaklanmaktadır. Emilen ilaçlar venöz pleksusa geçer, bu da internal iliak damarlara boşalır, ardından hemoroidal damarlara gelir ve sonunda periferik dolaşıma akar, böylece dolaşımdaki ilaçların seviyeleri ve etkileri artmaktadır.

İlacın vajinal yoldan emilmesinde çok çeşitli faktörler ve süreçler rol oynar. Vajinal doku yüzeyi genişlemeye uyum sağlamak için oldukça kıvrımlıdır ve karın içi basınç nedeniyle çöküntü şeklindedir (Shapiro ve diğerleri, 2024). Vajinal uygulamayı takiben ilacın emilim hızı ve kapsamı, hastanın yaşına, vajinal fizyolojiye, menstural siklusa ve çeşitli formülasyon parametrelerine bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir (Layek ve Das, 2021). Anatomik ve fizyolojik parametrelerde özellikle epitelyal kalınlıktaki değişiklikler ergenlik, hamilelik, menopoz ve menstrüel sikluslarda meydana gelir ve vajinal dozaj formları geliştirirken dikkate alınmalıdır (Machado, Palmeira-De-Oliveira, Martinez-De-Oliveira ve Palmeira-De-Oliveira, 2013).

2.2.3. Vajinal ilaç verilişinin avantajları ve dezavantajları

Vajinal ilaç verilişinin avantajları: (Bilensoy ve diğerleri, 2006; Bilensoy, Çırpanlı, Şen, Doğan ve Çalış, 2007; Bonferoni ve diğerleri, 2008; Chore ve Dighade, 2020; de Araujo

Pereira ve Bruschi, 2012; El-Hammadi ve Arias, 2021; Layek ve Das, 2021; Tho ve Škalko-Basnet, 2024)

- Geniş spesifik yüzey alanı,
- Yüksek vaskülasrizasyon ve kan geçişi,
- Uygulama kolaylığı,
- Dozaj formunun hastanın kendi kendine yerleştirilebilmesi ve çıkarılabilmesi,
- Hedeflendirilmiş sistemler (uterusa hedefleme),
- Kontrollü/sürekli salım,
- Lokal/sistemik etki,
- Hepatik toksisitenin önlenmesi,
- Gastrointestinal enzimatik bozunmaya karşı korunması
- Oral uygulamayla ilişkili yan etkilerin engellenmesi
- Hepatik ilk geçiş etkisinin önlenmesi olarak sıralanabilir.

Vajinal yol ile uygulama bu avantajlarından dolayı pek çok ilacın lokal uygulanmasında tercih edilmektedir. Vajinal uygulama özellikle uterusa hedeflenen etkin maddeler için de potansiyel bir veriliş yoludur. Kadınlarda genital sistemin hijyenini sağlamak ve özellikle postmenapozal dönemde sıklıkla rastlanan vajinal kuruluğun giderilmesi için hazırlanan formülasyonların uygulanması açısından vajinal yol önem taşımaktadır.

Vajinal uygulamanın pek çok avantajı olmasına rağmen bazı dezavantajları bulunmaktadır. Vajinal ilaç dağıtımındaki en büyük zorluk, düşük kalış süresi, sızıntı, dağınıklık ve ilacın permeasyonunu sınırlayan mukus bariyerinin bulunmasıdır (Chatterjee, Kumar, Bhowmik ve Gupta, 2011; Mirza ve diğerleri, 2016). Ayrıca, vajinal uygulama sadece kadınlara özgüdür.

Vajina da dahil olmak üzere mukozal bölgelerin yüzeyi, moleküler ve partikül geçirgenliği/taşınmasına karşı en katı engeli oluşturan keratinize olmayan epitel içermektedir. Bu bariyer hem küçük moleküllere (örneğin su ve iyonlar) hem de mikroorganizmalar, spermatozoa veya nanopartiküller gibi büyük moleküler yapılara karşı seçici geçirgenlik göstermektedir (Vanić, Jøraholmen ve Škalko-Basnet, 2021).

Vajina uygulanan ilaçların etkinlikleri, vajinal duvar boyunca zayıf geçirgenlik ve vajinal kanaldan hızlı bir şekilde uzaklaştırılmaları nedeniyle oldukça sınırlıdır, ayrıca hormonların varlığından da etkilenmektedir. İlaç taşıyıcısının vajinadan hızla uzaklaştırılmasını önlemek için çoklu ve sık uygulamalara gerek duyulmaktadır, bu da ilaç yan etkilerinin artmasına ve hasta uyuncunun azalmasına yol açmaktadır (ALI IBRAHIM ve diğerleri, 2012; Chindamo, Sapino, Peira, Chirio ve Gallarate, 2021).

Vajinal ilaç uygulamasında menstural döngü ve menopoz sonrası dönemde epitel kalınlığında meydana gelen değişiklikler ilaç emilini etkilemektedir (Claudia Valenta ve diğerleri, 2001). Postmenopozal kadınlarda azalan epitel kalınlığı ilaçların orijinal emilim oranlarını artırabilmektedir. Bu yüzden ilaç etkinliklerinde değişikler gözlenebilmektedir.

2.2.4. Vajinal ürünlerin kabul edilebilirliği

Vajinal yol ile uygulanan ürünlerin geliştirmede önemli konulardan birisi de kullanıcıların tercihleri ve kabul edilebilirliği ile ilgilidir. Kabul edilebilirlik, kişiyi ürünü kullanmaya istekli kılar, ürüne yönelik olumlu bir tutum sergilemesine neden olur. Hasta uyumunu ve etkinliğini etkileyen ana faktör olarak kabul edilebilirlik, vajinal ürünlerin doğru ve tutarlı kullanımını etkilemektedir. Vajinal ürünlerin kabul edilebilirliği kullanım kolaylığı, uygulama şekli, etkinliği, duyusal özellikleri ve olası yan etkileri gibi birçok faktöre bağlıdır (Z. Yang ve diğerleri, 2024).

İdeal vajinal ilaç dağıtım sistemlerinin kullanımı kolay olmalı, kendi kendine uygulama yapmaya uygun olmalı, günlük hayata minimum etkisi olmalı, ağrısız uygulama sağlamalı, uygun maliyetli olmalı ve sürekli uygulama için güvenli olması gerekmektedir (J Das Neves ve Bahia, 2006).

Özellikle vajinal nanosistemlerin özelliklerinin korunmasının veya ideal olarak geliştirilmesini garanti etmek için uygun tasarım ve karakterizasyon çok önemlidir (Mesquita, Galante, Nunes, Sarmento ve das Neves, 2019). Kadınların beklentilerini karşılayan ürünlerin tutarlı bir şekilde kullanılması ve dolayısıyla uygun koruma veya etki sağlaması beklenmektedir. Bireysel yaşam tarzlarına ve durumlara daha iyi uyum sağlayan ürünler ön plana çıkmaktadır.

Formülasyon, aplikatör ve ambalajlama gibi faktörler de kullanım sırasında uyumun sağlanmasında belirleyicidir. Kullanılan yardımcı maddelerin biyouyumluluğu ve tolere edilebilirliği, özellikle vajinal mukoza hasar gördüğünde, mukozal lezyonlarla ilişkili mikrobiyal veya viral patolojilerin tedavisinde kullanıldığında dikkat edilmesi gerekmektedir (Caramella, Rossi, Ferrari, Bonferoni ve Sandri, 2015).

Çeşitli vajinal rahatsızlıklar için birden fazla tedavi seçeneği bulunmaktadır. Düşük serum estradiol düzeyine sahip kadınların, daha yüksek estradiol düzeyine sahip kadınlara kıyasla vajinal kuruluk, disparoni ve cinsel aktivitede azalma yaşama olasılıkları daha yüksektir. Vajinal tabletler, halkalar ve kremler vajinal atrofi tedavisinde endikedir ve FDA orta-şiddetli postmenopozal disparoniyi tedavi etmek için düşük dozda konjuge östrojen kremini onaylamıştır. Düşük dozda vajinal östrojen kullanımının vajinal atrofi semptomlarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir ve endometrial güvenlik açısından vajinal preparatlar arasında anlamlı bir fark görülmemektedir. Kadınlar, mevcut tedavi seçeneklerinin potansiyel yararları ve riskleri konusunda bilgilendirilmeli ve sağlık hizmeti sağlayıcılarının yardımıyla, bireysel ihtiyaçlarına ve koşullarına en uygun ürünü seçmelidir (Krychman, 2011).

Vajinal ürünler için güvenlik verileri, gerekli maruziyet süresini içermelidir. Enfeksiyonları ve diğer akut koşulları tedavi etmeye yönelik formülasyonlar için akut toksisite verileri gerekirken, mikrobisidal ve diğer koruyucu ürünler ise uzun süreli kullanım için tasarlanmıştır ve bu nedenle kronik toksisite verileri gerekmektedir.

2.3. Cinsel Yolla Bulaşan Enfeksiyonlar (CYBE)

Vajina, bakteri, maya, virüs ve parazitlerin neden olduğu çeşitli inflamasyon veya enfeksiyonlardan etkilenmektedir. Vajinal enfektif hastalıklar, farklı yaş gruplarındaki ve değişen küresel, coğrafi konumlardaki kadınları değişken şekilde etkileyen protozoal enfeksiyonlar da dahil olmak üzere birincil ve ikincil bakteriyel, viral, fungal ve paraziter enfeksiyonlardan oluşan bir spektrumu kapsamaktadır (Pratistadevi K. Ramdial, 2013). Hastalık spektrumu, hastaların altta yatan bağışıklık durumundan da etkilenmektedir.

CYBE, korunmasız cinsel temas yoluyla bir kişiden diğerine bulaşan patojenlerin neden olduğu çeşitli klinik sendromları içermektedir. Bu hastalıkların yüksek insidansı ve

komplikasyonlarına bağlı olarak ağır hastalık yükü nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir halk sağlığı sorunudur (Beyazgul, Koruk ve Koruk, 2024). Cinsel temas yoluyla bulaşan 30'dan fazla bakteri, virüs ve parazit olduğu bilinmektedir. Genital doku, cinsel yolla bulaşan patojenlerin başlıca giriş kapısıdır ve mukozal bağışıklık ile patojenlere karşı savunma sağlanabilmektedir (VanBenschoten ve Woodrow, 2021). Cinsel yolla bulaşan hastalıkların yaygınlığı büyük ölçüde bölgeye ve cinsiyete bağlıdır (Thakur ve diğerleri, 2023a). 2016 yılında yaklaşık 1 milyon hamile kadının aktif Frengi hastası olduğu ve bu durumun 200.000 ölü doğum veya yenidoğan ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Yeni doğanlarda CYBE'nin dikey bulaşması nedeniyle düşük doğum ağırlığı, zatürre, konjenital deformiteler gibi olumsuz sonuçlar gözlenmektedir. Ergenlik dönemindeki riskli cinsel davranışlar, istenmeyen hamileliğe, HIV riskine ve diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklara sebep olmaktadır (Wilkins ve diğerleri, 2022).

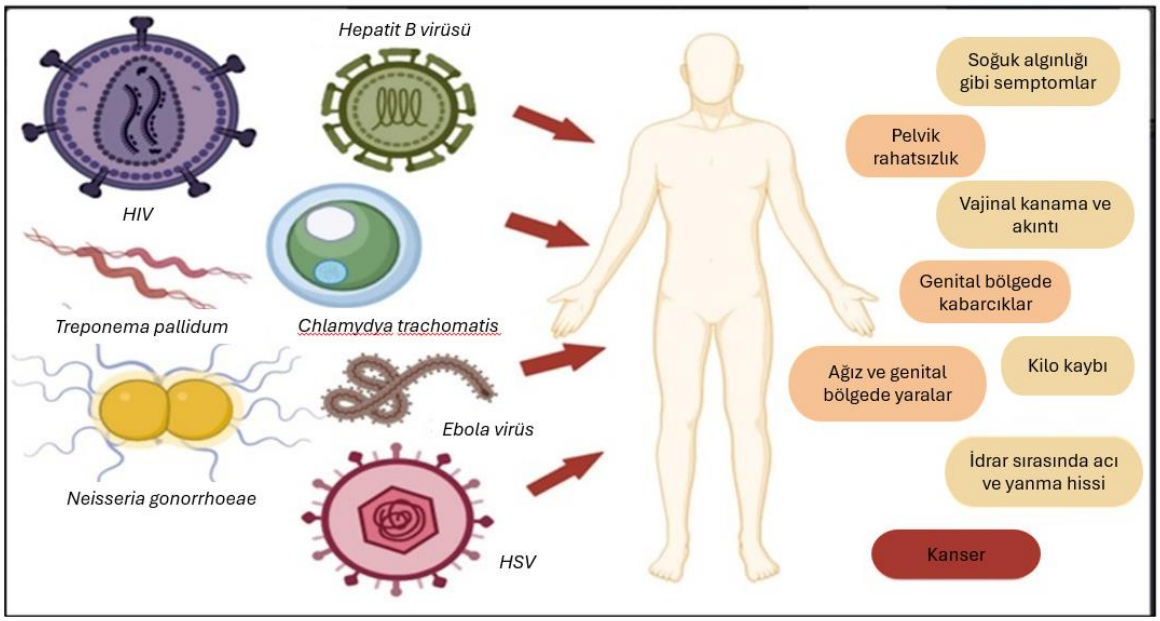
Virüsler, bakteriler, mantarlar, parazitler, protozoalar ve hatta eklembacaklılar cinsel yolla bulaşan hastalıkların etkenleri olabilmektedir (Thakur ve diğerleri, 2023b). Üreme sistemi boyunca ilerleyen ve tubal inflamasyona ve hasara neden olabilen tedavi edilmemiş cinsel yolla bulaşan hastalıklar infertilitelerin gelişmesine neden olmaktadır (Tsevat, Wiesenfeld, Parks ve Peipert, 2017).

CYBE'lerin önlenmesi ve kontrolü: (Workowski, 2021)

- Cinsel davranışlardaki değişiklikler ve önerilen korumaların kullanımı yoluyla CYBE'lerden kaçınmanın yolları konusunda risk altındaki kişilerin eğitimi ve danışmanlığı,
- Aşıyla önlenebilir CYBE'ler için temas öncesi aşılama,
- Asemptomatik enfeksiyonu olan kişilerin ve CYBE ile ilişkili semptomları olan kişilerin belirlenmesi,
- CYBE ile enfekte kişilerin etkili teşhisi, tedavisi, danışmanlığı ve takibi,
- CYBE ile enfekte kişilerin seks partnerlerinin değerlendirilmesi, tedavisi ve danışmanlığının yapılması ile sağlanacaktır.

Cinsel yolla bulaşan hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde ana stratejiler eğitim ve danışmanlıktır. En iyi koruyucu önlem, kondomun yararları konusunda toplumu bilgilendirmektir. Hem istenmeyen hamilelikten korur hem de CYBE'lerin yayılmasını da

etkili bir şekilde engeller (Wihlfahrt ve diğerleri, 2023). CYBE'lere sıklıkla damgalanma ve utanç eşlik etmektedir ve bu durum bireyleri tedavi görmekten ve durumlarını açıklamaktan alıkoymaktadır (Pair ve Somerall, 2024). Sağlık hizmeti ortamlarının tedaviye ulaşma durumunu etkilemekte ve hatta enfekte bireylerin tedavi için partnerlerini yönlendirmelerini engellemektedir (A. S. D. Lee ve Cody, 2020). Birinci basamak sağlık hizmeti sağlayıcıları, hasta katılımını teşvik eden güvenli bir ortam oluşturma konusunda ilk konumdadır. Hastaların tedaviye katılım eksikliği, dışlanmış hastaların (lezbiyen, gey, biseksüel ve transseksüel) CYBE taramasına erişmesini engellemekte ve bu da olası tedavi edilmemiş CYBE'ler ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Cinsel yolla bulaşan hastalıkların türleri ve belirtileri (Thakur ve diğerleri, 2023a).

2.3.1. İnsan immun yetmezlik virüsü (HIV)

HIV yaklaşık 100 nm çapında zarflı bir virüstür. Virüs genetik materyal olarak pozitif polariteli iki adet birbirinin kopyası olan RNA'ya sahiptir. HIV, viral protein p24 ve glikoproteinler gp120 ve gp41 içeren bir kapsid ile çevrelenmiş tek sarmallı RNA'dan oluşan bir virüstür (Gillespie, Paul, Chinen ve Shearer, 2013). HIV, Retroviridae familyasındaki Lentivirus cinsine aittir. Latince "lente" yavaş anlamına gelmektedir. Virüsün vücutta ilerleyişi yavaş gerçekleştiği için bu isim verilmiştir. Konakçıdan oluşturulan zar, nükleokapsid ve üç yapısal gen içeren RNA formundaki genetik materyalden oluşmaktadır

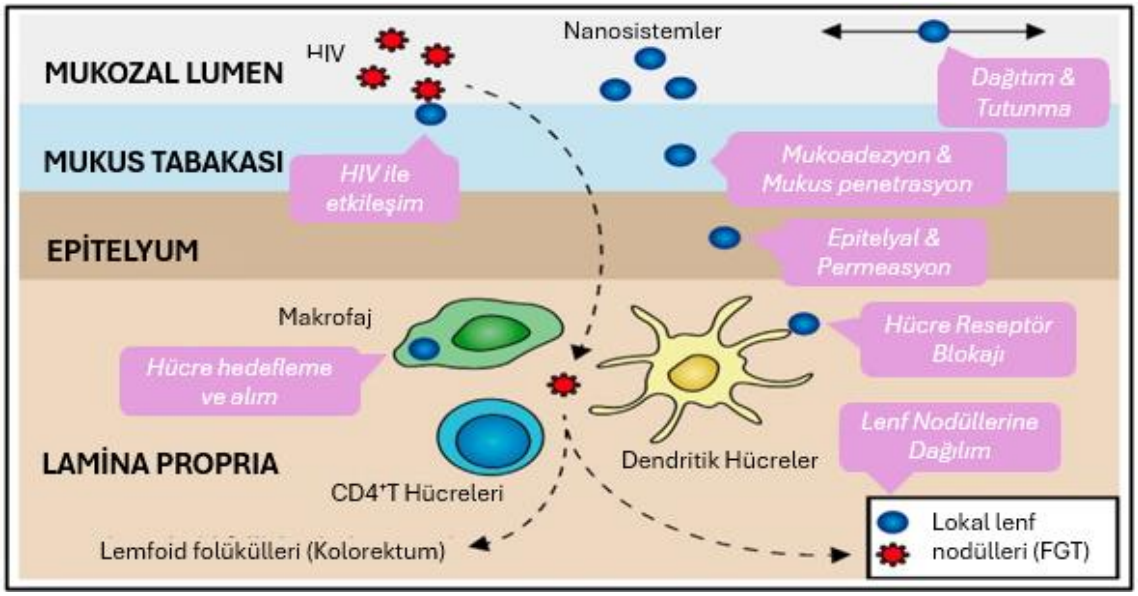
(Sosnik ve Amiji, 2010). Retroviruslar gibi revers transkriptaz (RT) enzimine sahiptir. Bu sayede replikasyon ile RNA'sının çift zincirli DNA şeklinde kopyasını çıkarmaktadır.

HIV, tanımlanan farklı 10 türü bulunmasına rağmen, yalnızca HIV-1 ve HIV-2 insanları enfekte edebilmektedir (Makuku ve diğerleri, 2022). Genetik ve serolojik olarak HIV-1 ve HIV-2 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. HIV-1, daha öldürücü ve bulaşıcı olmasının yanı sıra Avrupa, Amerika ve Orta Afrika'da mevcut olan birincil enfeksiyondur (Popović-Djordjević ve diğerleri, 2022). HIV-1; N, O ve M olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır; sonuncu tip ise dokuz alt türe ayrılmıştır: A-D, F–H, J ve K. Bunlar arasında alt tip C, Güney Afrika'daki HIV enfeksiyonlarının yaklaşık %95'inden sorumludur. HIV-1, HIV-2'den daha patojendir ve AIDS'e neden olan birincil etkendir. HIV-1 patojenitesi, daha yüksek bulaşma oranlarını ve hastaların daha hızlı klinik ilerlemesini yansıtmaktadır.

HIV, kedileri (kedi immün yetmezlik virüsü), koyunları (visna virüsü), keçileri (keçi artrit ensefalit virüsü) ve insan olmayan primatları (simian immün yetmezlik virüsü, SIV) enfekte eden hayvan lentivirüsleriyle genetik ve morfolojik benzerliklere sahip bir lentivirüs olarak sınıflandırılmaktadır (Gupta ve Jain, 2010).

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), T yardımcı hücreleri (CD4+) ve makrofajlar gibi hayati hücreleri enfekte ederek insanların bağışıklık sistemine saldırmaktadır (Şekil 2.3). Lentivirüsler genellikle yavaş, ilerleyici, nörodejeneratif etkilere ve ölüme ek olarak konakçılarında immün yetmezliğe neden olmaktadır.

Bulaşmanın önlenmesinde ve viral baskılamayı başarmak için tedavide ilerlemelere rağmen, yıllık HIV insidansı küresel hedeflerden birkaç kat daha fazla olmaya devam etmektedir (VanBenschoten ve Woodrow, 2021)



Şekil 2.3. Mikrobisit geliştirmede nanoteknoloji tabanlı sistemlerin potansiyel etki mekanizmaları (Mesquita ve diğerleri, 2019)

Edinilmiş immun yetmezliği sendromu (AIDS)

Tedavi edilmeyen HIV enfeksiyonları, ölümcül olan edinilmiş bağışıklık yetersizliği sendromuna (AIDS) ilerlemektedir (Hauck, Giri, Gao ve Chan, 2010). AIDS, HIV enfeksiyonunun en ileri aşamasıdır. AIDS, geçen yüzyılın en yıkıcı salgınlarından biridir. Bağışıklık hücrelerini yok ederek, kişinin bağışıklık sistemini ve diğer fırsatçı enfeksiyonlarla savaşma yeteneğini önemli ölçüde zayıflatmaktadır. HIV'in, yüksek mutasyon oranına sahip olması tedaviyi ve tanıyı zorlaştırmaktadır. Virüs, 35 yıl önceki ilk tanımından bu yana 75 milyondan fazla insana bulaşmış ve 40 milyondan fazla insanı ölümüne sebep olmuştur.

HIV, CD4+ hücrelerine zarar vererek T-yardımcı hücre bağışıklık sorunlarına neden olmaktadır. Bağışıklık sisteminin zayıflaması ile mantarlara, virüslere, mikobakterilere ve parazitlere karşı savunma zayıflamaktadır. AIDS ise CD4+ T lenfosit sayısı 200 hücre/mL'nin altına düştüğünde kullanılan terimdir.

HIV bulaşma yolları

HIV kan, semen, vajinal sıvı ve anne sütü ile temas yoluyla bulaşabilmektedir (Hauck ve diğerleri, 2010). HIV'i kontrol altına almanın en iyi yöntemi enfeksiyonları hızla tespit etmek ve bulaşmayı durdurmaktır.

Cinsel yol ile bulaş

HIV'in cinsel yolla bulaşı, HIV ile enfekte olmuş hücrelere ve/veya mukozal sekresyonlar veya menideki bulaşıcı virüse maruziyet ile gerçekleşmektedir (Shattock ve Moore, 2003).

Cinsel yolla bulaşan hastalıklar, HIV'in hem bulaşma olasılığını hem de HIV'e duyarlılığı artırmaktadır (Galvin ve Cohen, 2004). Cinsel yolla bulaşan hastalıklar, mukozal bozulma, genital sistemdeki bağışıklık değişiklikleri ve genital sistem mikroçevresi üzerindeki etkiler yoluyla duyarlılığı artmaktadır.

HIV'in vajinal bulaşında, primer HIV enfeksiyonunun önce tek katmanlı kübik epitel hücreleriyle kaplı endoservikste meydana geldiği düşünülmekteydi ancak histerektomi yapılmış kadınlar ve serviksi olmayan makakların, HIV veya simian immün yetmezlik virüsü (SHIV) ile enfekte olabildiği; dolayısıyla HIV'in vajinanın katmanlı skuamöz epiteline geçebildiği gözlenmiştir (VanBenschoten ve Woodrow, 2021).

HIV'in vajinal bulaşında, vajinal epitelde enfeksiyon için hedeflenen hücrelerin bulunduğu lamina propriaya erişimde zorlu bir bariyer oluşturan çok sayıda hücre katmanının varlığı gibi doğuştan gelen fiziksel engeller bulunmaktadır. Bu etki, adet döngüsünün foliküler ve yumurtlama aşamalarında, progesterondaki azalmaya bağlı olarak epitelyal kalınlaşmaya yol açtığı durumlarda artmaktadır. Ayrıca, servikovajinal mukusun HIV moleküllerinin hareketliliğini bozduğu gösterilmiştir. Bu doğuştan gelen savunma mekanizmalarına rağmen, sağlam bir vajinal epitelyum üzerinden çok sayıda olası bulaşma yolu vardır.

HIV'ın mukozal temasından sonra hücresel hedefleri, aktifleştirilmiş CD4+ T hücreleri, dendritik hücreler ya da makrofajlardır (Shattock ve Moore, 2003). Vajina ve rektumun sağlam epitel tabakası aktive edilmiş CD4 ve CCR5 eksprese eden ve olgunlaşmamış Langerhans hücrelerini içermektedir. Genital dentritik hücreler subepitelyal tabaka içinde yer alır ve integrin olmayanı yakalayan dendritik hücreye özgü, hücre içi yapışma molekülü

olarak bilinen yüzey yapışma molekülünü eksprese edebilen güçlü antijen sağlayan hücrelerdir. Bu molekül, dendritik hücrelerin yokluğunda HIV virüsünü bağlamaktadır. Bu durum, dendritik hücre aktivasyonunu, olgunlaşmasını ve dentritik hücreler ile ilişkili antijenlerin submukoza ve/veya bölgesel lenf düğümlerine göçünü indüklemektedir (Fox ve Fidler, 2010).

Diğer cinsel yolla bulaşan hastalıklarla birlikte enfeksiyon, epitel zayıflaması ve immünojenik T hücresi toplanması yoluyla vajinal HIV enfeksiyonuna duyarlılığı da artırabilir. Vajinal mukoza, sistemik HIV enfeksiyonu için etkili bir giriş bölgesidir.

Prezervatif kullanımı ve davranışsal müdahaleler cinsel HIV bulaşmasını azaltsa da bu önlemlerin toplum düzeyinde kabul edilmesi HIV bulaşının azalmasında yetersiz kalmıştır (Fox ve Fidler, 2010)

Perinatal yol ile bulaş

Perinatal HIV bulaşması HIV'li doğum yapan bir ebeveynden hamilelik, doğum veya emzirme sırasında çocuğuna HIV bulaşmasına perinatal HIV bulaşması denir (HIV ınfo). Bebeklerin çoğunluğu doğum sırasında enfekte olmaktadır (McGowan, 2000). Doğum sırasında annenin HIV-1 plazma viral yükü dikey bulaşmanın en önemli belirleyicisidir. Bu nedenle bulaşmayı durdurmak için antiretroviral tedavinin kullanımına odaklanılmıştır.

Perinatal HIV enfeksiyonu olan çocukların morbiditesi ve hayatta kalması büyük ölçüde ne zaman ve nerede doğduklarına bağlıdır (Flynn ve Abrams, 2019). Antiretroviral ilaçların kullanımı, perinatal HIV enfeksiyonunu ölümcül bir hastalıktan kronik bir sağlık durumuna dönüştürmüştür.

Kan ve kan ürünleri ile bulaş

Kan nakli hayat kurtarabilir ancak aynı zamanda HIV enfeksiyonu ve viral hepatit gibi zararlı bulaşıcı hastalıkların vektörü de olabilmektedir (Dongmo, Nsagha, Zofou, Njunda ve Joseph, 2020). Dünya çapında kan nakliyle bulaşan enfeksiyonları azaltmaya yönelik önemli çabalara rağmen HIV kan yoluyla bulaşabilmektedir.

Madde kullanan kişiler enjektörlerini, iğnelerini paylaşabildikleri için önemli bir risk grubunu oluşturmaktadırlar (Tümer ve Ünal, 2001). Kontamine enjeksiyon başına bulaşma riski üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır.

İğnelerin alıcılar arasında kullanımında dezenfekte edilmesinin daha muhtemel olduğu iğne batmasında bulaşma riski, intravenöz olmayan tıbbi enjeksiyonlara göre daha derin ve daha fazla sıvı içeren intravenöz enjeksiyonlardan kaynaklanan riskten daha düşük olabilmektedir (Baggaley, Boily, White ve Alary, 2006).

HIV tedavi seçenekleri

HIV, insandan insana cinsel ilişki, vücut sıvıları yoluyla veya enfekte bir kişiden diğerine parenteral ve perinatal yolla bulaşmaktadır (Makuku ve diğerleri, 2022). İlk kez 1981 yılında ortaya çıkan HIV/AIDS salgını, sadece 10 yıl içinde ilerleyerek 1 milyonu ABD'de olmak üzere dünya çapında 10 milyon insanı etkileyen bir hastalığa dönüşmüştür. HIV tedavi edilemeyen bir hastalık olduğu için amaç antiretroviral tedavi ile plazmadaki viremiyi klinik testlerin tespit limitlerinin altındaki seviyelere kadar baskılamaktadır (Esteban-Cantos ve diğerleri, 2024). Çalışmalar HIV tedavisinin HIV bulaşmasını önlemedeki etkinliğini ortaya koymuştur; hastalar saptanamayan bir viral yüke ulaştığında neredeyse ortadan kaldırılmaktadır (Sued, Figueroa ve Cahn, 2016). Virolojik baskılama, HIV bulaşmasını, bağışıklık sisteminin bozulmasını ve AIDS'e ilerlemeyi önleyerek sağlıklı yaşam süresini uzatmaktadır ancak birçok yan etkisi bulunmaktadır. HIV'in hücrelerde kalıcı olması tedavi için önemli bir engel oluşturmaktadır. HIV korkusu, erkeklerle seks yapan erkekler, damar içi uyuşturucu kullanıcılarına, seks işçilerine ve göçmenlere karşı damgalanmayı ve ayrımcılığı artırmıştır (Sued ve diğerleri, 2016).

Antiretroviral tedavi

Günümüzde antiretroviral (ARV) tedavi güçlü, kullanışlı ve genellikle iyi tolere edilen bir tedavidir; tedavinin başlamasından sonraki birkaç hafta içinde HIV kan konsantrasyonunu saptanamayan değerlere düşürerek güçlü ve sürekli bir CD4 T hücresi kazanımı sağlamaktadır (Palmisano ve Vella, 2011). 1987 yılında azidotimidin HIV/AIDS tedavisinde kullanılması onaylanmıştır ancak klinik yararlılığı ilişkili toksisiteler ve direncin ortaya çıkması nedeniyle kullanımı ciddi şekilde sınırlanmıştır.

Antiretroviral laçların sınıflandırılması, viral yaşam döngüsünde inhibe ettikleri basamağa göre veya kimyasal yapılarına göre yapılabilir (Palmisano ve Vella, 2011). HIV infeksiyonunda tedavi, artan bilgi birikimi ve ilaç sayısı nedeniyle gittikçe daha karmaşık bir hale gelmektedir. Tedavide kullanılan ilaçların yan etkileri vardır, uygulanan şemalar komplekstir ve en önemlisi tedavinin uygunsuz yapılması direnç gelişimine neden olmaktadır.

Nükleosid analog inhibitörleri, HIV'e karşı kombinasyon tedavisinin omurgasını oluşturur ve herpes, hepatit B ve hepatit C gibi viral enfeksiyonlarla mücadelede başarılı olmuştur (Schinazi, Patel ve Ehteshami, 2022). Nükleosid analog ters transkriptaz inhibitörleri, trifosforile NRTI üzerinde 3'-hidroksil grubunun bulunmamasından dolayı viral RNA'ya bağımlı DNA sentezinin zincir sonlandırıcıları olarak görev yapmaktadır.

Çizelge 2.3. Klinikte kullanılan antiretroviral ilaçların sınıflandırılması (Volberding ve Deeks, 2010; Nayan vd., 2023; (Enggi ve diğerleri, 2021).

Nükleosid ve nükleotid ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI'ler)	Nükleosid olmayan ters transkriptaz inhibitörleri (NNRTI'ler)	İntegraz inhibitörleri	Proteaz inhibitörleri	Giriş (CCR5) inhibitörleri	Füzyon inhibitörleri
Tenofovir Abakavirr Zidovudin Stavudin Lamivudin Emtrisitabin	Efavirenz Nevirapin Etravirin Rilpivirin	Raltegravir Elvitegravir Dolutegravir	Fosamprenavir Atazanavir Darunavir Lopinavir Sakinavir Ritonavir	Maravirok	Enfuvirtid

Yüksek etkili antiretroviral tedavi (HAART)

Günümüzde en çok kullanılan tedavi şekli HAART'dir. HAART ilk olarak 1996 yılında uygulanmaya başlanmıştır. Bu yöntem HIV enfeksiyonu için birkaç antiretroviral ilacın kombine olarak kullanıldığı bir terdavi şeklidir. Amacı viral yükü ölçülemeyecek seviyeye kadar indirmektir. Başka bir deyişle AIDS etkisini olabildiğince geciktirmektir. Birçok yan etkisi olmasına karşın şu an HIV infeksiyonuna karşı kullanılan en başarılı tedavi yöntemlerden biridir.

HAART'ın başarısı, yeni nesil ARV bazlı önleme stratejilerinin geliştirilmesi için bir paradigma sağlayarak, güçlü ve geniş çapta aktif inhibitörlerin bir kombinasyonunun, HIV bulaşmasına karşı üstün koruma sağlaması ve ilaç direncinin ortaya çıkma olasılığını azaltmaktadır. Virüs replikasyonunu konakçı hücrede baskılayarak gelişmiş ülkelerde AIDS'in yayılımını büyük ölçüde azaltmıştır (Asvadi, Dang, Davis-Poynter ve Coombes, 2013).

İlaç kombinasyonları, kullanıldığında benzersiz ilaç-ilaç aktivitesi mekanizmalarını kolaylaştırarak, tek başına kullanılan ajanların antiretroviral aktivitesini önemli ölçüde artırmaktadır (Chaowanachan, Krogstad, Ball ve Woodrow, 2013). HIV tedavisinde, kombinasyon antiretroviral ürün, viral replikasyon döngüsündeki birden fazla mekanizmayı hedefleyerek veya daha yüksek antiviral aktivite sağlayarak ilave veya sinerjistik etkiler yoluyla, birincil ilaç direncinin sık görüldüğü ortamlarda düşük etkililiğe önleyebilir ve dirençli türlere karşı daha geniş kapsamlı aktivite sağlayabilir (Murphy ve diğerleri, 2018). Nükleosit ters transkriptaz inhibitörleri, HIV enfeksiyonunun sistemik tedavisi için HAART tedavisinin önemli bileşenlerindendir. Örneğin, ilacı metabolize eden enzimlerin veya efflux taşıyıcı sistemlerinin inhibisyonunun sağlayan ilaçların sakinavir ile kombinasyon halinde kullanıldığında ritonavirde olduğu gibi ya da FTC veya efavirenz (EFV) ile kombinasyon halinde tenofovirdeki (TFV) gibi kombinasyonları geliştirilmiş virolojik tepki sağlamaktadır. Bununla birlikte, ilaçlar arasında fizikokimyasal uyumsuzluklar nedeniyle tüm ARV ilaçları uygun kombinasyon sağlanamayabilir.

Profilaksi yöntemleri

AIDS hastalarının sayısı çok fazla ve yeni enfekte olan hastalar hızla arttığı için AIDS'in önlenmesi ve kontrolü zorunlu bir gereklilik olmuştur. Önleme veya tedavi amaçlı ilaçlara yüksek düzeyde uyum, birçok insan için önemli, çoğu zaman ulaşılamayan bir zorluktur (Krovi, Johnson, Luecke, Achilles ve van der Straten, 2021). AIDS'in tüm bulaşma yolları arasında cinsel yolla bulaşma hâlâ HIV enfeksiyonunun en önemli bulaş yoludur. HIV vücuda girdikten sonra atılamayan bir virüs olduğu için vücutta HIV yayılımının ve bağışıklık sisteminin kontrol altına alınarak tedavi edilmesi önem kazanmaktadır. Güvenli ve etkili bir profilaktik ilaç ile AIDS'in cinsel yolla bulaşmasını azaltmak AIDS'in önlenmesi için zorunlu hale gelmiştir.

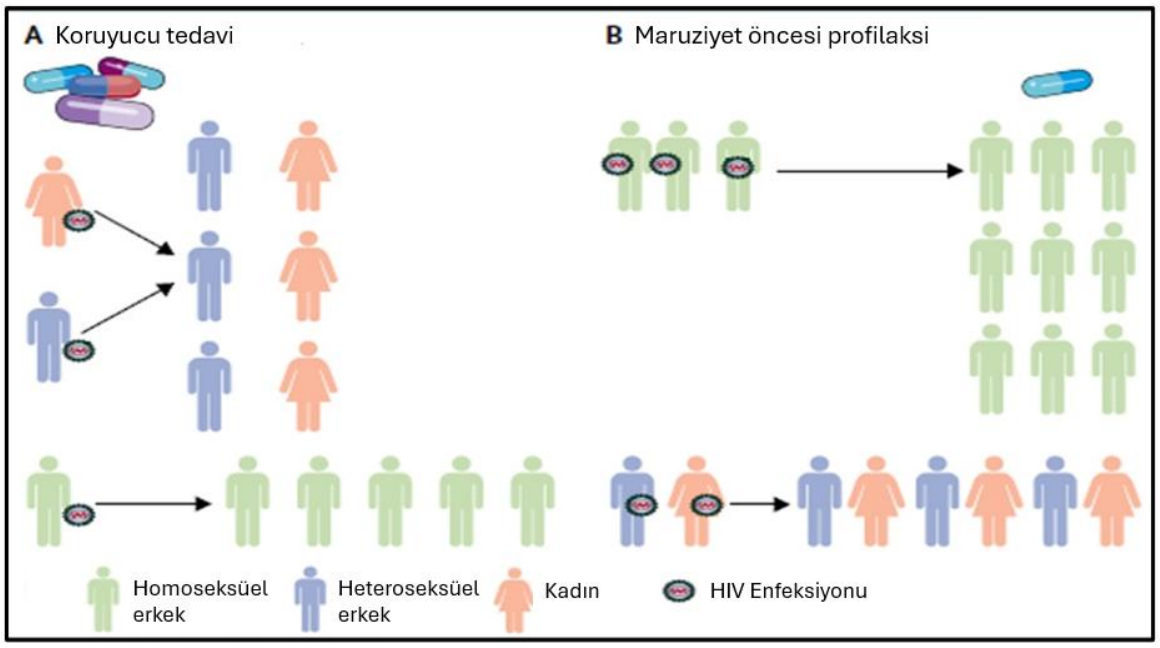
Sistemik oral HAART tedavisinde geleneksel olarak kullanılan çeşitli nükleosid ters transkriptaz inhibitörleri (NRTI) ve NRTI olmayanlar (NNRTI), şu anda 'spesifik' topikal vajinal mikrobisitler olarak değerlendirilmektedir (Asvadi ve diğerleri, 2013).

Maruziyet öncesi profilaksi (PrEP)

PrEP ürünleri, HIV önleme seçeneklerinin sunulmasına yönelik toplum merkezli yaklaşımlarla birleştirilirse salgının sona erdirilmesinde etkili olacaktır. Bu potansiyelin anahtarı, HIV'den korunmaya ihtiyaç duyan kişilerin farklı ihtiyaçlarını karşılayabilecek bir ürün geliştirmektir. HIV'e maruz kalma öncesi profilaksi (PrEP), ilk kez 2012 yılında Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylandı ve HIV enfeksiyonunu önlemede oldukça etkilidir (Carter-Davis ve Seymour, 2024).

HIV'e maruziyet öncesi profilaksi için antiretroviral tedavi kombinasyonunun kullanımı önerilmektedir. Bununla birlikte, çoğu oral antiretroviral ilacın biyoyararlanımı düşük olması yan etkileri ve yüksek tedavi maliyetlerinin olması profilaktik etkinin büyük ölçüde azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle yan etkileri azaltacak ve ilacın biyoyararlılığını artıracak yeni ilaç dağıtım sistemlerinin bulunması acil bir ihtiyaçtır. Topikal olarak vajinal yol ile uygulanan PrEP, sistemik ilaç maruziyetini en aza indirirken vajinal mukozada hızlı bir profilaktik ilaç seviyesi başlangıcı sağladığından, oral PrEP'ten daha etkili olduğu değerlendirilen bir uygulamadır (Darwesh, Helmy, Abdelhakk, Giri ve Maniruzzaman, 2024).

İnsanlarda yapılan klinik araştırmalardan elde edilen raporlar, HIV'in cinsel yolla bulaşmasını önlemek için PrEP stratejisi olarak oral ve topikal uygulanan antiretroviral ilaçların potansiyel yararlılığını desteklemektedir (José das Neves ve diğerleri, 2013).



Şekil 2.4. a.) Koruyucu tedavi b) Maruziyet öncesi tedavi (Ghosn, Taiwo, Seedat, Autran ve Katlama, 2018)

HIV pozitif bireylerin baskılayıcı antiretroviral tedavi ile tedavi edilmesi, HIV negatif cinsel partnerlerini HIV enfeksiyonuna yakalanmaktan koruma amacıyla yapılmaktadır. HIV pozitif cinsel partnerlerden viral bulaşmayı önlemek için HIV negatif bireylere maruziyet öncesi antiretroviral profilaksi uygulanması ise maruziyet öncesi profilaksi ile sağlanmaktadır. (Şekil 2.4)

PrEP'e yönelik kullanıcı talebini arttırmak için araştırılan iki ana yaklaşım vardır: İlacın kullanım süresini arttırmak veya çok işlevli ve birden fazla kullanıcı ihtiyacını karşılayan ürünler geliştirmektir (J. T. Clark ve diğerleri, 2014). Birçok farmasötik ürün türünde kullanıcının uyumu ve doz süresinin pozitif olarak ilişkili olduğu gözlemlenmiştir.

PrEP alımındaki eşitsizliklere rağmen, HIV'in önlenmesi için PrEP'in genel kullanımında önemli ilerleme kaydedilmiştir (Carter-Davis ve Seymour, 2024). 2017'de PrEP'ten yararlanabilecek kişilerin yalnızca %13'üne reçete yazılırken; bu oran 2021'de %30'a çıkmıştır. PrEP kullanımındaki artış ve test ve tedavideki gelişmeler, 2017'den 2021'e kadar 13 ila 24 yaş arası erkeklerle seks yapan erkeklerde %12 oranında HIV enfeksiyonu oranlarının düşmesine katkı sağlamıştır.

Maruziyet sonrası profilaksi

Maruziyet sonrası profilakside (Post-exposure prophylaxis, PEP), HIV'i önlemek için olası maruziyet sonrasında 72 saat (3 gün) içinde HIV ilaçlarının alınması gerekmektedir. Mevcut kılavuzlar, HIV'e maruz kaldıktan sonraki 36-72 saat içinde 28 günlük bir ART kürünü önermektedir (Sultan, Benn ve Waters, 2014).

Mesleki bir maruziyet, enjekte ederek uyuşturucu kullanımı veya cinsel maruziyet sonrasında HIV'e yakalanma riskinin ortalama <%0,1 ile %3 arasında değişmektedir. Kaynağın plazma HIV-RNA'sının yüksek olması her bir maruz kalma riskini artırmaktadır. Bireyin, cinsel yolla bulaşan diğer hastalıklar ve mukoza zarının yırtılması gibi diğer faktörler, daha yüksek HIV bulaşma riskiyle ilişkilidir (Registration ve diğerleri, 2002). Hesaplanan riske dayanarak PEP önerilmelidir (Marfatia, Jose, Baxi ve Shah, 2017).

Maruziyet sonrası profilaksi yalnızca acil durumlarda kullanılmalıdır. HIV'e maruz kalabilecek kişilerin düzenli kullanımı amaçlanmamıştır. Maruziyet sonrası profilaksi, maruziyet öncesi profilaksi (PrEP) gibi diğer HIV önleme yöntemlerinin düzenli kullanımının yerine kullanılmamaktadır (Organization, 2018).

Mikrobisit formülasyonları

Vajinal olarak uygulanan topikal mikrobisitlerin kullanımı, CYBE'ların yayılmasını azaltmak için ilgi çekici bir yaklaşımdır (Mngadi ve diğerleri, 2014).

Mikrobisit geliştirilmesinde, iyi uyumu kolaylaştırabilecek dozaj formlarına odaklanılmıştır. İlk nesil topikal mikrobisitler cinsel ilişki öncesi kullanılan jellerdi; daha sonra, uygulanmaları gereken süre konusunda daha fazla esnekliğe sahip, perikoital veya günlük kullanıma yönelik ARV'leri içeren jeller üzerinde yoğunlaşmıştır (Devlin, Nuttall, Wilder, Woodsong ve Rosenberg, 2013). Nonoksinol-9 içeren ticari olarak temin edilebilen spermisitlere odaklanan ilk topikal mikrobisitleri, HIV, HSV ve *Chlamydia trachomatis* dahil olmak üzere CYBE patojenlerine karşı in vitro olarak aktif olduğu gösterilmiştir (Bourne, Zaneveld, Ward, Ireland ve Stanberry, 2003). Nonoksinol-9 yüzey aktif maddesi ve asidik özellikteki maddeler gibi spesifik olmayan mikrobisitler, sırasıyla virüs zarf proteinlerini çözerek ve vajinanın doğal savunma asidik pH'ını 3,5-4,5 aralığında tutarak etki

etmektedir (Asvadi ve diğerleri, 2013). Nonoksil-9 içeren surfaktan tipi çalışmaların çoğu kadınları HIV enfeksiyonuna karşı korumakta başarısız olmuştur aynı zamanda bazıları plasebo ürünüyle karşılaştırıldığında HIV enfeksiyon oranlarını gerçekten artırdığı için bu ürünler mikrobisit üretimi için tercih edilmemiştir (Malcolm, Boyd, McCoy ve Murphy, 2016).

Viral giriş inhibitörleri monoklonal antikorlar, ters transkriptaz inhibitörleri, iyonik yüzey aktif maddeler, dendrimerler, sülfatlanmış ve sülfonatlanmış polimerler, çinko tuzları, safra tuzları ve monoklonal antikorların topikal kullanımının da HIV bulaşmasını önlemede etkili olabileceği gösterilmiştir. Virüs girişi/füzyon inhibitörlerinin, elektrostatik etkileşim yoluyla virüs zarf proteinlerine (HIV'de gp120 ve gp141) bağlandıkları, böylece virüsün genital alt mukozal bölgedeki hedef hücrelere girişini önlemektedir (T. Xiao, Cai ve Chen, 2021). Galaktoza bağlı polisakkaritlerin (karragenan) vajinal formülasyonlarının, fareleri HSV enfeksiyonundan koruduğu, servikal epitel hücrelerindeki HIV enfeksiyonunu bloke ettiği ve HIV ile enfekte makrofajların vajinadan lenf düğümlerine geçişini bloke ettiiği bilinmektedir.

Polianyonik dendrimerler son zamanlarda daha umut verici adaylar olarak ortaya çıkmıştır; Oligomerik kısımları (örn. naftalen disülfonat) kesin konfigürasyonlarına sahip L-lizinden yapılmış olup, viral zarf proteinlerine yüksek afiniteli bağlanmaktadır. Bu tür nanoyapılar, vajinal jel formülasyonunda uygulandığında maymun-insan immün yetmezlik virüsüne (SHIV) karşı güçlü antiviral aktivite sergilemiş ve herpes simpleks virüsüne (HSV-2) karşı koruma sağlamıştır.

Mikrobisitler HIV'e spesifik (giriş, integraz, füzyon ve revers transkriptaz inhibitörleri) veya non-spesifik olarak sınıflandırılabilir (Akil ve diğerleri, 2011) Mikrobisitler, vajinal epitel hücreleri, spermatozoa ve hastalığa neden olan patojenler üzerindeki etkilerine dayanarak genel olarak sitotoksik ve sitotoksik olmayan olarak da sınıflandırılabilmektedir (Garg ve diğerleri, 2005).

Vajinal mikrobisitler

Kadınlar sınırlı ekonomik seçenekler ve cinsiyet eşitsizliği nedeniyle cinsel ilişkileri güvenli bir şekilde konuşamamakta ve istenmeyen gebelik ve HIV de dahil olmak üzere cinsel yolla

bulaşan enfeksiyonlara karşı savunmasız kalmaktadır (Cutler ve ark., 2008). Kullanımı pahalı ve kullanılışsız olan kadın kondomu dışında kadının kontrolünde başka bir korunma yolu bulunmamaktadır. Uzun yıllardır evrensel koruma olarak erkek prezervatifi seçeneğine sahip olan erkekler gibi kadınlar da acilen evrensel hayat kurtarıcı koruma aracına (mikrobisitlere) ihtiyaç duymaktadırlar (Omar ve Bergeron, 2011). HIV tedavi edilemeyen bir hastalıktır ve kadınlarda görülme sıklığı daha fazladır, bu nedenlerden dolayı HIV virüs bulaşının önlenmesi amacıyla özellikle kadınların kullanacağı önleme stratejileri olarak vajinal mikrobisitler önemli bir ihtiyaçtır.

Mikrobisitler, HIV'in önlenmesinde umut verici bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Mikrobisitler, HIV ve potansiyel olarak diğer zarflı virüslerin yanı sıra *Chlamydia trachomatis* ve *Treponema pallidum* gibi cinsel yolla bulaşan patojenlerin neden olduğu enfeksiyonu önlemek veya azaltmak için kadınlar tarafından vajina içinde topikal olarak kullanılabilen kimyasal maddelerdir. Mikrobisitler, cinsel ilişki sırasında vajinaya biriken patojenleri etkisiz hale getirmektedir. Mikrobisitler, kadınların kontrol edebileceği bir önleme yöntemi sağlamaktadır.

Geliştirilmekte olan vajinal mikrobisitler, HIV'in cinsel yolla bulaşmasını azaltarak sağlık üzerinde önemli bir etki sağlamaktadır (Mandal, Prathipati, ve diğerleri, 2017). HIV bulaşması esas olarak vücudun her yerindeki mukozal yüzeylerde meydana gelir; kadınlar için en yaygın enfeksiyon yolu vajinal bulaşmadır (VanBenschoten ve Woodrow, 2021). Vajinal HIV bulaşmasını önlemek, özellikle düşük ve orta gelirli bölgelerde ve ilaca dirençli viral türlerde artışların yaşandığı ülkelerde kadınlar ve çocuklar üzerinde çok büyük etkileri bulunmaktadır.

Vajinal ilaç verilişine ilişkin araştırmaların çoğu HIV enfeksiyonunun ve cinsel yolla bulaşan hastalıkların önlenmesine odaklanmaktadır.

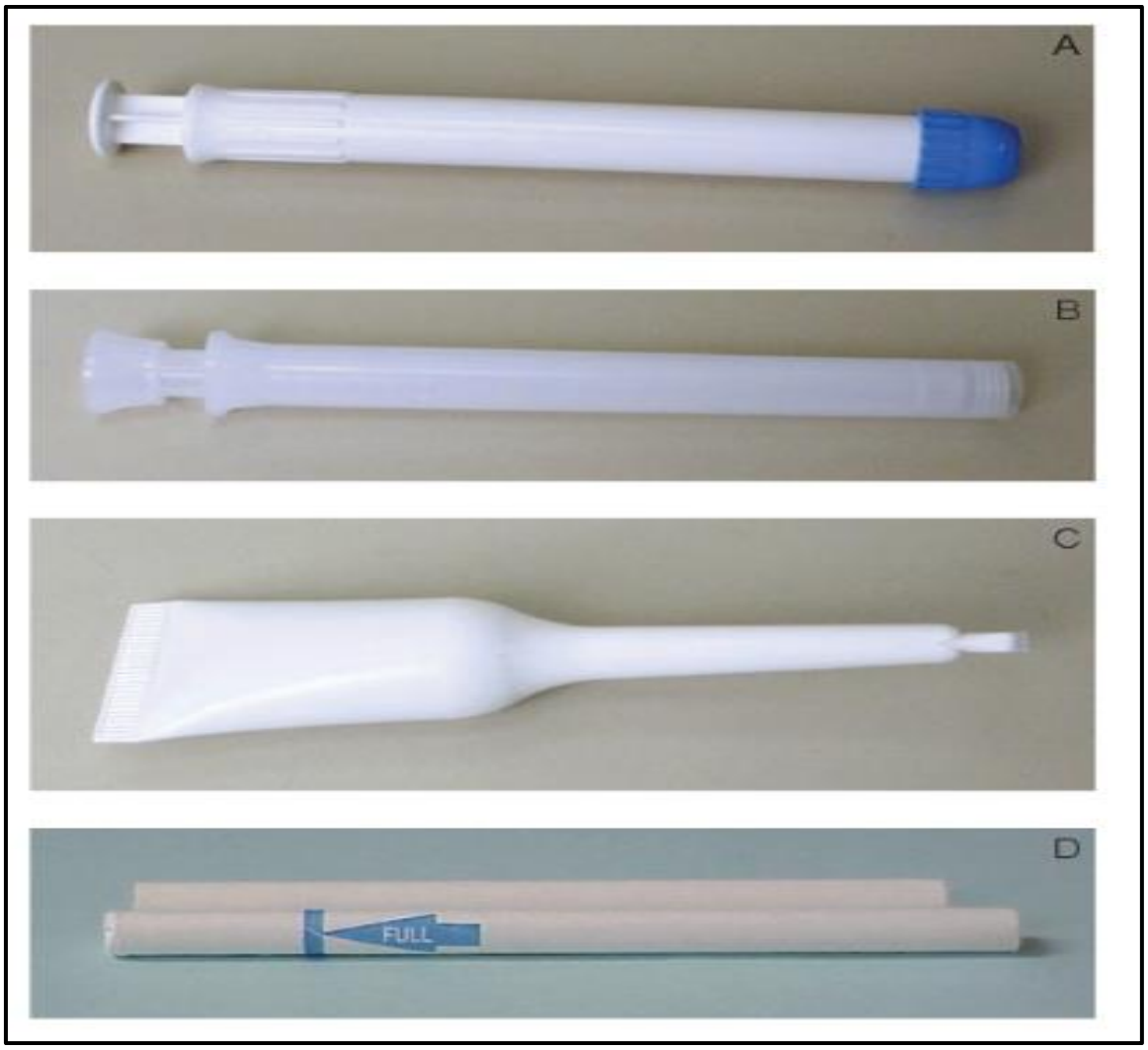
Antiretroviral ilaçların ya da çeştli mikrobisit maddelerin vajinal ilaç taşıyıcı sistem olarak nanolifler ile uygulanması, HIV'in önlenmesinde çeşitli avantajlar sağlamaktadır: (Blakney, Ball, Krogstad ve Woodrow, 2013).

- Gizli uygulama ve kadın kontrollü bir yöntemdir.
- Çok çeşitli ajanları sunmak için kullanılabilmekte ve birden fazla ilacın birleştirilmesi için kompozitler halinde üretilebilmektedir.
- Hem perikoital hem de sürekli kullanım sağlar.
- İlaçların hızlı ve sürekli salımı sağlar.
- Elektroçekimin endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılması için seri üretime yönelik altyapı oluşturulmuştur.
- Kullanıcı merkezli tasarım sağlayarak çeşitli geometriler ve mekanik özellikler sağlamaktadır.

HIV'in önlenmesi amacıyla topikal vajinal film formülasyonlarını üzerinde de çalışmalar yapılmıştır. Özellikle antiretroviral ilaçları içeren vajinal filmler HIV virüsünün cinsel yolla bulaşmasını önlemek amacıyla geliştirilen etkili vajinal mikrobisitlerdir (Notario-Pérez ve diğerleri, 2019). Filmler antiretroviral ilaçları tekli veya kombine halde içerebilmektedir.

Vajinal halkaların çeşitli klinik endikasyonlar için piyasada bulunmasına rağmen, mikrobisit içeren vajinal halkaların önünde pek çok büyük zorluk bulunmaktadır (Malcolm, Edwards, Kiser, Romano ve Smith, 2010). Vajinal ilaç verilişinde lipozomlar teknolojik nanomikrobisitlerin geliştirilmesinde daha az değerlendirilmişlerdir (Wu ve diğerleri, 2018).

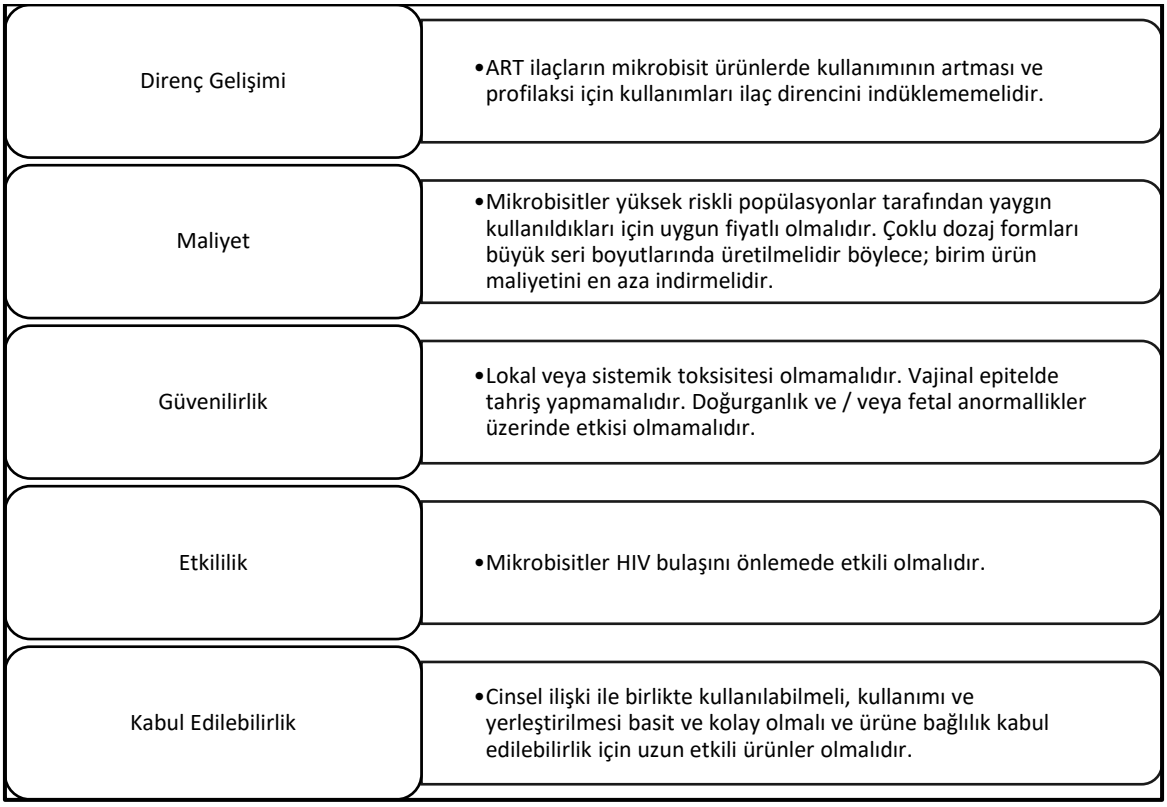
Vajinal jelin vajinaya doğru ve tutarlı bir şekilde uygulanması için bir aplikatör gerekmektedir (Friend, 2010). Mikrobisit alanında kullanılan aplikatörler genellikle iki farklı tipte olmaktadır: (1) piston önceden doldurulmuş veya tek kullanımlık ve yeniden kullanılabilir aplikatör veya (2) tek kullanımlık sıkma tüpleri şeklinde olabilir. Bu ürünlerde kullanılan plastikler yüksek yoğunluklu polietilen ve yüksek yoğunluklu polipropilen ya da düşük yoğunluklu polietilen (Micralax®) içermektedir. Bu aplikatörlere örnekler aşağıdaki Resim 2.1'de gösterilmiştir.



Resim 2.1. Vajinal uygulamada kullanılan aplikatörlere örnekler, a) Tek kullanımlık b) Çoklu kullanımlık c) Tek kullanımlık Micralax® d) TekPak tek kullanımlık kağıt vajinal aplikatörlerin fotoğrafları.

Kullanıcının ihtiyaçlarını karşılamanın ve uyumu iyileştirmenin bir yolu olarak, geçmişte hem vajinal hem de rektal kullanım için çift bölmeli mikrobisit formülasyonlarının geliştirilmesi çalışılmıştır (Çizelge 2.4). Böyle bir strateji aynı zamanda nanoteknoloji bazlı mikrobisitlerin geliştirilmesi açısından da ilgi çekici olabilmektedir. Çünkü nanosistemler viral bulaşmaya karşı hem vajinal hem de rektal koruma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, iki anatomik bölge arasındaki fizyolojik farklılıklar, ikili kullanıma uygun ürünlerin tasarlanmasını zorlaştırmaktadır. HIV için kullanılacak ürünlerde kullanıcılar açısından kabul edilebilirlik, uyumluluk, kullanıcı tercihi belirlenirken erkek ya da kadınların sosyal, kültürel ve davranışsal faktörler dikkate alınmalıdır (Woodsong ve ark., 2015).

HIV'in önlenmesinde iyi in vitro profiller sergileyen bir dizi vajinal ürün, in vivo etkinlik göstermede başarısız olmuştur. Bu durum, klinik deneylerdeki zayıf kullanıma bağlı bulunmuştur. Bu nedenle, klinik deneylerde test edilen bazı ürünlerin klinik güvenliği ve potansiyel etkinliği hala bilinmemektedir. Sosyal ve davranışsal araştırmalar, kadınların bu ürünleri neden kullanıp kullanamayacağına ve ürünün onların ihtiyaç ve tercihlerini karşılayacak şekilde nasıl geliştirilebileceğine dair önemli bilgiler sağlamaktadır. HIV için geliştirilirilen mikrobisitlerin hedeflenen popülasyonda kabul edilebilirliği, ürün uyumu ve dolayısıyla ürün etkinliği açısından önemlidir. Mikrobisit kullanıcılarının kişisel tercihlerini karşılamak için birden fazla uygulama yönteminin gerekli olacağı öngörülmektedir. Nel ve arkadaşları, farklı ülkelerden vajinal tablet, film ve yumuşak jel kapsül kullanan kadınlarda kabuledilebilir ilaç şeklinin hangisi olduğunu değerlendirmişlerdir (Nel, Mitchnick, Risha, Muungo ve Norick, 2011). Her üç dozaj formu da ankete katılan kadınlar için kabul edilebilir olduğu ve tercih edilen dozaj formları ülkeye göre değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Bu veriler, mikrobisitlerin çoklu dozaj formlarının etkinliği artırabileceğini göstermektedir. Mikrobisit formülasyonlarının kabul edilebilirliği artırması için çeşitli özellikleri taşıması gerekmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Mikrobisit formülasyonlarının taşıması gereken özellikler (Woodsong ve Holt, 2015)

Kullanılan konvansiyonel dozaj şekillerinin çeşitli dezavantajları vardır. Vajinal jeller günlük kullanım için uygundur ancak fizikokimyasal olarak çeşitli ilaçların verilişinde sınırlamaları vardır. Vajinal jeller kullanıldığında uygulama yerinden damlama, yayılma veya sızma gibi sorunlar gözlenebilmektedir (Blakney ve diğerleri, 2013). Vajinal tabletler kolayca üretilir ancak çözündükten sonra vajinal boşlukta kalıntı bırakabilir. Vajinal halkalar, sürekli salımlı dozaj şeklidir ve katı dozaj formu olarak gelişmiş ürün stabilitesine sahiptir, ancak imalatı nispeten karmaşık ve pahalıdır. Vajinal filmler fizikokimyasal olarak çeşitli ilaçların verilişi için uygundur ancak bu ürünlerde de düşük yükleme miktarından dolayı yeterli dozlama sorunu yaşanabilir. Vajinal filmler, uygulama ve kullanım sırasında tahriş neden olabilecek keskin kenar ve köşelerden kaçınmak için kontrol edilmeleri gerekmektedir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2021).

Çizelge 2.4. Vajinal olarak uygulanan mikrobisit formülasyonları

Etkin Madde	Polimer	Dozaj Şekli	Yapılan Çalışmalar	Referans
Kabotegravir	Pluronics®, hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC), Carbomer	Termosensitif ve mukoadezif jel	Jeller fiziksel özellikleri, ısıya duyarlılıkları ve mukoadesif özellikleri, in vitro ve ex vivo dağılım davranışları ve in vivo iritasyon çalışmaları değerlendirildi.	(Enggi ve diğerleri, 2021)
Dapivirin	PCL, PEO	Polimerik Nanopartikül	Nanopartiküllerin karakterizasyonu, kolorektal ve servikovajinal dokularda permeasyonu ve retansiyonu, toksisitelerinin incelenmesi	(José das Neves ve diğerleri, 2013)
Sakinavir mesilat	mPEG-PL(L)GA kopolimer	Nanopartikül içeren hidrojel	Nanopartiküllerin karakterizasyonu, reolojik özelliklerin incelenmesi ve salım çalışmaları	(Tiboni ve diğerleri, 2023)
Atazanavir sulphate Fluoksetin HCl	Eudragit® S100	Nanopartikül içeren jel	Laktobasil canlılığının değerlendirilmesi, lateks uyumluluğu, anti-HIV aktivitesi ve spermisit etkisi in vitro hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmiş, murin modellerinde in vivo nanopartikül tutulma çalışmaları	(Fernandes ve diğerleri, 2023)
4-etinil-2-floro-2-deoksiadenozin	PVA HPMC	Film	Filmlerin istenilen özellikte üretilmeleri için deney tasarımı ile optimize edilerek fizikokimyasal özellikler, in vitro sitotoksisite, epitelyal bütünlük, in vitro ve ex vivo permeabilite ve biyoaktivite testleri	(W. Zhang, Parniak, Sarafianos, Cost ve Rohan, 2014)
Dapivirine Drunavir	Silikon	Vajinal Halka	Vajinal halkalardan ilaç salımı, halka büyüklüğünün etkisinin incelenmesi, makakalarda farmakokinetik çalışmalar	(Murphy ve diğerleri, 2018)
Dapivirin Levonorgestrol	Silikon	Vajinal Halka	Vajinal halkaların mekanik özellikleri, kopma uzaması, reolojik özelliklerin incelenmesi, ilaç içeriğinin belirlenmesi	(Dallal Bashi ve diğerleri, 2021)
Efavirenz Ritonavir	PVP, HPMC, PVA, Kitozan	3D Baskılı Kısa Nanolif/Hidrojel	Morfolojik özellikleri, mekanik özellikleri ve ilaç salım profillerinin incelenmesi	(Darwesh ve diğerleri, 2024)

Çizelge 2.4. (devam) Vajinal olarak uygulanan mikrobisit formülasyonları

Etkin Madde	Polimer	Dozaj Şekli	Yapılan Çalışmalar	Referans
Etravirin	PLGA (nanopartikül), PVA, PVP	Nanopartikül içeren nanolif	Nanopartiküllerin karakterizasyonu, morfolojilerinin incelenmesi, in-vivo farmakokinetik çalışmalar	(Krogstad ve diğerleri, 2017)
Dapivirin Metronidazol	Silikon	Vajinal Halka	Vajinal halkaların mekanik özellikleri, kopma uzaması, ilaç içeriğinin belirlenmesi, modifiye edilmiş zamana bağlı etkinlik testi	(Zhao ve diğerleri, 2023)
Biktegravir	Pullulan	Nanomisel yüklü Vajinal Film	Anyonik polimerin sentezi, polimerin yapısal karakterizasyonu, in-vitro sitotoksisite ve membran bütünlüğü deneyi, epitel bütünlüğü testi, yapısal kristal özellikleri, in vitro salım çalışmaları, Anti-HIV aktivitesi ve hücre canlılığı çalışmaları	(Vartak ve diğerleri, 2022)
Efavirenz	PVA Karagenan	Nanomisel yüklü vajinal film	Çözünürlük çalışmaları, in vitro sitotoksisite ve membran bütünlüğü deneyi, filmlerin fizikokmyasal ve morfolojik karakterizasyonu, in-vitro salım çalışmaları, Anti-HIV aktivitesi çalışmaları, membran bütünlüğü ve epitel bütünlüğü çalışmaları	(Patki ve diğerleri, 2020)
Etonogestrel Etinil estradiol İslatravir	Silikon poliüretan	3D Baskılı vajinal halka	Koyunlarda in vitro salım, stabilite, vajinal mikrobiyom uyumluluğu değerlendirilmiş, farmakokinetik ve güvenlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir.	(Young ve diğerleri, 2023)
Raltegravir Efavirenz	PLGA (nanopartikül), Pluronic F127® Pluronic F68®	Nanopartikül içeren jel	Hücre kültürü çalışmaları, nanopartikül morfolojik karakterizasyonu, İn vitro sitotoksisite, Anti-HIV aktivitesi, hücre içi salım ve floresan nanopartiküllerden salım ile hücre içi salımının incelenmesi	(Date ve diğerleri, 2012)

Nanolif vajinal mikrobisitlerin geliştirilmesi son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Chaowanachan ve diğerleri, 2013).

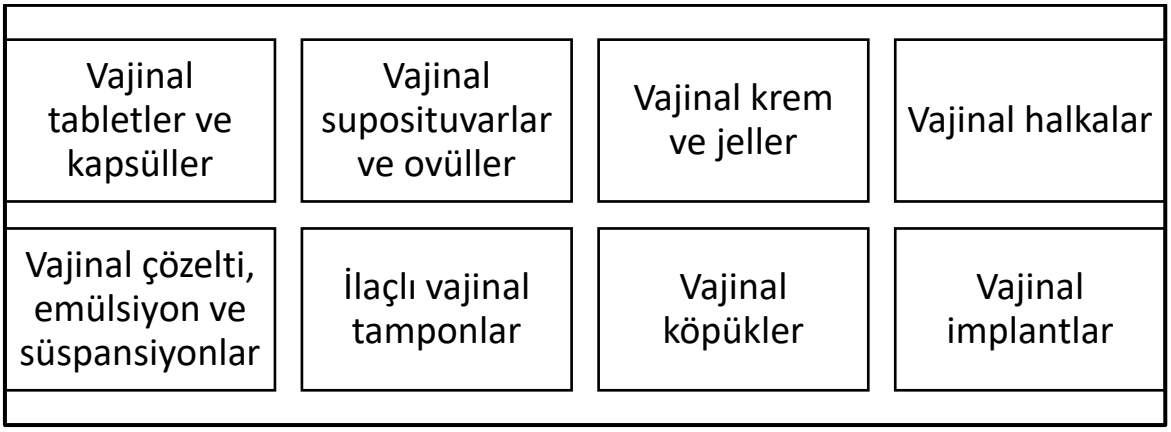
HAART ile tedavide gözlenen ilaç-ilaç etkileşimleri nanolif ilaç taşıyıcı sistemler ile koaksiyel üretim veya sandwich-tipi nanolif formülasyonlarının geliştirilmesinde birlikte uyumsuz olan ARV bileşiklerin birlikte verilmesi için alternatif bir sistem olarak kullanılabilir. Bu nanolif formülasyonları, ilaç-ilaç etkileşimlerinin araştırılmasına olanak sağlayabilmekte veya spesifik ilaç kombinasyonları kullanılarak ilaç sinerjisini elde etmek için gerekli ilaç etki profillerini modüle edebilmektedir.

Çok amaçlı koruma

İstenmeyen gebelik, HIV ve/veya diğer CYBE'lerin önlenmesini birleştirerek üreme sağlığı sonuçlarını iyileştirme potansiyeline sahip yenilikçi bir ürün sınıfıdır. Antiretroviralleri diğer CYBE önleme veya doğum kontrol yöntemleriyle birleştirme yeteneği, kullanıcının kabul edilebilirliğini artırabilecek bir avantaj sağlamaktadır(Blakney ve diğerleri, 2013). Örneğin, risk gruplarının, HIV önlemeyi doğum kontrol yöntemiyle birleştiren ikili bir koruma ürünü kullanma olasılıkları daha yüksek olabilir.

2.4. Vajinal Uygulanan İlaç Şekilleri

1980'li ve 1990'lı yıllarda vajinal ilaç taşıyıcı sistemler geniş çapta ilgi görmüştür (Z. Yang ve diğerleri, 2024). İlaçların vajinal uygulama yolu ile lokal ve sistemik etki gösterilebilmesi için yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilerek kadın sağlığına daha fazla odaklanılmıştır (Çizelge 2.5). Vajinal uygulama için geliştirilen formülasyonların çoğu, kadınların yaşadığı çeşitli sağlık koşullarını önlemenin yanı sıra enfeksiyonları etkili bir şekilde tedavi etmeyi de amaçlamaktadır (Vanić ve diğerleri, 2021). Vajinal uygulanan farklı ilaç taşıyıcı sistemler Şekil 2.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Vajinaya uygulanan ilaçların farmasötik ilaç şekilleri

2.4.1. Vajinal yarı katı sistemler

Vajinal ilaç verilişi için en yaygın olarak kullanılan yarı katı preparatlar arasında kremler, merhemler ve jeller bulunmaktadır (Bilensoy ve diğerleri, 2011; J Das Neves ve Bahia, 2006). Vajinal ilaç uygulaması için geleneksel olarak yarı katı dozaj formları arasından özellikle jeller tercih edilir (Kumbar, James, Nukavarapu ve Laurencin, 2008). Jeller vajinal yüzey alanına kolaylıkla yayıldıkları için tercih edilmektedir (Palmeira-De-Oliveira ve diğerleri, 2015). Yayılma yeteneği, retensiyon ve ilaç salım özellikleri ve in vivo jel performansı reolojik özelliklerle yakından ilişkilidir. Bu nedenle jel formülasyonlarının kapsamlı reolojik karakterizasyonunun yapılması optimum klinik performansının tahmin edilmesinde önemlidir (Yu, Malcolm, Woolfson, Jones ve Andrews, 2011). Jellerin yüksek su içerikleri nedeniyle, vajinal kurulukla ilişkili semptomların hafifletilmesine yardımcı olan nem ve kayganlaştırıcı etkileri bulunmaktadır. Jel formülasyonlarının hazırlanması nispeten basittir ve az sayıda yardımcı madde gerekmektedir (Kiser ve diğerleri, 2012).

Vajinal merhem bir sulu faz ve bir yağ fazından oluşmaktadır ve iki faz karıştırılarak hazırlanmaktadır (Johal, Garg, Rath ve Goyal, 2016). Krem formülasyonları, iyi yayılabilirliği ve kullanım kolaylığı nedeniyle en tercih edilen topikal formülasyonlardan biri olmasına rağmen, yağlı yapısı nedeniyle hastalara rahatsızlık vermektedir (Permana ve diğerleri, 2021). Östrojen bazlı kremler, düşük östrojen seviyeleri nedeniyle oluşan vajinal kuruluğu tedavi edebilmektedir (Hosseini, Radnia, Vafaei, Pirdehghan ve Mehrabadi, 2023). Menopoz ve düşük östrojene neden olan tıbbi durumların bazı etkilerini önlemektedir. Vajinal bir halka olan Estring® kullanımı konjuge östrojen vajinal kremle karşılaştırıldığında hem doktorların hem de hastaların değerlendirmesinde etkinlik veya vajinal kuruluk ve

atrofinin iyileştirilmesinde hiçbir fark kaydedilmemiştir (Krause, Wheeler, Snyder ve Richter, 2009).

2.4.2. Vajinal supozituvarlar/pesariler/ovüller/globüller

Supozituvarlar, genel olarak vücut boşluklarına yerleştirilmek üzere tasarlanmıştır, vajinal ortamda eriyerek veya çözünderek, lokal/istemik etki gösteren katı dozaj formlarıdır. Vajinal supozituvarlar, yağlı taşıyıcılar veya suda çözünür taşıyıcılar kullanılarak hazırlanan dozaj formlarıdır (Abbaspour ve diğerleri, 2022) Çeşitli şekil ve ağırlıklara sahiptirler ve bu şekil ve boyutlarına göre farklı isimler almaktadırlar. Supozituvarların şekli ve boyutu, amaçlanan bölgeye kolayca yerleştirilebilecek kapasitede olmalıdır (Abass, Kamel ve Abdelbary, 2012). Vajinal supozituvarların doz tekdüzeliğini koruyabilmesi, tahrişe neden olmaması ve aktif maddenin salınması için büyük miktarda sıvının gerekli olmaması gibi bazı avantajları vardır (Kaewnopparat ve Kaewnopparat, 2009). Vajinal supozituvarlar, doğumdan önce servikal olgunlaşmaya yönelik ilaçların uygulanması ve ilaçların lokal olarak verilmesi için kullanılmaktadır (Rodrigues ve diğerleri, 2015).

Vajinaya yerleştirilen cihazlar olan pesariler, binlerce yıldır kullanılmaktadır ve MÖ 400 gibi erken bir tarihte Hipokrat, vajina içinde şaraba batırılmış bir nar kullanılarak vajinal sarkıklığın azaltıldığını bildirmiştir (Ma ve diğerleri, 2021; Zeiger ve diğerleri, 2022). Pesariler, orijinal olarak lateksten yapılmıştır, mevcut pesariler ise alerjik olmayan malzemeye sahip silikondan yapılmıştır. Vajinal pesari kullanımı hastalarda rahatsızlık ve alerjik sorunlar gibi çeşitli komplikasyonlara da yol açmaktadır (Permana ve diğerleri, 2021).

2.4.3. Vajinal filmler

Vajinal filmler son yıllarda pek çok ilaç için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Vajinal filmlerin, vajinal mukozaya uygulandığında kolay çözünmesi, uygulamanın kolay olması, hızlı ve doğru doz uygulamasının sağlanması, sızıntının önlenmesi, esnek, düşük maliyetli olması, düşük ürün hacminin olması, aplikatör kullanımına gerek olmaması ve sulu halde dayanıksız olan formülasyonların stabilize edilmesi gibi avantajları vardır (Akil ve diğerleri, 2011; N. B. Dobaria, Badhan ve Mashru, 2009; Notario-Pérez ve diğerleri, 2019; W. Zhang ve diğerleri, 2014). Son çalışmalar filmlerin kadınlar tarafından jel, tablet, köpük, ovül gibi

dozaj şekillerine tercih edildiğini göstermiştir. Vajinal filmlerin üretiminde, solvent casting yöntemi, 3D baskı ile üretim ve holt melt ekstrüzyon yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (Borumand, Mortazavi, Jafari Azar ve Teymouri Rad, 2014; Repka, Gerding, Repka ve McGinity, 1999; Varan, Şen, Sandler, Aktaş ve Bilensoy, 2019). Ayrıca, vajinal filmlerin kabul edilebilir dozaj formları olarak rahat kullanımı, taşınabilir olması hasta uyuncunu artırmaktadır.

2.4.4. Vajinal tabletler

Yarı katı sistemlerle karşılaştırıldığında, vajinal tabletler gibi katı formülasyonlar daha iyi doz tekrarlanabilirliği, daha uzun stabilite, uygulama kolaylığı, büyük ölçekli üretim ve hedef bölgede yüksek ilaç seviyelerine ulaşmak için uygun bir terapötik strateji sağlamaktadır (Sánchez, Ruiz, Castán ve Morales, 2018; Tunpanich, Limpongsa, Pongjanyakul, Sripanidkulchai ve Jaipakdee, 2019). Bununla birlikte, geleneksel vajinal tabletler, düşük mukoadezyon ve kısa kalış süresi sağladığından, bu tabletlerin etkinliğini sağlamak için çoklu dozların uygulanması gerekmektedir. Mukoadezif vajinal tabletlerin geliştirilmesi ile kalış süresini uzatabilir ve adezyon özelliği geliştirebilir.

2.4.5. Vajinal halkalar

Vajinal halkalar, lokal veya sistemik etki için vajinaya uzun süreli, sürekli veya kontrollü madde salımını sağlayan esnek, simit şeklinde, elastomerik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Vajinal halkalar kullanılarak vajinada sürekli/kontrollü ilaç verilmesi kavramı ilk olarak 1970 tarihli bir patentte açıklanmıştır (Malcolm ve diğerleri, 2010). Vajinal halkaların kullanımı, özellikle halkaların imalatı için yeni halka tasarımlarının ve yeni polimerik malzemelerin kullanımındaki inovasyonlarla artış göstermiştir. Vajinal halkaların üretiminde çok farklı yapıda polimerler (polidimetilsiloksan, PEVA) ve farklı üretim metotları (enjeksiyon kalıplama veya sıcak ekstrüzyon) kullanılmaktadır (Brache ve Faundes, 2010).

2.4.6. 3D baskı ilaç şekilleri

Vajinal ilaç taşıyıcı sistemler, hastanın anatomisine uygun olarak tasarlanıp üretilmesi büyük önem taşıdığından üretimleri yüksek düzeyde beceri ve teknoloji gerektirmektedir. Hastanın fizyolojik yapısına göre bu cihazların kesin boyutsal bilgilerinin elde edilmesi, bilgisayar

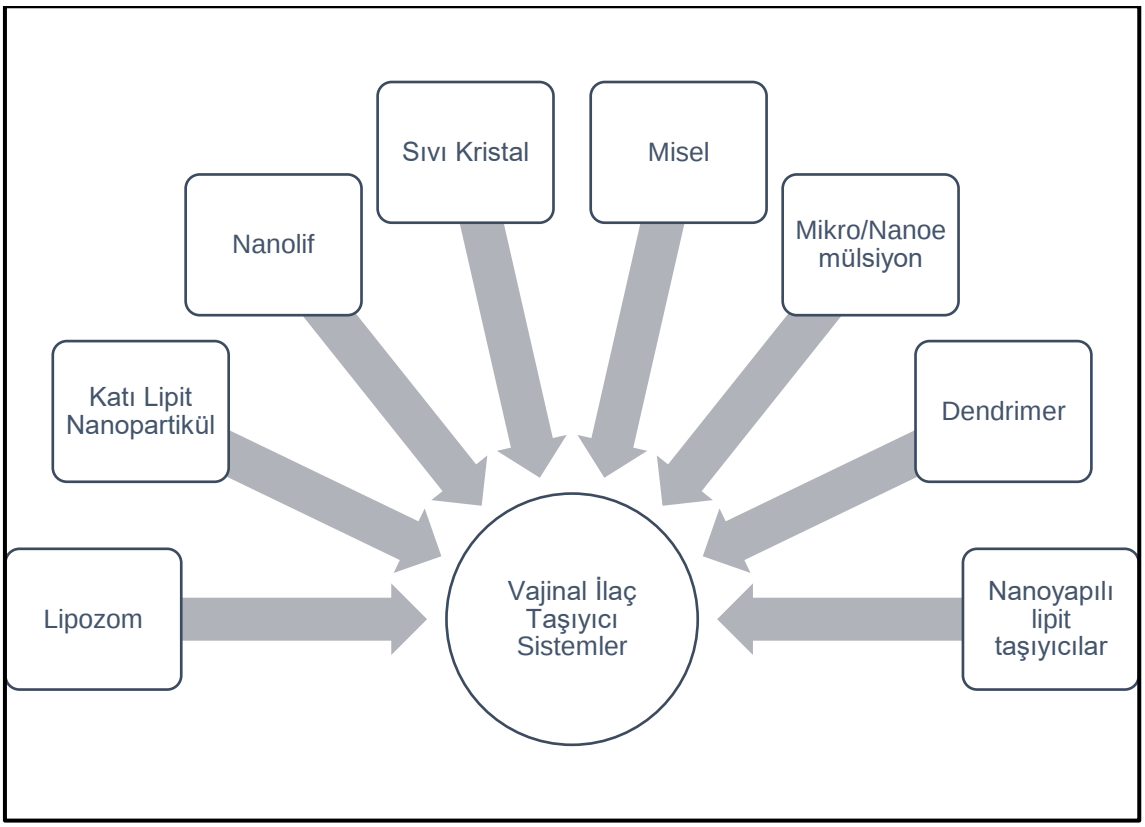
destekli simülasyonlar ve görüntüleme kullanılarak etkili bir kişiselleştirilmiş ilaç tedavisi sağlanabilmektedir (Nikazar ve Bahrololoumi, 2023). Üç boyutlu baskı bir nesnenin katman katman elde edilmesi işlemi olarak tanımlanabilir. Eriyik biriktirme modelleme, mürekkep püskürtmeli baskı ve lazer tabanlı baskı teknolojisi dahil olmak üzere çeşitli 3D baskı türleri bulunmaktadır (Koçak, Yıldız ve Acartürk, 2021). 3D baskı sistemleri ile vajinal halkalar, ürojinekolojik ağ implantları, supozituvar kalıpları, rahim içi araçlar, vajinal filmler gibi kişiselleştirilmiş vajinal dozaj formlarının üretiminde kullanılmaktadır (Teworte ve diğerleri, 2023).

Çizelge 2.5. Vajinal ilaç verilişinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler

İlaç Taşıyıcı Sistem	Etkin Madde	Hastalık ve/veya Etki	Referans
İn situ gel	Metronidazol Kurkumin	Anti-trichomonas aktivite	(Pozharani ve diğerleri, 2023)
İn situ sprey jel	Mikonazol Nitrat	Antifungal aktivite	(Hsin ve diğerleri, 2023)
İn situ jel	Metronidazol Kurkumin	Anti-trichomonas aktivite	(Pozharani ve diğerleri, 2023)
Termosensitif jel	Lactobacillus crispatus	Gonorrhea koruyucu	(N'Guessan Gnaman ve diğerleri, 2020)
Mikroemülsiyon bazlı jel	Flukonazol	Antifungal aktivite	(Bachhav ve Patravale, 2009)
Vajinal Tablet	5-Fluorourasil	Kitosan-(poli)akrilik asit bazlı polielektrolit komplekslerinin etkinliğinin incelenlemesi	(Abidin, Murphy, Fehrenbach, Gately ve Major, 2024)
3D baskı vajinal ovül	Pirfenidon	Endometriozis ve fibrotik rahim hastalıkları	(Teworte ve diğerleri, 2023)
Supozituvar	Gen Tedavisi (25-kDa liner PEI and DNA complex)	İnsan papilloma virüsünü (HPV) hedef alan gen terapisi, rahim ağzı kanseri	(Ren ve diğerleri, 2019)
Supozituvar	Klotrimazol	Antifungal aktivite	(Mustapha, Oyedepo, Akin-Ajani ve Odeku, 2023)
Supozituvar	Kimyon tohumu esansiyel yağı	Antifungal aktivite	(Abd Ellah ve diğerleri, 2019)
3D baskı vajinal film	Sidofovir Paklitaksel	Servikal kanser	(Varan ve diğerleri, 2019)
Vajinal film	Nitrik Oksit	Kadın cinsel işlev bozukluğu	(Yoo, Acharya ve Lee, 2009)
Vajinal film	Tiakonazol	Antifungal aktivite	(Calvo ve diğerleri, 2019)
3D baskı vajinal halka	Klotrimazol	Antifungal aktivite	(Tiboni, Campana, Frangipani ve Casettari, 2021)
3D baskı vajinal halka	Progesteron	Hormon replasman tedavisi	(Fu, Yu ve Jin, 2018)

2.4.7. Nano ilaç taşıyıcı sistemler

Son yıllarda, geleneksel dozaj formlarının sınırlamalarının üstesinden gelmek amacıyla vajinal ilaç verilişi için çeşitli nano ilaç taşıyıcılar (mukoadezif, mukoadezif olmayan veya mukusa nüfuz eden) araştırılmıştır (Çizelge 2.6) (Chindamo ve diğerleri, 2021). Geleneksel mukoadezif formülasyonlarla karşılaştırıldığında, polimer bazlı mukoadezif nanopartiküller ve mukusa nüfuz eden nanopartiküller, vajinal bariyerlerin aşılması konusundaki gelişmiş yetenekleriyle vajinal ilaç verilişi için önem kazanmaktadır (Valamla ve diğerleri, 2022). Vajinal uygulanan nano taşıyıcı sistemler Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Vajinal enfeksiyonların topikal tedavisi için önerilen nano ilaç taşıyıcı sistemler

Vajinada kalma süresi ve aktif moleküllerin daha derin epitelyuma iletilmesini sağlama yetenekleri ön plana çıkmaktadır. Yapısal ve yüzey özelliklerine göre sınıflandırılabilmektedirler. Mukoadezif polimerlerle kaplanarak mukoadezif özelliklerine göre vajinal yoldan uygulanan partiküler sistemler sınıflandırılmaktadır (Vanić ve diğerleri, 2021).

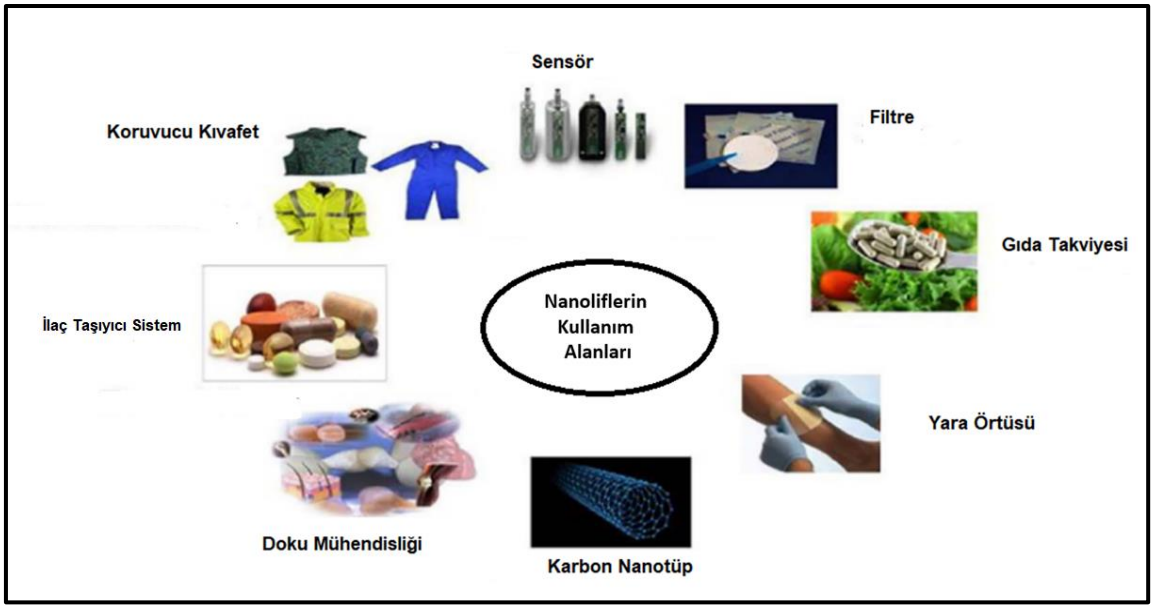
Çizelge 2.6. Vajinal ilaç verilişinde kullanılan nano-ilaç taşıyıcı sistemler

İlaç Taşıyıcı Sistem	Etkin Madde	Kullanım	Referans
Kitosan–fitik acid polyelectrolit kompleksi nanopartikülleri	Metronidazol	Bakteriyel vajinozis	(Nayak ve diğerleri, 2024)
Liposomal jel	Linezolid	Bakteriyel vajinozis	(Satapathy, Biswal, Pattnaik, Parida ve Sahoo, 2023)
Poli (β-amino ester) nanopartikül içeren jel	CRISPR/Cas9 system	Gen tedavisi	(Niu ve diğerleri, 2020)
Nanoemülsiyon	Amfoterisin B	Antifungal aktivite	(M. U. Patil, Rajput, Belgamwar ve Chalikwar, 2022)
Lipozom	Kurkumin	Antikanser aktivite	(Berginc ve diğerleri, 2014)
PEG-Lipozom	İnterferon alpha-2b	HPV tedavisi	(Jøraholmen, Basnet, Acharya ve Škalko-Basnet, 2017)
Katıl Lipit Nanopartikül	Progesteron	Östrus siklusunun düzenlenmesi	(Fogolari ve diğerleri, 2023)
Nanolif	Metronidazol	Bakteriyel vajinozis	(Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2020)
In-situ Sıvı Kristal Jel	Fitantriol	Servikal kanser tedavisi	(Jie ve diğerleri, 2019)
PEG-Nanokristal	Dosetaksel	Servikal kanser tedavisi	(Lv ve diğerleri, 2021)
Dendrimer içeren jel	SPL7013 dendrimeri	Mikrobisit	(Mumper ve diğerleri, 2009)

2.5. Nanolif İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kontrollü ilaç salımı sağlamak, hedeflemeyi ve ilaç stabilitesini artırmak için nanoteknoloji bazlı ilaç dağıtım sistemlerine olan ilgiyi artırmıştır (Palmeira-de-Oliveira ve diğerleri, 2015). Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin farklı özelliklerinden yararlanılarak farklı uygulamalara yönelik oral, transdermal, implante edilebilir, inhale ve enjekte edilebilir sistemler geliştirilmektedir (A. Sharma ve diğerleri, 2013).

Çeşitli nanotaşıyıcılar arasında nanolifler, doğal biyolojik dokulara benzer gözenekli yapılarıyla birçok farklı uygulamada avantaj sağlamaktadır (Leung ve Ko, 2011). Nanolifler; ilaç veriliş sistemleri, filtre, maske üretimi, doku mühendisliği ve yara pansumanı gibi farklı kullanım alanlarında geniş çapta araştırılmıştır (Şekil 2.8). Nanoliflerin, yüksek yüzey/hacim oranı, yüksek gözeneklilik, kontrol edilebilir gözenek çapı, yüzey özellikleri ve mekanik özellikleri gibi pek çok avantajı bulunmaktadır (Rüzgar Özemre ve diğerleri, 2023). Sentetik veya doğal polimerlerden veya bunların karışımlarından elde edilen nanolifler, çeşitli şekillerde üretilebilmesi ve bileşimin istenildiği gibi ayarlanabilmesi ile ilaç uygulamalarında çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Bhardwaj ve Kundu, 2010; Esentürk ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.8. Nanoliflerin farklı kullanım alanları

Nanolifler, yüksek gerilme direnci ve esneklik gibi mükemmel mekanik özelliklere sahiptirler (Kuang ve diğerleri, 2024). İlaç taşıyıcı sistemlerde nanoliflerin bu

fizikokimyasal özellikleri, ilaçların kapsülleme ve salım kinetiğinde önemli rol oynamaktadır. Boncuklu, şeritli, gözenekli veya çekirdek kabuk yapısı gibi farklı lif morfolojileri üretilebilmektedir (Ramakrishna ve diğerleri, 2006).

Nanolifler hızlı, pulsatil, gecikmiş ve iki fazlı salım gibi farklı ilaç salım profillerine ulaşmak için başarıyla kullanılmıştır (Hu ve diğerleri, 2014). Nanoliflerden ilaç salımı, polimerlerin ve çözücülerin seçilmesi, formülasyon ve proses parametrelerinin ayarlanması ile ayarlanabilmektedir (Coimbra, Freitas, Gonçalves, Gil ve Figueiredo, 2019; Holan ve diğerleri, 2011). Çözünürlüğü düşük ilaçların çözünürlüğü nanolif formülasyonların hazırlanmasıyla artırılabilmektedir.

Nanoliflerden ilaç salımı, ilacın yüzeye desorpsiyonu, gözenekler yoluyla difüzyonu veya matris bozunması yoluyla gerçekleşebilmektedir (Thakkar ve Misra, 2017). Etkin maddenin liflerden salınmasını etkileyen diğer parametreler; etkin maddenin moleküler ağırlığı ve hidrofobiklik/hidrofilik özellikleri, nanolif yapısının gözeneklilik, morfolojisi ve lif geometrisidir (Holan ve diğerleri, 2011; Thakkar ve Misra, 2017).

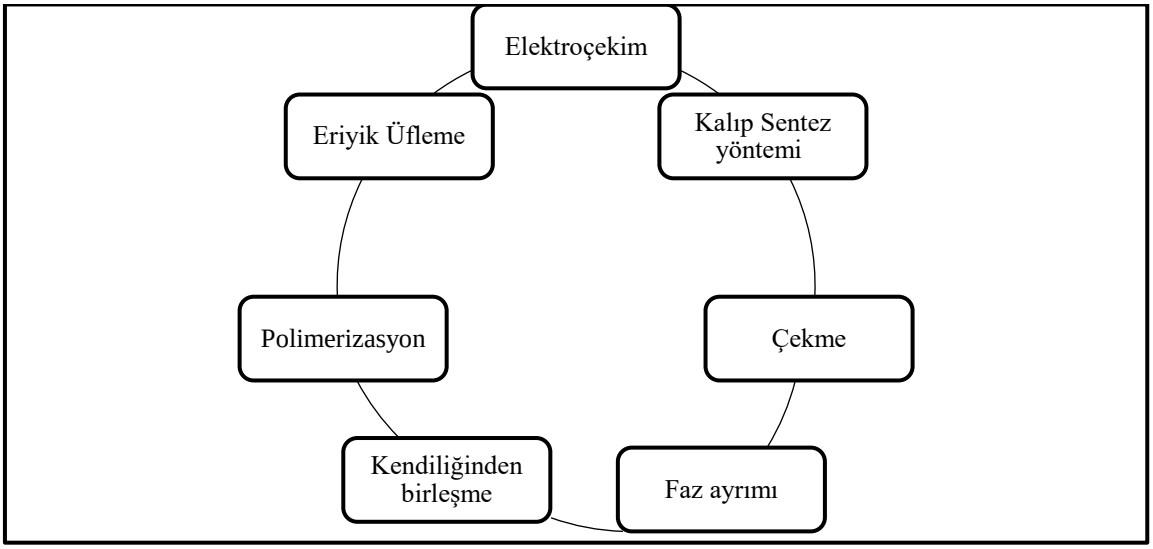
Küçük moleküllü ilaçlar (diklofenak sodyum, selekoksib ve doksorubisin gibi), proteinler (epidermal büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörü-2) ve nükleik asitler (DNA, siRNA) gibi farklı terapötik ajanlar nanolif yapısına yüklenebilmektedir (Deepak, Goyal ve Rath, 2018; Feng ve diğerleri, 2019).

Kompozit nanolifler, mekanik özellikler, termal stabilite, kimyasal direnç, yüzey ve optik özellikler, elektriksel iletkenlik ve moleküler geçirgenlik gibi özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla üretilmektedir (Dhand ve diğerleri, 2017). Kompozit nanolifler genel olarak üç farklı kategoriye ayrılabilir: (i) polimer-polimer kompozit nanofiberler, (ii) polimer-seramik/metal kompozit nanofiberler ve (iii) polimer-karbon nanomalzeme kompozit nanofiberler.

Nanolifler, tek başına kullanılmasının yanı sıra, kompozit ilaç taşıyıcılar hazırlamak filmler, süngerler ve 3D baskılı iskeleler gibi diğer dozaj formlarıyla birleştirilebilmektedir (Kuang ve diğerleri, 2024) Bu sayede, kontrollü ilaç salımı, anti-adezyon ve hemostaz gibi çeşitli işlevlere sahip tek bir ilaç taşıyıcı sistemin üretimi sağlanmaktadır.

2.5.1. Nanolif üretim yöntemleri

Nanolifler yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yöntemler veya fiziksel, kimyasal ve biyolojik yaklaşımlar veya döndürmeli ve döndürmesiz yöntemler gibi farklı üretim teknikleriyle üretilebilmektedir (Anusiya ve Jaiganesh, 2022). Yukarıdan aşağıya olan yaklaşımda, karmaşık malzemeler mikro veya nano boyutlu parçacıklara dönüştürülürken, aşağıdan yukarıya olan yaklaşımda, küçük parçacıkların yapıyı oluşturmak üzere kümelenmesidir. Şekil 2.9'da görüldüğü gibi, nanoliflerin üretiminde çok sayıda üretim süreci mevcuttur ancak elektroçekim nanoliflerin üretiminde en yaygın kullanılan yöntemdir (Turanlı, Tort ve Acartürk, 2019; Yıldız, Kara ve Acartürk, 2020)



Şekil 2.9. Nanolif üretim yöntemleri

2.5.2. Elektroçekim yöntemi

Elektroçekim yöntemi, modern talepler doğrultusunda yeniden keşfedilen ve tüm dünyada hem laboratuvarlarda hem de endüstrilerde yoğun bir şekilde uygulanan eski bir yöntemdir (Fadil ve diğerleri, 2021). 17. yüzyılda William Gilbert, yüksek gerilimli doğru akımın bir çözüme uygulanmasıyla ilgili araştırmaları belgeleyen ilk kişi olmuştur (Castillo-Henríquez, Vargas-Zúñiga, Pacheco-Molina ve Vega-Baudrit, 2020). Bir su damlası elektrik yüklü kehribarın yanına yaklaştığında koni şeklini gözlemlemiştir. Elektroçekim, 1897'de Rayleigh tarafından icat edilen çok eski bir tekniktir. 20. yüzyılın başında Cooley ve Morton elektroçekim ile fiber üretmeyi başarmışlarıdr. Cooley tarafından elektroçekim kurulumuna dönen bir elektrot eklenmiştir. 1930 yılında Formhals tarafından elektroçekim yöntemiyle

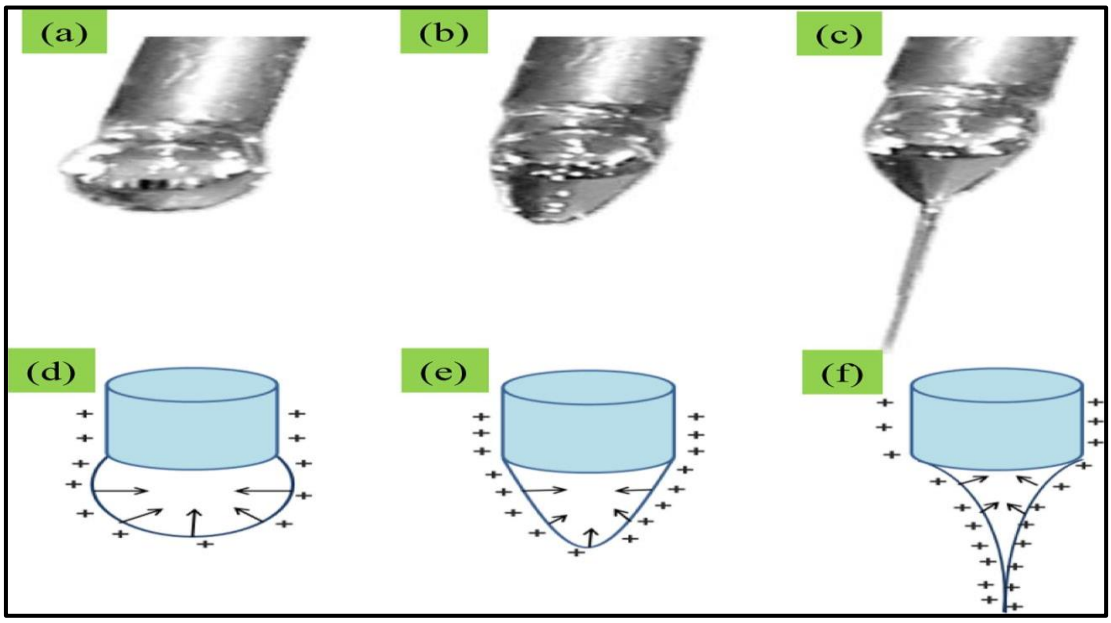
üretilmiştir ve sürecin ve aparatın patentini almıştır. Formhals, elektrostatik polimer nanolif üretim yöntemiyle birden fazla polimerden kompozit nanolif üretmek için patent almıştır.

Elektroçekim yöntemi, nanoliflerin üretiminde elektrostatik kuvvetlerin itici güç olarak kullanıldığı en basit ve en uygun yöntemdir. Nanometreden mikrometreye kadar değişen çaplarda polimerik nanolifler üretmek için çok yönlü ve ölçeklenebilir bir tekniktir. Elektroçekim, uzunlukları 5-100 nm aralığında nanolif üreten etkili bir tekniktir (Kalantari, Afifi, Jahangirian ve Webster, 2019). Bu yöntem sentetik ve doğal polimerler, polimer karışımları ve nanopartiküller için kullanılabilmektedir.

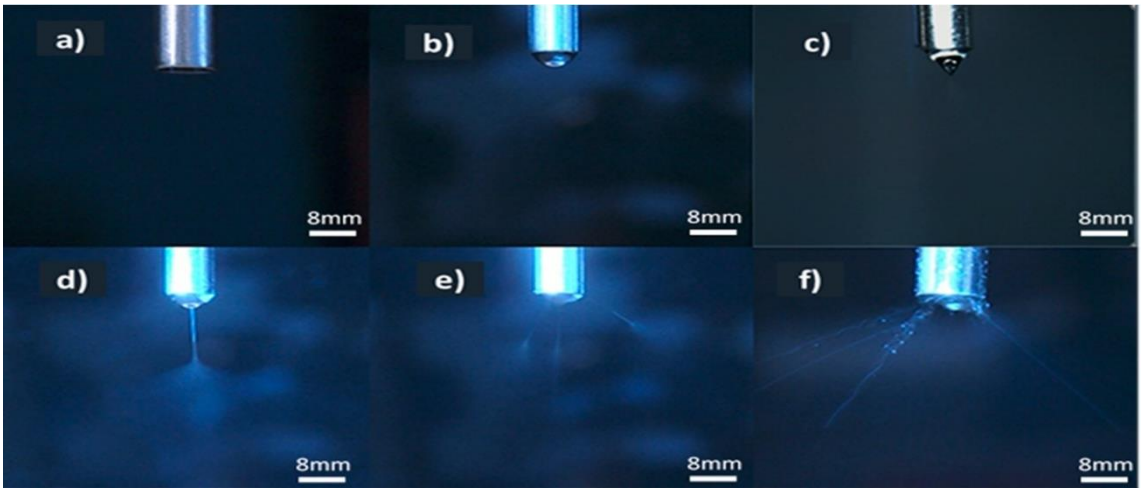
Elektroçekim yönteminde, yüksek voltaj uygulanarak enjektör pompası tarafından püskürtülen polimer çözeltisi üzerinde yük oluşması esasına dayanmaktadır (Haider, Haider ve Kang, 2018). Elektrik yüklerinin metalik iğne aracılığıyla polimer çözeltisine geçmesiyle başlar. Bu, polimer damlacığı üzerindeki yüklerin indüklenmesinin bir sonucu olarak polimer çözeltisi içinde kararsızlığa neden olur. Aynı zamanda, yüklerin karşılıklı itilmesi, yüzey gerilimine karşı çıkan bir kuvvet üretir ve sonuçta polimer çözeltisi, elektrik alanı yönünde akmaktadır. Oluşan yük hareketi, yüzey geriliminin oluşturduğu iğne ucundaki küresel damlanın gerilmesine neden olmaktadır. Elektrik alanındaki daha fazla artış, küresel damlacığın deforme olmasına ve konik bir şekil almasına neden olur. Yüklü çözeltinin elektrostatik itmesi yüzey gerilimini aştığında, koni benzeri bir yapı oluşur ve bu yapı "Taylor konisi" olarak adlandırılır. Taylor konisi ince bir fiber halinde uzayarak çözücünün buharlaşmasıyla birlikte toplayıcı plakaya doğru uzanır. Bu aşamada, optimize edilmiş bir mesafede tutulan metalik toplayıcı üzerinde toplanan konik polimer damlacıklarından ultra ince nanolifler oluşur. Elektoçekim işlemi, polimer çözelti jetinin nano ölçekte yoğunlaşmasına olanak tanıyan birden fazla büküm içermektedir (Aghababaei, McClements, Martinez ve Hadidi, 2024). İşlem sırasında iç ve dış yükleme kuvvetleri sıvı jetinin toplayıcı yönünde savrulmasına neden olur. Bu çırpma hareketi, çözelti içindeki polimer zincirlerinin gerilmesine ve birbirlerinin üzerinden kaymasına olanak tanır, bu da nanolif olarak adlandırılabilecek kadar küçük çaplı liflerin oluşmasına neden olur. Lifler alüminyum folyo, cam slaytlar, metal plakalar veya döner toplayıcılar üzerinde toplanmaktadır (Vidyadhari, Singh, Ralli, Parvez ve Kohli, 2023).

Taylor konisinin oluşumu Şekil 2.10 ve Resim 2.2'de görüldüğü gibi, yüzey gerilimi tarafından tutulan polimer çözeltisine yüksek voltajın uygulanması ile sıvının yüzeyinde bir

yük oluşturmaktadır. Karşılıklı yük itmesi ve yüzey yüklerinin karşı elektrota doğru büzülmesi, yüzey geriliminin tam tersi bir kuvvete neden olur. Elektrik alanın şiddeti arttıkça iğne ucunun ucunda oluşan yarı küresel damla konik şekle dönüşmektedir.



Şekil 2.10. Artan elektrik alanının etkisi altında polivinilpirolidon damlacığının üç aşamalı deformasyonunu gösteren dijital görüntüler. d – f, yüklerin polimerik damlacıklar üzerindeki etkisinin mekanizmasını göstermektedir (Haider ve diğerleri, 2018).



Resim 2.2. Elektroçekim jet oluşumunun aşamaları. (a) Uygulanan voltaj altında akış, (b) damlacık, (c) kararlı Taylor konisi, (d) jet akımı oluşumu, (e) çoklu jet akımları, (f) kurutulmuş jet akımları.(Nazari ve diğerleri, 2019)

Elektroçekim prosesinin ardından, biriken nanolif ağ genellikle iletken bir alt tabakanın üzerinde 10-30 mm kalınlığındaki tabakalar halinde toplanmaktadır (Fadil ve diğerleri, 2021). Elektro-çekim yöntemi temel olarak 3 kısımdan oluşur (Şekil 2.12):

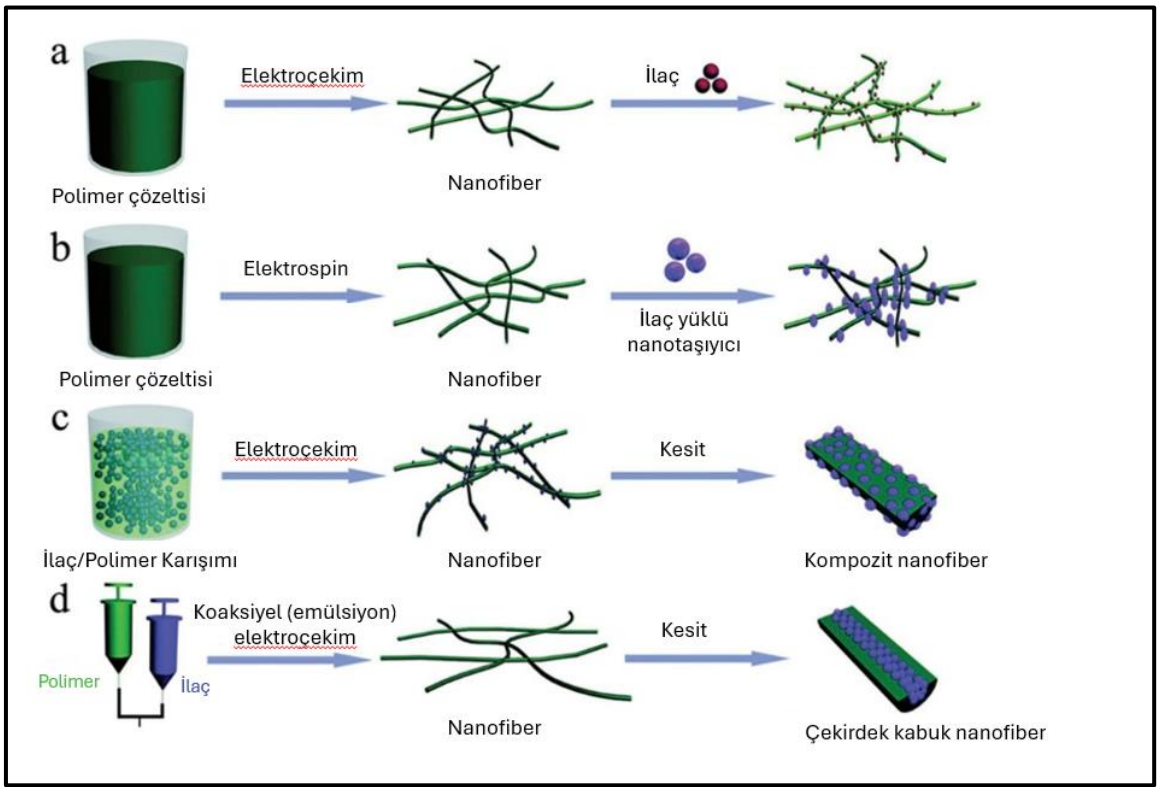
- Yüksek voltaj güç kaynağı,
- Metal ya da plastik enjektör bağlanmış besleme pompası
- Toplayıcı plaka

Elektroçekim yönteminin, artmış yüzey alanı, yüksek gözeneklilik ve yüklü ilaçların amorfizasyonu gibi avantajları bulunmaktadır. Oluşan bu lifler etkin maddenin çözünürlüğünü, çözünme hızını ve biyoyararlanımını artırmaktadır (Birer ve diğerleri, 2024). Elektroçekim yönteminin, basit olması, çok yönlülük sağlaması, karmaşık yapısal ürünleri tasarlamak ve elde etmek için işlem parametrelerinin kolay manipülasyonu, şekilsel düzenleme sağlaması ve çok çeşitli uygulamalar için ayarlanabilir morfolojiler ile üretilmesi gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır (J. A. Silva, De Gregorio, Rivero, Abraham ve Nader-Macías, 2021). Elektroçekim yönteminin basitliği, ölçeklenebilirliği, tutarlılığı ve uygun fiyatı ile diğer lif üretim yöntemlerine göre daha avantajlıdır.

Film ve nanoliflerin karşılaştırıldığı bir çalışmada; solvent-casting metodu ile film üretimi ve elektroçekim yöntemi ile nanolif üretimi gerçekleştirilmektedir. Elektroçekim yöntemi polimer filmlerin plastisitesini artırarak mekanik özelliklerini etkilemeden esnekliği artırmıştır (Ghosal ve diğerleri, 2018). Elektroçekim ile üretilen membranın artmış plastisitesiyle amorf yapısı arasında bir bağlantı gözlenmiştir. Aynı solvent ile üretilen ve yarı kristal yapılara sahip formülasyonlar, elektroçekim yönyemi ile üretilmiş amorf membranlaın aksine kırılgan yapılıdır ancak esnek değillerdir. Elektroçekim ile hazırlanan membran içindeki liflerin yönelimi de mekanik özellikleri ayarlamıştır.

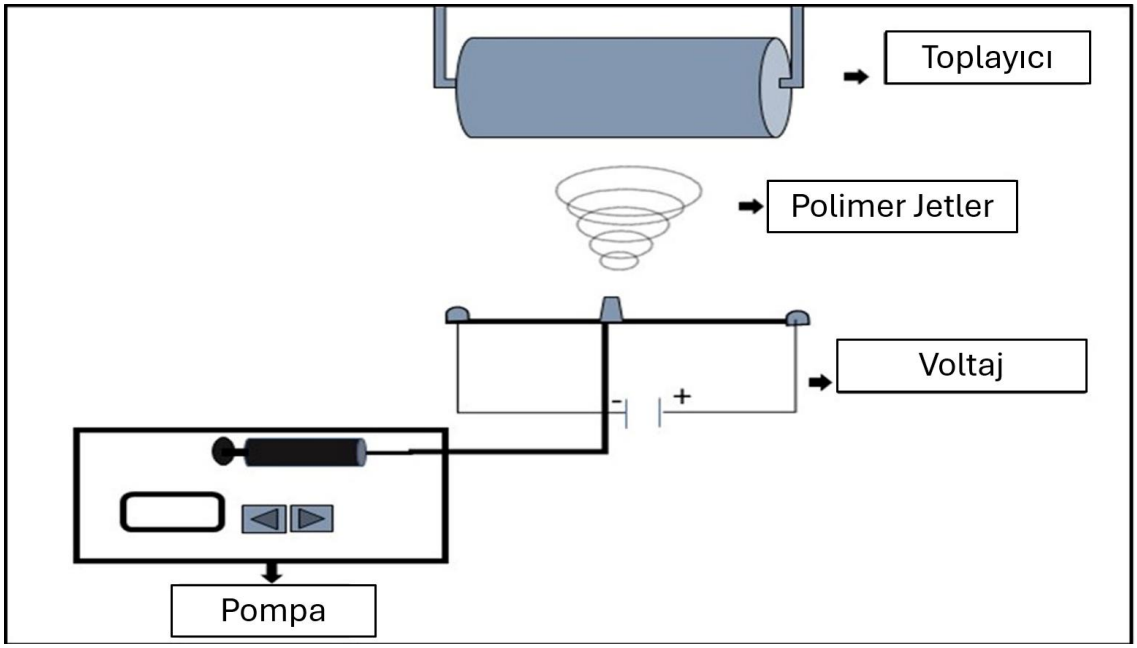
Elektroçekim yöntemi birçok farklı polimerden nanoliflerin üretimini kolaylaştırır (Reneker & Chun, 1996). Çözeltiden elektroçekim yoluyla nanolif üretmek amacıyla hem doğal hem de sentetik yaklaşık 100'den fazla polimer üzerinde kapsamlı araştırmalar yapılmıştır (Aghababaei ve diğerleri, 2024). İlaç dozaj formlarının tasarımı ve geliştirilmesi için polimer seçimi, aday aktif madde kadar önemlidir ve nano ölçekli taşıyıcılar için genellikle biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler tercih edilir (José das Neves ve diğerleri, 2015; Nazari ve diğerleri, 2017). Doğal polimerlerin düşük moleküler ağırlık gibi

dezavantajları nedeniyle elektroçekim yoluyla nanolif üretmek zordur, genellikle bu polimerler diğer polimerlerle karıştırılarak kompozitler oluşturulur veya farklı moleküllerle işlevselleştirilmesi gerekir (Sofi vd., 2019).



Şekil 2.11. Nanoliflere ilaç yükleme yöntemlerinin şeması: a) lif üretimi sonrası lif yüzeyine adsorsiyon; b) ilaç yüklü nanotaşıyıcıların nanoliflere immobilizasyonu. c) İlaç-polimer karışımlarının birlikte üretimi; d) emülsiyon (koaksiyel) elektroçekim (Rasouli, Barhoum, Bechelany ve Dufresne, 2019)

Nanoliflerin üretiminde hyaluronik asit, kitosan, kondroitin sülfat, kollajen, ipek fibroin ve nişasta gibi doğal polimerlerin elektroçekim yönteminde uygulamaları vardır (Sabra vd., 2020). Poli (laktik asit), poli (-kaprolakton), poli (etilen oksit), poli (glikolik asit) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) ve poli (L-laktit-ko-kaprolakton) gibi sentetik polimerler araştırılmıştır ve biyolojik olarak parçalanabilenler özellikle tercih edilmektedir (Hu ve diğerleri, 2014). Elektroçekim yönteminde kullanılan sentetik polimerler daha iyi mekanik özelliklere sahipken, doğal polimerler daha iyi hücre uyumluluğu göstermektedir (Stafiej vd., 2017). Bu nedenle daha iyi mekanik özelliklere sahip nanoliflerin üretilmesi için doğal ve sentetik polimerler bir arada kullanılmaktadır (Şekil 2.11).



Şekil 2.12. Elektroçekim yönteminin şematik gösterimi

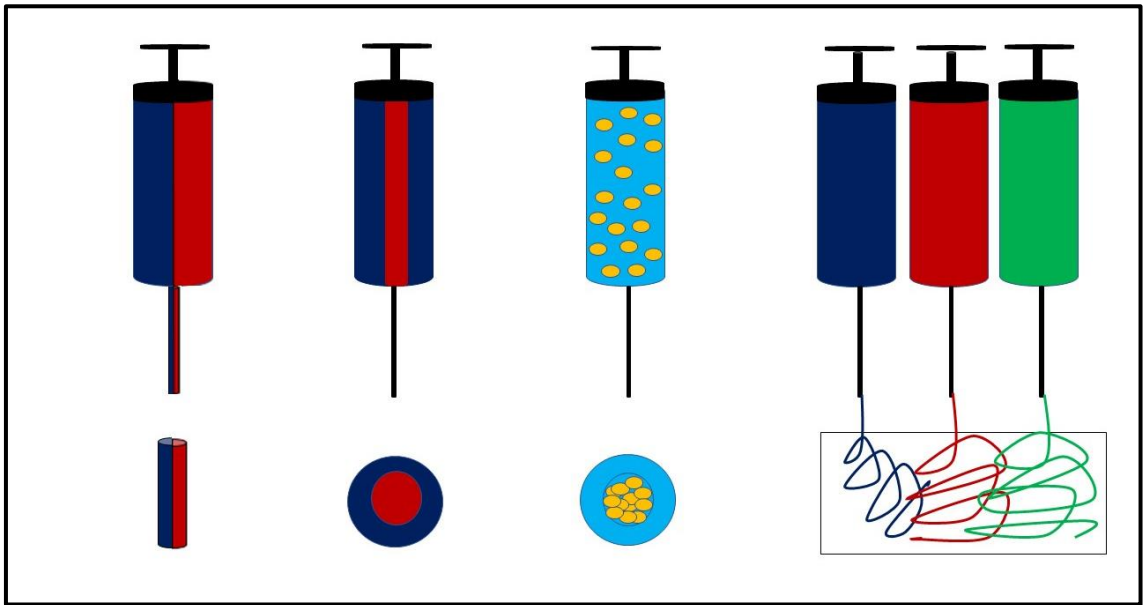
Nozulların yapısına ve sayısına bağlı olarak farklı elektroçekim yöntemleri geliştirilmiştir (Şekil 2.13). Bu yöntemler üretimi arttırmak, kontrollü salım sağlamak ve istenilen lif yapısını üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Geleneksel tekli elektroçekim yöntemine göre alternatif koaksiyel elektroçekim, yan yana elektroçekim ve çoklu elektroçekim gibi daha yeni teknikler ortaya çıkmıştır (Ibrahim ve Klingner, 2020).

Ko-aksiyel elektroçekim

Koaksiyel elektroçekim, farklı çözümlerle eşmerkezli düze ile çekirdek-kabuk yapısına sahip nanolifler üretmek için uygulanan bir yöntemdir (Yu vd., 2013). Koaksiyel elektroçekim yöntemi, çekirdekteki aktif maddelerin bir kabuk yapısıyla kaplanmasıyla sürekli ilaç verilişinde kullanılmaktadır (Esmaeili ve Haseli, 2017). Çekirdek-kabuk için kullanılan çözücüler, kabuk çözeltisinin polimer bileşimleri ve konsantrasyonları, çekirdek çözeltisine eklenen katkı maddelerinin türleri ve miktarları, iç çekirdek akış hızları gibi çeşitli parametreler koaksiyel elektroçekim yönteminde önemlidir (Wanga ve Windbergs, 2019).

Koaksiyel elektroçekim yöntemi gözenekli, içi boş ve çok kanallı nanofiberlerin üretilmesini sağlamaktadır (Rostamabadi ve diğerleri, 2020). Ayrıca bu yöntemin gelişmesiyle birlikte çekirdek-kabuk yapısında elektroçekim nanolifler çekirdek, orta katman ve kılıf içeren üç

eksenli elektroçekim ile üretilebilmektedir (Pant vd., 2019). Koaksiyel nanofiberler ilaç verilişinde, kanser tedavisinde ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır (Silva ve diğerleri, 2019). Tawfik ve arkadaşları kornea aşınmasının tedavisi için koaksiyel elektroçekim yöntemiyle iki ilacı farklı bölmelere yüklemişlerdir (Tawfik ve ark., 2020). Pirfenidon yüklü PLGA'nın dış katmanı oluşturduğu ve moksifloksasin yüklü PVP'nin iç çekirdeği oluşturduğu çekirdek-kabuk lifleri üretilmiştir. Bu yapıda geliştirilen lifler her iki ilacın da günde bir kez dozlanmasını sağlayarak sürekli salım sağlar ve moksifloksasinin ilk ani salımını engellemektedir. İlaç yüklü koaksiyel lifler, yaklaşık 2 saat sonra tam pirfenidon salımı sergilerken, moksifloksasinin %60'ı 30 dakika sonra salınmıştır. Çalışmada salım profilinin ayarlanması gerekmesine rağmen sürekli salım yapılabilen ve liflerde iki bölmede iki farklı ilacın uygulanabileceğini göstermişlerdir.



Şekil 2.13. Farklı elektroçekim nanoliflerinin şematik gösterimi: a) Yan yana elektroçekim b) Koaksiyel elektroçekim c) Emülsiyon elektroçekim d) Çok jetli elektroçekim

Side-by-side (yan-yana) elektroçekim

Yan yana elektroçekim tekniği, farklı yüzey kimyasına sahip kompozit yapıların, kimyasal işlevselleştirmenin ve nanofiberlerin üretimi için farklı polimerlerin ve farklı çözücülerin karışabilirlik problemlerini ortadan kaldırmaktadır (Ibrahim ve Klingner, 2020). Bu yöntemde polimer çözeltileri birbiriyle temas eder ancak koaksiyel yöntemde olduğu gibi birbirini sarmamaktadır (Balusamy vd., 2020). Koaksiyel prosesten farklı olarak çift bölmeli nanolifler, yan yana elektroçekim yöntemiyle üretilmektedir.

Emülsiyon elektroçekim

Emülsiyon elektroçekim yöntemi, flavonoidler, peptidler, enzimler, proteinler gibi maddelerin, yağ içinde su veya su içinde yağ emülsiyonu olarak birbirine karışmayan iki sıvının karışımı ile çekirdek-kabuk nanofiberleri üretmek için kullanılan yeni ve basit bir tekniktir (Zhang ve diğerleri, 2018). Emülsiyon elektroçekim tekniği aynı zamanda koaksiyel yöntem gibi çekirdek kabuk lifleri üretmek için de kullanılabilmektedir (Dai ve diğerleri, 2010). Koaksiyel elektroçekim ile karşılaştırıldığında, emülsiyon elektroçekim daha basit bir kurulumu vardır, ancak ilacın yapının çekirdeğine veya kabuğuna yerleştirilmesi tam olarak kontrol edilememektedir (Su ve diğerleri, 2021).

Emülsiyonun stabilitesi, elektroçekim yöntemi için önemlidir ve emülgatör veya bir yüzey aktif madde ile stabilize edilmelidir (Li ve diğerleri, 2009). Yöntemde emülgatör olarak kullanılan yüzey aktif maddelerin türleri ve konsantrasyonları, liflerin morfolojisini ve özelliklerini etkilemektedir (Ma ve diğerleri, 2019). Emülsiyon elektroçekim, ani salımını azaltır ve biyomakromoleküller ile organik solvent arasındaki teması en aza indirdiğinden, organik solventlerle temas nedeniyle denatürasyona duyarlı biyomakromoleküller için de uygun bir yöntemdir (Coimbra ve diğerleri, 2019).

Multijet (Çok iğneli) elektroçekim

Çok iğneli yöntem, birden fazla iğnenin birleştirilmesiyle birden fazla jet elde edilerek lif üretiminde önemli bir artış sağlamaktadır. Çok nozüllü elektroçekim, geleneksel elektroçekime göre daha yüksek üretim oranları ve daha geniş kapsama alanı elde etmek için birden fazla jet kullanılmaktadır. Geleneksel elektroçekimde, nozuldan tek bir jet çıkar ve elektrik alanına doğru yönlendirilen kuvvetler tarafından yönetilmektedir; Çok nozullu elektroçekimde ise jetler, elektrik alan kuvvetlerine ek olarak komşu jetler tarafından uygulanan coulomb kuvvetleri tarafından belirlenmektedir (El-Sayed ve diğerleri, 2019).

Nozul aralığı, nozul ölçü numarası ve dizi yapısı, çok nozullu elektroçekim için önemli parametrelerdir. Nozullar doğrusal bir dizi halinde veya üçgen, dairesel veya kare şekillerde düzenlenebilir. Tomaszewski ve Szadkowski üç tip çok jetli nozül yapısı geliştirmişlerdir: seri, eliptik ve eşmerkezli. Bu nozül yapılarını elektroçekim ile incelemek için poli(vinil alkol) (PVA) çözeltisi kullanıldı. Konsantrik elektroçekim yapısı, hem prosesin verimliliği

hem de kalitesi açısından en iyi tür olarak seçilmiştir. Elektroçekim verimliliğinin işlem süresine ve nozül sayısına bağlı olduğu belirlendi.

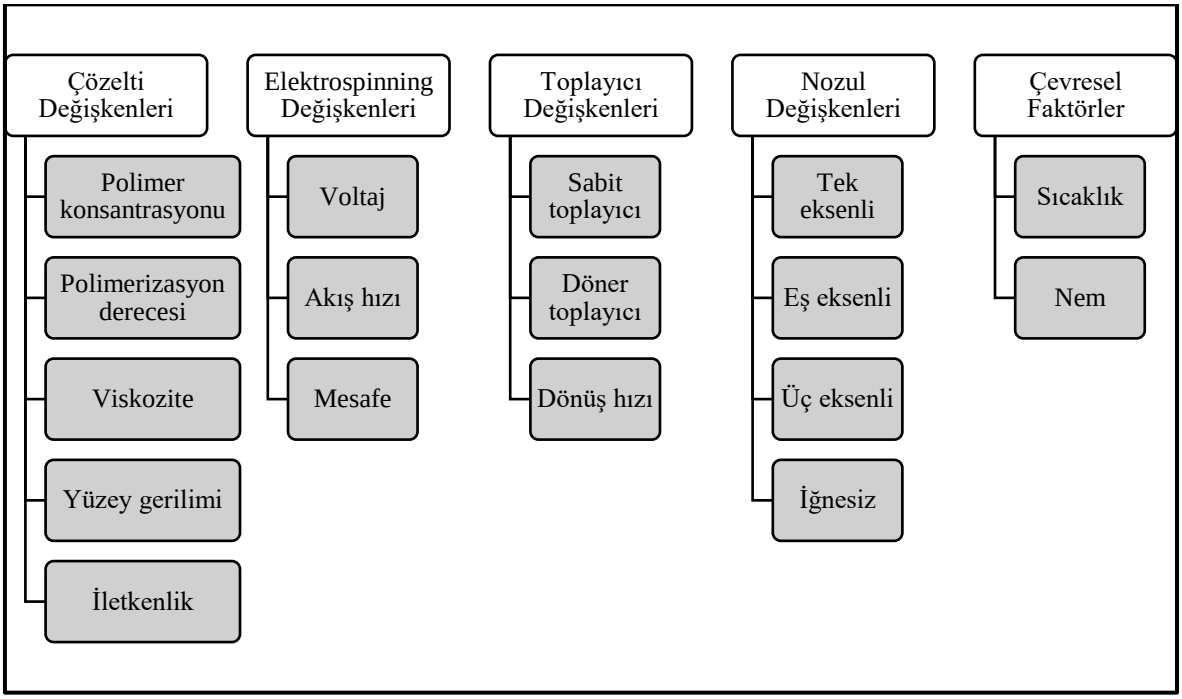
Elektroçekim nanoliflerinin üretimi, iğne sayısını artırarak veya birden fazla iğnenin düzenini değiştirerek geliştirilebilse de çok iğneli elektroçekim teknolojisinde, iğneler arasındaki karşılıklı elektrik alanı girişiminin varlığı, lif çapında büyük farklılıklara ve zayıf nanolif oluşumuna yol açmaktadır. Yardımcı elektrotların kullanımı, çok iğneli elektroçekim sisteminde nanoliflerin çapının kontrol edilmesinde ve optimize edilmesinde etkilidir ve verimliliği artırmaktadır.

Çizelge 2.7. Farklı elektroçekim yöntemleri ile nanolif üretimi

Etkin Madde	Polimer	Çözücü Sistemi	Üretim Metodu	Referans
Tangeretin	PVA / poly (akrilik asit)	Deiyonize su	Emülsiyon elektroçekim	(Zhan, Yan, Li, Sheng ve Li, 2021)
Balık yağı	PVA	Distile su	Emülsiyon elektroçekim	(García-Moreno ve diğerleri, 2016)
(R)-(+) limonen	PVA	Distile su	Emülsiyon elektroçekim	(Camerlo, Vebert-Nardin, Rossi ve Popa, 2013)
Doksorubisin	PVA/PCL	Distile su / 2,2,2-Trifluoroetanol	Koaksiyal elektroçekim	(Yan ve diğerleri, 2020)
Metronidazol	PCL/jelatin	2,2,2-Trifluoroetanol / Deiyonize su	Koaksiyal elektroçekim	(He ve diğerleri, 2015)
Siprofloksasin	PVA/PMMA	Asetik asit / Formik asit	Koaksiyal elektroçekim	(Zupancic, Sinha-Ray, Sinha-Ray, Kristl ve Yarin, 2016)
Ferulik asit	PVP/Zein	Etanol / Asetik asit	Side-by-side elektroçekim	(M. Wang ve diğerleri, 2020)
Gümüş nitrat	PCL/PVP	N, N dimetilformamit	Side-by-side elektroçekim	(R. Li ve diğerleri, 2019)
Siprofloksasin /Gümüş nanopartikül	PVP/ Etil Selüloz	Etanol / Asetik asit / Aseton	Side-by-side elektroçekim	(J. Yang ve diğerleri, 2020)

2.5.3. Elektroçekim yöntemine etki eden parametreler

Elektroçekim işlemini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Yöntemi etkileyen parametreler Şekil 2.14'te verilmiştir. Bu parametreler, pürüzsüz ve boncuksuz liflerin üretimini doğrudan etkilemektedir. Bu parametrelerin uygun şekilde kontrol edilmesiyle istenilen morfoloji ve çaplarda lifler üretebilmektedir. Elektroçekim tekniğini ve polimerik nanoliflerin üretimini daha iyi anlamak için tüm bu yönetim parametrelerinin etkilerini anlamak önemlidir. Bu faktörlerin etkisi tasarımla kalite yaklaşımı ile geliştirilebilir.



Şekil 2.14. Elektroçekim yöntemini etkileyen parametreler

Üretim parametrelerin etkisi

Üretim parametleri hazırlanan liflerin morfoloji ve mekanik özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Nanolif üretiminde kullanılan voltaj, akış hızı ve mesafeye bağlı olarak nanolif morfolojileri değişmektedir.

Voltaj: Yüklü jetlerin Taylor konisinden fırlatılması için eşik voltajının aşılması gerektiğinden, uygulanan voltaj elektroçekim yönteminde çok önemli bir faktördür. Uygulanan voltajın artmasıyla fiber çapı artmaktadır (Refate ve diğerleri, 2023). Elektrostatik alan voltajının azalmasıyla birlikte fiberin ortalama çapı azalmakta ve çap dağılımı daralmaktadır.

Akış hızı: Küçük çaplı lifler daha düşük akış hızlarında üretilir ve akış hızının fazla olması liflerin toplayıcıya vardıklarında kuru olmamasına neden olmaktadır (Abu Owida ve diğerleri, 2022)

Mesafe: Uç ile toplayıcı arasındaki mesafe, nanoliflerin çaplarını ve morfolojisini etkileyen diğer bir parametre olarak bilinmektedir (Kalantari ve diğerleri, 2019). Nanoliflerin toplayıcıya ulaşmadan önce kuruması için yeterli süreyi vermek için minimum bir mesafe gerekmektedir. Bu parametrenin elektrik alanın gücü ve jetin uçuş süresi üzerinde de doğrudan etkisi vardır. Nozül ile toplayıcı mesafesini azaltmanın etkisi, voltajı artırmanın etkisi ile hemen hemen aynıdır.

Çözelti değişkenlerinin etkisi

Çözeltinin viskozitesinin fiber üretimi için optimum olması gerekir çünkü aşırı çözelti viskozitesi stabil olmayan bir jete neden olmaktadır (V. S. Reddy ve diğerleri, 2021). Viskozite, çözünen maddenin ve çözücünün oranına göre değişmektedir.

Çözeltinin iletkenliği büyük ölçüde birkaç temel parametreden etkilenir: polimer türü, çözücü ve tuz içeriği (iyonlaşma derecesi). Çözeltinin iletkenliği arttıkça nanofiber çapı azalırken çözelti iletkenliğindeki bir azalma, jet oluşumunun uzamasına neden olur, bu da düzensizliğe ve boncuk oluşumuna ve hatta çözelti akışında tıkanmaya neden olur.

Yüzey gerilimi, sıvıların doğasında bulunan temel bir özelliktir ve moleküller arasındaki adezyon kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır. Yüzey gerilimine, farklı çözücülerin etkili olabileceği gösterilmiştir (Z. Li ve Wang, 2013). Çözeltinin yüzey gerilimini azaltarak boncuklu lifler pürüzsüz liflere dönüştürülebilmektedir. Yüzey gerilimi nanofiber morfolojisini şekillendirmede önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek yüzey gerilimi, elektriksel kuvvetlerde karşılık gelen bir artış gerektirmektedir; bu da sıvı jetini bozmakta ve fiberlerin yüksek çapa ve düşük homojenliğine neden olmaktadır.

Nozül değişkenliğinin etkisi

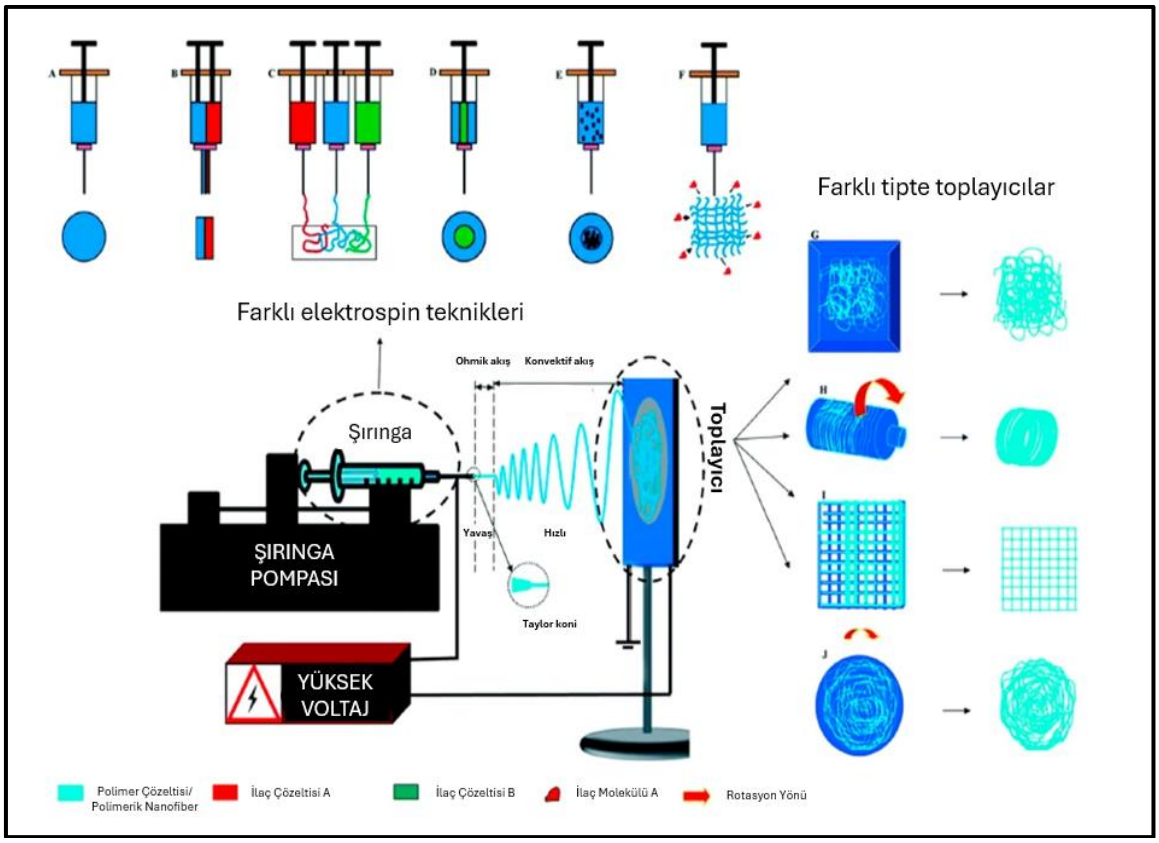
Kullanılan iğne düzeneğine bağlı olarak tek katmanlı (tek eksenli) veya iki katmanlı (koaksiyel) lifler üretilebilmektedir (Tawfik ve diğerleri, 2021).

Toplayıcı değişkenlerinin etkisi

Toplayıcı, nanoliflerin düzenlenmesi ve verimliliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Zare ve Ramakrishna, 2020). Spesifik bir uygulama için nanofiber elde etmek amacıyla elektroçekim kurulumundaki değişiklik, farklı elektroçekim türlerinin tasarlanmasına yol açmaktadır (Şekil 2.15). Çoğu elektroçekim cihazında fiberler genellikle düz bir toplayıcının yüzeyinde rastgele yönlendirilmiş olarak toplanmaktadır. Farklı uygulamalar için genellikle iyi hizalanmış ve yüksek düzeyde düzenli mimarilere ihtiyaç duyulur. Kollektörün tasarımı, nanoliflerin hizalanmasını etkilemede kritik bir rol oynamaktadır (Kılıç, Yıldırım, İçoğlu, Türkoğlu ve Topalbekiroğlu, 2024). Nanoliflerin tek eksenli hizalanmasını sağlamak için çeşitli toplayıcılar araştırılmıştır. Bunlar arasında döner tamburlu toplayıcı özellikle yaygındır. Bu toplayıcı, tamburun dönme hareketinden yararlanarak nanolifleri tek eksenli olarak hizalar, toplayıcının dönüş hızı bu hizalamayı etkileyen çok önemli bir faktördür. Tamburun yanı sıra, dönen diskler, dönen huniler ve dinamik sıvı banyoları, çerçeve toplayıcı, tekerlek benzeri disk veya bir yardımcı elektrot/elektrikli alan gibi kollektörün veya elektrik alanının dağıtımının modifikasyonu da dahil olmak üzere farklı tipte toplayıcılar da kullanılmaktadır (Hu ve diğerleri, 2014).

Çevresel koşulların etkisi

Ortamın nem ve sıcaklığı üretilen nanolif formülasyonlarının çapını ve şeklini etkilemektedir. Nem değişikliğine bağlı olarak boncuklu lif yapısı oluşur veya lif oluşması gecikmektedir. Çalışmalara bakıldığında bazı durumlarda kullanılan polimer tipine bağlı olarak sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörlerin etkisinde değişiklikler gözlenmektedir. Sıcaklıkdaki bir artış, nanolif çapında bir artışa ve daha geniş çap dağılımına neden olduğu belirtilirken (Haider ve diğerleri, 2018); başka bir durumda artan sıcaklık, fiber çapının azalmasına neden olmaktadır (Amith, Sridhar, Angadi ve HNNM, 2019). Ayrıca, nem oranının azalması solventin tamamen kurumasına neden olabilmektedir. Artan nem aynı zamanda liflerin yüzeyinde küçük gözeneklerin oluşmasına da neden olabilmektedir.



Şekil 2.15. Elektroçekim için kullanılan başlıca ilaç yükleme teknikleri ve toplayıcı türleri. (a) Karışım elektroçekim; (b) yan yana elektroçekim; (c) çok jetli elektroçekim; (d) eş eksenli elektroçekim; (e) emülsiyon elektroçekim; (f) yüzey immobilizasyonu; (g) statik plaka; (h) dönen mandrel; (ı) ızgara; (j) dönen disk (Vellayappan ve diğerleri, 2016)

2.5.4. Elektroçekim yönteminde scale-up

Nanoliflerin çeşitli uygulamaları için büyük miktarlarda lif gerekmektedir (Bhardwaj ve Kundu, 2010). Nanoliflerin büyük ölçekli üretimi için bazı teknikler geliştirilmiş olsa da nanoliflerin ölçeklendirilmesinde hala teknolojik zorluklar bulunmaktadır (Y. Ding, Hou, Zhao, Zhu ve Fong, 2016). Nanolif üretimini arttırmak amacıyla çok nozullu elektroçekim yöntemi, iğnesiz elektroçekim ve santrifüj eğirme gibi yöntemler geliştirilmiştir (Valipouri, 2017; Vass ve diğerleri, 2020).

Elektroçekim yöntemi, çoklu püskürtme uçları, iğnesiz varyasyonlar ve diğer stratejiler kullanılarak endüstriyel uygulamalar için ölçeklenebilir bir teknoloji olarak kabul edilmektedir (J. A. Silva ve diğerleri, 2021). Ölçek büyütme, spinlenebilir çözeltilerin sınırlı olması, nanoliflerin elektroçekim yöntemindeki tutarsızlıkları ve istikrarsızlığı nedeniyle sınırlıdır. Elektroçekim yönteminde, üretim adımlarında makro ölçekli üretim, proses

stabilitesi ve tekrarlanabilirliği içerensorunlar nedeniyle sınırlıdır. Bu sorunların üstesinden gelmek için üretim verimliliğinin arttırılması gerekmektedir. Elektroçekim ile liflerin büyük ölçekli üretiminde karşılaşılan en büyük zorluk, tek iğneli nozüllerin kullanımından kaynaklanan düşük üretim kapasitesidir (0,01 g–2 g/saat).

İğnesiz elektroçekim yöntemi bu nedenle daha avantajlı bulunmaktaktadır. Araştırmacılar artık endüstriyel ölçeğe geçmek için kaliteli elektroçekim nanofiberlerin seri üretimine yönelik iğnesiz elektroçekim sistemlerinin geliştirilmesine yönelmiştir.

Niu ve arkadaşları tarafından yürütülen araştırmada nanolif üretim oranını artırılmıştır. Araştırmalarında, 23 g/s poliakrilonitril lif üretim hızı, 2 metreye kadar genişlikte, daha yüksek lif verimliliğine sahip, bobin bazlı, iğnesiz elektroçekim sistemi ile başarıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçek büyütmeli elektroçekim sistemlerinde kullanılan toplayıcı tasarımları, iğnesiz elektroçekim sistemlerinin konfigürasyonu, nanofiberlerin kalitesini ve Taylor konisinin şeklini etkilemektedir.

2.5.5. Nanolif formülasyonlarının karakterizasyon

Liflerin karakterizasyonu geometrik, kimyasal ve mekanik karakterizasyon olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilebilmektedir (Yıldız ve diğerleri, 2020).

Geometrik karakterizasyon

Fiber morfolojisi ve fiber çapının değerlendirilmesini içerir ve taramalı elektron mikroskobu (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM), alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak gerçekleştirilebilir. Morfolojik çalışmalarla lifin homojenliği ve boyutu izlenebilmektedir

Kimyasal karakterizasyon

Nanoliflerin etkileşimleri ve genel kimyasal özellikler (moleküler yapı, moleküller arası ve molekül içi etkileşimler gibi) spektroskopik tekniklerle değerlendirilir (Partheniadis, Nikolakakis, Laidmäe ve Heinämäki, 2020). Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi

(FT-IR), nükleer manyetik rezonans (NMR), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve x-ışını kırınımı kullanılarak XRD ile karakterize edilmektedir.

Mekanik karakterizasyon

Nanoliflerin mekanik karakterizasyonu genellikle texture analiz cihazı ve optik gerilim ölçen cihazlarla gerçekleştirilmektedir. Mekanik karakterizasyonlarda nanoliflerin temas açısı, kopma uzaması, gerilme direnci ve adezyon değerleri gibi mekanik özellikleri değerlendirilmektedir. (Tan ve Lim, 2006; Tort, Acartürk ve Beşikci, 2017). Nanoliflerin mekanik özellikleri polimer tipi ve konsantrasyonundan, proses parametrelerinden ve proses koşullarından etkilenmektedir (Partheniadis ve diğerleri, 2020).

2.5.6. Nanoliflerin vajinal kullanımları

Nanolifler, sıvı veya jel bazlı dozaj formlarının dağınıklık ve sızıntı özelliklerinin üstesinden gelmeye yardımcı olabilecek katı bir dozaj formudur (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2021). Elektroçekim nanolifler kütlece %60'a kadar etkin madde içerebilmektedir. Etkin madde/polimer oranları ve çekirdek-kabuk yapısı nedeniyle etkin maddenin, salımını günler hatta haftalar boyunca devam edecek şekilde ayarlanabilmektedir (Chindamo ve diğerleri, 2021). Ayrıca nanolifler, farklı ajanları kapsülleme, üretim parametrelerinde esneklik, pratik uygulama ve çoklu geometrilere sahip olmalarıyla tercih edilen dozaj şekilleridir (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.8. Vajinal uygulamalar için geliştirilen nanolif formülasyonları

Etkin Madde	Polimer	Solvan Sistem	Hastalık	Referans
Metronidazol	PVP	Etanol	Bakteriyel vajinozis	(Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2020)
Benzidamin	PVP	Etanol	Vajinit	(Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2021)
Sisplatin	PCL/kitosan	DCM:DMF (6:4)	Servikal Kanser	(Aggarwal, Goyal ve Rath, 2017)
Klotrimazol	Aljinat PVA Dekstran	Distile su	Antifungal aktivite	(Nematpour ve diğerleri, 2020)
Progesteron	PEO Na CMC	Distile su:Etanol (1:1)	Erken doğumu önlemek	(Brako, Raimi-Abraham, Mahalingam, Craig ve Edirisinghe, 2018)
Probiotik	PVA (Yağsız süt /Laktoz/Gliserol)	Distile	Ürogenital enfeksiyonları önlemek	(J. A. Silva ve diğerleri, 2021)
Progesteron Arabin pesari	PCL	Kloroform:DMF (7:3)	Erken doğumun önlenmesi	(Almousained ve diğerleri, 2024)
PEGile paklitaksel nanokristalleri	PVA	Distile su	Servikal kanser tedavisi	(Duan ve diğerleri, 2024)
Progesteron	Pullulan	Distile su	Erken doğumun önlenmesi	(Lavanya ve diğerleri, 2024)
Flukonazol	PVA	Distile su	Antifungal aktivite	(R. Sharma, Garg, Goyal ve Rath, 2016)

Nanoliflerin mekanik özellikleri, üretim parametrelerinin kontrol edilmesiyle kolaylıkla ayarlanabilmektedir (Cazorla-Luna, Ruiz-Caro, Veiga, Malcolm ve Lamprou, 2021). Nanolif formülasyonlarının güçlü ve pürüzsüz olması gerektiğinden mekanik performansın optimizasyonu vajinal dozaj formları için özellikle önemlidir. Bazı çalışmalar kadınların pürüzsüz dokulu, taşıma ve uygulama için küçük boyutlu ve uygun dozlama sıklığına sahip katı formülasyonları tercih etmektedir.

2.5.7. Nanoliflerin diğer kullanım alanları

Nanofiber teknolojisi yanık ve yara bakımı, doku mühendisliği, kozmetik, sensör, tekstil gibi çeşitli alanlarda birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Yara pansumanları, doku mühendisliği iskeleleri ve ilaç dağıtım sistemleri üzerine yapılan birçok çalışmada nanofiberler, yüksek performans göstermiştir (Leung ve Ko, 2011). Nanofiber iskeleler yüksek spesifik yüzey alanı, yüksek gözeneklilik ve geçirgenlik özellikleriyle kemik, kıkırdak, deri, sinir, tendon, bağ gibi dokular için uygulanmaktadır (G. Liu, Gu, Hong, Cheng ve Li, 2017). Nanoliflerde kullanılan polimerlerin fonksiyonel grupları, hücre

yapışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve doku yenilenmesini kolaylaştıracak şekilde ayarlanabilir (Cho, Jung, Kang, Shin ve Youk, 2015; Tao ve diğerleri, 2020). Nanolifler ayrıca periodontal doku rejenerasyonu gibi durumlar için doğal ve sentetik polimerlerden üretilerek yaygın olarak kullanılmaktadır (Wright, Parrag, Yang ve Santerre, 2017).

Nanolifler biyouyumlulukları, çeşitli yapısal özellikleri ve şekilleri nedeniyle biyosensör olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Nanolifler, sensör olarak kullanıldığında küçük boyutları, teşhis için küçük bir numune gerektirmesi ve daha iyi etkileşim sağlayan esnek ve gözenekli yapılara sahip geniş reaksiyon yüzeyi ile birçok avantaj sağlamaktadır (Hernández ve Chauhan, 2022). Kanserli tümörlerin görüntülenmesinde nanofiberlerin kullanılmasıyla erken tanı ve tedavi başarısı artmaktadır (Mane, Ambekar ve Kandasubramanian, 2020). Mikro ve nanolifli malzemeler yara pansumanlarının hazırlanması için uygundur (Jayakumar, Prabaharan, Nair ve Tamura, 2010). İdeal bir yara pansumanının yara iyileşmesini arttırmak için nem dengesini koruması, mikroorganizmalara karşı koruma sağlaması, yaralanan bölgeye uyum sağlaması ve düşük maliyetli olması gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Felgueiras ve Amorim, 2017). Nanolifler, geniş yüzey alanları, nano gözenekli yapıları ve hücre dışı matrisi taklit etme yetenekleriyle hücre sinyal yollarını hızla aktive ederek fibroblastik hücrelerin tepkisini uyardıkları için geleneksel yara örtülerine göre çeşitli avantajlara sahiptir (Haider ve diğerleri, 2018; Tort ve diğerleri, 2017). Nanoliflerin farklı alanlardaki uygulamaları Çizelge 2.9.'da gösterilmektedir.

Çizelge 2.9. Nanoliflerin diğer alanlardaki uygulamaları

Polimer	Yapı	Uygulama Alanı	Referans
PVA	Nanofiber	Sensör	(Yilmaz ve Erdem, 2020)
Kollajen, kitosan, aljinat	Nanofiber	Yara örtüsü	(Tort ve diğerleri, 2017)
PLGA, kollajen	Nanofiber Nanokompozit İskele	Kemik doku mühendisliği	(Jose ve diğerleri, 2010)
PVA	Nanofiber	Elektrokatalist	(Barakat ve diğerleri, 2015)
Poliamid, polivinil asetat, poliakrilonitril, selüloz asetat	Nanofiber	Filtrasyon	(Matulevicius, Kliucininkas, Prasauskas, Buivydiene ve Martuzevicius, 2016)
Karboksillenmiş çok tabakalı karbon nanotüp, Naylon 6	Kompozit nanolif	Enzim elektrokatalitik immünosensör	(Xiaoying Wang, Gao, Shu, Wang ve Liu, 2015)
PVA, polianilin	Nanolif	Gaz sensör	(Bittencourt, de Santana Gois, Rodrigues de Oliveira, da Silva Agostini ve de Almeida Olivati, 2019)
Politetrafloroetilen	Hollow fiber membran	Membran distilasyon	(Su, Guo, Tong, Chang ve Song, 2000)
Polikaprolakton / D-Glukozamin sülfat	Çekirdek kabuk nanofiber mat	Kıkırdak doku mühendisliği	(S. Chen, Chen, Chen, Mo ve Fan, 2021)
Poliüretan	Nanofiber mat	Koruyucu giysi	(Gorji, Jeddi ve Gharehaghaji, 2012)
Selüloz	Nanofiber	Batarya	(D. Park, Park ve Kim, 2021)

Nanolifler ayrıca çevre koruma, nanosensör, elektronik/optik, koruyucu giysi, enerji dönüşümü ve depolanması, filtreleme gibi alanlarda da kullanılmaktadır (Ghorbani-Choghamarani ve Taherinia, 2020; Y. Liu ve diğerleri, 2020). Ayrıca nanolifler farklı özellikleriyle çok çeşitli analitik teknikler ve süreçlerde kullanılmaktadır (Yafang Zhang ve diğerleri, 2020). Aktif gruplara sahip nanolifler, yüzeylerindeki fonksiyonel gruba bağlı olarak farklı adsorpsiyon mekanizmaları ile toksik maddelerin adsorbe edilmesiyle atık su ve içme sularının temizlenmesinde kullanılmaktadır (Thenmozhi, Dharmaraj, Kadirvelu ve Kim, 2017).

2.6. Kullanılan Polimerlerin Özellikleri

Vajinal ilaç taşıyıcı sistemler verimliliği artırmak ve vajinal mukozal hücreler tarafından adsorpsiyonu ve tutulmayı uzatmak için genellikle polimerik moleküller kullanılarak hazırlanmaktadır (Braga, Dal Sasso, Spallino, Sturla ve Culici, 2009) Farmasötik olarak kabul edilebilir polimerler, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlere epitelyal ve mukozal yüzeylerin kaplanması için yararlı olan belirli bir viskozite sağlayarak ilacın temas halinde kalmasını sağlar ve böylece aktif moleküllerinin lokal verilişini uzatmaktadır. Ayrıca bu polimerler antibakteriyel, antimikotik, antioksidan ve antiinflamatuar etkilerin yanı sıra lokal olarak kullanımda etkili olan yüzey aktif madde ve nemlendirici aktivitelere de sahip olabilmektedirler.

FDA ve diğer yetkili kuruluşlar tarafından onaylanmış farklı türde biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, mukozal yüzeylerde kontrollü ilaç verilişi için önerilmektedir. Bunlar arasında poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), selüloz türevleri, poli(etilen oksit) (PEO)/poli(propilen oksit) (PPO) triblok kopolimerleri (PEO-PPO-PEO), polikaprolakton (PCL), poliakrilatlar, poli(etilen glikol) (PEG), poli(vinil alkol) (PVA) ve aljinat gibi polimerler formülasyonlarda ana formülasyon bileşenleri veya yardımcı madde olarak incelenmiştir (Chindamo ve diğerleri, 2021). İlaç taşıyıcı olarak yaygın kullanılan polimerler Çizelge 2.10'te verilmiştir.

Çizelge 2.10. İlaç taşıyıcı olarak yaygın olarak kullanılan mukoadezif polimerler (Acarturk, 2009; Cazorla-Luna vd., 2021)

Sentetik Polimerler	Yarı sentetik Polimerler	Doğal Polimerler
Poliakrilik Asit	Metilselüloz	Kitozan
Polivinilprolidon	HPMC	Aljinat
Polivinilalkol	Metil Etil Selüloz	Pektin
Polietilen Oksit	Hidroksi Etil Selüloz	Jelatin
Polihidroksietil Metakrilat	Hidroksi Propil Selüloz	Karagenan
Polietil vinil eter		Pullulan
Yüksek Molekül Ağırlıklı		Zein

Poli(vinil alkol) (PVA), dayanıklılık, suda çözünürlük, gaz geçirgenliği, mekanik performans ve termal özellikler gibi mükemmel özelliklere sahip, oldukça hidrofilik, toksik olmayan ve biyouyumlu sentetik yarı kristal bir polimerdir (Kusumawati, Istiqomah, Husnia ve Fathurin, 2021; J.-C. Park ve diğerleri, 2010; Teixeira, Amorim ve Felgueiras, 2019). PVA, poli(vinil asetatın) hidrolizinden (veya alkolizinden) türetildiği için çeşitli hidroliz derecelerinde mevcuttur. PVA'nın yüzey stabilizatörü olarak kullanılması veya PEG zinciri ile yüzey kaplaması, vajinal yapışmaya katkıda sağladığı ve müsinin hidrofobik bölgeleri ile bağlanmayı artırarak servikovajinal mukusta hızlı difüzyon sağlamaktadır (Chindamo ve diğerleri, 2021).

Poli(D,L-laktit-ko-glikolit) (PLGA), laktik asit ve glikolik asitten oluşan bir kopolimerdir. PLGA, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu polyester polimer ailesinin bir üyesidir (Prakapenka, Bimonte-Nelson ve Sirianni, 2017). İlaç verilişinde taşıyıcı olarak veya doku mühendisliği gibi alanlarda kullanılan polimerlerden birisidir. PLGA, hedefleme, görüntüleme ve tedavi açısından büyük bir potansiyele sahiptir. PLGA'nın en büyük avantajı sulu ortamda tamamen biyolojik olarak parçalanabilmesidir. PLGA, biyouyumluluk ve biyoparçalanabilirlik, FDA ve EMA onaylı olması, sürekli salım sistemlerinin geliştirilmesi, biyolojik etkileşimlerin sağlanması için uygulanabilir yüzey modifikasyonları, ilacın bozunmaya karşı korunması ve belirli bir organ veya hücreleri hedefleme sağlaması gibi avantajları vardır (Mir, Ahmed ve Rehman, 2017). Vücuttaki PLGA, hidroliz yoluyla endojen monomerlere, laktik asit ve glikolik asite ayrışır, bunlar daha sonra su ve karbon dioksite ayrışır ve düşük toksisite gözlenmektedir (Choi, Seo ve Yoo, 2012). Moleküler ağırlıkların uygun şekilde seçilmesiyle PLGA'nın bozunma süresi bir haftadan birkaç aya kadar değiştirebilmektedir, böylece kontrollü veya sürekli bir şekilde ilaç salımı sağlanabilmektedir (Leyva-Gómez ve diğerleri, 2018).

Poli(etilen oksit) (PEO), hidrofilik, toksik olmayan ve intravajinal uygulamalar için adezyonu artırabilen biyoadezif özellikte bir polimerdir (Minooei ve diğerleri, 2023). PEO, geniş bir moleküler ağırlık aralıklarında bulunabilen, iyonik olmayan, tabletleme veya kaplama işlemlerinde yaygın olarak kullanılan farmasötik bir yardımcı maddedir (Szymańska ve diğerleri, 2022). Sulu çözeltilerdeki iyi viskoelastik davranışı nedeniyle PEO, eğirme yöntemi ile nanoliflerin üretimini kolaylaştıran, kolayca üretilebilen bir polimerdir (Szymańska ve diğerleri, 2022).

Zein, ilaç verilişinde ve kaplamada kullanılan, suda çözünmeyen bitkisel bir proteinidir (Omer ve Zelkó, 2021). Düşük mekanik özelliklerini arttırmak için çeşitli modifikasyonların yapılması gerekmektedir. Zein, çözünürlük özelliklerine ve sekans homolojilerine göre dört ana gruba ayrılan farklı proteinlerin bir karışımından oluşmaktadır (Aghababaei ve diğerleri, 2024). Birinci grup, molekül ağırlığı 19 ve 22 kDa olan iki formu olan ve ağırlık bazında toplam zeinin %70-85'ini oluşturan en baskın yapı olan α-zeindir. Yüksek bir α-sarmal içeriğine sahiptir. İkinci grup ise molekül ağırlığı 14 kDa olan β-zeindir. Üçüncü grup ise etanolde çözünebilen, molekül ağırlığı 16 ve 27 kDa olan iki formu bulunan γ-zeindir. Dördüncü grup ise molekül ağırlığı 10 kDa olan δ-zeindir. Zein, temel amino asitler olan riptofan ve lisin açısından eksik olmasına rağmen, onu diğer birçok proteinden ayıran yüksek seviyelerde histidin ve arginin içermektedir.

Ayrıca çalışmamızda farklı özelliklerinden dolayı tercih ettiğimiz PVP, siklodekstrinler, kitozan, gluten gibi polimerler de incelenmiştir. Polivinilpirolidon (PVP), FDA onaylı, Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan (GRAS) bir polimerdir (Birer ve diğerleri, 2024). PVP, vajinal olarak uygulamaya uygun, hidrofilik özellikte, mukoadezif, biyouyumlu bir polimer olması nedeniyle tercih edilir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2020). Güvenlidir ve zayıf çözünen malzemelerin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını arttırmak için elektroçekim çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mukoadezif bir polimer olarak PVP içeren ticari vajinal jel formülasyonları mevcuttur (S. Roy ve Prabhakar, 2010). Kitozan, vajinal uygulamalar için kullanılabilecek biyouyumlu, antimikrobiyal etkili ve mukoadezif özellikte bir biyopolimerdir (Araujo, De Souza, Carvalho, Duarte ve Chorilli, 2021). Siklodekstrinler, hidrofilik bir dış yüzeye ve ilaçlarla kompleks oluşturma kabiliyeti sağlayan hidrofobik bir boşluğa sahip olmaları, dolayısıyla sulu çözünürlük ve stabilitelerini arttırma ve toksisitelerini azaltma özelliği ile karakterize edilen siklik oligosakkaritlerdir (Palmeira-De-Oliveira ve diğerleri, 2015).

2.7. Kullanılan Etken Maddelerin Özellikleri

Çalışmalarımızda TDF ve FTC olmak üzere iki farklı etkin madde kullanılmıştır. Oral PrEP'de FTC ve TDF içeren piyasa preparatı olan Truvada® günlük kullanımı, kadınlarda HIV insidansını azaltmada klinik başarı göstermiştir (Pereira ve diğerleri, 2014). Günde bir kez kullanılan Truvada® 300 mg TDF ve 200 mg FTC içeren bir kombinasyon olarak yüksek enfeksiyon riski taşıyan bireylerin korunması için FDA ve EMA tarafından onaylanmıştır

(Cautela, Moshe, Sosnik, Sarmento ve Das Neves, 2019). TDF ve FTC, HIV-1 ve HIV-2 üzerinde sinerjik antiviral etkilere sahiptir (Masho, Wang ve Nixon, 2007). Bu iki NRTI'nin etkinliği, yüksek tolere edilebilirliklerine ve hasta kabul edilebilirliğine bağlıdır (Mandal, Belshan, Holec, Zhou ve Destache, 2017).

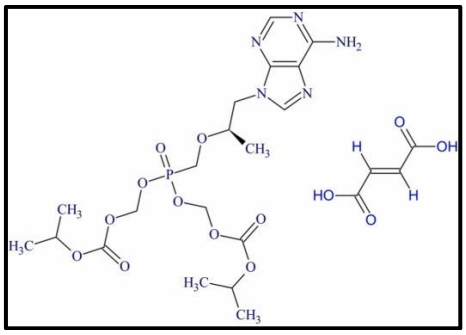
2.7.1. Tenofovir disoproksil fumarat (TDF)

Tez çalışmamızda etken madde olarak HIV'e karşı antiviral aktiviteye sahip bir nükleotid reverse transkriptaz inhibitörü olan TDF kullanılmıştır (Bektaş, 2019). HIV enfeksiyonunun tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir asiklik nükleotid analoğu ters transkriptaz inhibitörü olan tenofovirin ön ilacıdır (Vidal ve diğerleri, 2006). TDF absorbe olduktan sonra hızla tenofovir'e dönüşür. TDF, daha yüksek geçirgenliğe ve HIV-1'e karşı tenofovirden önemli ölçüde daha düşük konsantrasyonlarda etkili (EC50) bir ön ilaçtır (Şekil 2.16) (Destache ve diğerleri, 2016).

TDF, uzun hücre içi yarı ömrü, düşük direnç gelişimi riski ve günde bir kez oral formülasyon olarak emtrisitabin ile kombine kullanımındaki başarısı ile HIV'in önlenmesi için kullanılan temel ilaçlardan birisidir (Parikh ve diğerleri, 2009). Tenofovir, %1'lik jelinin klinik çalışmalarda HIV'in cinsel yolla bulaşmasını azaltmadaki etkinliğini gösteren CAPRISA 004 çalışmasından bu yana, vajinal mikrobisitlerin geliştirilmesi için yaygın olarak incelenen ilaçlardan biridir (Notario-Pérez ve diğerleri, 2018). Artan korumanın servikovajinal mukoza ve sıvılardaki daha yüksek tenofovir düzeyleriyle ilişkili olduğu görülmüştür. Bu olasılık daha sonra vajinal ve rektal tenofovir ve diğer ilaç adayları için insanlarda yapılan diğer klinik çalışmalarla desteklenmiştir. Hücresel düzeyde etki mekanizması olan mikrobisit ilaçların, yani ters transkriptaz inhibitörlerinin, yalnızca vajinal ve rektal sıvılarda bulunması değil, aynı zamanda orada bulunan HIV'e duyarlı hücrelere ulaşabilmek için dokuya da en azından bir dereceye kadar nüfuz etmesi gerekmektedir. TDF, BCS Sınıf 3 bir etkin maddedir yani yüksek çözünürlüğe ve düşük geçirgenliğe sahiptir.

<u>Fizikokimyasal özellikleri</u>

TDF'nin kimyasal formülü $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P$ olup açık formülü 9-((R)-2-((bis(((izopropoksikarboniloksi)metoksi)fosfonil)metoksi)propil) adenin fumarat (1:1)'dir (Gomes ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.16. TDF'nin kimyasal yapısı

Etki mekanizması

TDF, in vivo olarak tenofovire hidrolize edilir, bu daha sonra hücresel kinazlar tarafından farmakolojik olarak aktif metabolit tenofovir difosfata fosforile edilmektedir (Chapman, McGavin ve Noble, 2003). Tenofovir difosfat, viral DNA'ya dahil olmak için nükleotid deoksiadenosin 5'-trifosfat ile rekabet ederek HIV ters transkriptazın aktivitesini inhibe etmektedir. Viral DNA'ya dahil edildikten sonra riboz halkasının olmaması nedeniyle DNA uzamasını durdurarak etki eder.

Antiviral aktivite

TDF, MT-2 T-lenfositlerinde HIV-1IIIb'ye karşı tenofovire kıyasla daha yüksek inhibitör aktiviteye sahiptir. Virüsün inhibisyonu için gereken konsantrasyon [IC50], TDF için 0,003 vs 0,5 μmol/L iken TFV için 0,007 vs 0,63 μmol/L'dır (Chapman ve diğerleri, 2003). Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) için de benzer bir sonuç gözlenmiştir. (IC50: 0,005'e karşı 0,18 μmol/L). TDF'nin hücre içi alımının tenofovirden daha hızlıdır. Bu durumun aktif metabolit olan tenofovir difosfatın yaklaşık 1000 kat daha yüksek hücre içi birikiminden olduğu düşünülmektedir.

Farmakokinetik özellikler

Tenofovir disoproksil fumarat, bis-izopropoksikarboniloksimetil ester türevinin fumarik asit tuzu veya adenozin 5'-monofosfatın asiklik nükleosid fosfonat analoğu olan tenofovirin bir ön ilacı olarak ifade edilmektedir (Shahabadi, Hadidi ve Feizi, 2015). İlk çalışmalar tenofovirin hücre içi yarı ömrü uzatılmış güçlü bir antiviral olduğunu göstermesine rağmen, zayıf oral biyoyararlanımın gözlenmiştir. İki alkil metil karbonat esterin eklenmesi,

tenofovirin stabilitesini, bağırsak emilimini ve oral biyoyararlanımını önemli ölçüde artırmış ve oral uygulama için tek bir tablet halinde formüle edilmesine olanak sağlamıştır. Tenofovirin oral biyoyararlanımı, yüksek yağlı bir yemekle birlikte uygulandığında artar, ancak tipik bir yemekle birlikte veya yemeksiz uygulandığında kararlı durumda benzer bulunmuştur (Kearney, Flaherty ve Shah, 2004).

TDF'nin hayvanlara oral uygulanmasını takiben, maksimum tenofovir plazma konsantrasyonlarına 0,25-1,5 saat içinde ulaşılmıştır. Gözlenen terminal eliminasyon yarı ömrü değerleri sıçanlarda, maymunlarda ve köpeklerde sırasıyla yaklaşık 7, 9 ve 60 saat olarak bulunmuştur. Tenofovirin oral biyoyararlanımı köpeklerde ve maymunlarda en yüksek (%30-40), kemirgenlerde ise en düşük (%10-20) gözlenmiştir. Sıçanlarda ve köpeklerde erken zaman noktalarında gözlenen, monoester dışında tenofovirin dolaşımda bulunan hiçbir metaboliti gözlenmemiştir. Bu durum, karaciğer ve bağırsak homojenatlarında tenofovir metabolizmasının eksikliği ile ilişkilidir. Hücre içi kinazlarla fosforilasyon adımı gerektiren çoğu NRTI'den farklı olarak tenofovir, TDF'nin farmakolojik olarak aktif metabolit olan tenofovir difosfatı üretmesi gerekmektedir (Grim ve Romanelli, 2003).

Toksikolojik etkileri

TDF'nin özellikle uzun süreli kullanımda ciddi yan etkileri vardır. TDF ile tedavi edilen HIV hastalarında renal toksisite yaygınlaşmaktadır ve TDF kullanımına ile ilişikili ciddi renal tübüler toksisite vakaları gözlenmiştir (Abraham, Ramamoorthy ve Isaac, 2013). 2-9 yıl boyunca tenofovir ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %15'inde renal tübüler disfonksiyon gelişmektedir. TDF toksisitesinin ana bölgesi proksimal tübüldür ve ciddi vakalarda hastalarda Fanconi sendromu gelişebilmektedir. Bu sendrom fosfatüri, glikozüri, bikarbonat kaybı, tübüler proteinüri ve aminoasidüri ile karakterizedir.

Çizelge 2.11. TDF ve FTC ticari ürünlerde kombine kullanımı (Popović-Djordjević ve diğerleri, 2022)

Etkin Madde kombinasyonları	Ticari İsim	Firma	Formülasyon Tipi
FTC/tenofovir disoproksil (TDF)	Truvada®	Gilead Sciences Inc.	Tablet
Efavirenz/Emtrisitabin/Tenofovir	Atripla®	Bristol-Myers Squibb Company/Gilead Sciences, Inc.	Tablet
Biktegravir/Emtrisitabin/Tenofovir	Biktarvy®	Gilead Sciences Inc.	Tablet
Emtrisitabin/Tenofovir	Descovy®	Gilead Sciences Inc.	Tablet
Darunavir/Kobicistat/Emtrisitabin/ Tenofovir	Symtuza®	Janssen Pharmaceuticals Inc.	Tablet
Emtrisitabin/Elvitegravir/Kobicistat /Tenofovir	Genvoya®	Gilead Sciences Inc.	Tablet
Elvitegravir/Kobicistat/Emtrisitabin /Tenofovir	Stribild®	Gilead Sciences Inc.	Tablet
Emtrisitabin/Rilpivirin/Tenofovir	Eviplera®	Gilead Sciences Inc.	Film kaplı tablet
Emtrisitabin/Rilpivirin/Tenofovir	Odefsey®	Gilead Sciences Inc.	Tablet

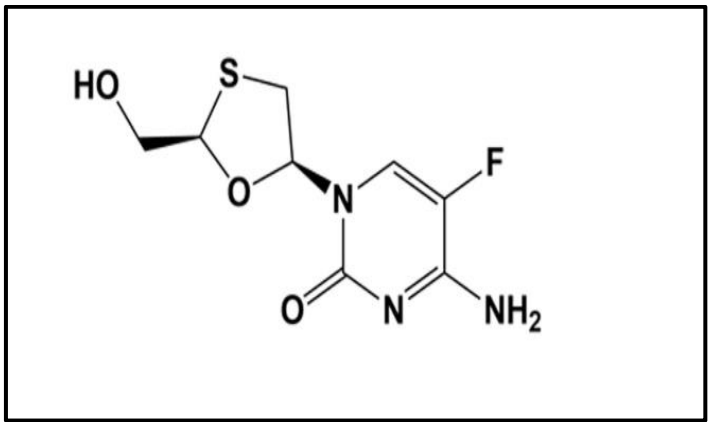
2.7.2. Emtrisitabin (FTC)

FTC, ilk olarak 1989 yılında Dr. Dennis Liotta ve Raymond Schinazi'nin rehberliğinde doktora sonrası araştırmacı Dr. Woo-Bang Choi tarafından Emory Üniversitesi'nde rasemat olarak sentezlenmiştir (Schinazi ve diğerleri, 2022). Emory grubu (-)-enantiyomerini saflaştırmış ve FTC'nin HIV'e karşı antiviral aktivitesini açıklamışlardır (Şekil 2.17).

Birincil antiretroviral kombinasyon terapilerinde ikili NRTI tedavilerinin temel bir bileşeni olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Mandal, Belshan, ve diğerleri, 2017). Emtriva® (Emtricitabin; FTC) olarak bilinen bu ürün, HIV-1, HIV-2 ve hepatit B virüsüne karşı aktif olan, bir deoksisitidin analoğu olan lamivudinin (3TC) florlu bir türevidir. Viral ters transkriptaz inhibitörüdür ve in vitro hem HIV hem de HBV'ye karşı etkilidir (Ramaswamy, 2018). Emtriva® 2003 yılından beri FDA onaylıdır ve şu anda HIV hastalarının başlangıç tedavisinin bir parçasını oluşturmaktadır. FTC, BCS Sınıf 1 bir etkin maddedir yani yüksek çözünürlüğe ve yüksek geçirgenliğe sahiptir.

Fizikokimyasal özellikleri

FTC beyaz ile kirli beyaz renkli kristal tozdur (R. K. Mishra, Chaubey, Patel, Mishra ve Singh, 2020). 4-amino-5-fluoro-1-[(2R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]pyrimidin-2-on olarak adlandırılmaktadır (Scholar, 2009)



Şekil 2.17. FTC'nin kimyasal yapısı (Al-Majed, Bakheit, Al-Qahtani, Al-Kahtani ve Abdelhameed, 2020)

Etki mekanizması

Nükleosid ters transkriptaz inhibitörü (NRTI) olan FTC, hücresel enzimler tarafından fosforile edilerek emtrisitabin 5'-trifosfat oluşturulur; bu, ters transkriptazı rekabetçi bir şekilde inhibe ederek ve yeni oluşan viral DNA'ya dahil olmaktadır, böylece virüsün replikasyonunu inhibe etmektedir (Kabbara ve Ramadan, 2015). Ayrıca, memeli DNA polimerazı α, β, ε ve mitokondriyal DNA polimerazı γ'nın zayıf bir inhibitörüdür.

Antiviral aktivitesi

FTC, hem HIV-1 ve HIV-2'nin laboratuvar suşlarına karşı in vitro aktivitesi çeşitli hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (Richman, 2001). Emtrisitabinin, %50 etkili konsantrasyon (EC50), kullanılan viral izolat ve hücre hattına bağlı olarak 0,002 ila 1,5 μmol/L arasında değişmektedir (Saravolatz ve Saag, 2006). İn vitro olarak emtrisitabin, periferik kan mononükleer hücrelerinde, monositlerde ve makrofajlarda HIV'in klinik ve laboratuvar türlerine karşı antiviral aktivite göstermiştir; ortalama %50 etkili inhibitör konsantrasyon (IC50) değerleri emtrisitabin için 0,0014–0,14 mmol/L bulunmuştur (Bang ve Scott, 2003; Frampton ve Perry, 2005)

Farklı hücre virüsü test sistemlerinde, periferik kan mononükleer hücrelerinde, lenfoblastoid hücre dizilerinde ve laboratuvar veya klinik HIV izolatlarıyla enfekte MAGI-CCR5 hücre dizisinde in vitro anti-HIV aktivitesi, ortalama %50 etkili inhibitör konsantrasyonu 0,001–0,64 μmol/L bulunmuştur

FTC, hem HIV-1 ve HIV-2'nin laboratuvar suşlarına hem de HIV-1'in klinik izolatlarına karşı in vitro aktiviteye sahiptir. %50 etkili konsantrasyon (EC50), kullanılan viral izolata ve hücre hattına bağlı olarak 0,002 ila 1,5 μmol/L arasında değişmektedir (Saravolatz ve Saag, 2006).

Emtrisitabinin güçlü anti-HIV aktivitesi, diğer antiretroviraller ile sinerjik etki göstermesi, tolere edilebilirliği ve günde bir kez dozlamayı sağlayan hücre içi yarılanma ömrü ile anti-HIV rejimlerinde kombinasyon halinde kullanım için ideal bir ilaç adayıdır. Emtrisitabin bazlı tedavi genellikle iyi tolere edilmektedir; yan etkilerin çoğu hafif ila orta şiddettedir (Bang ve Scott, 2003). Faz 1 klinik çalışmalarda FTC, hiçbir olumsuz olay gözlenmeden tüm denekler tarafından iyi tolere edilmiştir (Liotta ve Painter, 2016)

Farmakokinetik özellikler

Emtrisitabin gastrointestinal sistemden hızla ve geniş ölçüde emilir ve öğünlere bakılmaksızın alınabilir (Scholar, 2009). Plazma proteinlerine anlamlı derecede bağlanmaz. İlacın küçük bir yüzdesi karaciğer tarafından metabolize edilir ve idrarda 3 metabolit bulunur. Diğer nükleozid analoglarıyla karşılaştırıldığında yavaş bir sistemik klerensi ve 8-10 saatlik uzun bir eliminasyon yarı ömrü vardır. Trifosfatın ayrıca uzun bir yarı ömrü vardır. Emtrisitabin esas olarak idrarla değişmeden atılır

Emtrisitabin günde bir kez 200 mg verildiğinde, kendisinin plazma yarı ömrü yaklaşık 10 saat ve metaboliti olan emtrisitabin trifosfatın yarı ömrü yaklaşık 39 saattir. Emtrisitabin plazma proteinlerine düşük oranda bağlanmaktadır.

HIV enfeksiyonu olan 18 hastada yapılan randomize, çift-kör bir çalışmada, emtrisitabin 100-1200 mg, tek bir oral dozun ardından doğrusal farmakokinetik sergilemiştir(Bang ve Scott, 2003). Plazma konsantrasyonu-zaman eğrisinin altındaki ortalama alan (EAA) değerleri 3,87–57,8 μg·saat/mL, ortalama zirve plazma konsantrasyonları (C_{maks}) 1,01–11,5

μg/mL ve (tmaks) 1,25–1,61 saat olarak bulunmuştur. Tek doz emtrisitabin 400 mg ile birlikte yüksek yağlı bir öğün tüketimi, t_{maks}'ı uzatmış (2,8 saat) ve C_{maks}'ı (%23 oranında) düşürmüş, ancak AUC değerleri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır.

Toksisitesi

Tüm nükleozid analogları gibi, FTC de mitokondriyal DNA polimeraz γ gibi insan mitokondriyal DNA enzimleriyle etkileşimin neden olduğu toksisite potansiyeline sahiptir (Saravolatz ve Saag, 2006). Bu tür etkileşimler klinik olarak önemli miyopati ve nöropatiye yol açabilmekte ve primer laktik asidoz sendromunun gelişimine neden olabilecek hepatik steatoz nedeni olarak kabul edilmektedir.

TDF ve FTC'nin HIV-1 ve HIV-2 üzerinde sinerjistik antiviral etkileri vardır. Birlikte kombine edilmeleri çoklu ilaç HIV tedavisi rejimlerinde kullanılabilecek etkili bir tedavi sağlamaktadır (Masho ve diğerleri, 2007).

Çizelge 2.12. TDF ve FTC ile geliştirilen vajinal çalışmalar

Etkin Madde	Dozaj Şekli	Polimer	Yapılan Çalışmalar	Referans
TDF FTC	Lipozom içeren nanolif	PCL PVA	Yapısal karakterizasyon çalışmaları, mekanik özellikler, salım çalışmaları, mukoadezyon çalışmaları, sitotoksisite çalışmaları	(Nunes ve diğerleri, 2021)
TDF FTC	Nanopartikül içeren film	PVA Eudragit® L 100	Nanopartiküllerin karakterizayonu, in vitro salım çalışmaları, anti-HIV aktivitesinin değerlendirilmesi ve tavşanlarda in vivo farmakokinetik çalışmalar	(Cautela ve diğerleri, 2019)
Tenofovir	Katı lipit nanopartikül	Softisan®	Partikül karakterizasyonu, morfolojik özelliklerin incelenmesi, sitotoksisite çalışmaları	(Alukda, Sturgis ve Youan, 2011)
TDF	Halka	Silikon	İn vitro salım ve etkin madde stabilite çalışmaları	(Baum ve diğerleri, 2015)
Tenofovir	Nanolif	PVA	Nanoliflerin morfolojisi, ilaç yükleme etkinliği ve salım kinetiği çalışmaları	(Krogstad ve Woodrow, 2014)
Efavirenz Tenofovir	Nanopartikül içeren film	PVA HPMC PLGA	Filmlerin karakterizasyonu, fizikokimyasal özellikleri ve farmakokinetik çalışmalar	(Cunha-Reis ve diğerleri, 2016)
Tenofovir UC781	Mukoadezif jel	HEC Carbopol 974P.	Reolojik özellikleri, in vitro ilaç salım özellikleri ve in vitro doku geçirgenliği, tavşanlarda in vitro geçirgenlik ve güvenlik çalışmaları ve in vivo farmakokinetik çalışmalar	(Kiser ve diğerleri, 2012)
Tenofovir	Vajinal tablet	HPMC, Kitozan Guar gum and Eudragit® RS	Yapısal özellikleri, şişme özellikleri, salım özellikleri, mukoadzeyon çalışmaları	(Notario-Pérez ve diğerleri, 2018)
Tenofovir	Vajinal film	Eudragit® RS PO Eudragit® RL PO Eudragit® S 100 Eudragit® L 100	Mekanik özellikleri, sitotoksisite testleri, permeabilite çalışmaları ve membran tutulma çalışmaları	(Notario-Pérez ve diğerleri, 2021)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamızda HIV'ın önlenmesine yönelik vajinal uygulanan nanolif formülasyonları elektroçekim yöntemi ile üretilmiştir.

- Bu amaçla, öncelikle PVA polimeri kullanılarak ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımının da sonuçlarına dayanarak %10 PVA içeren çözelti ile hazırlanan nanolif formülasyonları optimum özelliklerinden dolayı baz formülasyon olarak belirlenmiştir.
- Baz PVA formülasyonunun mukoadezyon özelliklerini artırmak için çeşitli polimerler kullanarak PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyon grubu hazırlanmış ve uygun mekanik ve mukoadezif özellik gösteren formülasyonlara TDF ve FTC yüklenerek karakterizasyon çalışmaları gerçekleştilmiştir.
- PVA bazlı nanolif formülasyonları kontrollü salım özelliği sağlamadığı için zein bazlı nanolif grubu hazırlanmış ve karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Bu formülasyonların mekanik özellikleri uygun bulunmadığı için PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonları hazırlanmıştır.
- Formülasyon çalışmalarının sonunda mukoadezif özellikleri artırmak ve kontrollü salım özelliklerini artırmak için tabakalı nanolifler PLGA ve PVA polimleri kullanarak hazırlanmıştır.
- Formülasyonların çözelti karakterizasyonları yapılmış ve elektroçekim yöntemi için üretim parametreleri belirlenmiştir.
- Nanoliflerin in vitro karakterizasyon çalışmalarında; yapısal karakterizasyonlar, morfolojik özellikleri, etkin madde yükleme etkinlikleri, mekanik özellikleri, temas açıları, BET ile yüzey analizleri, Franz hücresi ile in vitro salım özellikler ve USP sepet yöntemi ile çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Seçilen nanolifde; ex-vivo alıkonma, ex-vivo permeabilite ve mukoadezyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Optimum formülasyonlar Yeni Zelanda tipi tavşanlara uygulanarak farmakokinetik çalışmalar, biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihaz ve Sarf Malzemeler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Toplayıcı kısmı döner silindir ve koaksiyal nanolif üretimine uygun elektro-çekim cihazı (NE-300, İnovenso, Türkiye)
- Diferansiyal taramalı kalorimetri cihazı (DSC 60, Shimadzu, Japonya)
- Fourier transform infrared spektrofotometri cihazı (Spectrum 400, Perkin Elmer, ABD)
- İletkenlik ölçüm cihazı (Seven2Go S3, Mettler Toledo, ABD)
- Rotasyonel viskometre (DV-III Rheometer, Brookfield, ABD)
- Yüzey gerilimi ve temas açısı ölçüm cihazı (Theta Lite optical tensiometer, Biolin Scienctific, Attension, Finlandiya)
- Taramalı elektron mikroskobu (Quanta 400, Fei, ABD)
- Tekstür analiz (Texture Analyzer) cihazı (TA-XT Plus, Texture Analyser, İngiltere)
- UV spektrofotometre cihazı (UV-1700, Shimadzu, Japonya)
- Çözünme hızı test cihazı (708-DS, Agilent Technologies, ABD)
- UV lambalı (253 nm) laminar hava akışlı test kabini (Euroflow Class IIA, Clean Air Techniek, Hollanda)
- Stabilite test kabinleri (TK-252, Nüve, Türkiye)
- HPLC (Agilent 1220LC, ABD)
- LC MSMS (Agilent 6460, Triple Quad LC/MS)
- pH Metre (Ohaus ST300, Amerika)
- Çözünme hızı (Agilent 708-DS, Amerika)
- Santrifüj cihazı (Allegra X-30R, Almanya)
- Süzme kiti (Alltech, Türkiye)
- Vorteks (Nüve-NM 110, Türkiye)
- -80°C dondurucu (Thermo Scientific, ABD)
- UV spektrofotometre (Shimadzu UV 1700, Japonya)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA RCT Standart, Almanya)
- Franz Difüzyon Hücresi (Çalışkan cam, Türkiye)
- Hassas terazi (Shimadzu AW 320, Japonya)
- Ultrasonik banyo (Bandelin, Almanya)
- Otomatik pipet (Eppendorf, Almanya)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeler

- Tenofovir Disoproksil Fumarat (Gen İlaç, Türkiye)
- Emtrisitabin (İlko, Türkiye)
- Truvada (Gilead Sciences, Inc, ABD)
- Zein (Sigma, ABD)
- PLGA (Corbion, Hollanda)
- Polietilen oksit (Colorcon, İngiltere)
- PVA (Wacker Chemie AG, Almanya)
- PVP (BASF, Almanya)
- Kitosan (Sigma, MA: 50.000-190.000 Da, ABD)
- Pullulan (Sigma, ABD)
- B-Siklodekstrin (Thermosciencetific, ABD)
- Kolon, ters faz, C18, 5 µm, 150 x 4.6 mm (Waters, ABD)
- Gluten (Sigma, ABD)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck, ABD)
- Potasyum klorür (Merck, ABD)
- Asetik Asit (Sigma, ABD)
- Potasyum hidroksit (Sigma, ABD)
- Kalsiyum hidroksit (Emir Kimya, Türkiye)
- Bovin serum albümin (Sigma, ABD)
- Laktik asit (Emir Kimya, Türkiye)
- Üre (Emir Kimya, Türkiye)
- Glukoz (Emir Kimya, Türkiye)
- Gliserol (Türk Tıp San., Türkiye)
- Sodyum klorür (Sigma, ABD)
- Sodyum hidroksit pellet (Merck, ABD)
- HCl (%37, Sigma Aldrich, ABD)
- Etanol (>%99,9 Absolü HPLC grade, Merck, ABD)
- Metanol (>%99,9AbsolüHPLC grade, Merck, ABD)
- N,N-Dimetilformamid (Merck, ABD)
- Diklorometan (Merck, ABD)
- Dimetil sülfoksit (≥%99,5, Sigma Aldrich, ABD)
- Diyaliz membran (M.A<12000 Da) (Sigma, ABD)

3.1.3. Kullanılan yazılımlar

- DDSolver®
- PKSolver®
- Design Expert® 13
- GraphPad Prism 9®
- ImageJ® 1.53 (NIH, USA)
- Origin Pro® (Origin Lab, USA)

3.1.4. Kullanılan çözeltiler

Çalışmamızda etkin madde miktar tayini ve in vitro ve ex vivo salım çalışmalarında pH 4.2 simüle vajinal sıvı (SVS) kullanılmıştır (Marques, Loebenberg ve Almukainzi, 2011). Vajinal pH'ya uygun olması için in vitro çalışmalarda tüm maddeler tartıldı ve distile suda çözüldü. Hazırlanan çözelti manyetik karıştırıcıda homojen oluncaya kadar karıştırıldı ve daha sonra pH metre ile 4.2'ye ayarlandı.

Çizelge 3.1. Simüle vajinal sıvı (SVS) içeriği (pH 4.2) (Marques ve diğerleri, 2011)

Sodyum Klorür	3,51 g
Potasyum Hidroksit	1,40 g
Kalsiyum Hidroksit	0,222 g
Bovin Serum Albumin	0,018 g
Laktik Asit	2 g
Asetik Asit	1 g
Gliserol	0,16 g
Üre	0,4 g
Glukoz	5 g
Distile Su	ym 1 L

3.2. Etkin Maddelerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre analizi

DSC, bir numunenin fiziksel özelliklerinin zamana karşı sıcaklıkla birlikte nasıl değiştiğini ölçen bir termal analiz cihazıdır (Gill, Moghadam ve Ranjbar, 2010). Malzeme geçişleriyle ilişkili sıcaklığı ve ısı akışını zamanın ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak belirlemektedir. Diferansiyel taramalı kalorimetre (Shimadzu, DSC-60, Japan) analizleri DSC analizi ile TDF, FTC ve kullanılan polimerler arasındaki geçimliliğin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Çalışmalarımızda TDF ve FTC'nin DSC termogramları alınarak karakteristik erime noktaları belirlenmiştir. DSC analizleri, azot gazı altında 10°C/dk'lık ısıtma hızında 25-300°C aralığında gerçekleştirilmiştir. Analizlerde 2 mg örnek tartılarak alüminyum panların içine konularak sıkıştırılmıştır. Daha sonrasında cihaz içinde belirlenen ısıtma hızında analiz edilmiştir. Cihazın yazılımı aracılığı ile 2 mg indiyum içeren kontrol panı ile kıyaslanarak termogramlar elde edilmiştir (Birer, 2021).

3.2.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometre analizi

FTIR, polimer karışımlarının kantitatif analizinin karakterizasyonu, moleküller arası hidrojen bağı yoluyla uyumluluklarının tanımlanması ve ayrıca bozunma süreçlerinin araştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Riaz ve Ashraf, 2014). Maddelerin fonksiyonel grupların kimyasal yapılarını aydınlatmak için kullanılmaktadır. Moleküllerin titreşim enerji seviyeleri hakkında bilgi vermektedir. Fonksiyonel grup araştırmaları ve bağlanma türlerinin konformasyonları aydınlatılmasında önemli bir araçtır. Polimerlerin ve etkin maddelerin kimyasal yapılarını, kızılötesi dalgalarla uyararak titreşim seviyelerini ölçerek kimyasal grupların titreştiği dalga boylarını belirlenmektedir. Elde edilen spektrumlarındaki bantlar moleküle özgüdür ve maddelerin bileşimleri hakkında doğrudan bilgi sağlamaktadır. Moleküldeki atomların farklı bağlanma kuvvetlerinden ve bağlanma açılarından kaynaklanan farklı titreşim biçimleri ayırt edilmektedir.

Karışımlarının fiziksel özellikleri moleküler zincirlerin yapılarından etkilendiği için FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Maddelerin yapısına bağlı olarak, mekanik ve fiziksel özelliklerinin tahmin edilmesi için farklı etkileşimler ve konfigürasyonlar sergilemektedir.

TDF ve FTC'nin yapısal olarak karakterize edilmesi, yapılarının belirlenmesi ve geçimlilik çalışmaları için FT-IR yöntemi ile 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında analizler yapılmıştır.

3.2.3. X-Ray difraktometre (XRD) analizi

Kristallik derecesi, akma gerilimi, elastik modül ve darbe direnci gibi mekanik özellikleri belirlediği için bir polimerin en önemli özelliklerinden biridir (Kong ve Hay, 2002). X-Işını kırınım analizi (XRD), bir malzemenin kristalografik yapısı, kristal fazlarının tanınması (polimorfizm), kimyasal bileşimi ve fiziksel özellikleri hakkında bilgi veren mikroyapısal analiz yöntemlerinden biridir (Inan, 2017; Raja, Munusamy, Perumal ve Ibrahim, 2022). XRD analizleri, monokromatik X ışınlarının ve incelenen örneğin girişimine dayanmaktadır. X-ışınları, yeterli enerjiye sahip elektrik yüklü parçacıkların yavaşlatılmasıyla üretilen daha kısa dalga boylu elektromanyetik radyasyondur. XRD'de, üretilen X-ışınları birleştirilerek örneğe yönlendirilir; burada gelen ışınların örnekle etkileşimi, daha sonra belirlenen, işlenen ve sayılan kırınmış bir ışın üretmektedir. Analiz edilecek örneğin, farklı açılarında saçılan kırılan ışınların yoğunluğu, bir kırınım deseni gösterecek şekilde çizilerek, malzemenin özel kimyası ve atomik düzeni nedeniyle benzersiz bir kırınım modeli üretilir. Analiz sonucunda elde edilen kırınım deseni, kırınım desenlerinin basit bir toplamıdır.

TDF ve FTC'nin kristal özelliklerinin belirlenmesi için ODTÜ MERLAB'tan hizmet alımı ile XRD analizleri yapılmıştır. XRD analizleri maddeler için 3-45 derece aralığında 0.5 °C/dk hızda gerçekleştirilmiştir.

3.3. TDF ve FTC Miktar Tayini Yöntemi ve Yöntem Validasyonu

Literatürde, TDF ve FTC'nin miktar tayininin aynı anda gerçekleştirilmesi için UV spektrofotometre ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemleri kullanılmaktadır (R. K. Mishra ve diğerleri, 2020). Ancak çalışmalarımızda kullandığımız cihaz ve kolona bağlı olarak, TDF ve FTC'nin miktar tayini için ayrı analiz yöntemleri geliştirilerek UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography–HPLC) ile yapıldı (Resim 3.1).



Resim 3.1. UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, Agilent 1220LC, ABD

Yöntem vajinal nanoliflere yüklenmiş olan TDF ve FTC'nin miktar tayininde, alıkonma çalışmalarında, in vitro ve ex vivo salım çalışmalarında kullanılmıştır. Miktar tayini yönteminin validasyon çalışmaları ICH Harmonised Tripartite; Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir (Guideline, 2005). Miktar tayin yönteminin geçerliliği analitik yöntem validasyonu yapılarak gösterilmiştir. Validasyon çalışmaları için doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik), duyarlılık, saptanma sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı, dayanıklılık, seçicilik ve stabilite çalışmaları yapılmıştır.

TDF'nin HPLC yöntemi ile yapılan miktar tayini validasyonu için izokratik akış yöntemi kullanılarak geliştirilen yöntem koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. TDF'nin HPLC ile miktar tayini yöntem koşulları

Kolon	XSelect® Extend C18, 4.6x250 mm, 15 cm
Mobil Faz	1mM Fosfat Tamponu (pH 5) /Asetonitril (%70 : %30)
Akış Tipi	İzokratik akış
Kolon Sıcaklığı	30°C
Akış Debisi	1.5 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Dalga Boyu	260 nm
Alıkonma Zamanı	5.6 dk
Analiz Süresi	8 dk

FTC'nin HPLC ile analizinde izokratik akış çalışmalarında optimum/tekrar edilebilir sonuç alınamadığı için gradient akış yöntemi ile analiz metodu geliştirilmiştir. Yöntemin ayrıntıları Çizelge 3.3'te verilmiştir. FTC analizi için gradient akış yöntemi kullanılarak geliştirilen HPLC yöntemi ile yapılan miktar tayini validasyonu için kullanılan cihaz ve yöntem koşulları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. FTC'nin HPLC ile miktar tayini yöntem koşulları

Kolon	C18, 4.6x250 mm, 15 cm
Mobil Faz	1mM Fosfat Tamponu (pH 5) /Asetonitril
Akış Tipi	Gradient Akış
Kolon Sıcaklığı	35°C
Akış Debisi	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Dalga Boyu	280 nm
Alıkonma Zamanı	4.7 dk
Analiz Süresi	12 dk

Çizelge 3.4. FTC'nin gradient akış yöntemi ile geliştirilen metodu

FTC Gradient Akış Çalışma Koşulları		
t (dk)	A (1mM Fosfat Tamponu)	Asetonitril
0	95	5
2	95	5
4	80	20
5	10	90
7	10	90
7,1	95	5

3.3.1. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, numunedeki madde konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olan analiz sonuçları elde etme yeteneğidir (Akyar, 2011). Analiz edilen etkin madde çözeltilerinin konsantrasyonuyla, belirlenen analiz aralığı içinde bu çözelti kullanılarak elde edilen alan değerleri arasında lineer bir artış olması durumuna doğrusallık denir. Doğrusallığın sağlanması için en az 5 konsantrasyonun olması tavsiye edilmektedir ve doğrusallık için belirlenen aralık çalışmanın amaçlanan aralığına bağlı olarak seçilmelidir (Guideline, 2005). Doğrusallık parametresi kalibrasyon doğrusuna ait doğru denkleminin korelasyon katsayısı kullanılarak gösterilir.

İn vitro ve ex vivo salım çalışmalarında ve miktar tayini yönteminde kullanılan pH 4.2 SVS içerisinde hem TDF hem de FTC için kalibrasyon doğruları ve denklemleri belirlenmiştir. Bu amaçla TDF'nin ve FTC'nin 50µg/mL konsantrasyonlarda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden, farklı derişimlerde (0,5-50 µg/mL arasında) seyreltme yapılarak farklı konsantrasyonlarda örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler HPLC ile iki etkin madde için iki farklı yöntem kullanılarak analiz edilmiştir. Hazırlanan 3 ayrı stok çözeltiden konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları bulunmuştur. Konsantrasyona karşı elde edilen pik alanlarının grafikleri çizilerek maddeler için elde edilen alanların ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. TDF ve FTC konsantrasyonuna karşı ortalama alan için gerekli hesaplamalar yapılarak standart doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (R^2) tayin edilmiştir. Elde edilen doğrunun korelasyon katsayısı kullanılarak doğrusallık değerlendirilmiştir. Doğrusallığın gösterilmesi için R^2 değerinin 1'e yakın bulunması gerekmektedir.

3.3.2. Doğruluk ve geri elde

Doğruluk, belirlenen madde miktarının numune içerisindeki miktarına yakın olmasını belirtmektedir. Analiz metodunun doğruluğu % geri elde değeri±bağıl sapma ile ifade edilir. Çalışma için maddelerin bilinen derişimlerde çözeltileri hazırlanmış ve miktarları belirlemek için HPLC ile analizleri yapıldı.

Geri kazanım, örneğe eklenen ve örnekten ekstre edilen bilinen miktardaki maddenin aynı konsantrasyondaki saf madde ile karşılaştırılarak belirlenmektedir. Geri elde etme yüzdesi de yöntemin doğruluğunun göstergesidir. Doğruluk çalışmalarında pH 4.2 simüle vajinal sıvı içerisinde, bilinen 3 farklı konsantrasyonda (5, 10 ve 15 μg/mL) TDF ve FTC içeren çözeltiler hazırlanarak HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen değerler, belirlenen standart doğru denkleminde yerine konularak TDF ve FTC miktarı, yüzde geri elde ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen değerlerin gerçek konsantrasyonlara oranlanması ile % geri elde bulundu.

3.3.3. Kesinlik

Kesinlik, maddeler için geliştirilen miktar tayini yönteminin aynı anda ve başka zamanlarda tekrar edilebilir olduğunun göstermektedir. Aynı analiz parametreleri kullanılarak yapılan farklı analizlerin birbirlerine benzerliğini ölçen bir parametredir. Kesinlik bir analitik yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermesi açısından önemlidir. Deney içi kesinlik ve deneyler arası kesinlik olmak üzere iki ayrı kesinlik analizi gerçekleştirildi.

Deney içi kesinlik

Deney içi kesinlik analizi derişimi belirli bir çözeltinin aynı gün içinde yapılan analizlerinden elde edilen ölçümlerin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Gün içi kesinlik çalışması için SVS içerisinde aynı gün içinde 10 μg/mL TDF ve 15 μg/mL FTC olacak şekilde hazırlanan numunelerin art arda yapılan analizleri sonucunda elde edilen pik alanları incelenerek analitik yöntemin deney içi kesinliği ispatlandı.

Deneyler arası kesinlik

Etkin maddenin hazırlanmış olan standart çözeltisinin farklı günlerdeki analizlerinde elde edilen miktar tayini sonuçlarının kesinliğini ölçen parametredir. Deneyler arası kesinlik ölçüm sonuçlarının farklı günlerde tekrarlanabilirliğini kanıtlaması yönüyle analitik metot validasyonunda önemli bir yer tutar. Bizim çalışmamızda TDF ve FTC içeren örnekler her gün üç farklı stoktan, üç farklı konsantrasyonda (5, 25, 45 µg/mL) hazırlanarak HPLC ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçların ortalama standart sapma ve yüzde bağıl sapmaları hesaplandı ve metodun deneyler arası kesinliği yorumlandı.

3.3.4. Seçicilik

Analitik yöntemin seçiciliğindeki temel kriter, yöntemin maddeyi numunedeki diğer bileşenlerden ayırt etme yeteneğidir (McMillan, 2016). Yöntemin özgüllüğü, elde edilen sinyalin ölçülmek istenen maddeye ait olduğunu ve diğer matris bileşenlerinden, safsızlıklardan veya bozunma ürünlerinden kaynaklanan herhangi bir etkisi olmadığını göstermelidir. Analizin amacı analizin yapıldığı dalga boyunda analiz edilen maddeye ait miktar tayininde elde edilen değerin diğer maddelerden de aynı şekilde görülebildiğini ispatlamaktır. Bu amaçla formülasyonda yer alan maddelerin HPLC ile TDF ve FTC için geliştirilen miktar tayini yöntemi ile analiz edilerek girişim yapıp yapmadığı değerlendirildi.

3.3.5. Stabilite çalışmaları

Numunelerin ve stok çözeltilerin analiz süresince ya da saklanacakları süre boyunca kararlılıklarının belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmadır. TDF ve FTC içeren örnekler, in vitro salım çalışmalarında salım ortamı olarak kullanılarak SVS (pH 4.2) içerisinde 25±1°C'de ve 37±1°C'de 24 saat bekletilerek belirli zaman aralıklarında örnek alınarak HPLC ile analiz edilerek değişiklik olup olmadığı incelendi.

3.3.6. Duyarlılık ve saptama sınırı

HPLC'de yapılan TDF ve FTC miktar tayini yönteminin güvenilir şekilde analiz edebildiği en düşük miktarı belirlemek amacıyla aşağıdaki eşitlikler kullanılarak duyarlılık ve saptama sınırları hesaplandı.

Tespit sınırı (limit of detection, LOD) analiz edilecek bir maddenin arka plan gürültüsünden ayırt edilebilecek kadar absorbans verdiği en düşük derişim olarak tanımlanır (Borman ve Elder, 2017). Maddeye ait tespit limiti, bir numunede tespit edilebilen ancak kesin bir değer olarak niceliği belirlenemeyen en düşük analit miktarıdır. İstatistiksel kesinlikle ölçülebilen en düşük miktarı ifade etmektedir.

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

σ: Kalibrasyon eğrisinin standart sapması
S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

Tayin sınırı (limit of quantification, LOQ) ise analiz edilecek maddenin kabul edilebilir bir kesinlik ve tekrarlanabilirlik ile analiz edilebileceği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır (Borman ve Elder, 2017). Analiz edilecek maddenin en düşük ölçülebilecek limitidir. Uygun hassasiyet ve doğrulukla niceliksel olarak belirlenebilen numunedeki madde miktarıdır.

Saptama sınırı (LOQ)= (10xσ) /S (3.2)

σ: Kalibrasyon eğrisinin standart sapması
S: Kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.4. Etkin Madde ve Polimerlerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.4.1. DSC analizleri

Önformülasyon çalışmalarında DSC termogramlarının incelenmesi, etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki geçimliliğin incelenmesi için kullanılmıştır. DSC analizleri TDF, FTC ve kullanılan polimerler arasındaki geçimliliğin değerlendirilmesi için kullanıldı. Çalışmalarımızda TDF, FTC ve kullanılan polimerlerin 1:1 oranında karışımlarının Bölüm 3.2.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre bölümünde anlatıldığı şekilde DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Maddelerin tekli ve karışımlarının termogramları incelenerek etkileşimler değerlendirilmiştir.

3.4.2. FTIR analizi

Önformülasyon çalışmalarında FTIR, etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki geçimliliğin incelenmesi için kullanılmıştır. Çalışmalarımızda TDF, FTC ve kullanılan polimerlerin ve polimer-etkin maddelerin 1:1 oranında karışımlarının Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Maddelerin tekli ve karışımlarının spektrumları incelenerek etkileşimler değerlendirilmiştir.

3.5. Vajinal Nanolif Formülasyonlarının Tasarlanması

Vajinal mukoadezif özellikte nanolif formülasyonların geliştirilmesi için PVA, zein, PVP, PEO, PLGA polimerleri ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda öncelikle kullanılacak polimerin solvan sistemine karar verilmiştir. Bu amaçla farklı oranlarda solvan sistemleri denenmiştir. Daha sonra vajinal uygulamalara için optimum formülasyonu geliştirilmeye yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. PVA ile yapılan önformülasyon çalışmaları

Çalışmamızda yüksek mukoadezif özelliklere sahip PVA ile nanolif üretimi gerçekleştirilmiştir. PVA, biyoparçalanabilir, biyouyumlu, mukoadezif ve suda çözünür özelliklere sahip, biyomedikal ve farmasötik uygulamalar için kullanılan hidrofilik bir polimerdir. PVA yüksek mukoadezyon özelliği ile vajinal uygulamalar için tercih edilen polimerlerden birisidir.

PVA ile nanolif geliştirilmesi amacıyla farklı molekül ağırlıklarında PVA tiplerinden vajinal uygulama ve elektroçekim yöntemine uygun olabilecek olan formülasyonun seçimi için ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kullanılan polimerin molekül ağırlığı, çözeltisinin reolojik özellikleri, elektriksel iletkenliği, dielektrik sabiti ve yüzey gerilimi gibi özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Koski, Yim ve Shivkumar, 2004). Bu özellikler, elektroçekim sürecini yöneten ana parametrelerden bazılarıdır. Elektroçekim ile üretilebilecek çeşitli moleküler ağırlıklarında ve çözelti konsantrasyonlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Polyviol 13/140 (49.000 Da), Polyviol 26/140 (80.000 Da) ve Polyviol 40/140 (100.000 Da) olmak üzere üç farklı PVA tipi kullanılmıştır. Kullanılan Polyviol 13/140,

Polyviol 26/140 ve Polyviol 40/140 farklı molekül ağırlıklarındaki polimerler sırasıyla PVA-K, PVA-O ve PVA-B olarak adlandırılmıştır.

Çözücü seçimi elektroçekim işlemi için en önemli basamaklardan birisidir. Çözücü seçimi lif oluşup oluşamayacağını, oluşan liflerin porozitesini ve hazırlanan liflerin çapını doğrudan etkilemektedir. Elektroçekim işleminde daha uçucu bir çözücü kullanıldığı zaman yüksek porozite ve pürüzsüz yüzeye sahip lifler elde edilebilirken, düşük uçuculuğa sahip bir çözücü kullanılırsa lif oluşumu gözlenmeyebilir (Sill ve Von Recum, 2008). PVA ile hazırlanan nanolif formülasyonları için çözücü sistemi olarak çalışmalarda distile su kullanılmaktadır. Park ve arkadaşları hazırladıkları PVA nanolif formülasyonları için çözücü sistemi olarak distile su kullanmışlardır (J.-C. Park ve diğerleri, 2010). Distile suyun kaynama noktası, dielektrik sabiti ve yüzey gerilimi nanolif üretiminde kullanılan organik solvanlara göre daha yüksektir (Bhardwaj ve Kundu, 2010). Çalıştığımız cihazda sadece distile su ile hazırlanan PVA polimer çözeltileri ile lif eldesi gerçekleştirilememiştir. Bu yüzden elektroçekim yöntemi ile PVA ile nanolifi üretmek için litertürde kullanılan uygun olabilecek çözücü sistemleri denenmiştir.

Çalışmamızda PVA çözeltilerinin hazırlanması için çözücü sistemi olarak N,N-Dimethylformamide (DMF): distile su kullanılmıştır. PVA tartılarak bir flakon içerisinde, kullanılacak suyun tamamı ile 90 °C'de karıştırılmıştır. Daha sonra içerisine DMF ilave edilerek tamamen homojen bir şekilde karışıncaya kadar ağzı kapalı olarak manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de karıştırılmıştır. Hava kabarcıklarının gitmesi için ultrasonik banyo içerisinde bir dakika bekletilmiştir. Daha sonra 10 mL'lik enjektör içerisine aktarılarak nanolif üretimi için kullanılmıştır. Nanolif üretimi için elektro-çekim cihazında akış hızı, voltaj ve enjektör ile toplayıcı arası mesafe gibi parametreler değiştirilerek nanolif üretimi gerçekleştirilmiştir. Toplayıcının dönme hızı 500 rpm olarak ayarlanmıştır. Geliştirilen formülasyonların içeriği ve üretim parametreleri formülasyonlara bağlı olarak değşmektedir.

Çizelge 3.5. Farklı PVA tipleri ile hazırlanan çözelti karışımları

Konsantrasyon	PVA-K Polyviol 13/140 (49.000 Da)	PVA-O Polyviol 26/140 (80.000 Da)	PVA-B Polyviol 40/140 (100.000 Da)
%5	P1	P4	P7
%7.5	P2	P5	P8
%10	P3	P6	P9

3.5.2. Deneysel tasarım ile PVA nanolif üretiminin değerlendirilmesi

Tasarımla Kalite (QbD), hedeflerin önceden tanımlandığı ve bu yönlerin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına önem verilen, ürün ve süreç geliştirmeye yönelik sistematik bir yaklaşımdır. Bu, sağlam bilim ve kaliteli risk yönetimi yoluyla elde edilir. Bir ürünün gerekli güvenlik, etkinlik ve kalite standartlarına göre formüle edilmesine ve üretilmesine veya tutarlı bir şekilde gerekli doğruluk ve hassasiyetle analiz edilmesine olanak tanımaktadır (Nazari ve diğerleri, 2019). QbD yaklaşımını başlatmak için öncelikle kalite hedef ürün profilinin tanımlanması gerekir. Kalite hedef ürün profilinin bazı kritik kalite niteliklerini içerebilir. Bunlar, nihai ürünün kalitesini sağlamak için uygun bir aralıkta olması gereken ürününün, maddelerin ve ara maddelerin fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mikrobiyolojik özelliklerini içermektedir. Risk değerlendirmeleri, malzeme özelliklerinin ve süreç parametrelerinin kritik kalite nitelikleri üzerinde yaratabileceği ve dolayısıyla ürün kalitesini etkileyebilecek etkisini değerlendirmek için gerçekleştirilir. Yüksek risk olarak tanımlanan malzeme nitelikleri ve süreç değişkenleri, kritik malzeme nitelikleri ve kritik süreç parametreleri olarak ifade edilmektedir.

QbD'nin ilk adımı, ürün için tasarım hedeflerinin belirlenmesidir. İstatiksel deney tasarımı (DoE) da model oluşturma ve değerlendirme, istatiksel proses kontrolü gibi amaçlarla farmasötik formülasyonların gelişiminde kullanılacaktır.

PVA ile yapılan önformülasyon çalışmaları sonucunda seçilen yüksek molekül ağırlık PVA-O ve PVA-B tiplerinde lif çekiminde kesintisiz olmaması ve görüntüleme sonuçlarında lif yapılarının elde edilmesinin zor olduğu gözlenmiştir. PVA'yı farklı polimerlerle kombine şekilde geliştirilmesine olanak sağlayacak PVA-K tipi polimer ile uygun formülasyonu hazırlamak için deneysel tasarım yapılmaya karar verilmiştir. Formülasyon geliştirmede

kullanılan farklı polimer konsantrasyonları, çözücü tipi ve dönme hızı gibi üretimde etkili olan parametrelerin etkisi değerlendirilmiştir. Nanolif üretiminde etkili olan her parametreyi rastgele seçimler ve ölçümlerle denememiz zor ve uzun zaman alacağı için deneysel tasarım kullanılmıştır. DoE ile geliştirilen formülasyonların hedef parametreleri Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Hedeflenen vajinal formülasyonların özellikleri

Gerilme direnci	>1 MPa
Kopma uzaması	>%50

Nanolif formülasyonlarında DoE tasarımı için bağımsız değişken olarak; polimer konsatrasyonu, toplayıcının dönme hızı ve çözücü sistemi seçilmiştir. Nanolif üretiminin yapılabildiği polimer konsantrasyonları, farklı çözücü sistemleri ve toplayıcı dönme hızı dikkate alınarak 2^3 faktöriyel deney tasarımı kullanılarak istatiksel deney tasarım modeli oluşturulmuştur. Optimum formülasyon belirlenmesi için bağımlı değişken olarak nanolif formülasyonlarının mekanik özelllikleri ve mukoadezif özellikleri seçilmiştir.

Çizelge 3.7. Deneysel tasarımla geliştirilen nanolif formülasyonlarında kullanılan parametreler

Bağımsız değişken	Formülasyonlarda kullanılacak faktör seviyeleri	Yanıtlar
Polimer Konsatrasyonu	%7,5-%15	Gerilme Direnci (MPa) Kopma Uzaması (%)
Toplayıcının Dönme Hızı	100 rpm-1000 rpm	
Çözücü Sistemi	Distile su: Etanol-Distile su: DMF	

Faktöriyel tasarım ile 2 faktörlü (alt-üst değer), 3 değişken (polimer konsantrasyonu-çözücü sistemi-toplayıcı dönme hızı) ile 8 formülasyon Design Expert® 13 yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.8. Nanolif formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik belirlenen DoE tasarım parametreleri

Tasarım Formülasyonları	Polimer Konsantrasyonu (X_1)	Çözücü Sistemi (X_2)	Toplayıcı Dönme Hızı (X_3)
RUN 1	% 7,5	Etanol/Distile Su	100 rpm
RUN 2	% 7,5	DMF/Distile Su	100 rpm
RUN 3	% 7,5	Etanol/Distile Su	1000 rpm
RUN 4	% 15	DMF/Distile Su	1000 rpm
RUN 5	% 15	Etanol/Distile Su	1000 rpm
RUN 6	% 15	DMF/Distile Su	100 rpm
RUN 7	% 7,5	DMF/Distile Su	1000 rpm
RUN 8	% 15	Etanol/Distile Su	100 rpm

Çizelge 3.8'te verilen PVA-K ile hazırlanan formülasyonlarda yapılan mekanik ve mukoadezyon testler sonucunda kullanılacak polimer konsantrasyonu, çözücü sistemi ve toplayıcı dönme hızı hakkında bilgi edinildi. Bu formülasyonun mekanik ve mukoadezif özelliklerini geliştirmek için PVA, farklı tipte polimerler ile kombine edilerek çalışılmalara devam edildi.

3.5.3. PVA bazlı mukoadezif nanolif geliştirme çalışmaları

PVA baz polimer olarak seçilmiştir ve nanolif formülasyonlarının vajinal uygulamaya için mekanik ve mukoadezif özelliklerinin geliştirilmesi için farklı polimerler kullanılarak formülasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Bu amaçla kullanılan polimerler ve formülasyonların içeriği Çizelge 3.9'da gösterilmiştir. Mukoadezif, biyoparçalanabilir özellikte PVP, PEO, pullulan, gluten, kitozan vajinal uygulamalarda sıklıkla kullanılan polimerlerdir. Kullanılan polimer için ortak bir çözücü sistemi seçilerek nanolif formülasyonları başarıyla üretilmiştir. Formülasyonlar, Distile su: Etanol (1:1) içerisinde çözülerek farklı konsantrasyonlarda polimer çözeltileri ile hazırlanmıştır. F5 formülasyonunda etanol yerine DMF kullanılmıştır.

Etkin maddeleri içeren nanoliflerin hazırlanmasında kullanılan 10 mL'lik çözelti içerisinde 90 mg TDF ve 60 mg FTC bulunmaktadır. Formülasyon tablolarında belirtilmiştir.

Çizelge 3.9. Mukoadezif nanolif formülasyonlarının içeriği

Kod	PVA (%)	Pullulan (%)	PVP (K90) (%)	PEO (N80) (%)	Gluten (%)	Kitosan (LMW) (%)	β-CD (%)
F1	10	-	-	-	-	-	-
F2	10	5	-	-	-	-	-
F3	10	-	5	-	-	-	-
F4	10	-	-	5	-	-	-
F5	10	-	-	-	5	-	-
F6	10	-	-	-	-	0,5	-
F7	10	-	-	-	-	-	5

TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

PVA'nın farklı polimerler ile kombinasyonu ile hazırlanan formülasyonlarda karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Liflerde gerçekleştirilen mekanik özellikler (kopma uzaması ve kopma gerilimi), temas açıları ve mukoadezif özellerinin belirlenmesi sonucu en iyi özellikleri gösteren formülasyonlara TDF ve FTC yüklenerek etkin madde yüklü formülasyonlar geliştirildi (Çizelge 3.10). Bu formülasyonlar nanolif karakterizasyon çalışmaları sonucunda en iyi mekanik ve mukoadezif özellikleri gösteren formülasyonlardır.

Çizelge 3.10. TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının içeriği ve solvan sistemi

KOD	TDF (%)	FTC (%)	PVA (%)	Pullulan (%)	PVP (%)	PEO (%)
F1-TF	0,9	0,6	10	-	-	-
F2-TF	0,9	0,6	10	5	-	-
F3-TF	0,9	0,6	10	-	5	-
F4-TF*	0,9	0,6	10	-	-	5

*****in-vivo F grubu

3.5.4. Zein içeren nanolif formülasyonlarının hazırlanması

Zein yapısında birçok yüksüz amino asit kalıntısının varlığı, onu sulu ortamlarda çözünmez hale getirir, ancak belirli etanol konsantrasyonlarında, anyonik yüzey aktif maddelerde veya

alkalin çözeltilerde çözünmektedir (Falsafi ve diğerleri, 2023). Zein içeren polimer çözeltilerinin hazırlanması için 4:1 oranında Etanol: Distile su kullanılmıştır. Zein düşük mekanik ve mukoadezif özellikler gösterdiği için formülasyonlara bu özelliklerini artırmak için farklı polimerler ile kombinasyonları incelenmiştir. Sadece zein ile hazırlanan formülasyonlarda zein doğrudan solvan sistemi içinde çözüldü. Diğer polimerler ile hazırlanan karışımlarında, PVP K90, PEO WSR205 veya PEO N80, zein karışımına eklendi. Homojen bir şekilde karışıncaya kadar manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de karıştırılmıştır. Zein bazlı formülasyonların içerikleri Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Zein ile geliştirilen nanolif formülasyonlarının içeriği

Kod	Zein (%)	PEO WSR 205 (%)	PEO N80 (%)	PVP K90 (%)
Zein içeren formülasyonlar				
Z1	20	-	-	-
Z2	30	-	-	-
Zein-PEO WSR 205 içeren formülasyonlar				
ZW0	-	1	-	-
ZW1	2.5	1	-	-
ZW2	5	1	-	-
ZW3	10	1	-	-
ZW4	20	1	-	-
Zein-PEO N80 içeren formülasyonlar				
ZN0	-	-	5	-
ZN1	2.5	-	5	-
ZN2	5	-	5	-
ZN3	10	-	5	-
ZN4	20	-	5	-
ZN5	30	-	5	-
Zein-PVP içeren formülasyonlar				
ZK0	-	-	-	5
ZK1	2.5	-	-	5
ZK2	5	-	-	5
ZK3	10	-	-	5
ZK4	20	-	-	5
ZK5	30	-	-	5
ZK6	-	-	-	10
ZK7	2.5	-	-	10
ZK8	5	-	-	10
ZK9	10	-	-	10
ZK10	30	-	-	15

TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonları

Zein içeren nanoliflerde yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucun belirlenen optimum formülasyonlara TDF ve FTC yüklenerek nanolif formülayonları geliştirilmiştir. Polimer solvan sisteminden öncelikle TDF ve FTC çözülerek kullanılacak polimer karışıma

eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda homojen karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Elektroçekim işleminden önce ultrasonik banyoda hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için 1 dk beklenmiştir. Etkin madde içeren zein bazlı formülasyonların içeriği Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının içeriği

Kod	TDF (%)	FTC (%)	Zein (%)	PEO N80 (%)	PVP K9 0(%)
Z2-TF	0,9	0,6	30	-	-
N3-TF	0,9	0,6	10	5	-
K3-TF	0,9	0,6	10	-	5
K7-TF	0,9	0,6	2,5	-	10
K8-TF	0,9	0,6	5	-	10
K9-TF	0,9	0,6	10	-	10
K10-TF	0,9	0,6	30	-	15

3.5.5. PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonları

Formülasyonlarda daha uzun süreli salım elde edilmesi amacıyla PLGA polimeri denenmiştir. PLGA nanoliflerinin hazırlanması için öncelikle litertürde belirtilen 1:1 oranında DCM:DMF solvan sistemi kullanılmıştır (Eren Boncu, Ozdemir ve Uskudar Guclu, 2020). Daha sonra formülasyonda kullanılacak diğer polimer gerekli miktarda tartılarak bu karışımına eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda homojen karışım elde edilinceye kadar karıştırılmıştır. Elektroçekim işleminden önce ultrasonik banyoda hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için 1 dk beklenmiştir. TDF ve FTC yüklü PLGA bazlı formülasyonların içeriği Çizelge 3.13'de verilmiştir.

Çizelge 3.13. TDF ve FTC yüklü PLGA bazlı formülasyonların içeriği ve formülasyon kodları

Kod	TDF (%)	FTC (%)	PLGA (%)	PEO N80 (%)	PVP K90 (%)
M1-TF	0,9	0,6	10	-	-
M2-TF*	0,9	0,6	10	5	-
M3-TF	0,9	0,6	10	-	5

*in-vivo çalımalardaki F grubu

3.5.6. Tabakalı nanolif formülasyonlarının geliştirilmesi

PVA polimeri ile geliştirilen formülasyonlarda kontrollü salımın sağlanması amacıyla katlı-sandwich yapıda nanolif formülasyonları geliştirilmiştir. PLGA nanoliflerinin hazırlanması için literatürde belirtilen 9:1 oranında Aseton:DMF solvan sistemi kullanılmıştır. PLGA ile yapılan katlı lif formülasyonlarında orta kısımda PLGA yer alacak şekilde iki tarafına PVA ile tabakalı üretim gerçekleştirildi. PVA tabakasının kalınlığı değiştirilerek farklı formülasyonlar hazırlanmıştır. PVA bu formülayonlara mukoadezif özelliklerini geliştirmek için eklenmiştir. PVA tabakası için %10 PVA konsantrasyonu sabit tutulmuştur. PVA, 1:1 oranında distile su:etanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. İlk PVA tabakası hazırlandıktan sonra PLGA tabakası, ilk tabakanın üzerine üretilmiştir. TDF ve FTC sadece orta tabakadaki PLGA polimer çözeltisine ilave edilmiştir. Daha sonra en dış tabakanın üretimi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14. TDF ve FTC yüklü tabakalı nanolif formülasyonların içeriği ve formülasyon kodları

KOD	TDF (%)	FTC (%)	PVA (%10)	PLGA (%10)	PVA (%10)
			Üst için kullanılan çözelti miktarı (mL)	Orta için kullanılan çözelti miktarı (mL)	Alt için kullanılan çözelti miktarı (mL)
S1-TF*	0,9	0,6	1	10	1
S2-TF	0,9	0,6	2,5	10	2,5
S3-TF	0,9	0,6	5	10	5
S4-TF	0,9	0,6	7,5	10	7,5

*in-vivo çalımalardaki D grubu

3.6. Elektroçekim İşleminde Kullanılacak Polimer Karışımlarının Çözelti Karakterizasyonu

Elektroçekim işleminde kullanılacak olan etkin madde içeren ve içermeyen polimer çözeltileri, viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümleri ile karakterize edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre sistemlerin elektroçekim işlemi için uygunlukları değerlendirilmiştir.

3.6.1. Etkin madde/polimer karışımlarının iletkenlik ölçümlerinin yapılması

Elektroçekim yönteminde elektrottan polimer damlacığına elektrik yükünün aktarılması, dolayısıyla elektroçekim yöntemi için kullanılan çözeltide optimum elektrik iletkenliği göstermelidir. Elektroçekim işleminde, nanolif oluşumunda sırasında iletkenliği düşük olan polimer çözeltilerinde damla yapısında Taylor konisi şekline geçiş sağlanamaz ve nanolif elde edilemez. İletken olmayan çözeltiler ile elektroçekim işlemi gerçekleştiremez. İletkenlik, elektroçekim işleminde kullanılacak polimer çözeltisinin yüzeyinde bulunan elektrik yüklerinin sayısını gösterir ve nanolif oluşturma eğilimini kontrol etmektedir. Polimeri, çözücü içinde çözerken polimerdeki iyonik yüklere bağlı olarak çözeltinin iletkenliği değişmektedir (Amariei, Manea, Bertea, Bertea ve Popa, 2017). Çözeltideki polimer konsantrasyonunun artmasıyla elektriksel iletkenlik azalabilir veya polimerin kendisi polielektrolit tipi iyonik özelliklere sahipse, çözeltinin iletkenliği artacaktır.

Elektroçekim yönteminde oluşan jetlerin daha fazla yük taşıması nedeniyle çözeltinin elektriksel iletkenliği artarak nanoliflerin çapında azalmaya sebep olmaktadır (Angammana ve Jayaram, 2011). Genel olarak küçük fiber çapına sahip elektroçekim nanolifler, en yüksek iletkenliğe sahip çözeltiden elde edilebilmektedir. Bu sebeple kullanılacak polimer çözeltilerinin ve karışımlarının iletkenlik değerleri incelenmiştir. Bir çözeltinin elektriği ne kadar iyi ilettiği iyonların hareketliliğine, çözeltinin konsantrasyonuna, iyonların değerliğine ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. İletkenlik değerinin çok düşük olması sonucu lif çekimi gerçekleşmezse polimer çözeltisine tuz eklenmesi alternatif bir çözüm yoludur. İletkenlik değeri lif çapını belirleyen bir parametre olduğu için çözeltilerin μS/cm cinsinden iletkenlik değerleri ölçülmüştür. Ölçüm için cihazın probu polimer çözeltisi içerisine daldırılarak ölçüm sabitleninceye kadar beklenmiştir (Resim 3.2). Ölçümler her polimer için üç kere tekrarlanmıştır.



Resim 3.2. İletkenlik ölçüm cihazı, (Seven2Go S3, Mettler Toledo, İsviçre)

3.6.2. Etkin madde/polimer karışımlarının yüzey gerilimi ölçümlerinin yapılması

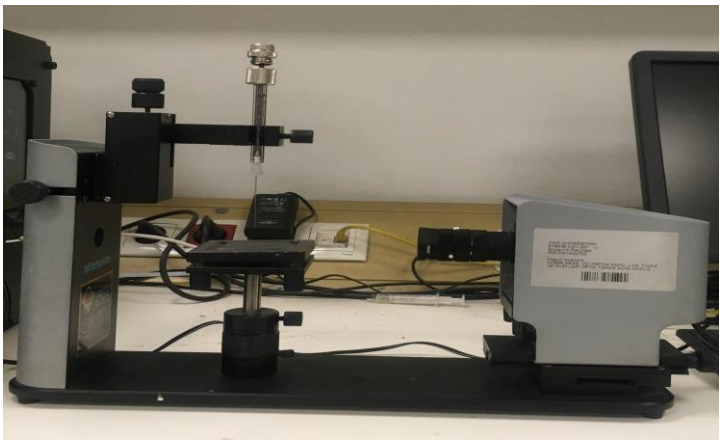
Yüzey gerilimi, yüzeyin 1 cm² artırılması için birim uzunluğa uygulanan kuvvettir. Yüzey gerilimi bileşimin bir fonksiyonudur ve elektroçekim işleminde kritik bir rol oynamaktadır (Okutan, Terzi ve Altay, 2014). Elektroçekim işlemi sırasında uygulanan gerilime karşı çıkan birincil kuvvettir. Elektoçekim yöntemi ile nanolif oluşumunda polimer çözeltisinin yüzey geriliminin düşük olması ile jet oluşumu gerçekleşmektedir. Polimer çözeltisinin yüzey geriliminin düşürülmesi boncuk oluşumunu azaltabilir veya önleyebilmektedir (Abutaleb ve diğerleri, 2017).

Çalışmalarımızda yüzey gerilimi ölçümleri asılı damla metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Asılı damla metodunda polimer karışımı ile doldurulan enjektörün iğne ucunda asılı duran belli büyüklükteki damlanın şekli cihaz tarafından resim olarak kaydedilmiştir. Damla yer çekimi kuvveti ile sıvının yüzey gerilimi arasındaki dengenin sonucu iğne ucundan düşmeden asılı kalmış hali ile analiz edilmektedir. Asılı damla yöntemi kullanılarak Attension-Theta Lite cihazı ile karışımların yüzey gerilimlerini ölçmek için iğnenin ucunda damlalar oluşturulmuştur (Resim 3.3). Ölçümler, %1.7 saniyedeki kare sayısı (FPS) ölçüm değeri kullanılarak, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Damlanın geometrik ölçülerine göre Young Laplace denklemi (Eş. 3.3) kullanılarak yüzey gerilimleri cihazın yazılımı kullanılarak alet tarafından hesaplanmıştır (Tort, 2016).

$$\gamma = \frac{\Delta P.G.R_0^2}{\beta} \quad (3.3)$$

Denklemde yer alan:

γ: yüzey gerilimi
Δ*P*: yüzeyler arasındaki yoğunluk farkı
G: yerçekimi sabiti
R: damla ucundaki eğim eğriliği yarıçapı
β: şekil faktörünü ifade etmektedir.



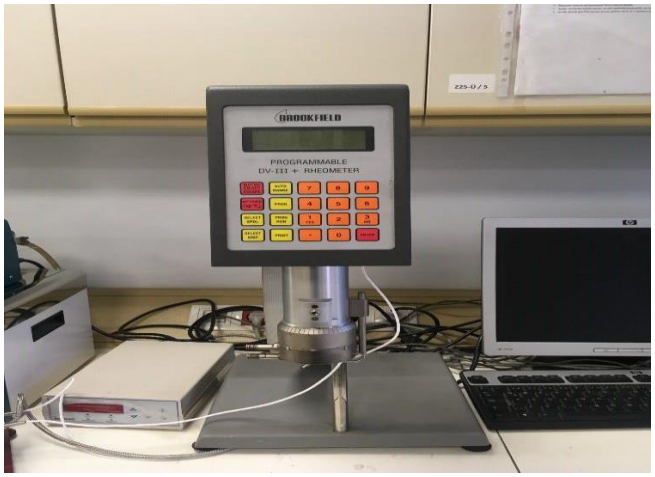
Resim 3.3. Yüzey gerilimi ölçüm cihazı (Theta Lite optical tensiometer, Biolin Scienctific, Attension, Finlandiya)

3.6.3. Etkin madde/polimer karışımlarının viskozite ölçümlerinin yapılması

Elektroçekim işleminde çok yüksek viskozitede çözeltinin akışı ve lif üretimi zorlaşırken çok düşük viskoziteli polimer çözeltilerinden devamlı ve düzgün yapılı lif oluşumu gözlenememektedir. Polimerlerin molekül ağırlıkları ve dağılımdaki değişiklikler viskoziteyi güçlü bir şekilde etkilemektedir (Nezarati, Eifert ve Cosgriff-Hernandez, 2013). Ayrıca, çözeltinin viskozitesi lif çapını etkileyen önemli parametrelerden birisidir (Amariei ve diğerleri, 2017). Bu nedenle hazırladığımız polimer çözeltilerinin viskozite değerleri incelenmiştir.

Sıvıların viskozitesi, akışkan üzerine uygulanan kaydırma kuvvetinin karşılaştığı sürtünme direncinin ölçüsüdür. Viskozite ölçümleri için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmalarımızda viskozite ölçümleri dönen mil yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Polimer çözeltilerinin/karışımlarının viskozitelerinin ölçümünde bölümümüzde bulunan Brookfield Programmable, DIII viskozimetre kullanılmıştır (Resim 3.4). Ölçümler için 0,5 mL örnek cihazın içerisine yerleştirildi ve 52 numaralı uç kullanılarak oda sıcaklığında 3 defa tekrarlanmıştır.



Resim 3.4. Viskozite ölçüm cihazı, rotasyonel viskometre (DV-III Rheometer, Brookfield, ABD)

3.7. Nanolif Formülasyonlarının Elektroçekim Yöntemi ile Üretimi

Hazırlanmış olan polimer çözeltileri NE300 elektroçekim cihazında döner silindir toplayıcı kullanılarak üretilmiştir (Resim 3.5). Üretilen tüm formülasyonların içeriği ve üretim parametreleri kullanılan polimere göre sınıflandırılarak kodlanmıştır. Çözeltiler 10 ml'lik enjektöre konulup, elektro çekim cihazında jet oluşumu için voltaj değerleri 3-25 kV arasında denenmiştir. İğne ucu toplayıcı arasındaki mesafe çözeltilerde kullanılan solvan sisteminin buharlaşması ve pamuklu bez üzerinde toplanan lifin ıslanmasını önlemek için 5-20 cm arasında denenip her formülasyon için uygun olan uzaklıkta lif üretimi gerçekleştirilmiştir. Döner silindirin dönüş hızı 100-1000 rpm olarak formülasyona bağlı olarak seçilmiştir. Mesafe ve dönüş hızı ayarlandıktan sonra formülasyonların konsantrasyonuna göre farklı akış hızları denenerek uygun lifler elde edilmiştir.



Resim 3.5. Elektroçekim işleminin gerçekleştirildiği cihaz (NE-300, İnovenso, Türkiye)

HIV maruziyet öncesi profilaksi için geliştirilen vajinal nanolif formülasyonlarımızın statejileri aşağıda belirtilmiştir:

- Çalışmalarımıza yüksek mukoadezif özellik gösteren ve kolay lif üretimi sağlayan PVA ile başlanmıştır.
- Farklı PVA tipleri içerisinde elektroçekim yöntemi ile üretebileceğimiz en uygun PVA tipinin belirlenmesine yönelik ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. (Çizelge 3.5).
- PVA tipi belirlendikten sonra önformülasyon çalışmaları deneysel tasarımla gerçekleştirilmiştir. (Çizelge 3.8).
- Vajinal uygulamalarda PVA bazlı nanoliflerin mukoadezif özelliklerini artırmak için farklı mukoadezif polimerler ilave edilerek yeni bir formülasyon grubu oluşturulmuştur. (Çizelge 3.9).
- Vajinada kalış süresini ve salım süresini artırmaya yönelik doğal bir polimer olan zein ile nanolif çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Zein ile hazırlanan nanoliflerin mekanik özellikleri vajinal uygulama için düşük olduğundan PEO ve PVP kullanılarak farklı alternatif formülasyonlar hazırlanmıştır. (Çizelge 3.11).
- Kontrollü salım yapması amacıyla PLGA içeren nanolif formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonların mukoadezif özellikleri artırması için PVP ve PEO ile kombinasyonları ile incelenmiştir. (Çizelge 3.13).

- PLGA ile hazırlanan formülasyonda salımı yavaşlatmak için tabakalı formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonların mukoadezif özelliklerini artırmak için PVA ile tabakalı nanolif formülasyonları incelenmiştir. (Çizelge 3.14).

3.7.1. PVA içeren formülasyonların elektroçekim yöntemi ile üretimi

Kullanılan PVA tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak farklı işlem parametreleri uygulanmıştır. Farklı PVA tipleri ile üretilen nanolif formülasyonları elektroçekim yönteminde kullanılan üretim parametreleri Çizelge 3.15'de verilmiştir.

Çizelge 3.15. PVA nanoliflerinin üretiminde kullanılan proses parametreleri

Formulasyon Kodu	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL/h)	Mesafe (mm)	Dönme Hızı (rpm)
P1	18,2	1	90	500
P2	18,5	0,9	95	500
P3	17,7	0,5	95	500
P4	14,5	1,5	115	500
P5	15,9	1,2	132	500
P6	14	0,5	145	500
P7	16,5	1	125	500
P8	15	0,7	148	500
P9	18	1	130	500

3.7.2. Deneysel tasarım ile geliştirilen nanoliflerin elektroçekim yöntemi ile üretimi

PVA nanolif üretiminde, formülasyon içeriği ve üretim prosesinin optimizasyonu için DoE ile geliştirilen formülasyonlarda farklı parametrelerin etkisinin incelemek ve nanolif formülasyonlarındaki değişiklikleri gözlemlemek amacıyla geliştirilen formülasyonların üretim parametreleri Çizelge 3.16'de verilmiştir.

Üretimde değişen PVA konsantrasyonuna, çözücü sistemine ve dönme hızına göre elektroçekim yöntemindeki parametrelerin nasıl değiştiği de gözlemlenmiştir. Diğer parametreler aynı kalmak şartıyla elektroçekim yönteminde meydana gelen değişimler

incelenmiştir. Bu sonraki çalışmalar için üretim parametrelerinin belirlenmesinde önemli ve üreitm parametrelerinin tahmin edilmesinde kolaylık sağlayacaktır.

Çizelge 3.16. Deneysel tasarım ile geliştirilen PVA nanoliflerinin üretiminde kullanılan proses parametreleri

Formulasyon Kodu	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL/h)	Mesafe (mm)	Dönme Hızı (rpm)
RUN 1	19.5	1.3	110	100
RUN 2	20	1	100	100
RUN 3	18.5	1	110	1000
RUN 4	19	0.8	130	1000
RUN 5	18	0.8	130	1000
RUN 6	17.5	0,7	110	100
RUN 7	19.5	0.9	105	1000
RUN 8	17.5	0.5	120	100

3.7.3. PVA bazlı mukoadezif nanoliflerin elektroçekim yöntemi ile üretimi

Polimer oranı ve tipine göre polimer çözeltilerindeki değişikliklere bağlı farklı üretim parametreleri kullanılarak nanolif formülasyonları elde edilmiştir (Çizelge 3.17).

Çizelge 3.17. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri

Formülasyon Kodu	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL/sa)	Mesafe (mm)	Toplayıcı Dönme Hızı (rpm)
F1	17,5	0,5	110	100
F2	21	0,5	120	100
F3	19	0,5	110	100
F4	16,5	0,6	160	100
F5	20	1	110	100
F6	22	0,5	105	100
F7	20	1	110	100

TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlar ile geliştirilen optimum formülasyonlara TDF ve FTC eklenerek nanolif formülasyonları elektroçekim yöntemiyle başarıyla üretilmiştir (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18. TDF ve FTC içeren mukoadezif PVA bazlı nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri

Kod	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL/sa)	Mesafe (mm)	Toplayıcı Dönme Hızı (rpm)
F1-TF	17,5	0,5	110	100
F2-TF	21	0,5	120	100
F3-TF	19	0,5	110	100
F4-TF*	16,5	0,6	160	100
F5-TF	20	1	110	100

*İn-vivo E grubu

3.7.4. Zein içeren nanolif formülasyonların elektroçekim yöntemi ile üretimi

Zein kullanarak üretilen nanoliflerin mekanik özellikleri düşük olduğu için farklı polimerler kullanılarak mekanik ve mukoadezif özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Formülasyonların üretim parametreleri Çizelge 3.19'de verilmiştir.

Çizelge 3.19. Zein içeren nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri

Formülasyon Kodu	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL/sa)	Mesafe (mm)	Toplayıcı Dönme Hızı (rpm)
Z1	20.5	0.3	80	100
Z2	20.5	0.4	100	100
ZW0	6.5	0.6	200	100
ZW1	8	1	200	100
ZW2	5.5	1.5	190	100
ZW3	7	1	230	100
ZW4	7	2	225	100
ZN0	16	1	120	100
ZN1	16.5	1.5	105	100
ZN2	13.5	1.8	120	100
ZN3	12.5	0.5	115	100
ZN4	13	2.5	120	100
ZN5	13.5	1.5	130	100
ZK0	17.5	2	120	100
ZK1	16.5	2.5	110	100
ZK2	17	1,5	120	100
ZK3	16,5	2,4	120	100
ZK4	17	2	125	100
ZK5	16,5	0,5	165	100
ZK6	16,5	7,5	130	100
ZK7	16,5	2	120	100
ZK8	16,5	1	155	100
ZK9	16,5	2,2	155	100
ZK10	17	1,3	155	100

Seçilen optimum formülasyonlara TDF ve FTC eklenerek üretimleri gerçekleştirilmiştir. Etkin maddelerin eklenmesi ile nanolif üretim parametreleri değişmektedir (Çizelge 3.20).

Çizelge 3.20. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının üretim parametreleri

Formülasyon Kodu	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL/sa)	Mesafe (mm)	Toplayıcı Dönme Hızı (rpm)
Z2-TF	20,5	0,5	90	100
ZN3-TF	20	1,5	12	100
ZK3-TF	19,5	2	15	100
ZK8-TF	19	1,8	16	100
ZK9-TF	20	1,5	12	100
ZK10-TF	16,5	1,5	155	100

3.7.5. PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonların elektroçekim yöntemi ile üretimi

Formülasyonlara alternatif daha hidrofobik yapıda olan kontrollü salım sağlaması amacıyla PLGA polimerleri kullanılarak nanolif formülasyonlarına geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen formülasyonlar Çizelge 3.21'de verilmiştir.

Çizelge 3.21. TDF ve FTC yüklü PLGA bazlı formülasyonların üretim parametreleri

Kod	Voltaj (kV)	Akış Hızı (mL/sa)	Mesafe (mm)	Toplayıcı Dönme Hızı (rpm)
M1-TF	21	0,5	90	100
M2-TF*	19	1,1	100	100
M3-TF	20,5	0,7	95	100

*in-vivo F grubu

3.7.6. Tabakalı nanolif formülasyonlarının elektroçekim yöntemi ile üretimi

PLGA ile karışım olarak üretilen formülasyonlara alternatif olarak geliştirilen katlı nanoliflerde orta katmanı oluşturan PLGA formülasyonu S1-TF (İn vivo D Grubu), S2-TF, S3-TF, S4-TF formülasyonlarında %10 PLGA sadece E-TF formülasyonunda %9 PLGA ile hazırlanmıştır. PLGA içeren katmanlar 19-20 kV aralığında voltaj, 100-110 mm aralığında üretim mesafesi ve 1.5 mL/sa akış hızında üretilmiştir. Üretimde toplayıcının dönme hızı

100 rpm'de sabit tutulmuştur. Lif üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir. PLGA konsantrasyonu ve çözücü sistemi literatürde belirtilen şekilde çalışılmıştır.

PVA katmanı için kullanılan çözelti sabit tutularak, kullanılan PVA çözeltisinin miktarı değiştir. PVA nanoliflerinin üretiminde 18-19 kV voltaj değerleri, 1,2-1,5 mL/sa akış değerleri kullanılarak 150 mm-160 mm aralığında üretim gerçekleştrilmiştir.

3.8. Nanolif Formülasyonlarında Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları

Nanoliflerin üretiminde elektroçekim işlemi kullanılması ile meydana gelen yapısal değişiklikler ve üretilen nanoliflerin özelliklerini analiz etmek için termal ve spektroskopik yöntemler ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, ilaç verilişinde nanoliflerin yapısal özelliklerinin etkin maddelerin veya formülasyonlarda meydana gelen değişikliklere bağlı olarak nasıl etki edeceğini anlamamıza ve in vitro veya in vivo ortamlarda etkileri hakkında bilgi edinmemize yardımcı olacaktır. Yapısal çalışmalar için nanolif formülasyonlarında DSC analizleri, XRD analizleri ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. DSC çalışmaları, polimerlerin, etkin maddelerin camsı geçiş sıcaklıkları, kristal ve amorf yapıları hakkında bilgi verecektir. FTIR analizleri maddelerdeki yapısal ve karakteristik bağlar hakkında bilgi verecektir. XRD çalışmaları da benzer şekilde etkin madde ve polimerlerin elektroçekim işlemi sonucunda kristal özellikleri hakkında bilgi verecektir.

3.8.1. Nanolif formülasyonlarının DSC ile karakterizasyonu

Hazırlanan vajinal nanoliflerin karakterlerini belirlemek için TDF, FTC ve polimerlerin DSC analizleri alınarak elde edilen termogramlar incelenmiştir. Çalışmalar, Bölüm 3.2.1. Diferansiyel taramalı kalorimetre analizinde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. Nanolif formülasyonlarının FTIR ile karakterizasyonu

FTIR analizlerinde TDF, FTC, kullanılan polimerler ve elektroçekim yöntemi ile üretimi ile elde edilen nanolif formülasyonları üzerinde çalışmalar gerçekleştirildi. Çalışmalar 3.4.2. FTIR analizinde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.8.3. Nanolif formülasyonlarının XRD ile karakterizasyonu

Vajinal nanolif üretiminde kullanılan bileşenlerin işlem sırasında polimerler ve etkin maddenin kristal yapısı üzerindeki değişiklikler incelemek için gerçekleştirilmiştir. Kullanılan polimerler, etkin maddeler ve elektroçekim yöntemi ile elde edilen nanolif formülasyonları üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.9. Nanolif Formülasyonlarının In Vitro Karakterizasyon Çalışmaları

Elektroçekim yöntemi ile geliştirilen nanolif formülasyonlarının vajinaya uygunluklarını değerlendirmek ve içerisindeki etkin madde miktarını belirlemek için in vitro çalışmalar yapılmıştır. Geliştirilen nanoliflerin, vajinal kullanımdaki potansiyellerini tam olarak anlamak için doğru ve eksiksiz bir karakterizasyon gerekmektedir. Vajinal uygulamalarda nanoliflerin, uygun esneklikte olması ve yeterli mukoadezyon göstermesi gerekmektedir. Bu nedenle nanoliflerin özelliklerinin karakterize edilmesine ihtiyaç vardır. Nanoliflerin mekanik karakterizasyonu için çekme testi, mukoadezyon testi, temas açısı testleri gibi deneysel karakterizasyon çalışmalarının incelemesini gerekmektedir. Vajinal liflerin, in vitro ya da in vivo ortamda vajinaya yeteri kadar tutunmasını sağlayacak kadar mukoadezif ve vajinal uygulamalarda herhangi bir rahatsızlık vermeyecek esneklikte olması gereklidir. In vitro çalışmalar, in-vivo uygulamaları simüle edecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, geliştirilen nanolif sistemlerinin in vivo uygulamalarda nasıl etki edeceğini tahmin etmemize yardımcı olması için planlanmıştır.

3.9.1. Nanolif formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

<u>Görüntüleme</u>

Elektron mikroskobunda görüntüleme, numunenin elektron ışınıyla etkileşiminin bir sonucudur. Elektron enerjisi, numune yoğunluğu, elementlerin atom sayısı ve elbette numune yüzeyinin topografyası gibi birçok faktörün bu etkileşim üzerinde etkisi vardır. Taramalı elektron mikroskobunun (SEM) avantajı, tarama seviyesinden çeşitli mesafelerdeki yapılar hakkında bilgi sağlayan yüksek netlik derinliği sağlamasıdır (Širc ve diğerleri, 2012). SEM, hazırlanan nanoliflerin temel özelliklerini (lif çapı gibi)

değerlendirmek için kullanışlı bir yöntemdir ve ayrıca elektroçekim işleminde çözeltinin belirli polimer konsantrasyonu ve iletkenliğine bağlı olarak işlem sırasında ortaya çıkan etkileri incelenmesine olanak sağlar.

Nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri, ODTÜ Merkez Laboratuarında taramalı elektron mikroskop (Scanning Electron Microscopy-SEM) hizmet alımı ile belirlenmiştir (Resim 3.6). Formülasyonlardan alınan 2 santimetrelik kesitler analiz edilmiştir. Morfolojik analiz için nanolif formülasyonları gridlere yapıştırılarak hazırlanmıştır. Püskürtmeli kaplayıcı ile altın kaplamadan sonra nanoliflerin 1000X, 5000X ve 10000X büyütme oranlarına morfolojik özellikleri incelenmiştir. Görüntüler incelenerek nanolif oluşup oluşmadığı tespit edilmiştir.

Lif çapının belirlenmesi

SEM görüntülerinde elde edilen nanolif görüntüler Image J programı (National Institutes of Health, Bethesda, USA) vasıtasıyla analiz edilerek ortalama lif çapları belirlenmiştir (Tyo ve diğerleri, 2017). Görüntüler programda açıldıktan sonra, görüntü skalasına göre lif çapı değerleri ölçülmüştür. Görüntüler analiz edilirken 100 tane lifin çap ölçümü yapılarak ortalama lif çapı belirlenmiştir.



Resim 3.6. SEM analizlerinde kullanılan cihaz, Quanta 400, Fei, ABD

Lif çap dağılımları

Elde edilen liflerin lif boyutu dağılımı incelenmiştir. Lif çapı ölçümleri kullanılarak grafik çizme programı olan Origin Pro® (Origin Lab, USA) ile lif çapı dağılım histogramları elde edilmiştir.

Porozite ölçümleri

Gözeneklilik, katı bir malzemedeki hava, gaz veya vakum miktarıdır; genellikle katı olmayan hacmin yüzdesi, bir katman biriminin toplam hacmine (toplam katı ve katı olmayan hacim) bölünerek hesaplanmaktadır (Aghayari, 2022). Nanolifler gözenekli yapılara sahiptir ve uygulamalarında bu özellik oldukça önemlidir.

Nanoliflerin porozite ölçümleri ImageJ kullanılarak yapılmıştır. Literatürde porozite ölçümleri ImageJ pragramı kullanılarak yapılmaktadır (Langwald, Ehrmann ve Sabantina, 2023). Bu yöntemde önce program nanoliflerin orijinal görüntüsünü siyah/beyaz olarak tekrar renklendirilmektedir. Nanolifler siyah, boşluk kısmı ise beyaz olarak renklendirildikten sonra iki farklı rengin alanları ayrı ayrı hesaplanmaktadır. Nanoliflerin alanı, toplam alana oranlanır ve bu oran % porozite olarak kabul edilir.

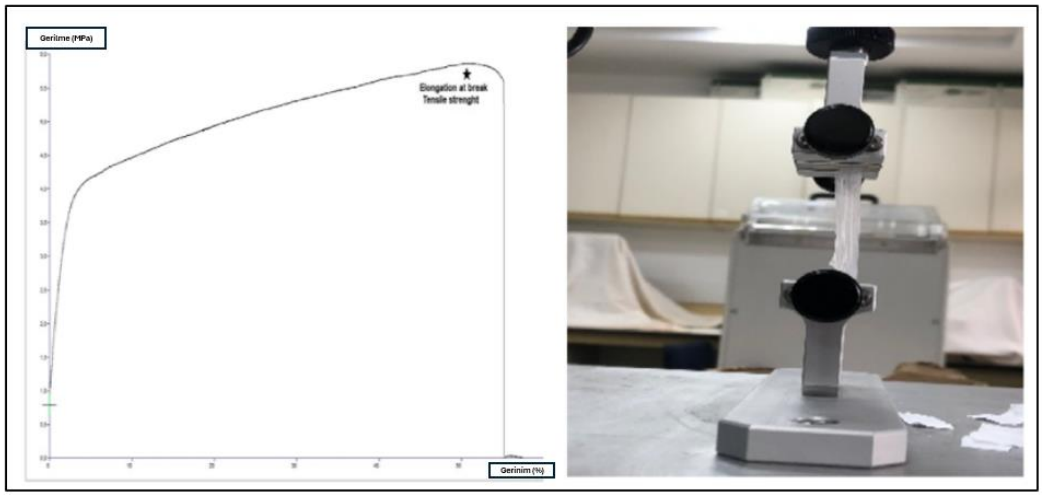
3.9.2. Nanolif formülasyonlarında etkin madde yükleme etkinliğinin belirlenmesi

Nanoliflerin yükleme etkinliği belirlenirken liflerin orta kısmından belirli ağırlıkta kesitler alınıp 5 mL'lik pH 4,2 SVS'y eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Eğer kullanılan polimer SVS'da çözünmüyorsa, ilaç yükleme etkinliğinin belirlenmesi için nanolif formülasyonlarında kullanılan polimeri çözen bir çözücüde çözülmüştür. Gerekli seyreltmeler yapılarak HPLC ile analiz edilerek konsantrasyon hesaplanmıştır (R. Sharma ve diğerleri, 2016). Daha sonra kalibrasyon eğrisinde yerine konularak liflerdeki TDF ve FTC miktarları hesaplanmıştır. Nanolifin tüm ağırlığı ile kesilen kesit ağırlığındaki orandan hesaplamalar yüklenen %TDF ve %FTC miktarları hesaplanmıştır.

3.9.3. Nanolif formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi

Nanoliflerin mekanik özellikleri polimer tipine, kristalleşme hızına ve kristallik seviyesine bağlıdır (Sanchaniya ve diğerleri, 2023). Liflerin üretim sürecinde toplayıcı üzerindeki yerleşimleri, lifler arasında etkileşim ve aşırı gözeneklilik nanoliflerin mekanik özelliklerini etkilemektedir. Hazırladığımız liflerin vajinal uygulama için uygun esneklik ve mekanik dirence sahip olmaları gerekmektedir.

Nanoliflerin mekanik özellikleri Texture Analyser TA-XT cihazında mini tensile grip aparatı kullanılarak incelenmiştir. Çalışmalarda 500 gram load cell kullanılmıştır. 3x1 cm boyutunda kesilen nanolifler aparatın tutacak kısımlarına sıkıştırılmıştır. Alt tutacak kısmı sabit olan aparatın üst tutacak kısmı 5 mm/dk hızında yukarı hareket ederken kopma uzaması ve gerilme direnci cihazın yazılımı yardımıyla hesaplanmıştır. Cihaz ile analiz sonucunda elde edilen ‘stres-gerginlik grafiklerinde’ (Resim 3.7) nanoliflerin x ekseni için max değeri kopma uzaması, y ekseni için max değeri gerilme direncini ifade etmektedir. Analiz sonucunda elde edilen verilerin karşılaştırmalı değerlendirilmesi yapılmıştır.



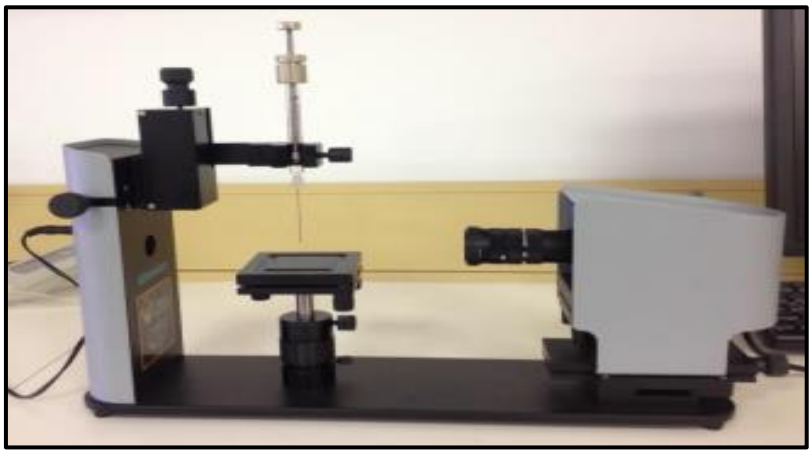
Resim 3.7. Nanoliflerin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılan cihaz ve analiz sonucunda elde edilen grafik

3.9.4. Nanolif formülasyonlarının temas açılarının ölçülmesi

Yüzey ile damlacık arasındaki temas açısı 90°'den büyükse böyle bir yüzey hidrofobik yüzey olarak bilinmektedir (Salam ve diğerleri, 2020). Hidrofilik yüzey durumunda, yüzey ile su damlacığı arasındaki temas açısı 90°'den azdır, bunun sonucunda su damlacığı malzemenin

yüzeyine temas ettiğinde malzemenin yüzeyinde adsorbe edilecektir. Temas açısının küçük olması (0-90°) ıslanabilirliğin iyi, büyük olması (90-180°) ise yetersiz olduğunun göstergesidir. Sıvının viskozitesi, sıvının katıyı ıslatma hızı, sıvının sıcaklığı ve yüzey gerilimi gibi faktörler temas açısını etkilemektedir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2020).

Temas açısı ölçümleri optik temas açısı ölçüm cihazında gerçekleştirilmiştir. Temas açısı ölçümleri bir materyalin üzerine bir damla sıvı bırakılarak çeşitli optik sistemlerin yardımıyla belli bir süre sonra damlanın boyutlarına göre değerlendirilmiştir. Ölçümlerde nanolif yüzeyine 5 µl distile su damlatılarak temas açısındaki değişim gözlenmiştir. Nanoliflerde kameradan düzgün şekil alabilmesi için "convex sample holder" kullanılmıştır (Resim 3.8). Bu aparat ile nanolif yüzeyi gerdirilerek pürüzsüz ve düzgün bir şekil alması sağlanmaktadır.



Resim 3.8. Temas açısı ölçüm cihazı, Theta Lite optical tensiometer, Biolin Scienctific, Attension, Finlandiya.

3.9.5. Nanoliflerin BET ile yüzey alanı analizi

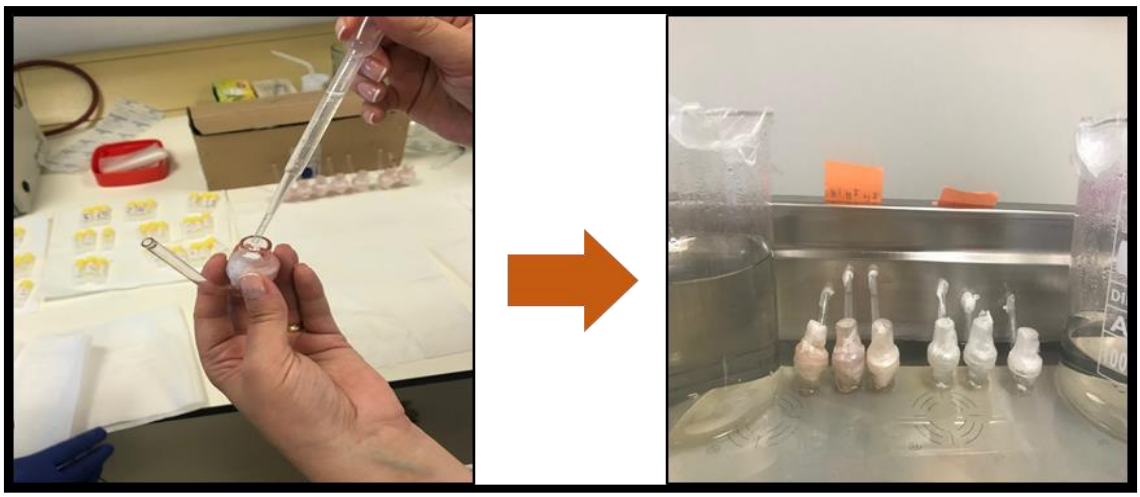
Adını, mucitleri olan Brunauer, Emmett ve Teller'den (BET) alan teknik, gözenekli malzemelerin spesifik yüzey alanının belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir (Širc ve diğerleri, 2012). Ölçüm, numune yüzeyindeki gazın fiziksel adsorpsiyonuna dayanmaktadır. Gaz miktarı, homojen yüzey üzerinde karşılıklı olarak etkilenmeyen tek katmanlı gaz molekülleri varsayılarak Langmuir izotermi ile tanımlanmaktadır.

BET analizi nanoliflerin yüzey alanı ölçümlerinde kullanılan bir yöntemdir. Bilkent Üniversitesi UNAM'da hizmet alımı ile formülasyonların gerçekleştirilmiştir. Nanolifler

100°C'de 3 saat analiz edilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak yüzey alanı hesaplanmış ve por genişliği ve kümülatif por hacmi grafikleri çizilmiştir.

3.9.6. Franz difüzyon hücresinde yapılan in vitro salım çalışmaları

Difüzyon hücresi, geçirgenlik ve stabilitenin değerlendirmesi için kullanılmaktadır (Kumar ve diğerleri, 2024). Franz difüzyon hücresi, kremler, merhemler ve jeller gibi topikal preparatlardan in vitro ilaç salımını güvenilir bir şekilde ölçebilen basit bir yöntemdir (Resim 3.9).



Resim 3.9. İn vitro permeabilite çalışmalarında kullanılan Franz difüzyon hücresi

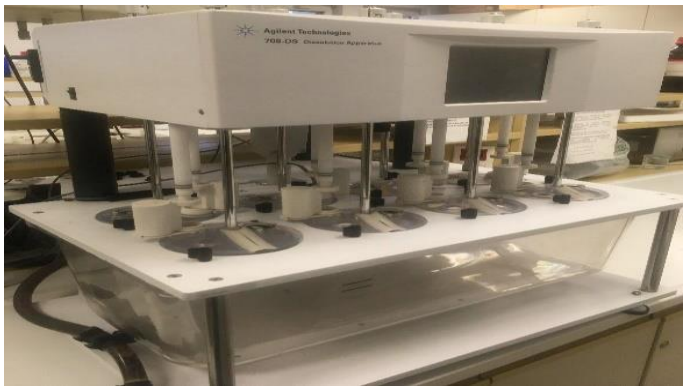
Seçilen optimum formülasyonlar için permeabilite çalışmaları kesit alanı 1 cm^2 olan Franz tipi difüzyon hücreleri kullanılarak yapıldı. Deneylerde 14000 Dalton'dan küçük moleküllere geçirgen olan diyaliz membran kullanıldı. Kullanılan membran yatay difüzyon hücresine yerleştirildi. Hücrenin alt kısmına (reseptör kompartmanına) SVS koyularak çalışmalar gerçekleştirildi. Reseptör hücreye 2.5 mL olacak şekilde SVS konuldu ve küçük magnetler eklenerek magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilerek karıştırıldı. Bu sistem 37°C'lik su banyosu üzerine yerleştirildi. Verici bölmesinde yüklenen etkin madde miktarı bilinen lif formülasyonları konularak reseptör fazından periyodik olarak 2.5 mL numuneler alınarak aynı hacimde taze tamponla doldurulduu. Çalışmalar sink koşulları altında gerçekleştirildi. Alınan örneklerden TDF ve FTC miktar tayini HPLC ile analiz edilmiştir.

3.9.7. USP sepet yöntemi ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları

İn vitro çözünme hızı testi, proses kontrolü ve kalite güvencesinin sağlanması ve ürünün özelliklerinin belirlenmesi açısından önemlidir (Gao, 2009). İn vitro çözünme testi, ilacın salım özelliğinin değerlendirilmesinde kullanılan testlerden birisidir.

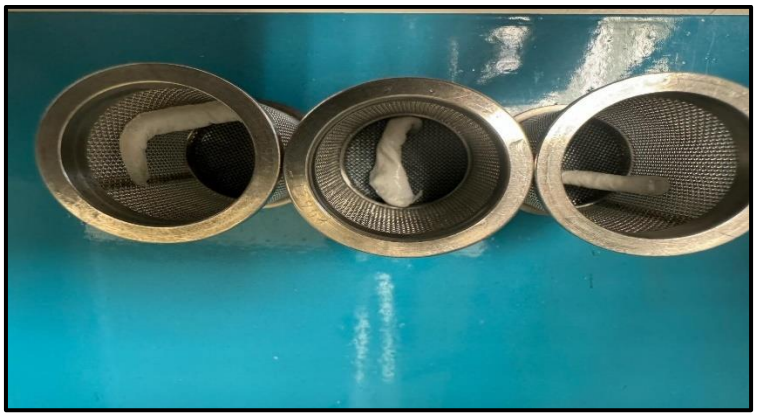
Çözünme hızı çalışmaları

Çözünme hızı çalışmalarında nanolif formülasyonları için önerilen USP Apparatus I-sepet yöntemi kullanılmıştır (Resim 3.10). Salım içn belli miktar lif tartılarak supozituvar-tampon benzeri şekle getrilerek salım çalışmaları incelendi. Bu yöntemde hazırlanan nanolifler sepetin içerisine yerleştirilmiştir. Çözünme hızı çalışmalarında pH 4.2 SVS kullanıldı. Çalışmada nanolifler, 37°C'deki SVS ortamına eklenerek ve cihaz 50 rpm palet dönüş hızında çalışıldı. Çözünme hızı ortamı 500 mL olarak kullanıldı. Belirlenen zaman aralıklarında 2 mL örnek alınarak yerine 2 mL taze SVS eklendi. TDF ve FTC'nin HPLC'de miktar tayini çalışmaları yapıldı. TDF için 13,4 mg/mL ve FTC için 112 mg/mL olarak verilen literatür çözünürlük bilgisine göre çalışmalar sink koşulları sağlanarak gerçekleştirildi.



Resim 3.10. Nanolifler ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışmalarının gerçekleştirildiği çözünme hızı cihazı (708-DS, Agilent Technologies, ABD)

Sepet yöntemi ile salım çalışması yapılan formülasyonların görüntüsü Resim 3.11'de gösterilmiştir.



Resim 3.11. Salım çalışmaları kullanılan liflerin görünümü

Salım kinetiklerinin belirlenmesi

Seçilen optimum formülasyonların çözünme hızı verileri kullanılarak ücretsiz bir Microsoft Excel eklentisi olan DDSolver® yazılımı ile analiz edilerek formülasyonun salım kinetiği belirlenmiştir (Yong Zhang ve diğerleri, 2010). Programa veri analizi için zamana karşı elde edilen % salım değerleri girildi. Bu amaçla sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson-Crowell, Higuchi, Weibull, Korsmeyer- Peppas matematiksel modelleri kullanılarak salım profilinin uygunluğu yazılım vasıtasıyla değerlendirilmiştir (Çizelge 3.22). DDsolver® aracılığıyla deneysel verilerden elde edilen farklı matematiksel modeller için r^2 (Korelasyon katsayısı), r^2_{adj}(Düzeltilmiş korelasyon katsayısı), AIC (Akaike bilgi ölçütü) ve MSC (Model seçme kriteri) değerlendirme kriteri olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.22. Nanolif formülasyonlarından ilaç salım verilerinin analizi için kullanılan kinetik modeller

No	Model	Model Denklemi
1	Zero Order	$F=k_0t$
2	First Order	$\ln (1-F) = - k_ft$
3	Higuchi	$F = k_H\sqrt{t}$
4	Korsmeyer-Peppas	$Mt/M = kt^n$
5	Hixson-Crowell	$1 - \sqrt[3]{1-F} = k_{1/2}t$
6	Weibull	$\ln[-\ln(1-F)]= - \beta \ln t_d + \beta \ln t$

3.10. Nanolif Formülasyonlarında Yapılan Ex-vivo Çalışmalar

3.10.1. Ex-vivo permeabilite çalışmaları

Seçilen optimum formülasyonlar için permeabilite çalışmaları Bölüm 3.9.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. Farklı olarak sentetik diyaliz membran yerine mezbahadan temin edilen inek vajinal dokusu kullanıldı. Dokular temin edildiğinde -20°C'de saklandı. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan yazıda bu çalışma için etik kurul iznine gerek olmadığı mezbaha materyalinin kullanılabileceği belirtilmiştir.

Ex vivo geçişte permeabilite katsayısı, zamana karşı (saat) çizilen dokudan penetre olan etkin madde miktarı (µg/cm^2) grafiğinden hareketle hesaplanır. Çizilen grafikteki doğrusal kısmın eğimi denge halindeki düzgün akı değerini (Js) verir ve bu değerin donör fazdaki etkin madde konsantrasyonuna bölünmesi ile permeabilite katsayısı (P) bulunur. Permeabilite katsayısı, zamana karşı taşınan ilacın %'sinin eğim grafiğinden hesaplandı (H. J. Patel, Patel, Desai ve Patel, 2010). J ve P değerleri Eş. 3.4 ve Eş. 3.5 kullanılarak hesaplanmıştır. (Chakraborti, Sahoo ve Behera, 2015; Tas, Özkan, Savaser ve Baykara, 2003).

$$P = \frac{\text{Eğim X Vd}}{S} \tag{3.4}$$

Vd = Donör çözeltinin hacmi
S = Dokunun yüzey alanı

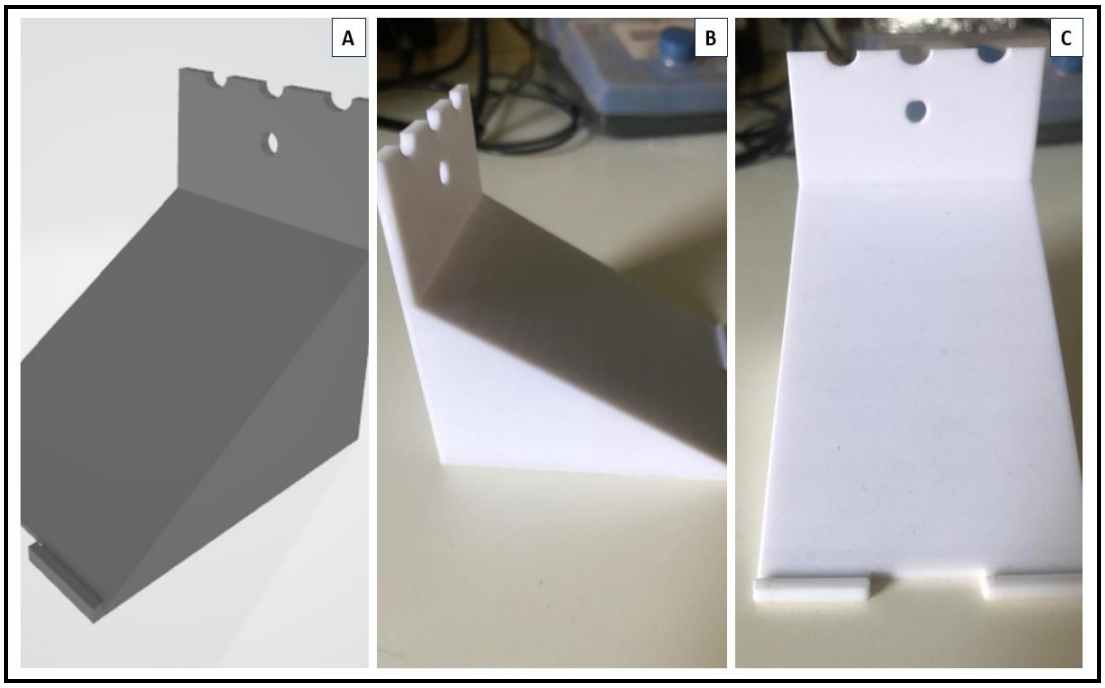
$$P = \frac{J_s}{C_d} \tag{3.5}$$

P: Permeabilite katsayısı (cm/sa)
J_s: Denge halindeki akı (µg/cm^2.sa)
C_d: Donör fazdaki ilaç konsantrasyonu (µg/cm^3)

3.10.2. Ex vivo alıkonma çalışmaları

Alıkonma çalışmaları için geliştirilen platform 3D yazıcı ile üretilmiştir (Resim 3.12). Bu amaçla istenen özelliklere sağlayan platformun tasarımı TinkerCad® programı ile

yapılmıştır. Platform FDM yazıcı ile üretilmiştir. Çalışmalarda akış hızını kontrol etmek için peristaltik pompa kullanılmıştır.



Resim 3.12. 3D olarak tasarlanan platform (A), yazıcı ile elde edilen platform (B-C)

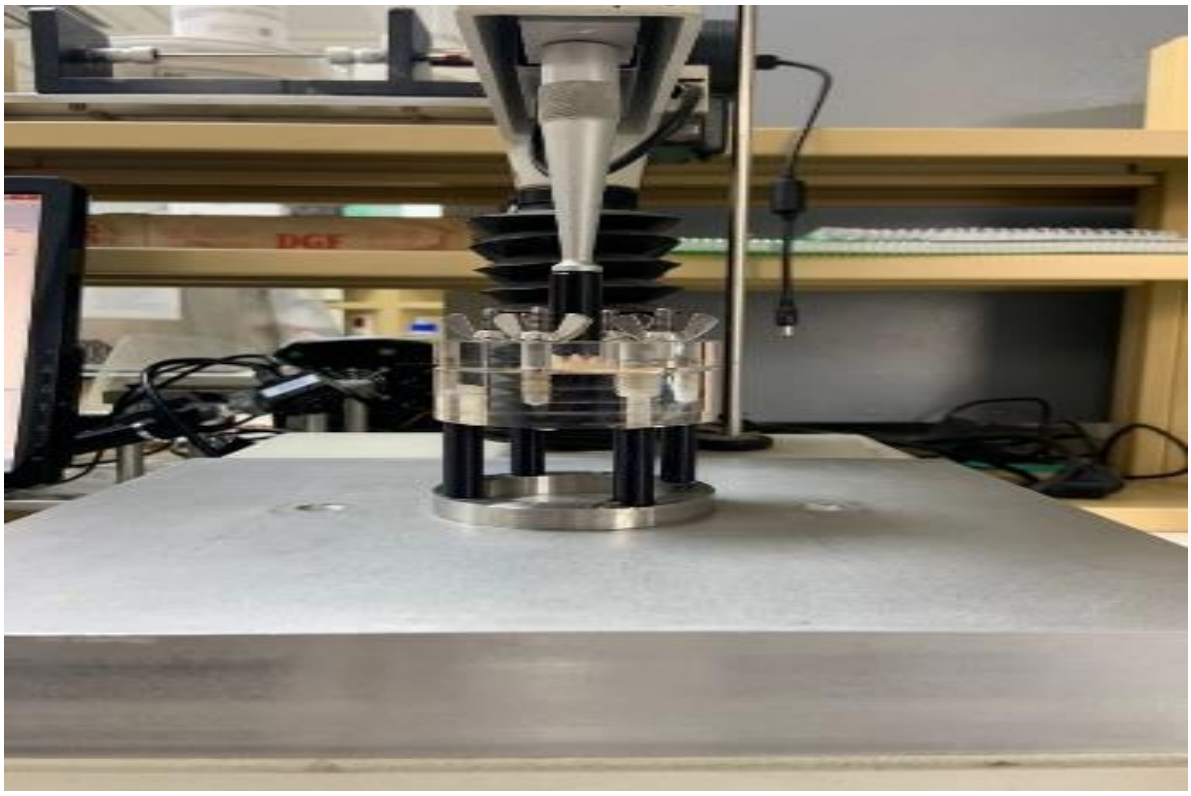
Vajinal ortamın dinamik yapısının simüle edilmesi için gerçekleştirildi. Vajinal dokuda, hazırlanan formülasyonların zamana bağlı alıkonma profili incelendi. İnek vajinası, 30°'lik eğimli bir platformda mukozal tarafı yukarı gelecek şekilde yerleştirildi (N. B. Dobaria ve diğerleri, 2009; Yoo, Dharmala ve Lee, 2006). Formülasyonlar mukozal yüzeye doku ile temas halinde uygulandı. Simüle vajinal sıvı, 5 mL/sa hızında vajinal doku üzerine damla damla uygulandı ve dokudan geçen sıvı, belirli bir zaman aralıklarında toplama kabı yardımı ile toplandı (Varan ve diğerleri, 2019). Toplanan sıvıda bulunan ilaç miktarı HPLC ile analiz edilerek hesaplandı.

3.10.3. Ex-vivo mukoadezyon çalışmaları

Formülasyonların mukoadezif özellikleri Texture Analyser TA-XT cihazında mukoadezyon aparatı ile incelendi. Çalışmalarda inek vajinal dokusu, yüzey alanının geniş olması nedeniyle model doku olarak kullanıldı. İnekten alınan vajinal doku -20 °C'de dondurulduu. Deney yapılmadan 1 saat önce çıkarılıp çözündürülen dokudan mukoadezyon için uygun büyüklükte kesitler alındı.

Geliştirilen nanolif formülasyonlarının TA-XTPlus Analyzer cihazında mukoadezyon özellikleri incelendi. Mukoadezyon çalışması için daha önceden valide edilmiş test koşulları kullanılarak gerçekleştirildi (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2013). Formülasyonları mukozal yüzeyden ayırmak için gereken kuvvet, yüzeyler arasında meydana gelen yapışma derecesinin fonksiyonu olarak ölçülerek elde edilen veriler doğrultusunda mukoadezyon işi hesaplandı. Bu çalışmalar sırasında kopma kuvveti (F) ve yapılan mukoadezyon işi (W) bulundu.

Ölçüm için proba göre nanoliflerden uygun boyutlarda kesitler alınarak proba yapıştırıldı. Probun belli bir hızla inerek dokunacağı yüzeyde mukoadezyon aparatı içerisinde inek vajinal dokusu yerleştirildi (Resim 3.13). İşlem parametreleri: Prob hızı 1,0 mm/sn; probun uyguladığı kuvvet 0,2 N; örnek ile temas süresi 150 sn. olarak belirlendi. Temas süresi bitiminde üst probun dokudan ayrılırken oluşan grafik yardımıyla mukoadezyon işi değeri yazılım tarafından hesaplandı (Tort ve Acartürk, 2016). Her ölçümde dokuyu değiştirerek ölçümler 3 kez tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.



Resim 3.13. Mukoadezyon çalışmalarında kullanılan aparat

TA.XT.Plus Texture Analyser cihazındaki yazılım programı bize kopma kuvvetini ve yapılan işi hesaplayıp vermektedir. Kuvvet-mesafe grafiğinde eğri altında kalan alandan yapılan iş hesaplanmaktadır, birimi N.mm'dir. Mukoadezyon işini bulmak için aşağıdaki denklemden yararlanıldı.

$$\text{Mukoadezyon İşi} = \frac{AUC}{\pi r^2} \qquad (3.7.)$$

AUC: Eğri altında kalan alan
πr^2: Formülasyon ve doku ile temas eden alan (1,1304 cm^2)

3.10.4. Stabilite çalışamaları

Stabilite çalışmaları ICH Stabilite Kılavuzu doğrultusunda gerçekleştirildi. Stabilite, 3 farklı ortamda (4ºC/ortam nemi, 25ºC/%60 bağıl nem ve 40ºC/%75 bağıl nem) planlandı (Ham ve ark., 2012). Hızlandırılmış testler (40ºC/%75 bağıl nem) 6 ay, uzun süreli testler (25ºC/%60 bağıl nem ve 4ºC/ortam nemi) en az 1 yıl devam edecektir.

Stabilite testleri boyunca, dozaj formlarının fiziksel ve kimyasal stabilitesi incelendi. Stabilitenin değerlendirmesi nanoliflerin görünümleri, temas açıları ve etkin madde miktar tayinleri yapılarak gerçekleştirildi. Vajinal yoldan uygulanmak üzere hazırlanan nanolif formülasyonların karakterizasyonları başlangıç değerleri ile karşılaştırıldı. Nanolif formülasyonları stabilite açısından oldukça dayanıklı formülasyonlardır, katı ilaçlar gibi kuru ortamda saklama koşulları vardır. Stabilite çalışmalarımız devam etmektedir.

3.11. İn-Vivo Deneyler

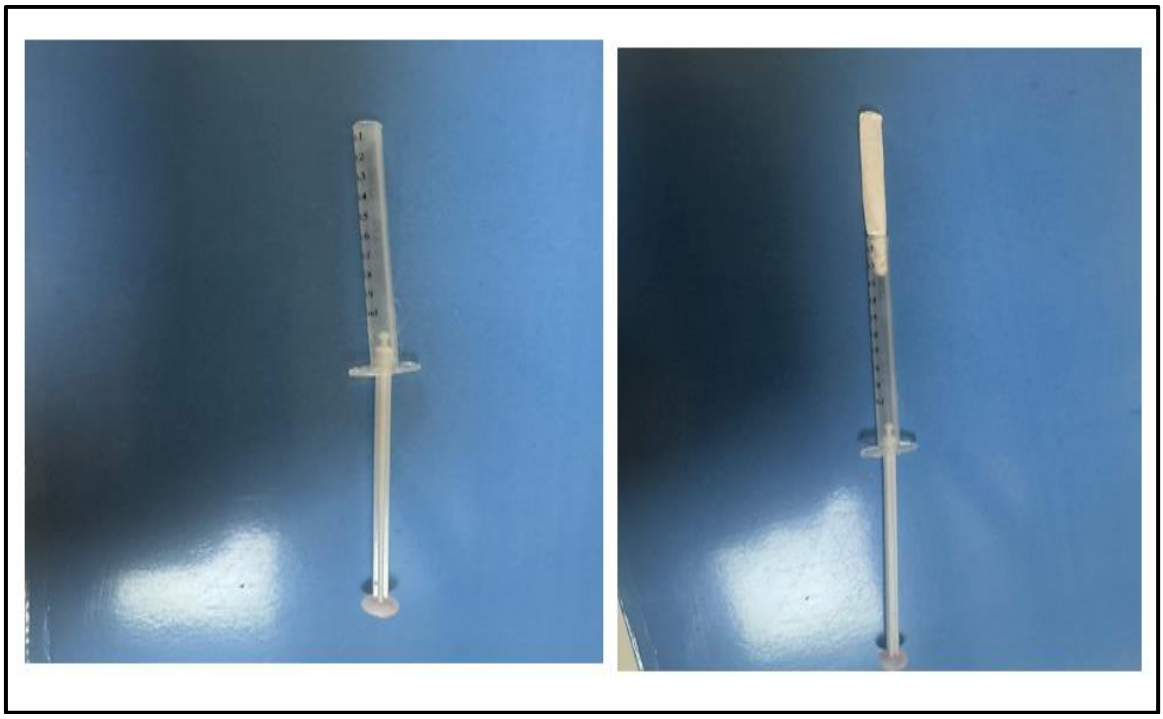
İn vivo deneyler Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından onaylanan 26.08.2020 tarihli E89044 sayılı kararı doğrultusunda yapıldı. İn vivo çalışmaların amacı geliştirdiğimiz TDF ve FTC içeren vajinal nanolif formülasyonlarının biyoyararlılığını incelemek ve oral yoldan verilen TRUVADA® ticari ürünü ile biyoyararlanım karşılaştırması yapmaktır. Truvada film kaplı tablet 200 mg FTC ve 300 mg TDF içermektedir. Oral gavaj yoluyla verilecek olan Truvada film kaplı tablet havanda ezilmiş ve etkin madde dozu 30 mg TDF/20 mg FTC olacak şekilde uygulandı (Clark, Peet, Davis, Doncel ve Friend, 2014; Nunes ve diğerleri, 2021). Nanolif

formülasyonları da aynı dozu içerecek şekilde hazırlanmış, tavşanlara vajinal yoldan uygulanmak üzere vajinal tampon şekline getirilmeye çalışıldı.

Tavşanlar, 18-22°C sıcaklıkta ve 12 saatlik aydınlık/karanlık fotoperiyodunda bulundurulmuştur. Deneylerde 2-3 kg ağırlığındaki dişi Yeni Zelanda tipi tavşanlar kullanılmıştır. Hayvanların üreme döneminde olmamalarına dikkat edilmiştir. Hayvanlar, deneyler boyunca bilinçli ve sadece formülasyon uygulanması sırasında hafif anestezi altında olacaklardır. Kan örnekleri tavşanların kulak venlerinden 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 24. saatlerde alınmış ve santrifüj edilerek TDF ve FTC plazmadan etkin madde miktar tayini yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır. Uygulama sırasında nanolifler sarmal şekil verilerek aplikatör içerisinde yerleştirilmiştir (Resim 3.14). İn vivo çalışmalarda uygulanan formülasyon grupları Çizelge 3.23'te verilmiştir.

Çizelge 3.23. In-vivo çalışmalarda uygulama yapılan deney grupları

Gruplar	Uygulama	Uygulama Yolu	Dozaj Şekli
A Grubu (n=5)	Kontrol-%0.9 NaCl Çözeltisi	Vajinal	Çözelti
C Grubu (n=6)	TDF ve FTC içeren piyasa preparatı (TRUVADA®)	Oral	Tablet (Oral gavaj için ezilerek süspande edildi.)
D Grubu (n=6)	TDF ve FTC içeren tabakalı lif (S1-TF Formülasyonu)	Vajinal	Nanolif
E Grubu (n=3)	TDF ve FTC içeren PVA-PEO lif (F4-TF Formülasyonu)	Vajinal	Nanolif
F Grubu (n=3)	TDF ve FTC içeren PLGA-PEO lif (M2-TF Formülasyonu)	Vajinal	Nanolif



Resim 3.14. Uygulama sırasında kullanılan aplikatör

3.11.1. Analiz metodu geliştirilmesi

Plazma ve doku örneklerinden TDF ve FTC'nin in vivo miktar tayini analizi ve validasyonları LC-MS/MS yöntemi ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Vajinal dokudan TDF ve FTC miktar tayini

Tavşanlar sakrifiye edildikten sonra dokular analiz gerçekleştirilinceye kadar -80ºC'de saklanmıştır. Hem kan hem de dokulardaki TDF ve FTC'nin total miktarının analizinin gerçekleştirilmesi için örnek hazırlama işleminin yapılması gerekmektedir. Kan örneklerinde proteinlerin çöktürülmesi ile doku örneklerinin ise analiz öncesinde homojenize edilerek hazırlanması gerekmektedir.

Kan örneklerinin hazırlanması

Plazmanın ekstrakyionu için, 100 µL plazma 1.5 mL'lik ependorf tüpüne alınarak üzerine 200 µL ultra saf su (%0,1 formik asit içeren) ve 800 µL asetonitril eklenir. 1 dk vortex işlemi uygulanır, 5000 rpm de santrifüj yapılır, üst fazdan 750 µL viale alınır ve analiz için

enjeksiyonlar yapılır. İç standart olarak ornidazol (30 ng/mL) asetonitril içerisinde çözülerek kullanılmıştır ve ekstraksiyon ilk aşamasında eklenmiştir. Boş plazma ve doku örnekleri de aynı şeklide hazırlanmış ve matriks eşleşmiş kalibrasyon eğirileri için kullanılmıştır.

Vajinal dokularının homojenizasyonu ve deney için hazırlanması

Vajina dokularının (doku örnekleri için 100mg) homojenizasyon işlemlerinde pH 7.4 PBS tamponu kullanılmıştır. Homojenizasyon işlemi öncesinde vajinal dokularının yaş ağırlıkları belirlenmiştir. Dokular soğukluğu muhafaza edilerek tüplere konulmuştur. Vajinal dokularının üzerine tampon ilave edilerek miktarları kaydedilmiştir. Dokuların soğukluğu korunarak homojenize edilmiştir.

Miktar tayini yöntemini geliştirilmesi

HPLC'ye dayanan, UV diyot detektörü ve floresans veya kütle spektrometrisi (MS) gibi farklı ayrım teknikleri kullanılmaktadır (Wiriyakosol ve diğerleri, 2018). LC-MS/MS çalışmalarında maddeleri kütle/yük oranlarına göre moleküllerine ayırmaktadır. Bu sistem sıvı kromatografi sistemi ile maddelerin analizine yardımcı olmaktadır. Her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) sistemi oluşturulmuştur. Tandem kütle spektrometresinin kullanılması, matris sistemlerden maddelerin analizi için uygun bir yöntemdir (Illamola ve diğerleri, 2016).

TDF ve FTC'nin miktar tayini yönteminin geliştirilmesi Agilent 6460 Triple Quant LC-MS cihazı kullanılmıştır. Maddelerin kan ve dokudan analizinde LC/MS/MS yönteminin seçilmesindeki en önemli etkenler seçicilik, özgünlük ve hassasiyet sağlamasıdır.

Sistem konfigürasyonu Agilent 1260 serisi sıvı kromatografi ve bu sisteme bağlı Agilent 6460 Kütle Spektrometre cihazından oluşmaktadır (Agilent Technologies, Inc., CA, USA). MS sistemi Jet Stream Elektrosprey iyonlaşma tekniğinde kullanılmış ve pozitif modda analizler yapılmıştır. Kromatografik ayrım için Agilent Poroshell SB C-18 (3.0mm x 100 mm x 2.7 µm) kolon kullanılmıştır. Analiz ve veri değerlendirmelerde Agilent MassHunter Yazılım B.07.00 Qualitative ve B.08.00 Quantitative versiyonu kullanılmıştır.

Tenofovir analizi

TDF uygulamasını takiben insan plazmasındaki TFV konsantrasyonlarının belirlenmesi için çeşitli biyoanalitik yöntemler geliştirilmiştir. TDF uygulamasından sonra plazma TFV'nin belirlenmesi plazmadaki TDF'nin hızlı hidrolizi ve bunun sonucunda ortaya çıkan yüksek TFV konsantrasyonu nedeniyle kolay analiz edilebilmektedir (D. Xiao ve diğerleri, 2020).

Analizlerde TFV'nin ölçümü:

- TFV analizi, farmakokinetik profilin belirlenmesi kadar önemlidir.
- TFV ve TDF'nin LC-MS/MS ile eş zamanlı belirlenmesi, yöntemin hem LC hem de MS kısımları için en uygun koşulları ve parametre ayarlarını gerektirmektedir.

İnternal standart seçimi

İnternal madde kullanımında internal standart olarak kararlı izotop kullanılmadan TDF ve FTC'nin eşzamanlı analizi için yapısal olarak benzer özellikteki ornidazol kullanılmıştır.

LC-MS/MS çalışma koşulları

Çalışmanın bu aşamasında, miktar tayini analizinin optimum parametrelerini bulmak için çeşitli çalışmalar yapılarak, etkin maddenin en yüksek intensite elde edildiği metot geliştirilmiştir. Uygun mobil fazı bulabilmek için formik asitin iyonlaştırmayı arttırıcı etkisinden faydalanıldı ve en uygun intensiteyi mobil faz A %0,1'lik formik asitli ultra saf su, mobil faz B %0,1'lik formik asitli asetonitril ile yapılan çalışmada elde edilmiştir. Analiz koşulları Çizelge 3.24'te verilmiştir.

Çizelge 3.24. İn-vivo çalışmaların analizine yönelik çalışma koşulları

Kolon	Agilent Poroshell SB C-18 (3.0mm x 100 mm x 2.7 µm)
Kolon Fırını	30 °C
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Analiz süresi	13 dk.
Mobil Faz A	%0,1 formik asitli ultra saf su
Mobil Faz B	Asetonitril
Akış	0.6 ml/dk
Akış programı	0.0 dk- 5% B
	1.0 dk- 5% B
	4.0 dk- 70% B
	5.5dk- 90% B
	8.0 dk- 90% B
	8.1 dk- 5% B
İyonlaşma modu	Pozitif
Kurutucu gaz sıcaklığı	300 °C
Kurutucu gaz akış, N_2	9 L/dk
Nebulizer	35 psi
Sheath gaz sıcaklığı	375 °C
Sheath gaz akışı	11 L/dk
Kapiler voltaj	3000 V
Nozzle voltaj	500

LC-MS/MS miktar tayinin validasyonu

Tenefovir Disoproxil Fumarate, Tenefovir ve Emtricitabine için ana iyon, fragmentor voltaj, parçalanma iyonları ve bu iyonlar için en uygun parçalanma enejileri bulunmuştur. En uygun kütle geçişleri elde edildikten sonra gradyen akış ve matriks enjeksiyonları ile kromatografi kısmında optimizasyonlar yapılmıştır. Bu çalışmalarda tekli standartlar halinde hazırlanan 10µg/mL derişimde çözeltiler kullanılmıştır.

TDF ve FTC'nin LC-MS/MS ile miktar tayini yöntemi için biyoanalilik yöntem validasyonunda aşağıdaki parametreler incelenmiştir:

- Carry-Over (Taşınma)
- Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik
- Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik
- En Düşük Miktar Saptama Alt Sınırı (LLOQ)
- Matriks Etkisi
- Seçicilik-Seçimlilik

3.11.2. Farmakokinetik çalışmalar

Etkin maddelerin serum konsantrasyonları saptanarak plazma-zaman profilleri çizilmiştir. Çalışmada eğri altında kalan alanı (AUC) hesaplamak için Trapez (Doğrusal AUC) Yöntemi kullanılmış ve PKSolver® programı ile hesaplanan AUC ile karşılaştırılmıştır. Trapez yönteminde plazma profilini oluşturan noktalar, koordinatları ile grafiğe geçirilmiştir ve her noktadan [Pn(tn,Cn)], x eksenine birer izdüşüm çizilmiştir. Böylece eğri altında kalan alan bir dizi yamuğa (Trapeze) dönüşür. Trapezlerin alanları ayrı ayrı hesaplanıp toplandığında toplam AUC bulunmuş olur. Her bir trapezin alanı denklem olarak gösterilerek toplanmıştır.

$$\underset{n\to\infty}{AUC} = \sum_{i=1}^{n} 0.5 * (t_n - t_{n-1}) * (C_n - C_{n-1}) \quad (3.8)$$

Bu trapezlerin alanları teker teker hesaplanıp deneysel noktaya kadar olan toplam alan ($\underset{0\to n}{AUC}$) hesaplanmış olur. Halbuki biyoyararlanım saptanmasında sıfırdan sonsuza olan alan ($\underset{0\to\infty}{AUC}$) gereklidir. Bunu bulabilmek için, plazma profilini tanımlayan denklemin n'den sonsuza integrali alınmıştır.

$$\underset{n\to\infty}{AUC} = \int_n^{\infty} C.dt = \frac{C_n}{\lambda_1} = \frac{C_n}{\lambda_1} \quad (3.9)$$

En son deneysel noktanın derişimi uzaklaşma hız değişmezine bölünerek toplam alan elde edilmiştir. Toplam alan aşağıdaki eşitlik gibi olmuştur.

$$\underset{0\to\infty}{AUC} = \underset{0\to n}{AUC} + \underset{n\to\infty}{AUC} \quad (3.10)$$

Denklemde belirtilen son nokta (C_n) düşük bir derişim olup, burada analiz hataları daha yüksek olma eğilimindedir, bundan dolayı, bağıl olarak daha fazla hata içeren bu noktadan giderek, daha güvenilir bir değer hesaplamak daha doğru olacaktır. Bunun için hesapta, Cn yerine $\hat{C}_n$ (C_nşapka) kullanılmıştır.

$$\underset{0\to\infty}{AUC} = \underset{0\to n}{AUC} + \frac{\hat{C}_n}{k_d} \quad (3.11)$$

Verilerden hareketle, C_{maks} (plazmadaki maksimum konsantrasyon), tmaks (C_{maks}'a ulaşmak için geçen süre), AUC0-24 (0'dan 24. saate kadar plazma zaman eğrisi altında kalan alan),

$AUC_{0-\infty}$ (0'dan sonsuza kadar plazma zaman eğrisi altında kalan alan), k_d (uzaklaşma hız sabiti), k_a (emilim hız sabiti), $t_{1/2}$ (biyolojik yarı ömür), V_d (dağılım hacmi), Cl (klirens) gibi farmakokinetik parametreleri non-kompartmantal analiz ile hesaplanarak biyoyararlanım değerlendirmesi yapılmıştır.

Farmakokinetik analizler yapıldıktan sonra formülasyonların bağıl biyoyararlanımları bulunmuştur.

$$\text{Bağıl Biyoyararlanım} = \frac{AUC_{\text{DGrubu}}}{AUC_{CGrubu}} x100 \quad (3.12)$$

$$\text{Bağıl Biyoyararlanım} = \frac{AUC_{\text{EGrubu}}}{AUC_{CGrubu}} x100 \quad (3.13)$$

$$\text{Bağıl Biyoyararlanım} = \frac{AUC_{\text{FGrubu}}}{AUC_{CGrubu}} x100 \quad (3.14)$$

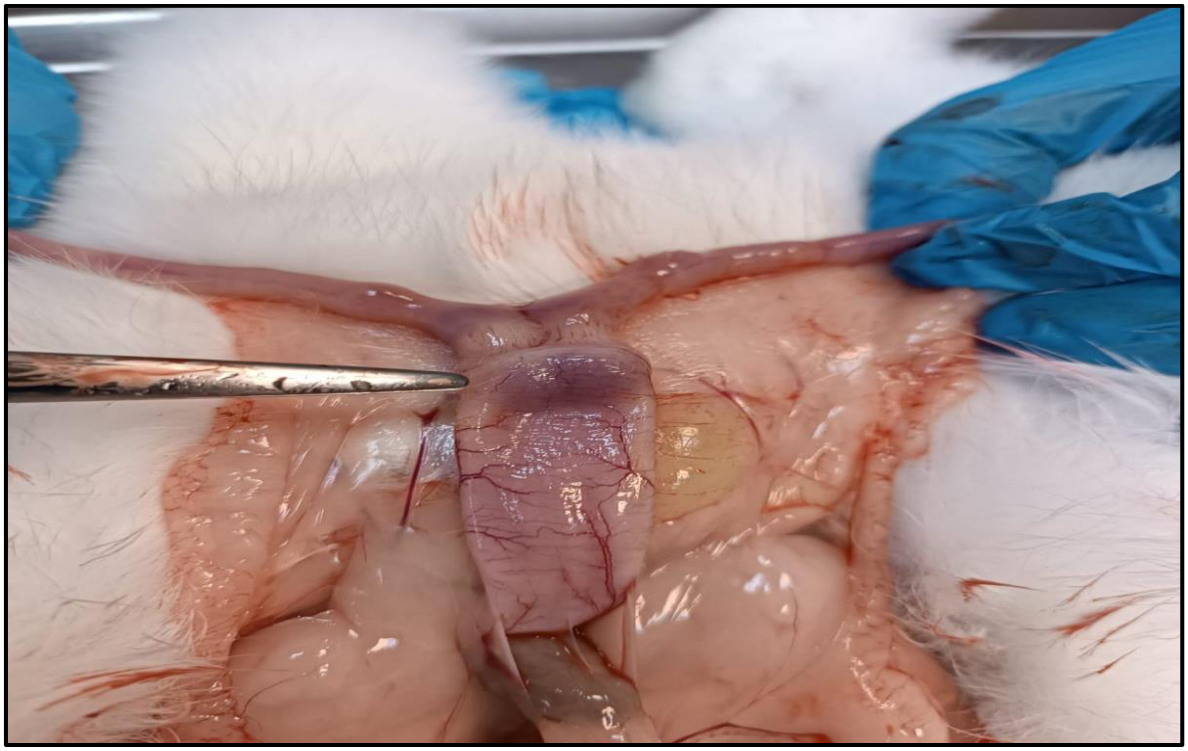
Çalışma sonunda tavşanlar sakrifiye edildikten sonra tüm vajina dokusu, karaciğer ve böbrek dokusu çıkartılmış ve çalışılıncaya kadar -80 ºC'de saklanmıştır. (Resim 3.15-3.18)



Resim 3.15. Tavşanlara formülasyonların uygulanması, a) Vajinal uygulama b) Oral uygulama)



Resim 3.16. Tavşanlara formülasyonlarının uygulanması sonrası hafif anestezi altında bekletilmeleri



Resim 3.17. Tavşanlarda çıkarılan vajinal dokunun görünümü



Resim 3.18. Tavşanlardan çıkarılan dokular (A: Böbrek, B: Karaciğer)

3.11.3. Biyokimyasal ve immunolojik çalışmalar

Etkin maddelerin yan etkilerinin yoğun olarak görüldüğü karaciğer ve böbrek dokularında MDA, NOx ve GSH düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu çalışmalar, Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Malondialdehit (MDA) ölçümü

Lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA, oksidatif stresin yaygın olarak kullanılan bir biyobelirtecidir (Montuschi, 2013). MDA, proteinlerin, lipoproteinlerin, DNA'nın ve RNA'nın fonksiyonel grupları ile kolaylıkla etkileşime girmektedir (Landau, Kodali, Malhotra ve Kaufman, 2013). Lipid peroksidasyon ürünlerinin içeriği homojenatlar tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren maddeler (TBARS), daha önce Yagi ve arkadaşları tarafından belirtilen şekilde ölçülmüştür (Yagi, 1998). Böbrek, karaciğer ve vajinal doku örnekleri tartılarak, homojenizatör ile soğuk trikloroasetik asit içinde homojenize edilmiştir. Daha sonra süpernatan alınarak üzerine tiyobarbitürik asit ve bütil hidroksi tolüen eklenmiştir. Numunelerin optik dansitesi UV spektrofotometrede 532 nm'de köre karşı okunarak analiz edilmiştir. Dokulardaki MDA konsantrasyonu nmol/g doku olarak hesaplanmıştır.

Dokuda nitrik oksit (NOx) tayin yöntemi

Dokulardaki NOx konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışılmıştır. Kontrol ve yara dokuları, sodyum fosfat tamponu ile homojenize edildikten sonra, 3500 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. 200 µL süpernatana, ortamdaki nitratı nitrite indirgemek amacıyla eşit miktarda VCl3 eklenerek ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklenerek ve 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı 540 nm'de analiz edilmiştir.

Dokuda glutatyon (GSH) tayin yöntemi

GSH, hücre biyolojisinde önemli bir rol oynayan, tiyol içeren bir tripeptittir (Pastore, Federici, Bertini ve Piemonte, 2003). Ksenobiyotiklere ve serbest radikaller ve hidroperoksitler gibi doğal olarak oluşan zararlı bileşiklere karşı hücresel savunmada rol oynamaktadır, hücre işlevselliğinin ve canlılığının oldukça hassas bir göstergesidir. GSH, birçok hastalıkta değişen faktörler olan redoks kontrolü, sinyal iletimi ve gen regülasyonunda önemli bir etkendir (Nuhu, Gordon, Sturmey, Seymour ve Bhandari, 2020). Dokuda GSH tayini için modifiye Elman yöntemi kullanılarak ölçülmüştür (Tort ve diğerleri, 2020). 0.15 M soğuk bir potasyum klorür içinde doku örnekleri homojenize edilecek ve karışım meta-fosforik asit/etilendiamintetraasetik asit/sodyum klorür 0.5 mL olacak şekilde deproteinizasyon homojenata ilave edilmiştir. 4,000 rpm'de 20 dakika santrifüjleme yapıldıktan sonra, 0.5 ml süpernananta 2 ml 0.3 M disodyum hidrojen fosfat ve 0.2 ml solüsyon dithiobisnitrobenzoat (0.4 mg/ml %1 sodyum sitrat) ilave edilmiştir. Bütün numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede 412 nm'de köre karşı okunarak analiz edilmiştir.

3.11.4. Histopatolojik değerlendirmeler

Bu çalışmalar, Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Histoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir. Dokular çıkarıldıktan sonra, kontrol ve deney gruplarındaki tüm vajinal dokular %10 formaldehit içerisinde sabitlenmiştir. Tüm dokular Thermo Scientific Excelsior (ES) makinesi tarafından tespit edilmiştir. Daha sonra hepsi parafine gömüldü ve tüm bloklar Histocentre 2 makinesi kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra Leica RM2255 mikrotom

kullanılarak parafin bloklara 3,5 µm marine camlı kesitler alınmıştır. Daha sonra tüm kesitler Shandon Varistan makinesinde hematoksilen-eozin (HE) ile boyanmıştır. Ayrıca ışık mikroskobu altında hem polarizasyon aparatlı Nikon Eclipse Ci hem de kameram Dijital Görüntü Analiz sistemi kullanılarak fotoğraf çekilerek incelenen kesitlerin tamamı deneysel dokulara sahip normal ve tüm patolojik gruplara aittir.

3.12. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

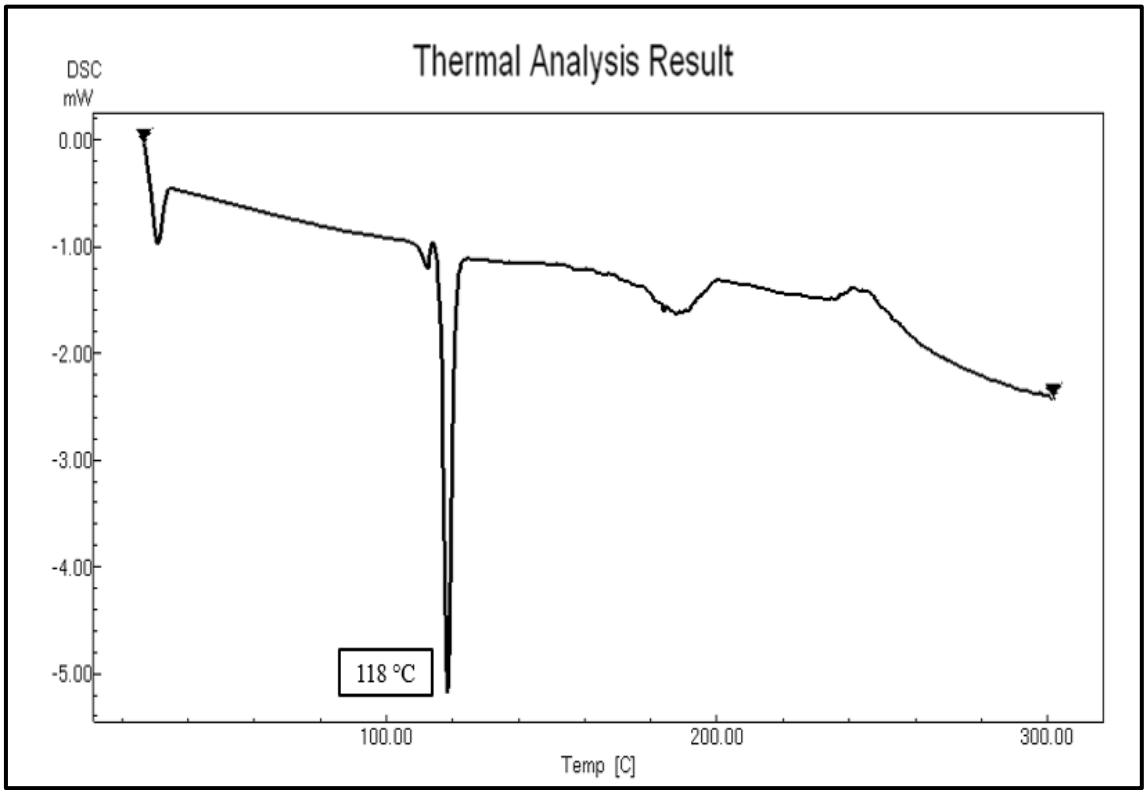
Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi için GraphPad Prism (GraphPad Prism 9.0.0, GraphPad Software Inc., ABD) yazılımı kullanılmıştır. Elde edilen bulguların ortalaması, standart sapması (SS) ve standart hata (SH) değerleri hesaplanmıştır. Tüm analizlerde parametrik testler kullanılmıştır. İki örneklemin kıyaslandığı durumlarda t testi ile ortalamalar kıyaslanarak analizler gerçekleştirilmiştir. İkiden fazla grubun olduğu durumlarda ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. ANOVA sonrasında örnekler bir kontrol grubuna karşı kıyaslanacak ise Dunnett T3 testi, örnekler birbirleri arasında kıyaslanacak ise Tukey HSD testi kullanılarak posthoc analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar %95 güven aralığında yapılmıştır. Analizlerde 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı fark olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

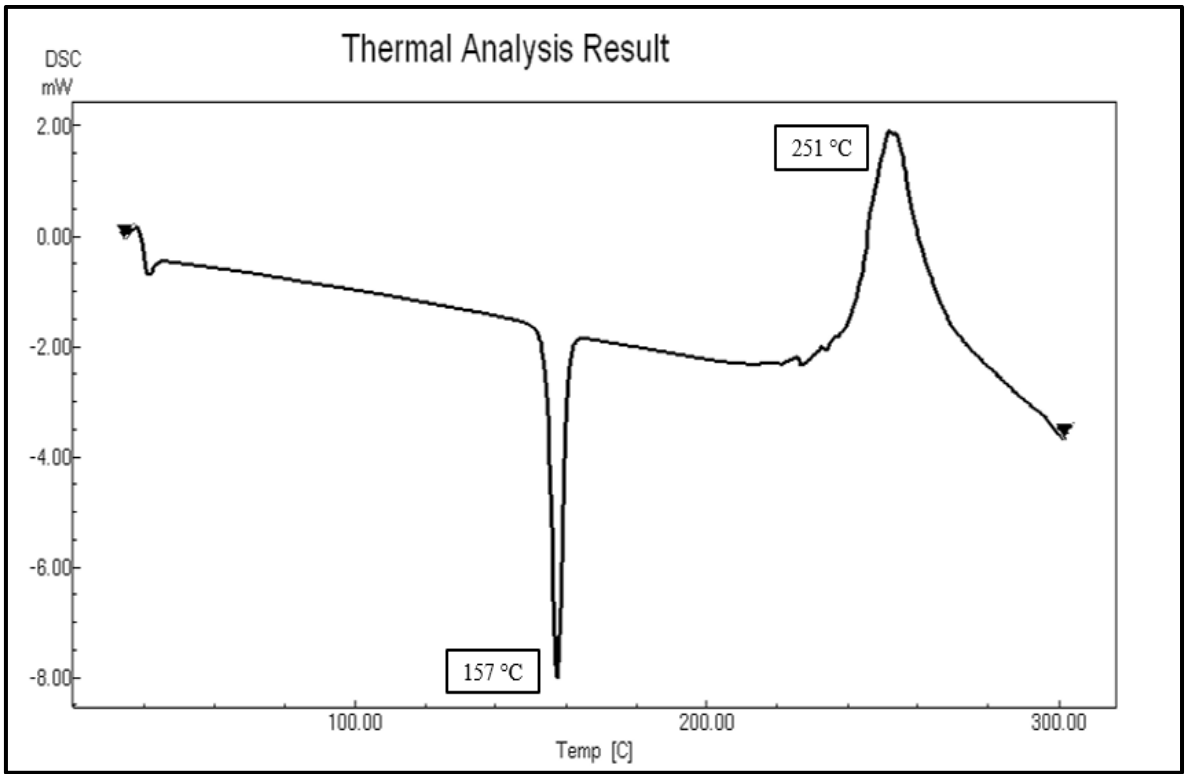
4.1. Etkin Maddelerin Karakteristik Özellikleri

4.1.1. DSC analizleri

TDF ve FTC'nin karakteristik piklerinin belirlenmesi amacıyla DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. TDF ve FTC'ye ait DSC termogramları sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. DSC analizleri Bölüm 3.2.1'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. TDF için erime noktası 118 °C, FTC için endotermik piki 157 °C'de ekzotermik piki 251 °C'de bulunmuştur.



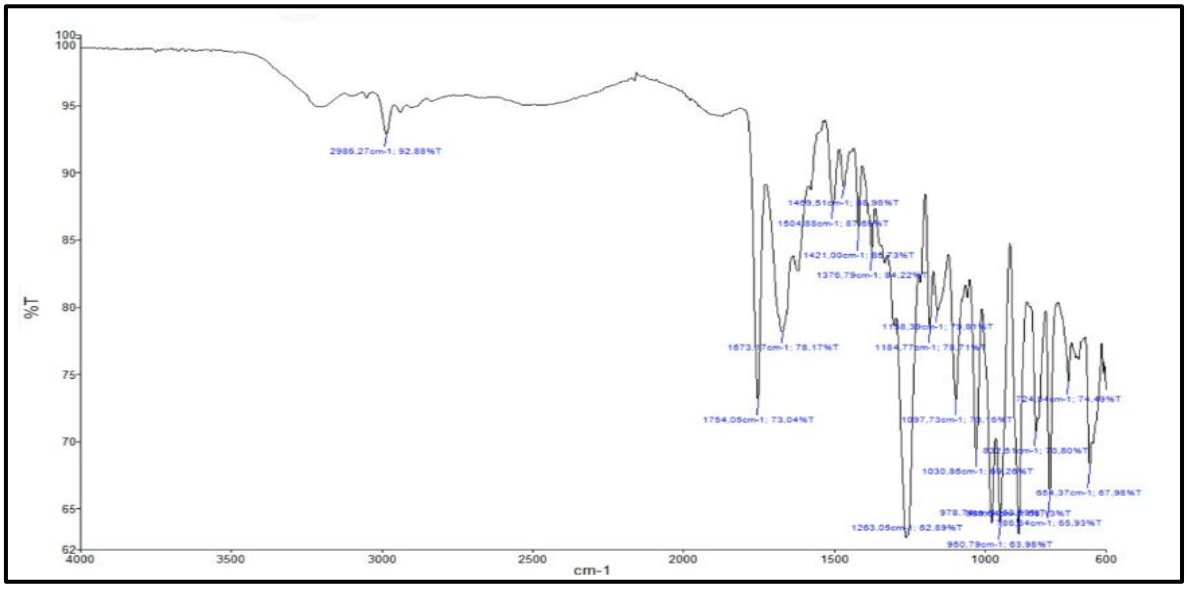
Şekil 4.1. TDF'nin DSC termogramı



Şekil 4.2. FTC'nin DSC termogramı

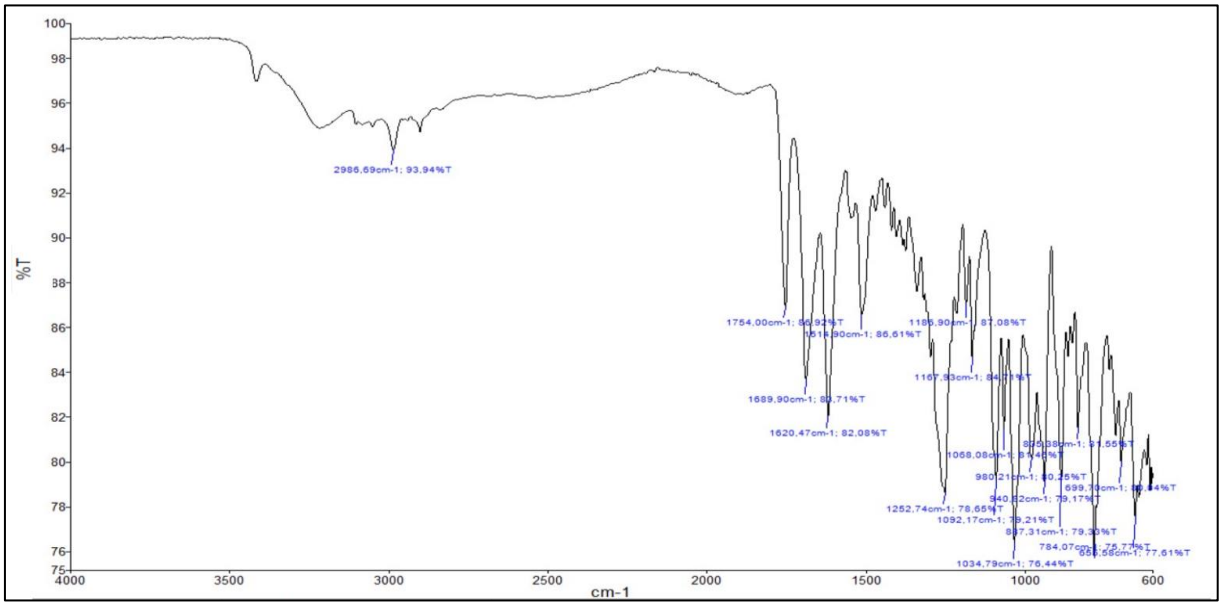
4.1.2. FT-IR analizleri

FT-IR analizlerinin metodu Bölüm 3.2.3'te ayrıntılı biçimde verilmiştir. TDF ve FTC'nin FT-IR spektrumları sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. TDF'nın FT-IR spektrumu

TDF'nin FTIR spektrumunda; 2986 cm^{-1} (CH alifatik gerilmesi), 1673 ve 1754 cm^{-1} (C=O gerilmesi), 1504 cm^{-1} (Aromatik C=C), 1097 cm^{-1} (C—O grubu/CH2OH gerilmesi), 654 cm^{-1} (düzlem bükülmesi olmayan aromatik halka), 1263 cm^{-1} (aromatik halkadaki C=C gerilmesi), 1421 cm^{-1} (birincil amin C-N bükülmesi), 1376 cm^{-1} (CH_3-zayıf pik), 1158 cm^{-1} (P=O gerilmesi), 1030 cm^{-1} (C-O eter gerilmesi), 832, 978 cm^{-1} (R-CH=CH_2 bükülmesi), 724 cm^{-1} (C-H bükülme) karakteristik pikleri gözlenmiştir (J. P. A. Silva ve diğerleri, 2017) (Bashir Khan ve Sharnagat Thakur, 2014).

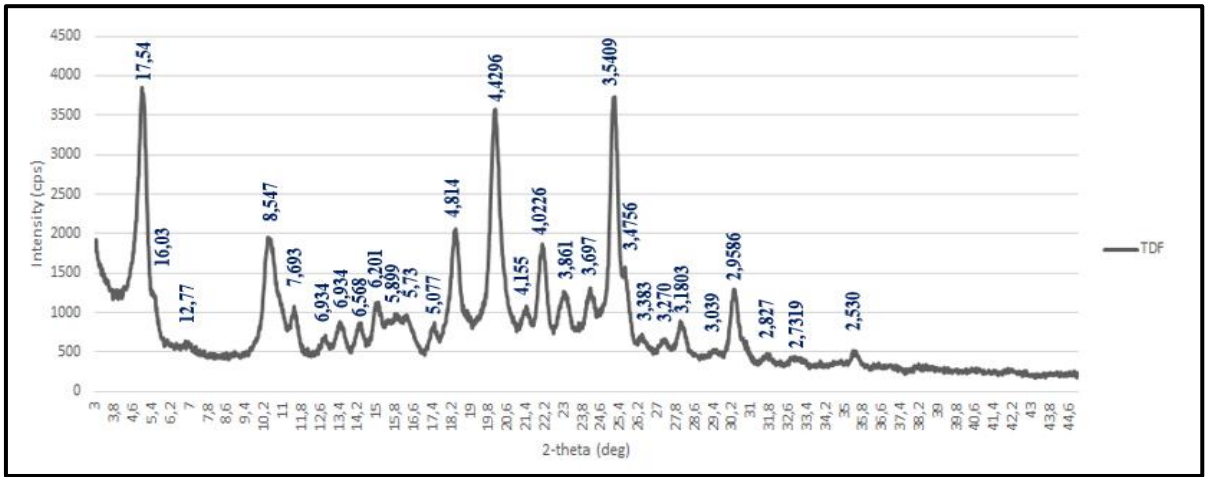


Şekil 4.4. FTC'nın FT-IR spektrumu

FTC için karakteristik titreşim pikleri Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Spektrumda; 3421,27 cm^{-1} (O-H gerilmesi), 3280 cm^{-1} (NH absorpsiyon bandı), 3100-3010 cm^{-1} (alkenil C-H grubu), 2986 cm^{-1} (Hidroksi grubunun geniş absorpsiyon bandı), 2111 cm^{-1} (C=N bandı), 1620 cm^{-1} (Alkenil C=C grubu), 1689 cm^{-1} (amid (C=O) grubu), 1167 cm^{-1} (C-N gerilmesi), 1092 cm^{-1} (C-O-C bandı) ve 1034 cm^{-1} (C-OH bandı)'de karakteristik gruplar gözlenmiştir. (X.-J. Wang, You ve Yu, 2015) (Al-Majed ve diğerleri, 2020).

4.1.3. XRD analizleri

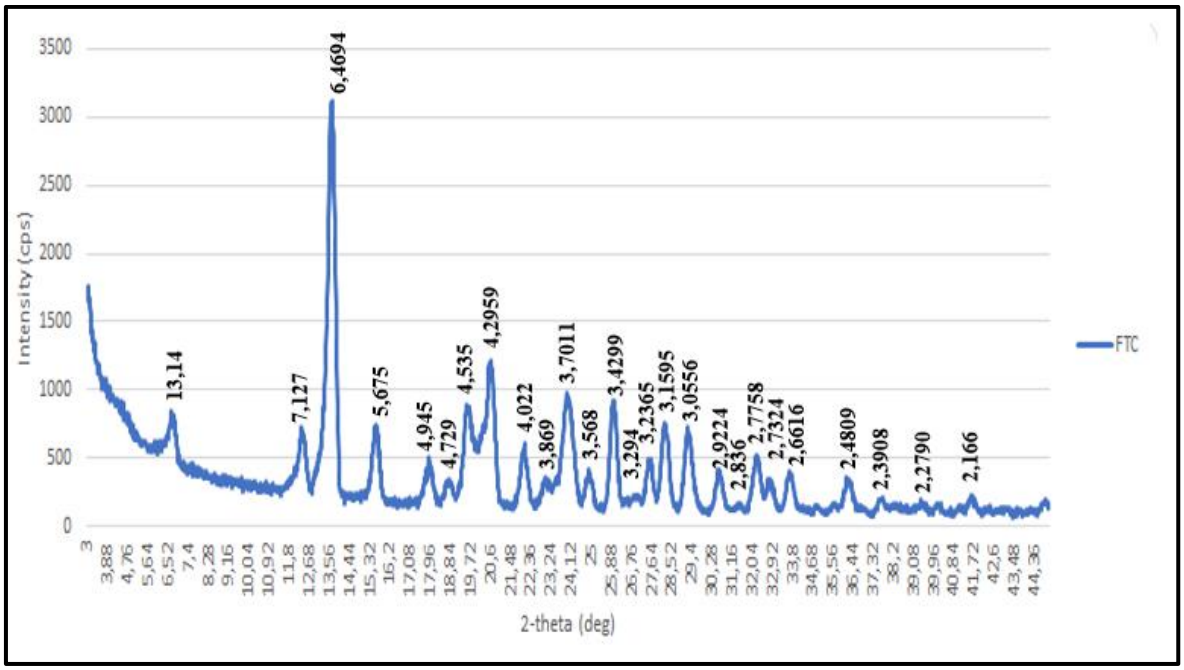
TDF ve FTC'ye ait karakteristik XRD sonuçları sırasıyla Şekil 4.5-Şekil 4.6'da, elde edilen kristalografik veriler ise Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. TDF'ye ait XRD difraktogramı

Çizelge 4.1. TDF'nin XRD analizinden elde edilen kristalografik veriler

2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I (cps deg)	FWHM (deg)	Size
5.033(6)	17.54(2)	1972(41)	1181(20)	0.443(8)	187(3)
5.510(18)	16.03(5)	299(16)	108(15)	0.28(3)	299(36)
6.92(6)	12.77(11)	73(8)	64(5)	0.46(9)	180(35)
10.341(7)	8.547(6)	950(28)	769(11)	0.668(11)	125(2)
11.493(11)	7.693(8)	329(17)	162(9)	0.364(18)	229(11)
12.76(3)	6.934(15)	111(10)	34(3)	0.29(3)	289(27)
13.470(17)	6.568(8)	228(14)	94(3)	0.389(16)	215(9)
14.271(18)	6.201(8)	206(13)	75(7)	0.34(2)	245(18)
15.007(14)	5.899(6)	321(16)	120(16)	0.35(3)	239(18)
15.46(6)	5.73(2)	50(6)	9(5)	0.17(7)	504(206)
15.87(3)	5.581(11)	66(7)	40(61)	0.57(11)	148(28)
16.33(2)	5.423(8)	239(14)	304(27)	1.20(12)	70(7)
17.454(12)	5.077(3)	142(11)	32(4)	0.17(3)	495(83)
18.417(11)	4.814(3)	865(27)	476(7)	0.425(13)	198(6)
20.029(7)	4.4296(15)	1803(39)	1084(11)	0.465(6)	181(2)
21.37(3)	4.155(6)	133(11)	29(3)	0.19(3)	451(68)
22.080(8)	4.0226(15)	698(24)	269(5)	0.326(8)	260(6)
23.015(17)	3.861(3)	302(16)	133(5)	0.374(16)	226(10)
24.052(11)	3.6970(17)	306(16)	150(5)	0.418(17)	203(8)
25.129(5)	3.5409(7)	2097(42)	949(15)	0.362(6)	235(4)
25.609(9)	3.4756(12)	556(22)	220(15)	0.321(18)	265(15)
26.32(3)	3.383(4)	85(8)	26(3)	0.25(3)	341(44)
27.25(3)	3.270(3)	95(9)	38(2)	0.36(3)	240(19)
28.033(12)	3.1803(14)	257(15)	111(3)	0.388(12)	221(7)
29.37(4)	3.039(4)	55(7)	20(4)	0.30(7)	291(65)
30.182(12)	2.9586(12)	552(21)	300(7)	0.446(16)	193(7)
31.62(3)	2.827(2)	59(7)	17(2)	0.23(4)	375(60)
32.755(19)	2.7319(15)	49(6)	25(2)	0.46(5)	187(20)
35.44(4)	2.530(3)	122(10)	71(4)	0.37(5)	232(29)



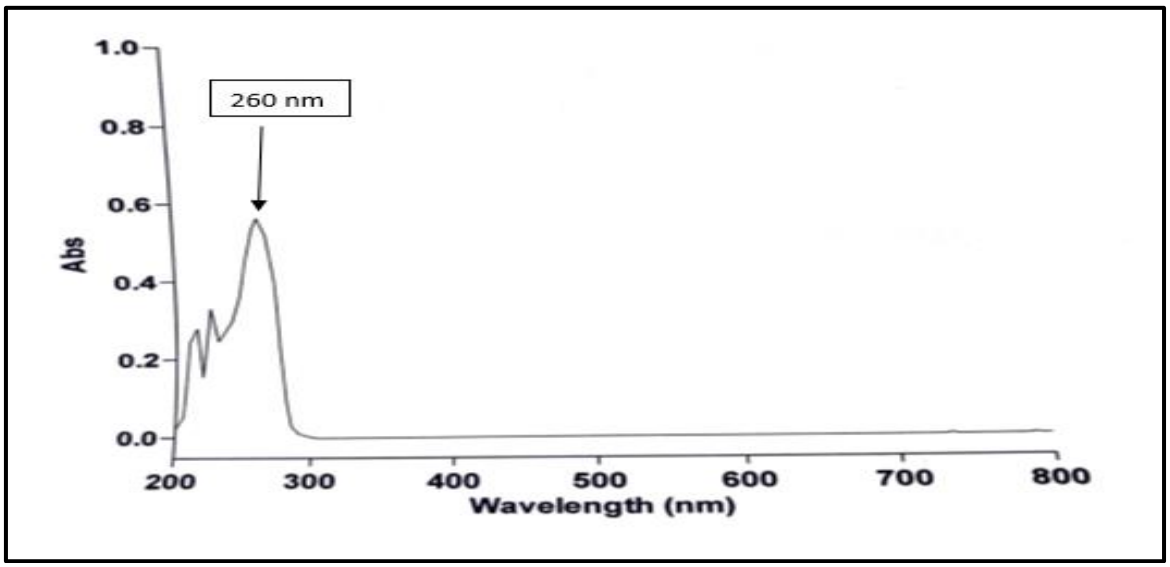
Şekil 4.6. FTC'ye ait XRD difraktogramı

Çizelge 4.2. Emtrisitabinin XRD analizinden elde edilen kristalografik veriler

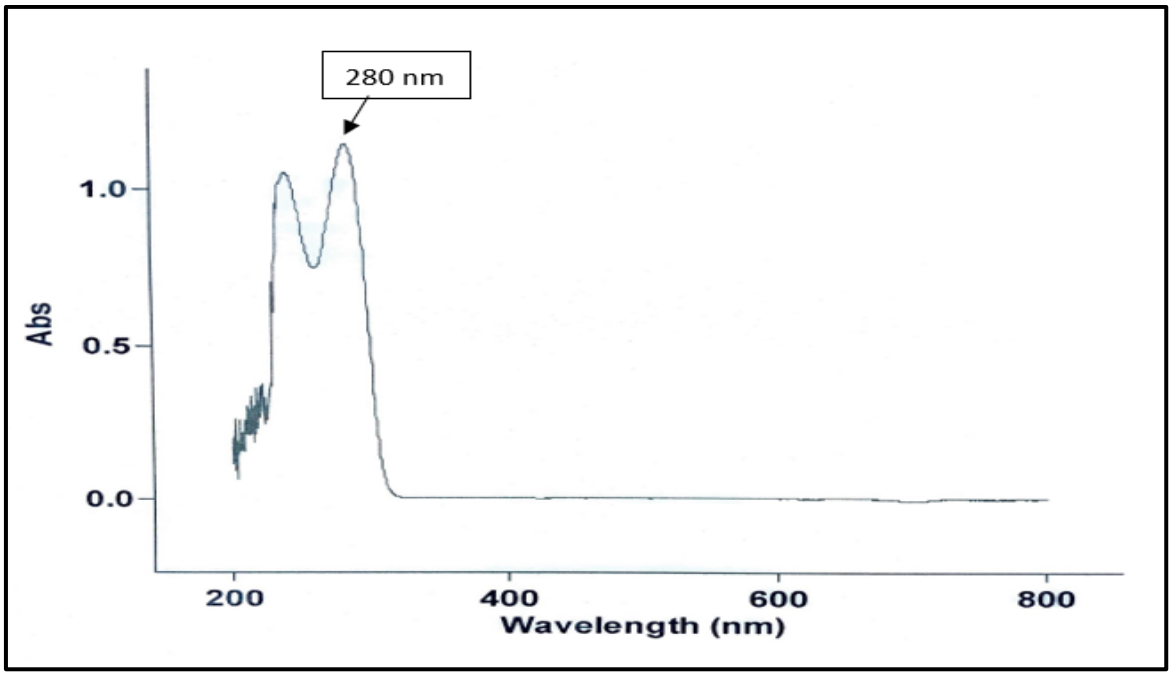
2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size
6.722(15)	13.14(3)	230(14)	134(4)	0.39(2)	215(12)
12.409(12)	7.127(7)	275(15)	132(4)	0.355(16)	235(11)
13.676(4)	6.4694(18)	1959(40)	931(6)	0.378(4)	221(2)
15.601(9)	5.675(3)	370(18)	156(3)	0.343(9)	244(6)
17.922(13)	4.945(3)	189(13)	79(2)	0.376(13)	224(8)
18.75(2)	4.729(6)	103(9)	46(3)	0.40(3)	209(14)
19.557(10)	4.535(2)	445(19)	277(10)	0.57(2)	148(6)
20.659(7)	4.2959(14)	644(23)	382(13)	0.531(16)	159(5)
22.084(11)	4.022(2)	277(15)	106(3)	0.332(9)	255(7)
22.97(3)	3.869(5)	118(10)	77(7)	0.54(6)	157(17)
24.025(9)	3.7011(14)	531(21)	311(7)	0.513(13)	165(4)
24.932(17)	3.568(2)	154(11)	49(2)	0.279(15)	305(17)
25.956(6)	3.4299(8)	543(21)	186(3)	0.314(5)	272(4)
27.05(4)	3.294(5)	51(7)	26(2)	0.48(5)	177(19)
27.545(13)	3.2355(15)	234(14)	86(2)	0.337(11)	253(8)
28.221(8)	3.1595(9)	425(19)	162(3)	0.350(7)	245(5)
29.202(7)	3.0556(7)	381(18)	161(3)	0.398(6)	216(3)
30.564(11)	2.9224(11)	190(13)	70.6(18)	0.350(9)	246(6)
31.52(4)	2.836(4)	32(5)	8.6(11)	0.25(4)	340(55)
32.222(11)	2.7758(9)	270(15)	112(3)	0.389(11)	222(6)
32.748(16)	2.7324(13)	148(11)	51.9(19)	0.329(16)	263(13)
33.644(12)	2.6616(9)	184(12)	70.3(16)	0.358(11)	242(7)
36.18(3)	2.4809(17)	157(11)	69(3)	0.38(2)	232(14)
37.590(16)	2.3908(10)	51(7)	21.9(18)	0.39(4)	227(24)
39.51(2)	2.2790(12)	33(5)	14.2(19)	0.36(7)	243(45)
41.66(6)	2.166(3)	61(7)	23(3)	0.34(4)	260(33)

4.2. TDF ve FTC için HPLC ile Yapılan Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Validasyon, kullanılan yöntemin devamlı olarak doğru ve güvenilir bir şekilde beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken işlemler bütünüdür. Validasyon işlemleri simüle vajinal sıvı için gerçekleştirilmiştir. Maddelerin HPLC ile analizi için öncelikle maksimum dalga boyunun belirlenmesi amacıyla UV ile tarama yapılarak ve literatür taraması yapılarak çalışılacak dalga boyu belirlenmiştir.



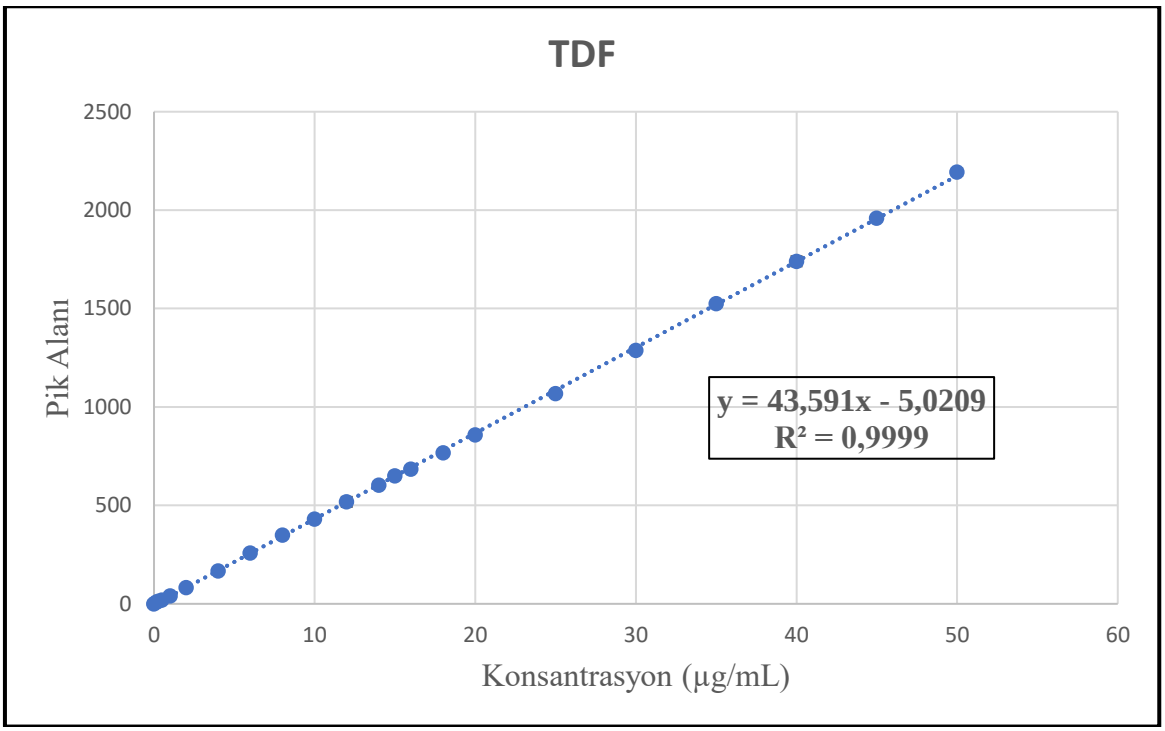
Şekil 4.7. TDF'nin UV Spektrumu (λ_{maks}=260 nm)



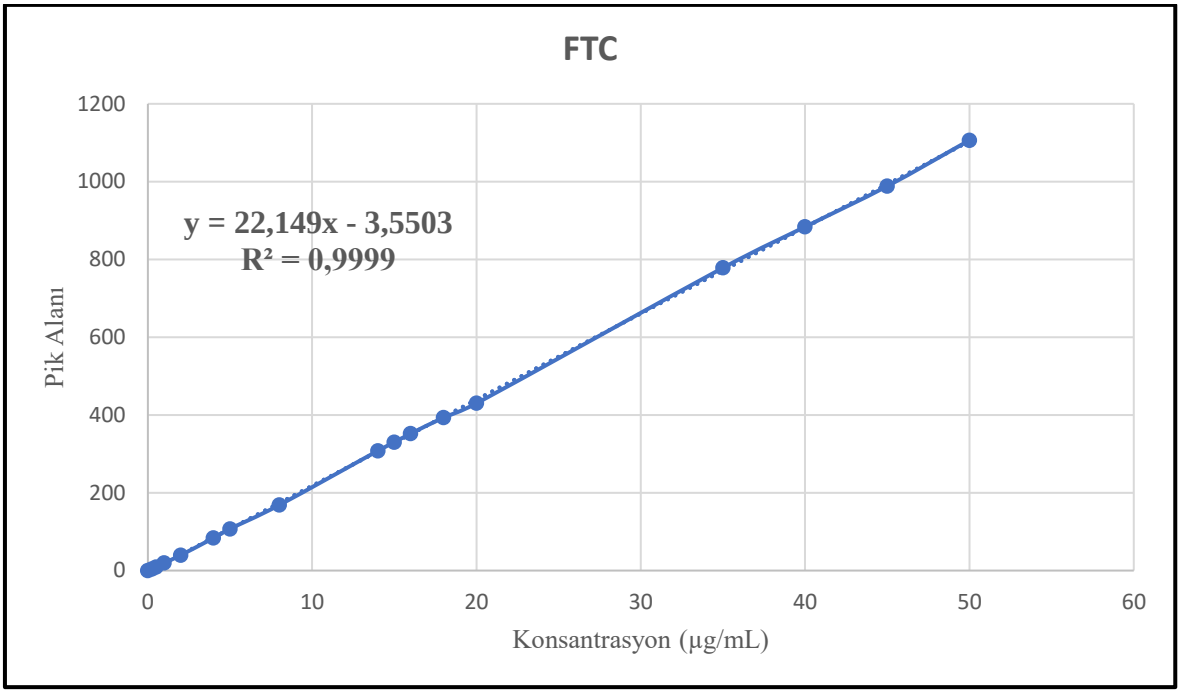
Şekil 4.8. FTC'nin UV Spektrumu (λ_{maks}=280 nm)

4.2.1. Doğrusallık

Numunedeki TDF miktarının belli bir aralık içerisindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantısal olduğunu gösterir. TDF'nin ve FTC'nin simüle vajinal sıvı içerisinde 3 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve HPLC'de Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'te belirtilen metotlat kullanılarak analiz edildi. Çözeltilerin HPLC analizi ile pik alanları bulunmuştur. TDF ve FTC'nin farklı derişimlerine karşı elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulanarak standart doğru denklemi oluşturuldu. Bu analizler sonucu elde edilen kalibrasyon denklemi TDF için Şekil 4.9'de ve FTC için Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. SVS içindeki TDF konsantrasyon-alan kalibrasyon doğrusu



Şekil 4.10. SVS içindeki FTC konsantrasyon-alan kalibrasyon doğrusu

4.2.2. Doğruluk ve geri elde

Geri elde ve doğruluk analizi ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi. TDF, SVS içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 oranında TDF içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı. TDF için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. TDF'nin SVS içerisindeki doğruluk ve yüzde geri (%) elde bulguları

Çözeltideki TDF derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan TDF derişimi (µg/mL)	Geri Elde (%)	Ortalama	SS	%BS
8	7,72	96,5	96,54	0,07	0,075
	7,73	96,6			
	7,72	96,5			
10	10,24	102,4	102,33	0,06	0,056
	10,23	102,3			
	10,23	102,3			
12	12,03	100,3	100,22	0,05	0,048
	12,02	100,2			
	12,03	100,3			

FTC'nin, SVS içerisinde hazırlanan %80, %100 ve %120 oranında FTC içeren çözeltilerinden kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı. FTC için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. FTC'nin SVS içerisindeki doğruluk ve yüzde geri elde analizi sonuçları

Çözeltideki FTC derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan FTC derişimi (µg/mL)	Geri Elde (%)	Ortalama	SS	%BS
8	8,60	107,5	107,46	0,07	0,067
	8,59	107,375			
	8,60	107,5			
10	10,78	107,8	107,83	0,06	0,053
	10,79	107,9			
	10,78	107,8			
12	12,36	103	102,92	0,08	0,080
	12,35	102,9167			
	12,34	102,8333			

4.2.3. Kesinlik

Kesinlik analizi Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı gibi deney içi kesinlik ve deneyler arası kesinlik analizleri olarak iki ayrı şekilde gerçekleştirildi. Kesinlik, standart sapma ve bağıl sapma değerleri ile değerlendirildi.

Deney içi kesinlik

TDF çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan 10 µg/mL çözelti, FTC'nin için 15 µg/mL konsantrasyonda çözelti HPLC'ye ardı ardına 10 kere enjekte edildi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.5. TDF'nin SVS içindeki deney içi kesinlik bulguları

Örnek No	TDF çözeltisinin derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan derişimler (µg/mL)
1	10	10,21
2	10	10,21
3	10	10,24
4	10	10,21
5	10	10,21
6	10	10,20
7	10	10,20
8	10	10,20
9	10	10,20
10	10	10,20
Ortalama		10,21
Standart Sapma		0,01
Bağıl Standart Sapma		0,10

Çizelge 4.6. FTC'nin SVS içindeki deney içi kesinlik bulguları

Örnek No	FTC çözeltisinin derişimi (µg/mL)	Hesapla bulunan derişimler (µg/mL)
1	15	15,59
2	15	15,61
3	15	15,65
4	15	15,62
5	15	15,62
6	15	15,64
7	15	15,64
8	15	15,64
9	15	15,65
10	15	15,63
Ortalama		15,63
Standart Sapma		0,02
Bağıl Standart Sapma		0,112

Deneyler arası kesinlik

TDF ve FTC'nin SVS içerisindeki 5, 25 ve 45 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Örnekler, 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına

karşılık gelen derişimlerin ortalaması ve standart sapması hesaplandı. TDF için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'te, FTC için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. TDF'nin SVS içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

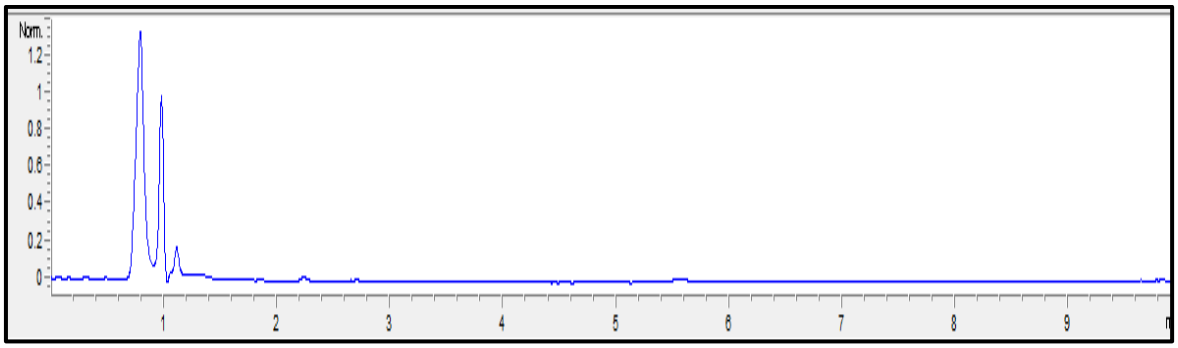
TDF Konsantrasyon (µg/mL)	1.Gün	2.Gün	3.Gün	Ort	SS	BSS
5	5,22	5,3	5,11	5,21	0,10	1,83
25	25,39	24,67	24,49	24,85	0,48	1,92
45	44,58	45,19	45,1	44,96	0,33	0,732

Çizelge 4.8. FTC'nin SVS içindeki deneyler arası kesinlik bulguları

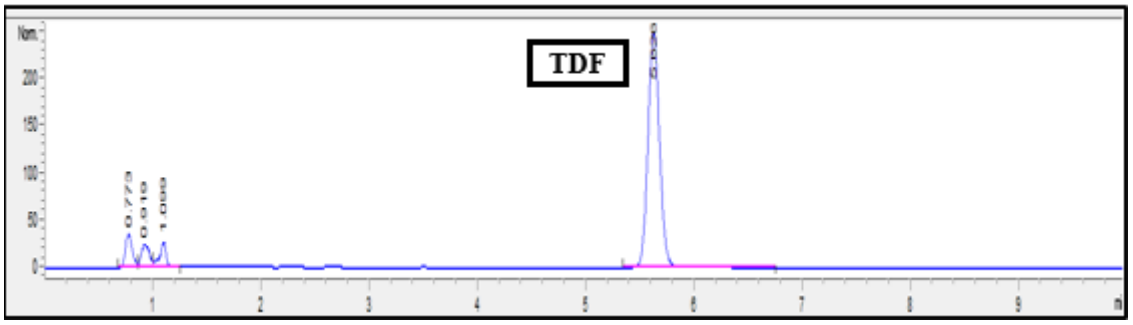
FTC Konsantrasyon (µg/mL)	1.Gün	2.Gün	3.Gün	Ort	SS	BSS
5	5,3	5,45	5,33	5,36	0,08	1,48
25	26,6	25,6	26,12	26,11	0,50	1,92
45	47,23	45,78	45,48	46,16	0,94	2,03

4.2.4. Seçicilik

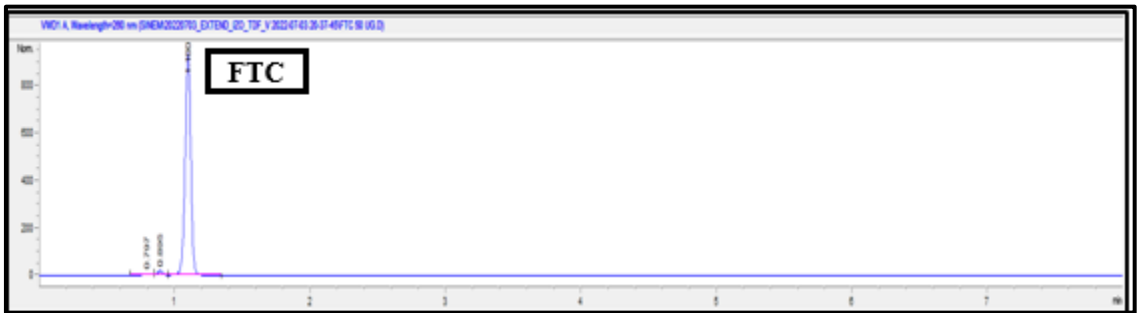
Kullanılan analiz yönteminin sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptaması gerekmektedir. Formülasyondaki TDF ve FTC dışındaki var olan diğer maddelerin analizi etkileyip etkilemediğinin kontrolü yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11 ile 4.18 arasında verilmiştir. Çalışma sonucunda yardımcı maddelerin pik vermediği görüldü. Kullanılan her iki yöntemde maddeye özgü bulunmuştur.



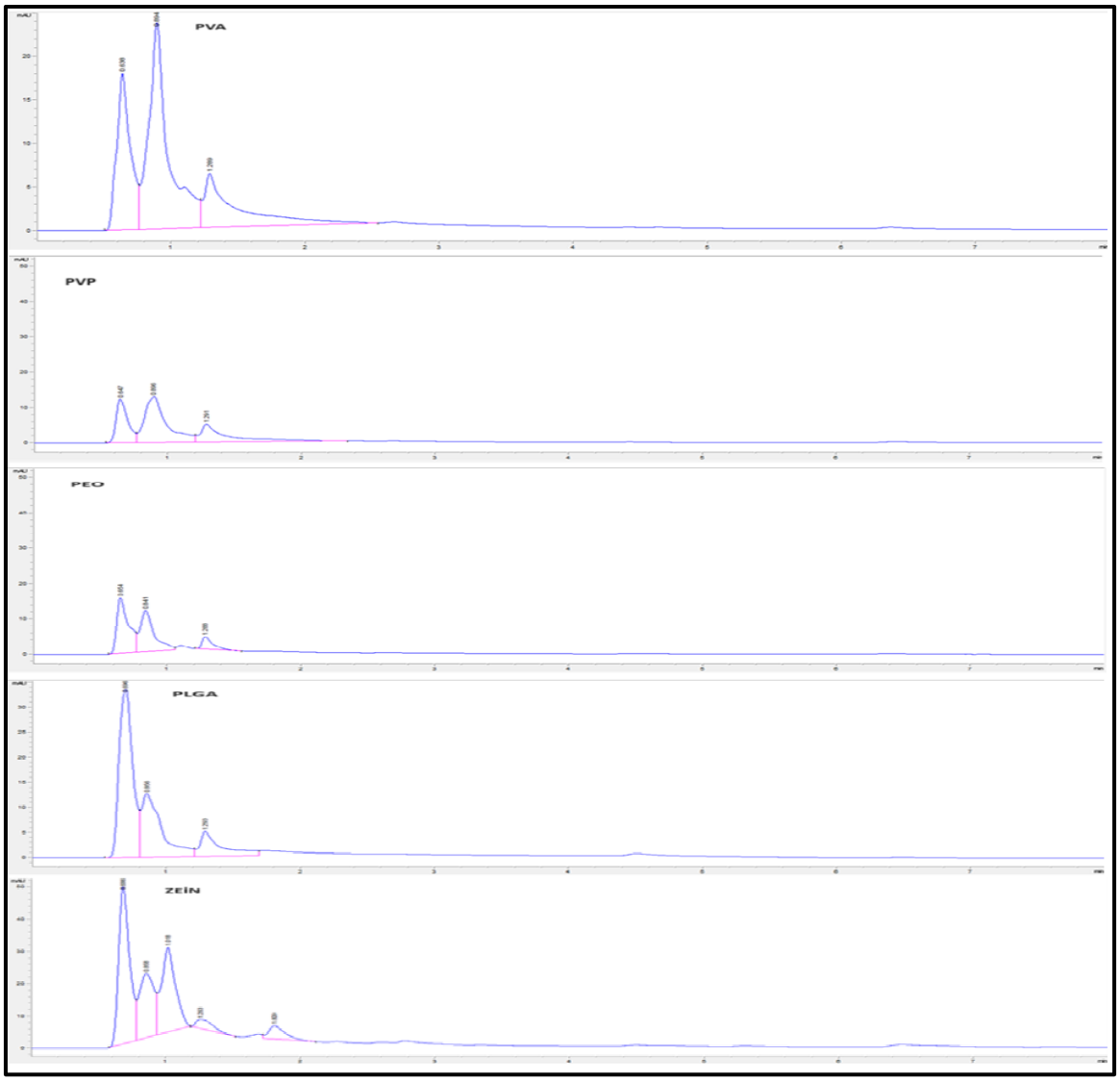
Şekil 4.11. SVS'nın TDF analizi için kullanılan yöntem ile HPLC analizi ile elde edilen pikler



Şekil 4.12. Simüle vajinal sıvı içinde TDF analizi ile elde edilen pik

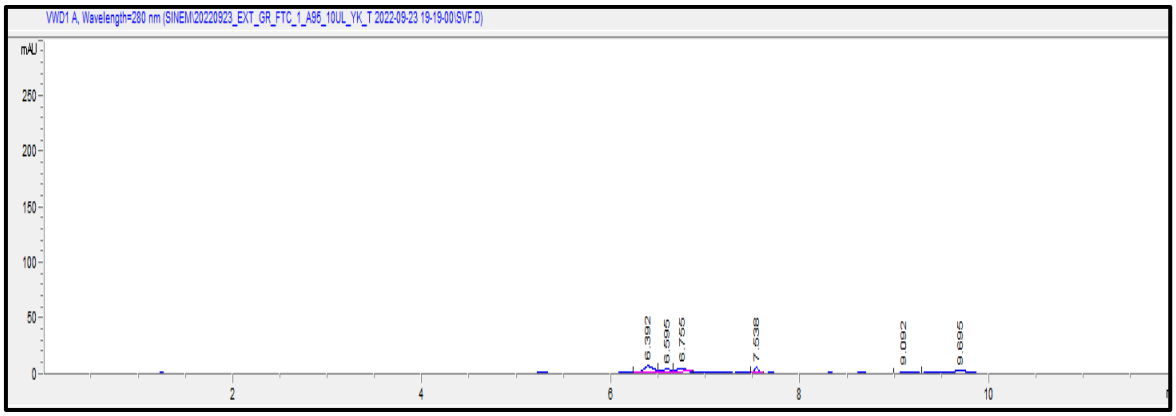


Şekil 4.13. TDF ait yöntemle simüle vajinal sıvı içinde FTC analizi ile elde edilen pik

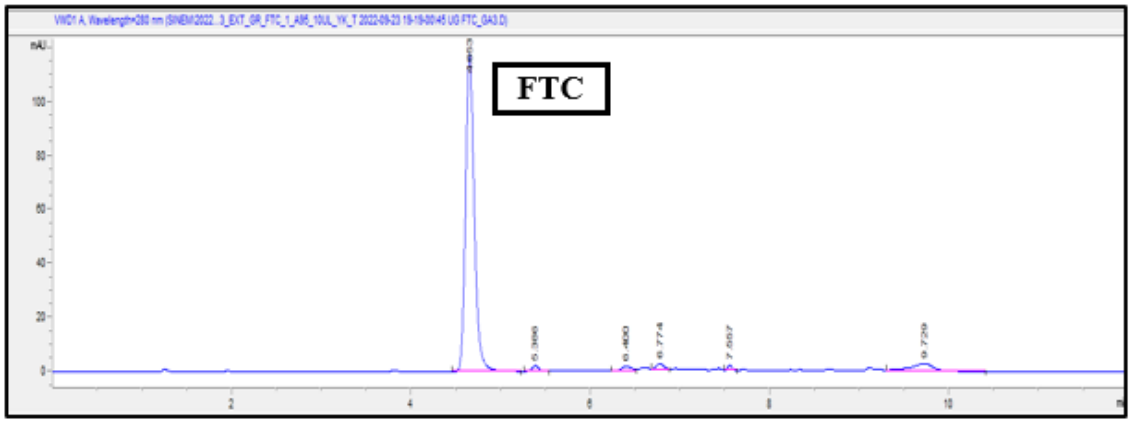


Şekil 4.14. TDF'ye ait yöntem kullanılarak formülasyondaki polimerlerin analizi ile elde edilen pikler

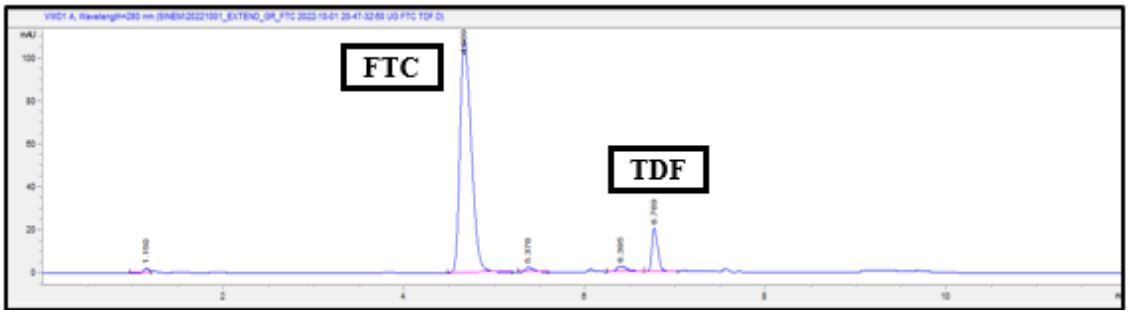
FTC için kullanılacak yöntem ile formülasyonda kullanılan maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir.



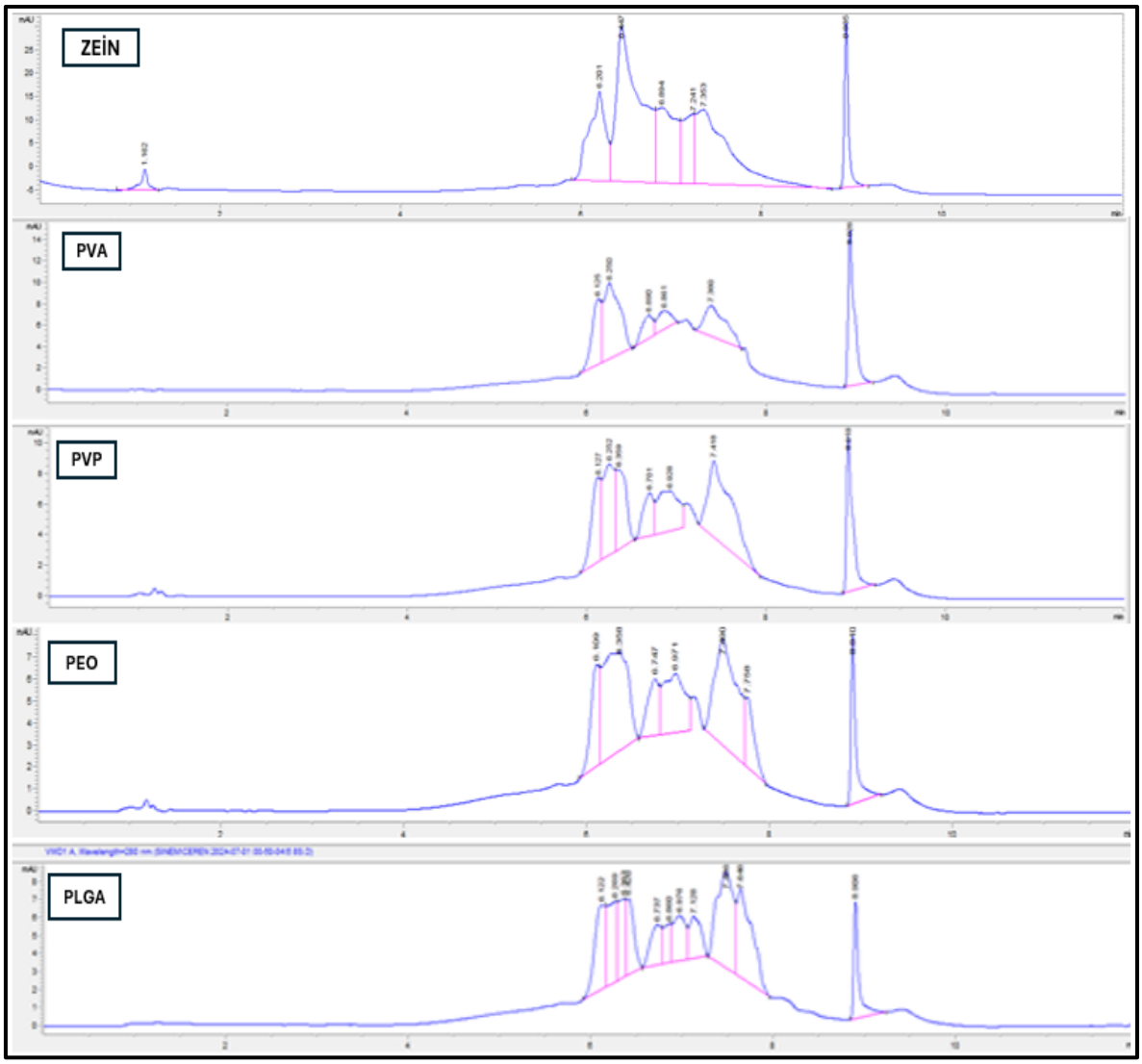
Şekil 4.15. Simüle vajinal sıvının FTC analiz yöntemi ile HPLC analizinde elde edilen pikler



Şekil 4.16. Simüle vajinal sıvı içinde FTC analizi ile elde edilen pik



Şekil 4.17. FTC analizine ait yöntemle simüle vajinal sıvı içinde TDF analizi ile elde edilen pik



Şekil 4.18. FTC'ne ait yöntem kullanılarak formülasyondaki polimerlerin analizi ile elde edilen pikler

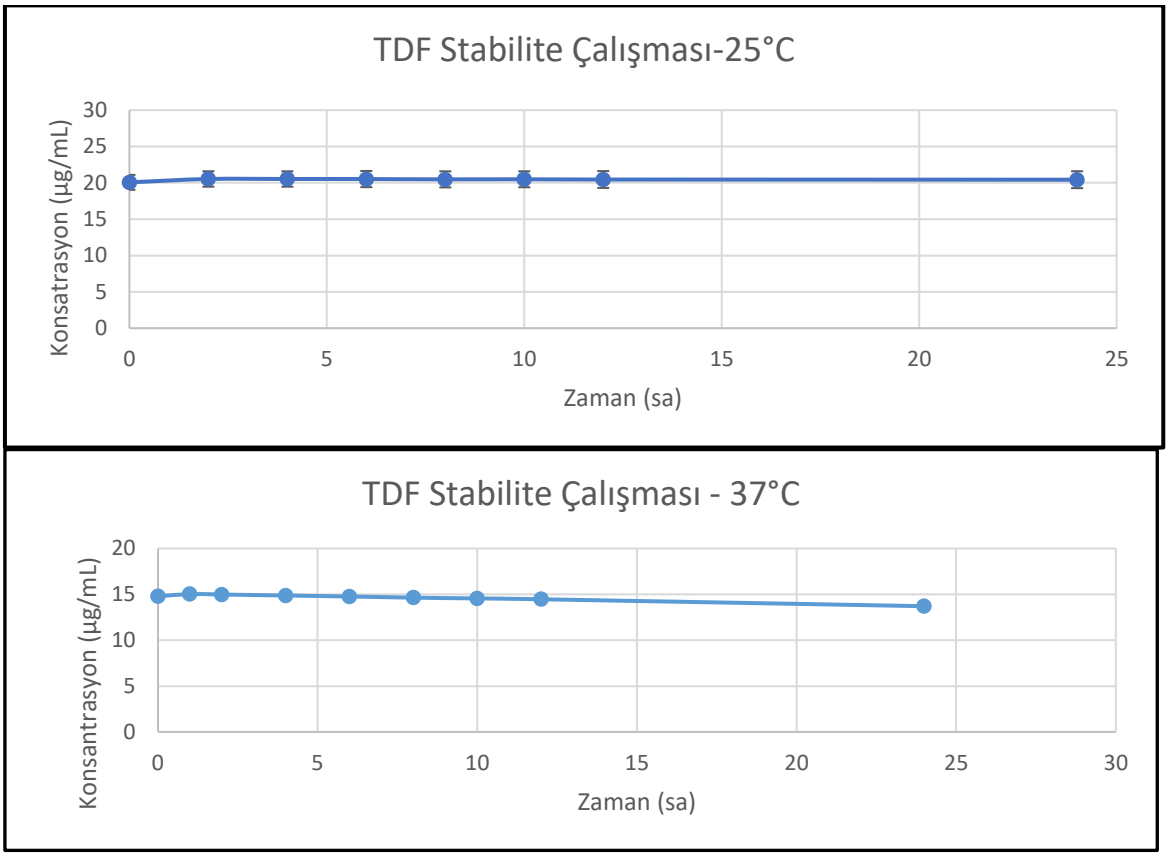
4.2.5. Duyarlılık ve saptama sınırı

Analitik yöntemin duyarlılığı simüle vajinal sıvı içinde TDF için 0,0140 µg/mL, saptama sınırı 0,0425 µg/mL olarak bulunmuştur.

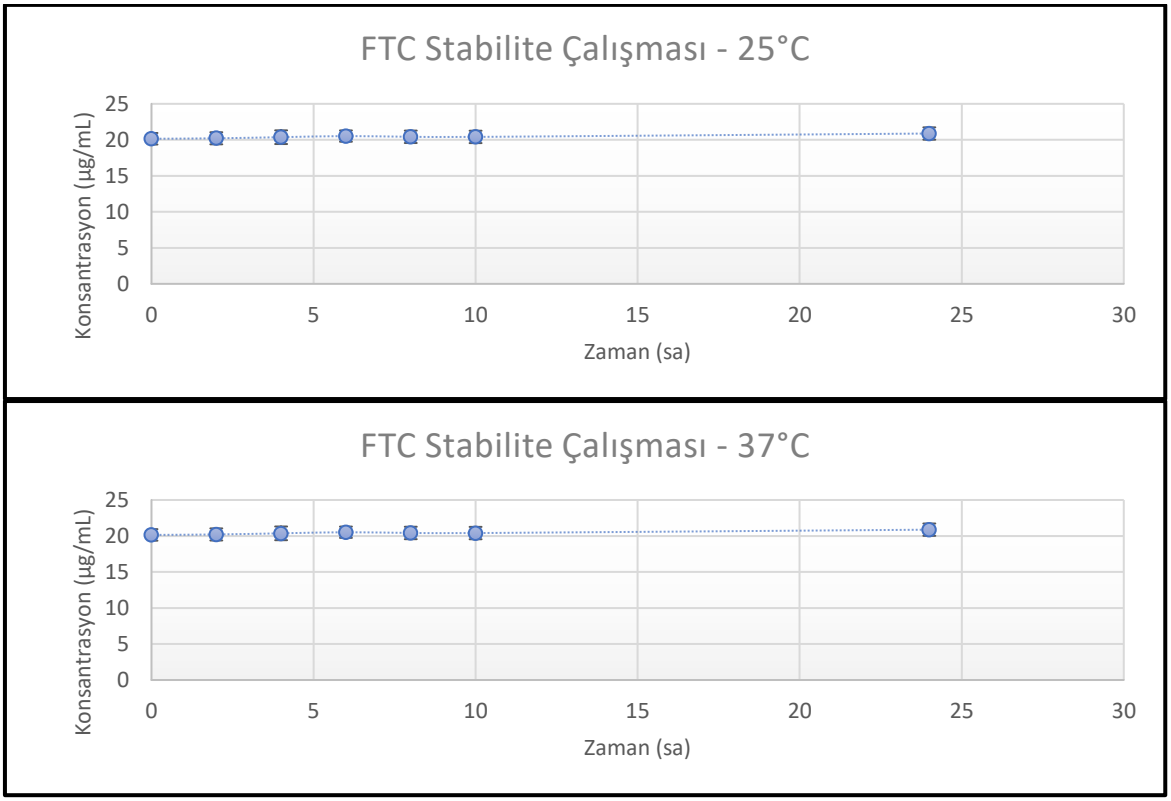
Analitik yöntemin duyarlılığı simüle vajinal sıvı içinde FTC için 0,0259 µg/mL, saptama sınırı 0,0786 µg/mL olarak bulunmuştur.

4.2.6. Stabilite çalışmaları

TDF ve FTC'nin stabilite çalışması 20 µg/mL konsantrasyonda belli aralıklarla örnek alınarak 24 saat 25 °C'de ve 37C'de yapılmıştır (Şekil 4.19-4.20). Çalışma sonucunda maddekonsantrasyonunda belirgin bir değişiklik görülmemiştir.



Şekil 4.19. TDF'nin SVS içindeki kararlılık sonuçları



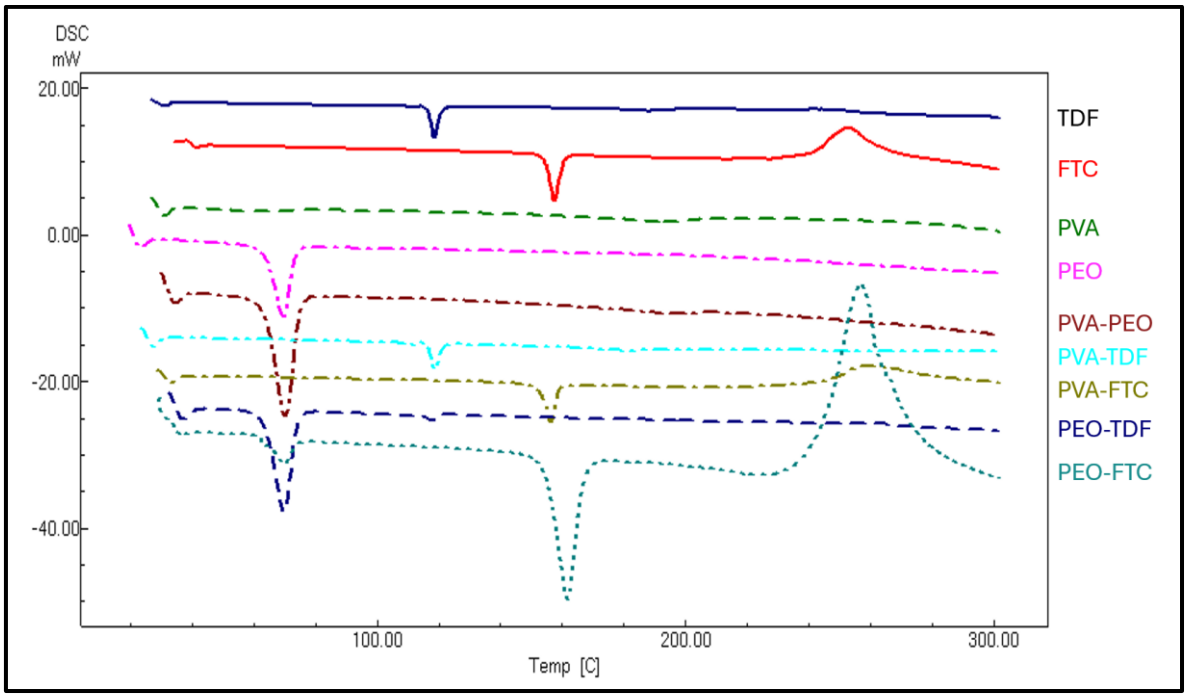
Şekil 4.20. FTC'nin SVS içindeki kararlılık sonuçları

4.3. Etkin Madde ve Polimerlerin Geçimlilik Çalışmaları

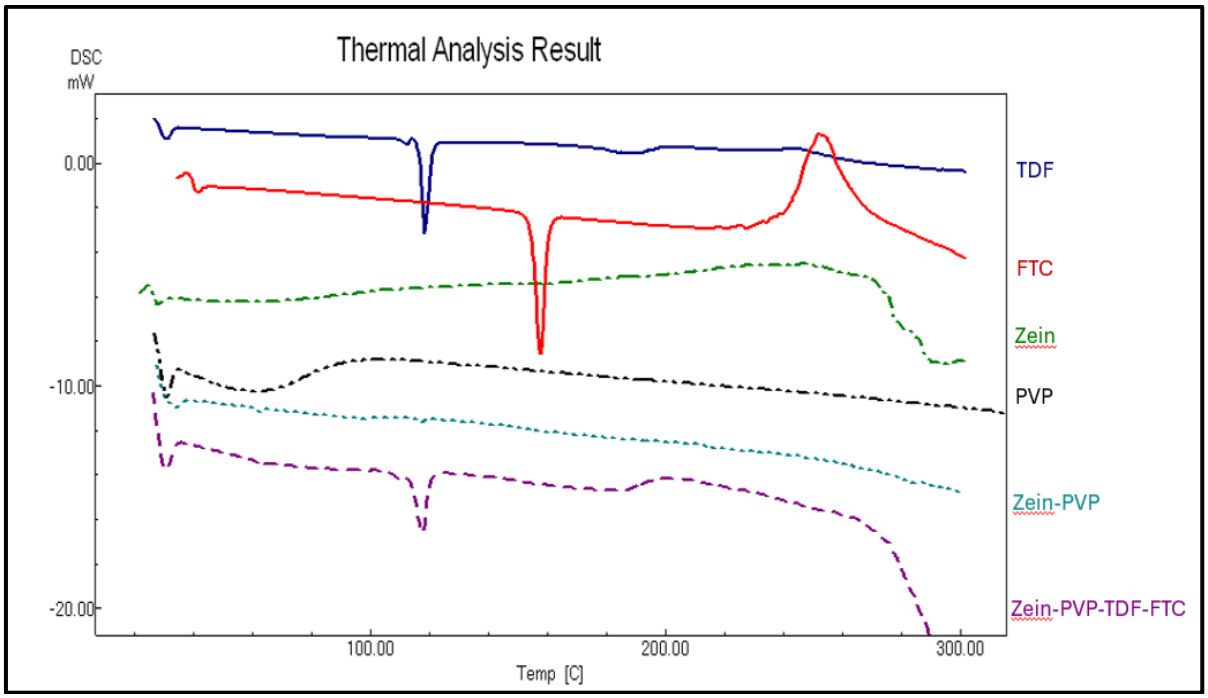
Formülasyon çalışmalarında etkin maddeler ile birlikte kullanılacak olan polimerlerin arasında geçimsizlik olup olmadığı incelenmek için termal ve spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.

4.3.1. DSC analizleri

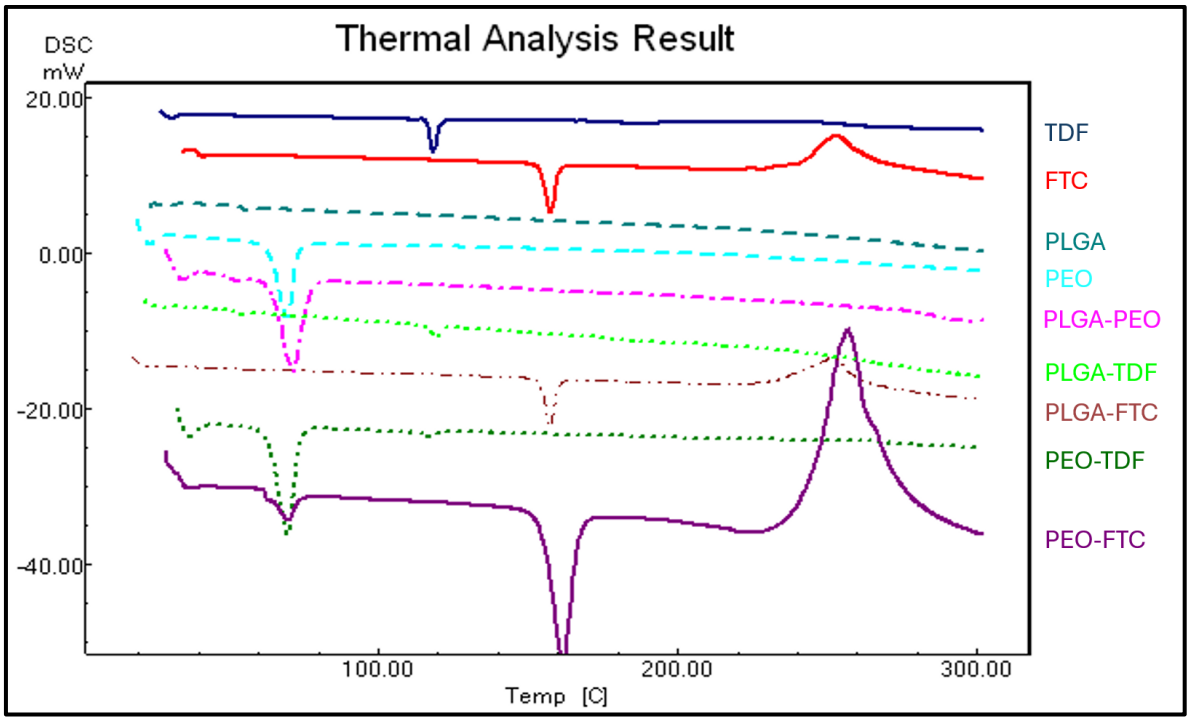
DSC analizleri Bölüm 3.2.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. TDF, FTC ve kullanılan polimerlerin tek tek ve fiziksel karışımları halinde hazırlanmış olan örneklerin termogramları Şekil 4.21 – 4.24 arasında verilmiştir.



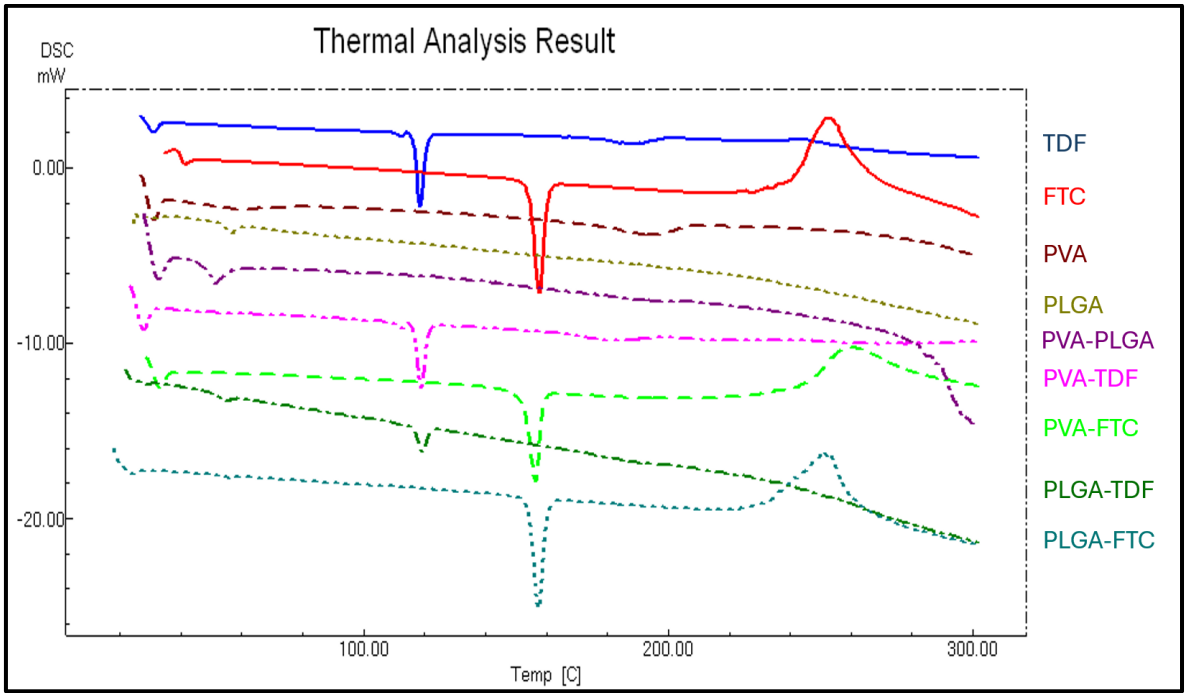
Şekil 4.21. TDF, FTC, PVA, PEO, PVA-PEO, PVA-TDF-FTC ve PEO-TDF-FTC tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı



Şekil 4.22. TDF, FTC, Zein, PVP, Zein-PVP ve Zein-PVP-TDF-FTC'nin tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı



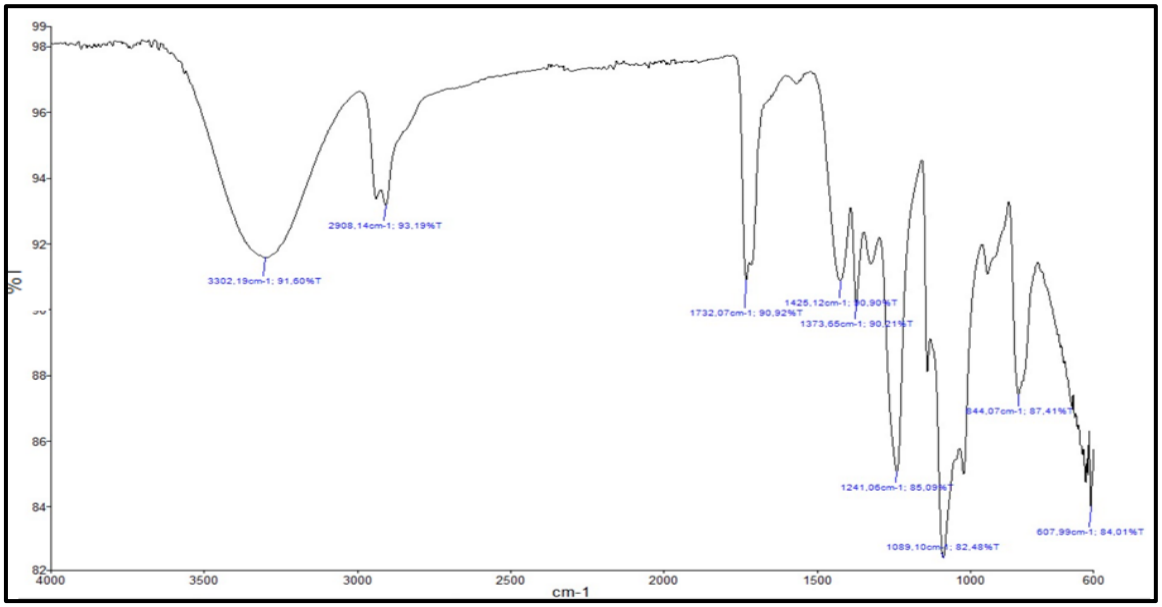
Şekil 4.23. TDF, FTC, PLGA, PEO, PLGA-PEO, PLGA-TDF-FTC ve PEO-TDF-FTC tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı



Şekil 4.24. TDF, FTC, PLGA, PVA, PLGA-PVA, PLGA-TDF-FTC ve PVA-TDF-FTC'nin tekli ve 1:1 oranında fiziksel karışımlarının DSC termogramı

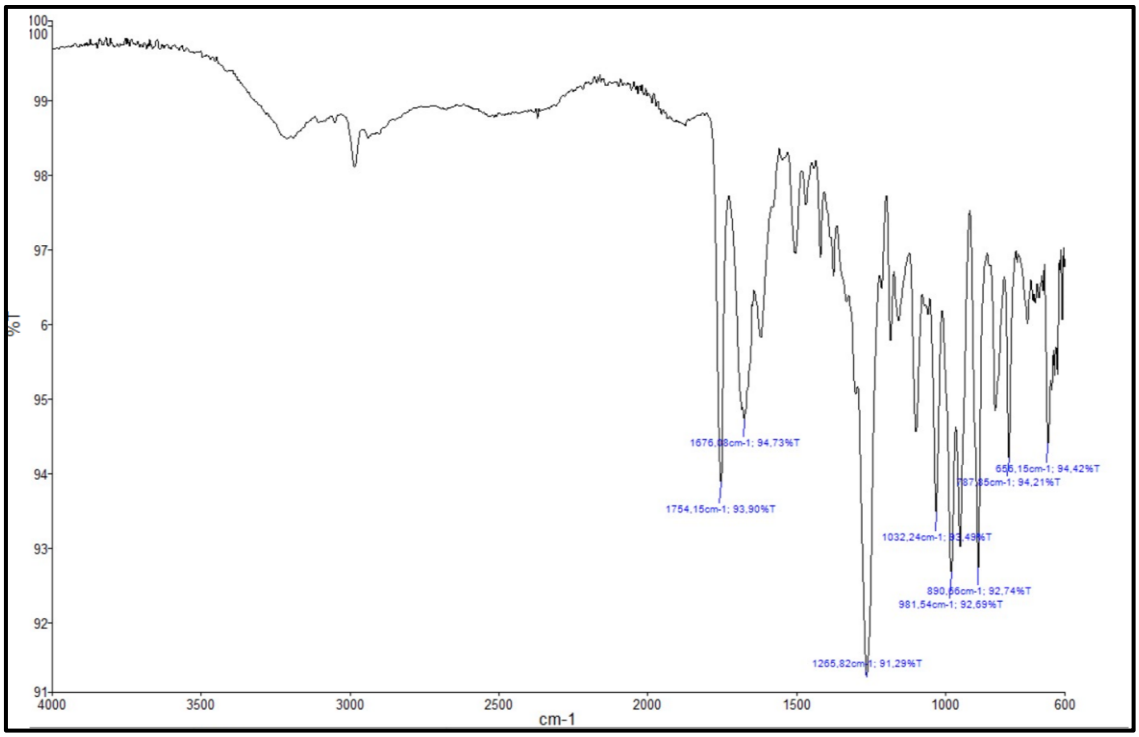
4.3.2. FTIR analizleri

FT-IR analizi Bölüm 3.4.2'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Şekil 4.25- ile Şekil 4.33 arasında FTIR spektrumları yer almaktadır.



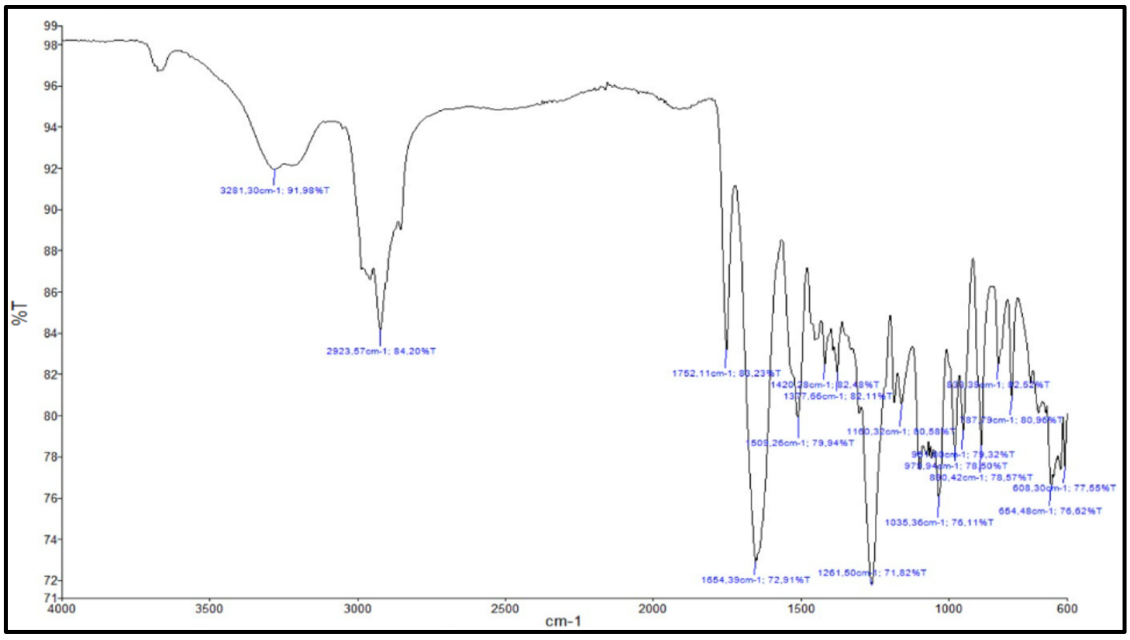
Şekil 4.25. PVA'nın FT-IR spektrumu

PVA için karakteristik titreşim pikleri Şekil 4.25'te gözlenmiştir.PVA için karakteristik tepe noktaları; 3302 cm^{-1} (O-H gerilmesi), 2908 cm^{-1} (Alkil gruplarının C-H), 1732 cm^{-1} (C=O bandı), 1425 cm^{-1} (CH_2 bükülmesi), 1373 cm^{-1} (C-H deformasyonunu), 1241 cm^{-1} (C—O'nun omuz gerilmesi), 1089 cm^{-1} (C-O'nun gerilmesi ve OH'nin bükülmesi) ve 844 cm^{-1} (C—C germe bantları) olarak spektrumda gözlenmiştir.



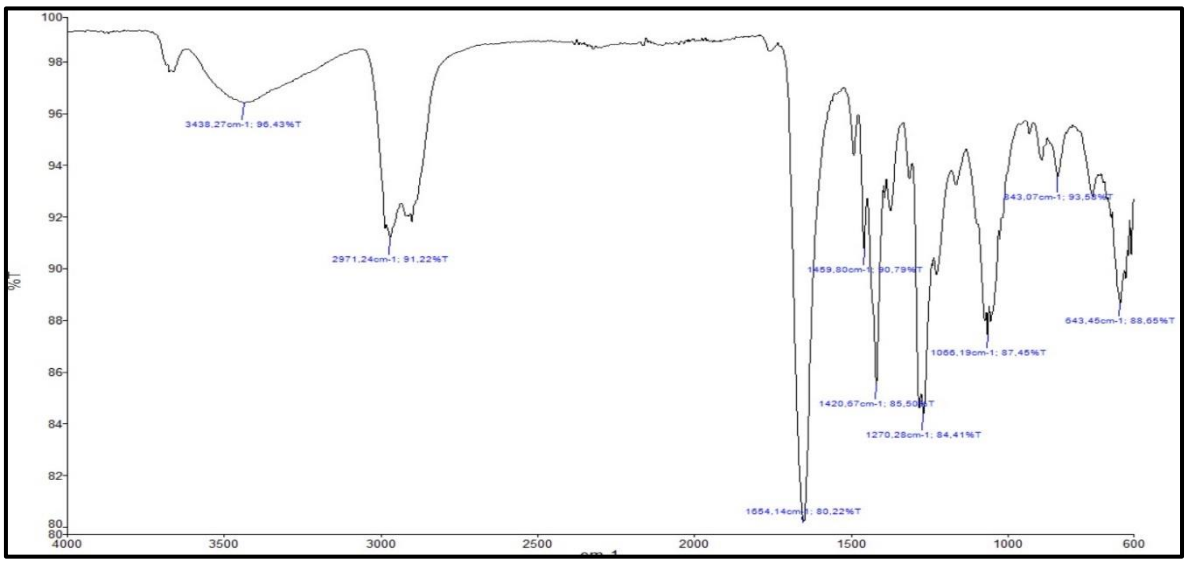
Şekil 4.26. PLGA'nın FT-IR spektrumu

PLGA için karakteristik titreşim pikleri Şekil 4.26'da verilmiştir. PLGA spektrumunda; 3500 cm^{-1} ve 3450 cm^{-1} (OH grubunun esneme titreşimi), 1754 cm^{-1} (CO esterin, Karbonil grubu), 1265 cm^{-1} (asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilmesi), 1032 cm^{-1} (C–O eter grubu) ve 890 cm^{-1} (karbonil CO gerilmesi) karakteristik bantları gözlenmiştir.



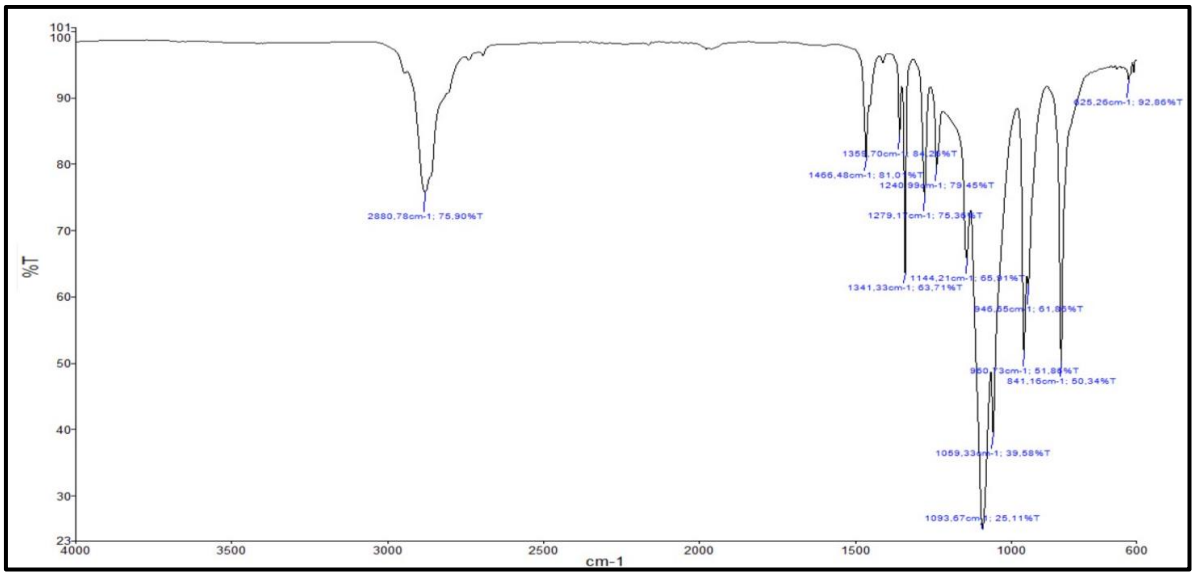
Şekil 4.27. Zeinin FT-IR spektrumu

Zein için karakteristik titreşim pikleri Şekil 4.27'de gözlenmiştir. Zein spektrumunda; 3281 cm^{-1} (N-H gerilme titreşimi), 2923 cm^{-1} (C-H esneme titreşimi), 1654 cm^{-1} (C=O gerilme titreşimi-Amid I) ve 1509 cm^{-1} (C-N gerilme titreşimi-Amid II) bantları gözlenmiştir. Ayrıca spektrumda, çeşitli peptid konformasyonlarıyla ilişkili önemli bantlar da 1400 cm^{-1}'in altında bulunmuştur. Bu bantlar spektrumda 420 cm^{-1}, 1377 cm^{-1}, 1160 cm^{-1}, 1261 cm^{-1}, 979 cm^{-1}, 961 cm^{-1}, 1035 cm^{-1}, 880 cm^{-1}, 838 cm^{-1}, 787 cm^{-1}, 654 cm^{-1} ve 608 cm^{-1} noktalarında gözlenmiştir.



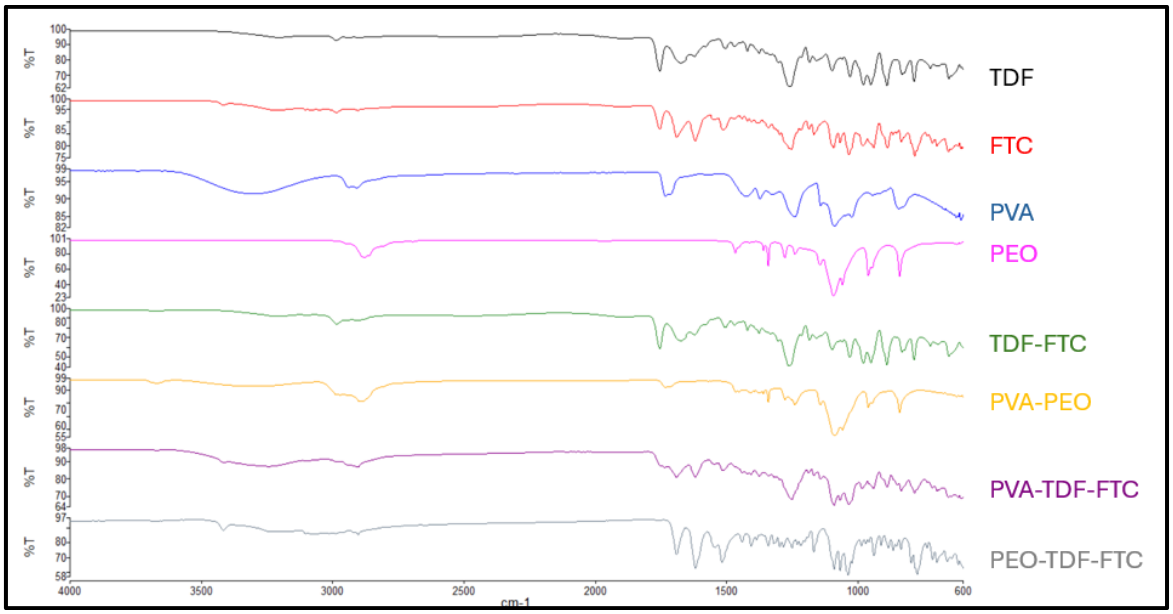
Şekil 4.28. PVP'nin FT-IR spektrumu

PVP için karakteristik titreşim pikleri Şekil 4.28'de gözlenmiştir. PVP karakteristik bantları; 3438 cm^{-1} (O-H gerilmesi), 2971 cm^{-1} (CH_2 asimetrik gerilmesi), 1654 cm^{-1} (C=O gerilme bandı), 1459 cm^{-1} (CH_2'nin CH bükülmesi ve/veya OH bükülmesi), 1420 cm^{-1} (CH_2 titreşimleri), 1270 cm^{-1} (CH_2 titreşimi), 1066 cm^{-1} (C-N gerilmesi) ve 843 cm^{-1} (CH_2 bükülmesi) olarak gözlenmiştir.

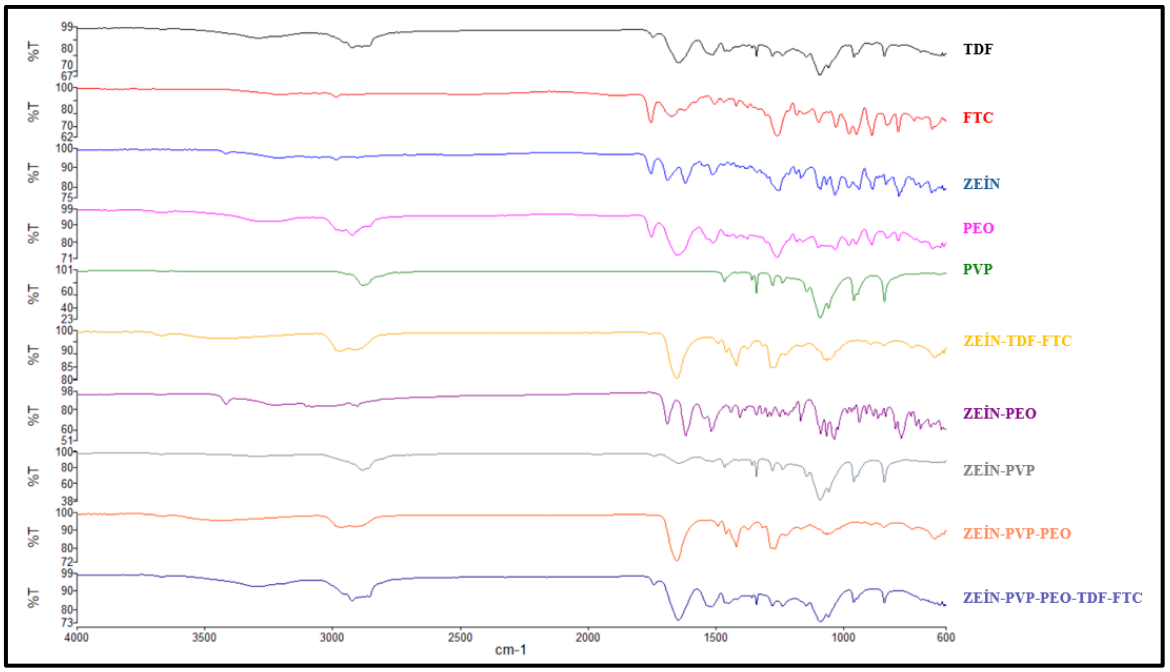


Şekil 4.29. PEO'nin FT-IR spektrumu

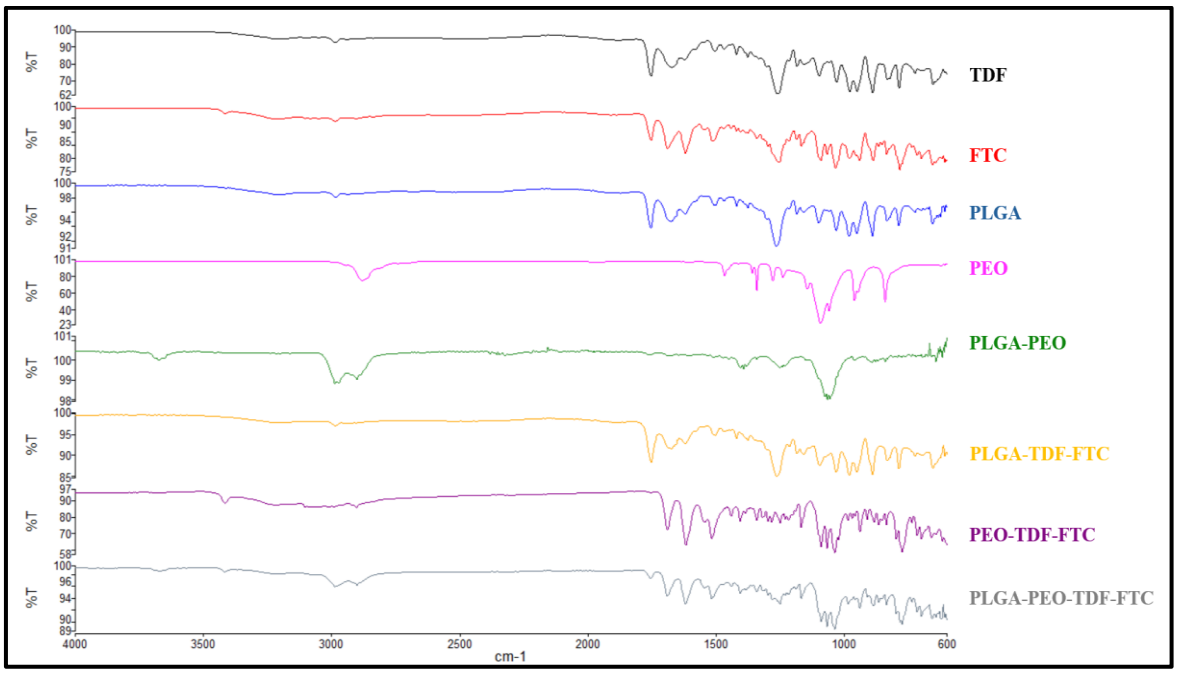
PEO için karakteristik titreşim pikleri Şekil 4.29'da gözlenmiştir. Karakteristik bantlar; 2880 cm^{-1} (C-H asimetrik gerilmesi), 1466 cm^{-1} (CH_2 titreşimi), 1341 cm^{-1} (CH_2 asimetrik bükülmesi), 1240 cm^{-1} (CH_2 simetrik bükülmesi), 1144 cm^{-1} (C-O-C esneme modu), 960 cm^{-1} ve 841 cm^{-1} (C–O gerilmesinin etkisiyle CH_2 asimetrik sallanması) olarak gözlenmiştir.



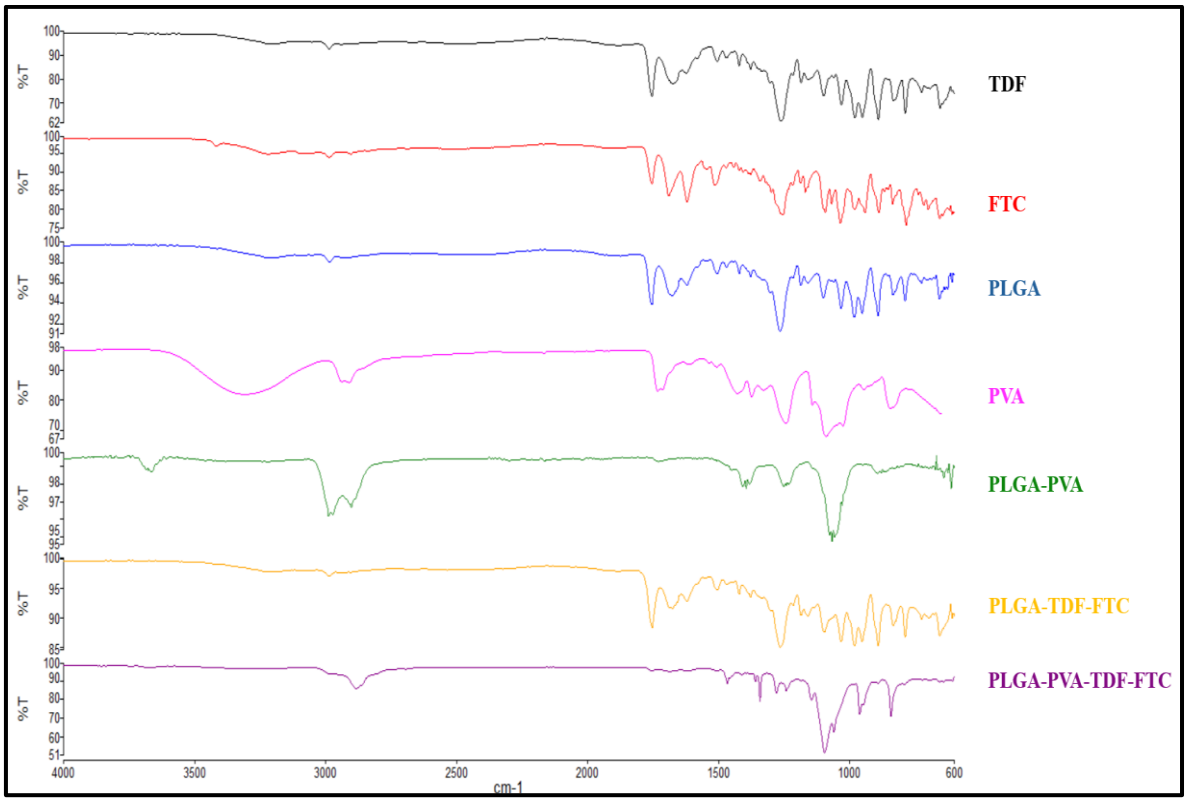
Şekil 4.30. TDF, FTC, PVA, PEO ve PVA'nın tekli ve 1:1 oranında karışımlarının FTIR spektrumu



Şekil 4.31. TDF, FTC, Zein, PVP ve PEO'nun tekli ve 1:1 oranında karışımlarının IR spektrumu



Şekil 4.32. TDF, FTC, PLGA ve PEO'nun tekli ve 1:1 oranında karışımlarının IR spektrumu



Şekil 4.33. TDF, FTC, PVA ve PLGA'nın tekli ve 1:1 oranında karışımlarının IR spektrumu

4.4. Elektroçekim İşleminde Kullanılacak Polimer Karışımlarının Çözelti Karakterizasyonu

Kullanılan polimer çözeltilerinin elektroçekim yöntemi için özelliklerinin uygunluğunu değerlendirmek için karakterizasyonu çalışmaları Bölüm 3.6.'da belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir.

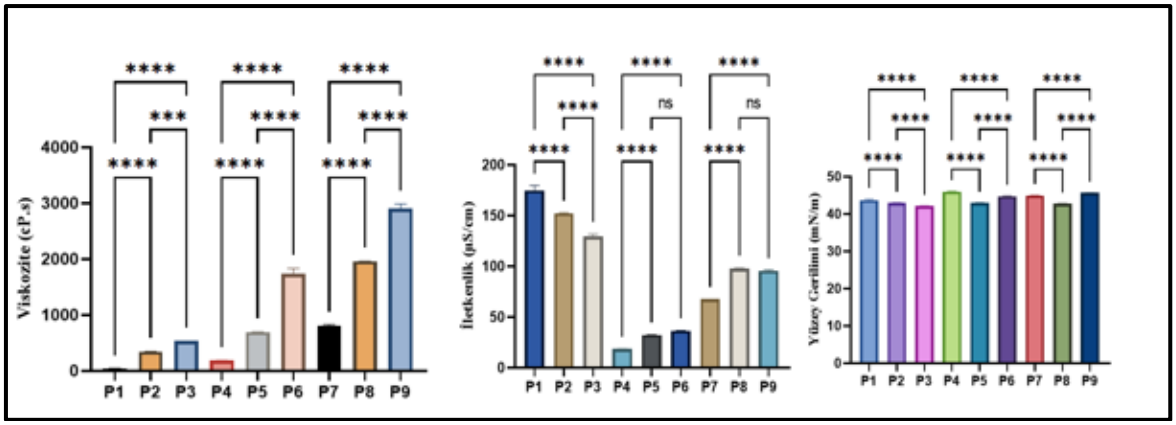
4.4.1. PVA önformülasyon çalışmalarında çözelti özellikleri

Önformülasyon çalışmaları için farklı tip PVA ile gerçekleştirilen nanolif formülasyonlarının sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. PVA önformülasyon çalışmaları ile geliştirilen polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları

Formülasyon Kodu	Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi ($mN.m^{-1}$)
P1	41,42±2,87	174,73±4,97	43,74±0,20
P2	349,67±2,89	152,27±0,51	43,00±0,03
P3	542±0	129,47±2,26	42,11±0,08
P4	183,89±4,97	18,46±0,11	46,01±0,10
P5	699,11±2,87	32,31±0,30	43,01±0,02
P6	1740,16±93,91	36,49±0,23	44,78±0,07
P7	805,14±24,85	67,51±0,14	44,92±0,04
P8	1960±5,739	97,82±0,35	42,72±0,13
P9	2909±80,29	95,61±0,74	45,67±0,03

Hazırlanan formülasyonlarda elde sonuçların polimer konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.34 arasında verilmiştir.



Şekil 4.34. PVA önformülasyon çalışmaları için geliştirilen polimer çözeltilerinin çözelti karakterizasyon sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi (*:p<0,05; *:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001; ns:p>0,05).

4.4.2. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri

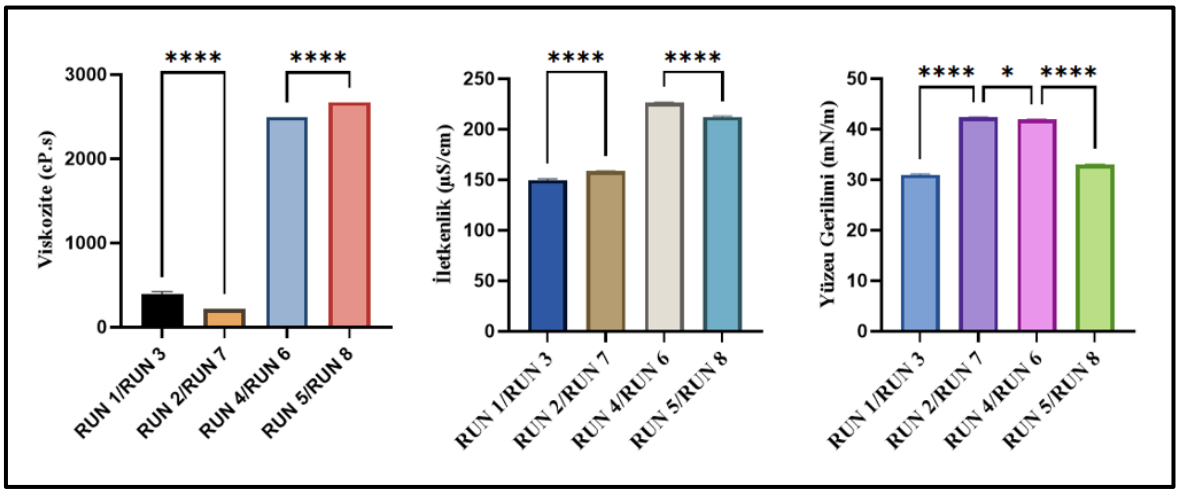
PVA ile geliştirilen Çizelge 4.10'da yan yana belirtilen formülasyonlar aynı çözelti olup tasarım ile üretimde işlem parametreleri değişmektedir.

Çizelge 4.10. PVA ile yapılan tasarım formülasyonlara yönelik geliştirilen polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları

Formulasyon Kodları		Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi ($mN.m^{-1}$)
RUN 1	RUN 3	395±26	149,8±1,2	30,98±0,15
RUN 2	RUN 7	219±0	158,4±0,4	42,34±0,10
RUN 4	RUN 6	2497±0	226,2±0,7	41,97±0,07
RUN 5	RUN 8	2672±0	212,2±0,8	32,97±0,15

Aynı oranda hazırlanan polimer çözeltileri ve solvan sistemindeki değişilikler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.35'te verilmiştir.

Deneysel tasarımla geliştirilen formülasyonların DoE ile analizi için öncelikle elektroçekim yöntemi ile üretilerek mekanik, morfolojik ve mukoadezif özelliklerinin kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla formülasyonlar üreilmeden önce sadece çözelti karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.35. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolifleri için geliştirilen polimer özeltilerinin karakterizasyon çalışmalarının istatistiksel değerlendirilmesi (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001; ns:p>0,05).

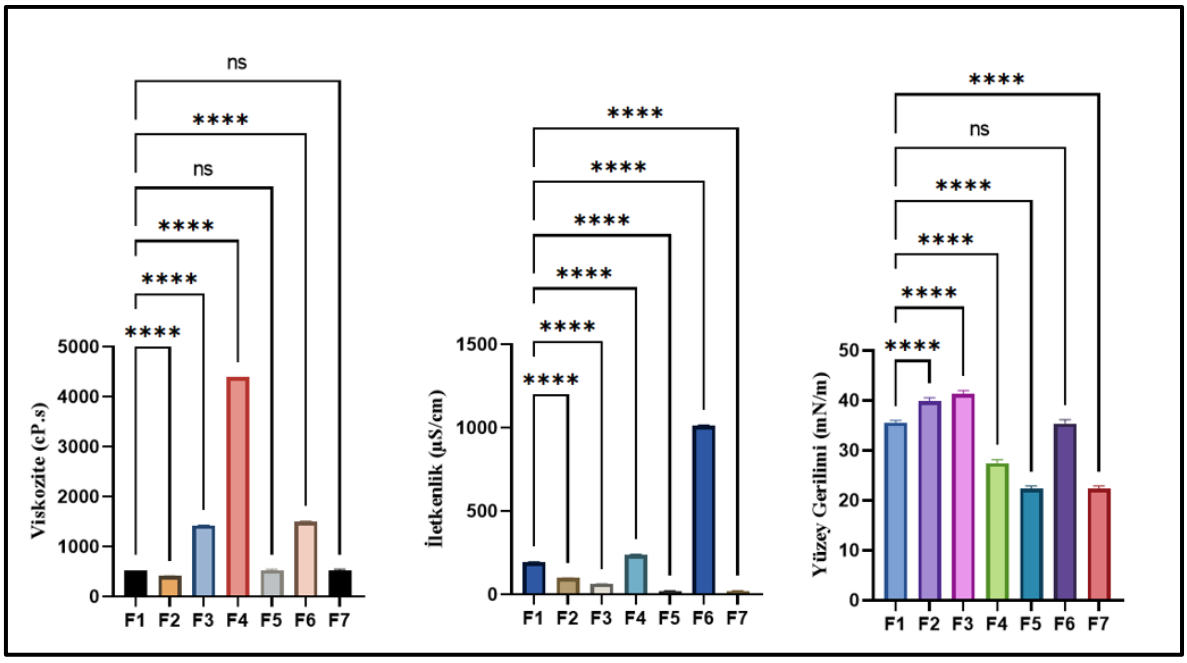
4.4.3. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri

Mukoadezif nanolif formülasyonları geliştirmek için PVA ile farklı polimerler kombine kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonların çözelti karakterizasyonu Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonların polimer çözeltilerinin karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi ($mN.m^{-1}$)
F1	531±0	194,5±2,456	5,61±0,380
F2	511,33±2,89	99,26±1,02	39,89±0,65
F3	1427,67±2,89	63,82±0,615	41,36±0,63
F4	4388,67±4,51	238,07±3,35	27,47±0,69
F5	530,13±17,45	22,38±0,46	22,38±0,46
F6	1497,67±12,58	1013,0±4,58	35,4±0,80
F7	530,13±17,45	22,38±0,46	22,38±0,46

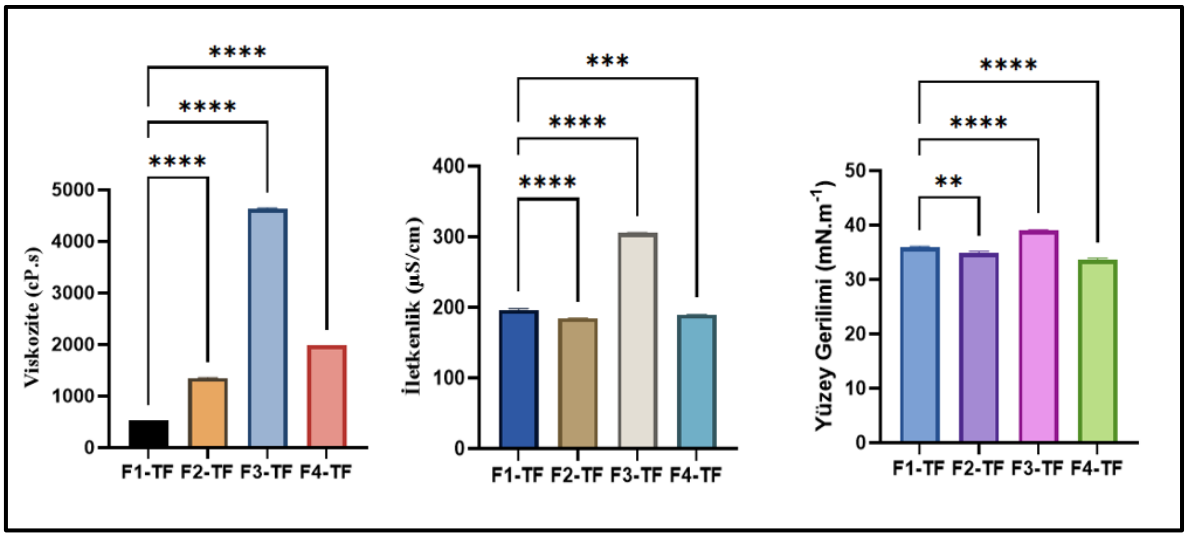
Uygun bulunan çözeltilere etkin maddeler eklenmiş ve formülasyon kodlarına 'TF' ilave edilerek her iki maddeyi taşıyan formülasyonlar olarak belirtilmiştir (Çizelge 4.12).



Şekil 4.36. Mukoadezif PVA-bazlı nanolifler için geliştirilen polimer çözeltilerinin ölçüm sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001; ns:p>0,05).

Çizelge 4.12. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarından seçilen optimum formülasyonlarla üretilen TDF ve FTC yüklü polimer çözeltilerinin karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi ($mN.m^{-1}$)
F1-TF	536,33±1,1547	196,5±1,789	35,91±0,18
F2-TF	1347,67±11,02	184,43±0,21	34,86±0,27
F3-TF	4631±19,5	305±1	39±0,15
F4-TF	1989±0	189,43±0,50	33,66±0,24



Şekil 4.37. TDF ve FTC yüklü mukoadezif PVA-bazlı nanolifler için geliştirilen polimer çözeltilerinin ölçüm sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001; ns:p>0,05).

4.4.4. Zein içeren nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri

Zein bazlı formülasyonların çözelti karakterizasyon sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. Zein ile hazırlanan polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları

Formülasyon Kodu	Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi ($mN.m^{-1}$)
Zein içeren formülasyonlar			
Z1	44±0	1238,33±1,52	22,66±0,05
Z2	309,33±1,15	1312,33±1,52	22,13±0,32
Zein-PEO WSR205 içeren formülasyonlar			
ZW0	237±5	46,64±0,50	45,20±0,72
ZW1	320,33±11,15	318,77±4,90	47,48±0,90
ZW2	56,66±1,15	638,50±0,45	23,80±0,03
ZW3	95±0	887,10±2,28	23,70±0,10
ZW4	175,66±1,15	1208±2	23,02±0,06
Zein-PEO N80 içeren formülasyonlar			
ZN0	326,3±14,5	23,99±0,29	31,30±0,24
ZN1	354,33±16,65	146,6±6,36	29,63±0,15
ZN2	329±0	501,83±1,15	23,68±0,04
ZN3	384,33±1,15	866,70±1,35	23,98±0,03
ZN4	431,33±1,15	1208,33±0,57	23,47±0,02
ZN5	572,33±1,15	1315,66±2,08	23,23±0,04
Zein-PVP içeren formülasyonlar			
ZK0	338,67±28,91	42,76±2,96	29,25±0,11
ZK1	247±41	269,2±11,8	28,79±0,16
ZK2	485,66±1,15	609,77±0,57	27,23±5,93
ZK3	536,33±4,16	815,93±3,05	23,42±0,09
ZK4	952,66±3,05	1026,66±1,52	23,23±0,10
ZK5	953,33±6,42	1164±4	23,6±0,62
ZK6	402,33±35,23	23,88±1,33	27,14±0,67
ZK7	423±24	99,73±2,29	29,72±0,22
ZK8	470±0	465,10±4,11	23,05±0,18
ZK9	525,67±1,15	751,73±10,96	22,99±0,47

Uygun bulunan çözeltilere etkin maddeler eklenmiş ve formülasyon kodlarına ‘TF’ ilave edilerek her iki maddeyi taşıyan formülasyonlar olarak belirtilmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları

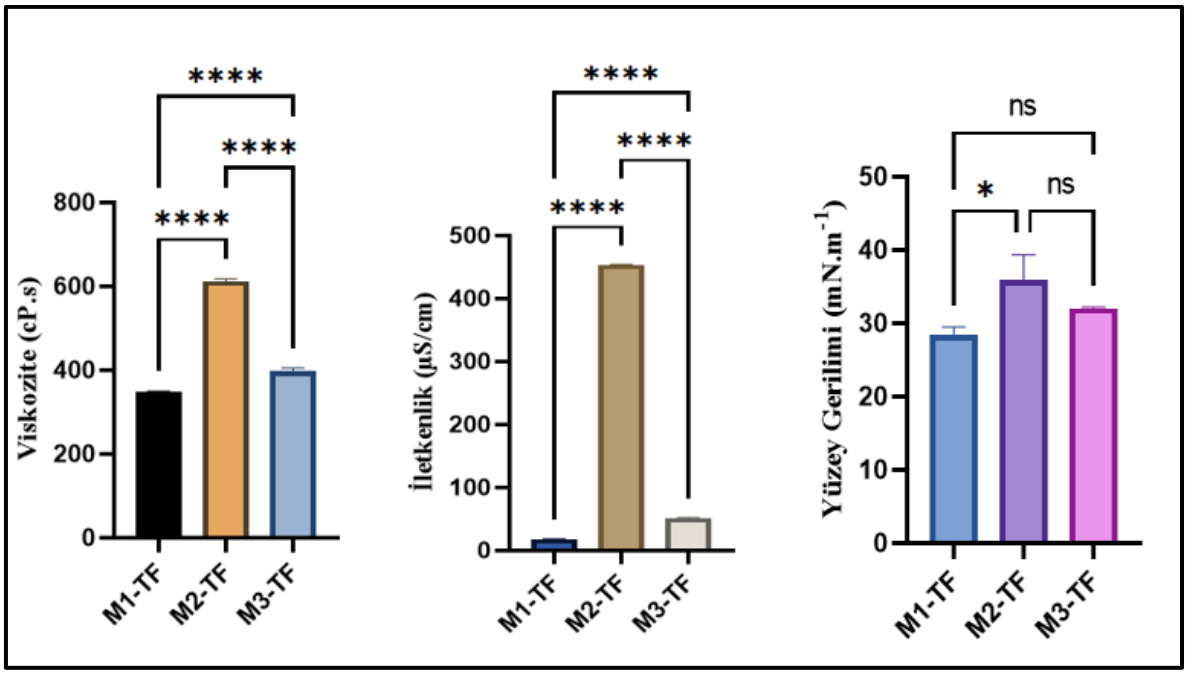
Formülasyon Kodu	Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi ($mN.m^{-1}$)
Z2-TF	362±10	1199±4	27,35±0,07
ZN3-TF	366±11	741,33±2,27	27,57±0,29
ZK3-TF	546±2	766,47±2,55	28,80±0,11
ZK8-TF	442±17	616±8	28,18±0,11
ZK9-TF	543±19	887,37±11,50	28,73±0,06

4.4.5. PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri

Uygun bulunan çözeltilere etkin maddeler eklenmiş ve formülasyon kodlarına 'TF' ilave edilerek her iki maddeyi taşıyan formülasyonlar olarak belirtilmiştir (Çizelge 4.15). Polimer miktarı sınırlı olmasından dolayı sadece etkin maddeli formülasyonlar üzerinde çalışılmıştır.

Çizelge 4.15. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı karışım formülasyonların polimer çözeltilerinin karakterizasyon sonuçları

Kod	Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi ($mN.m^{-1}$)
M1-TF	346,67±3,06	18,31±0,12	28,39±1,10
M2-TF	612,97±4,59	453,76±0,77	35,89±3,48
M3-TF	397,67±7,57	51,92±0,78	32,04±0,14



Şekil 4.38. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı karışım formülasyonların çözelti karakterizasyon sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001; ****:p<0,0001; ns:p>0,05).

4.4.6. Tabakalı nanolif formülasyonlarının çözelti özellikleri

Bölüm 3.5.6'da formülasyon içerikleri verilen tabakalı formülasyonların hepsinde aynı çözeltiler verilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin özellikleri Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.16. TDF ve FTC yüklü PLGA ile üretilen katlı lif formülasyonların çözelti karakterizasyonu

Katlı Formülasyon İçeriği		Viskozite (cP.s)	İletkenlik (µS/cm)	Yüzey Gerilimi (mN/m)
Orta Tabaka	TDF ve FTC içeren PLGA (%10)	927,667±30,005	35,238±0,342	35,717±0,811
İç-Dış Tabaka	PVA (%10)	531±0	194,5±2,456	35,61±0,380

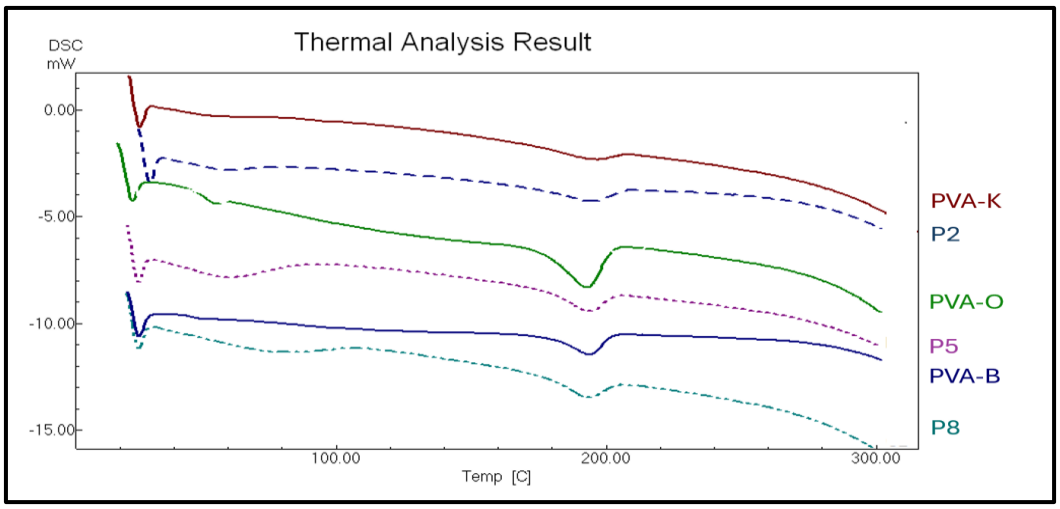
4.5. Nanolif Formülasyonlarının Üretimi

Nanolif formülasyonları; polimer tipi, polimer konsantrasyonu ve kullanılan solvan sistemine göre farklı parametreler kullanılarak üretilmiştir. Lif üretimi tekli nozul kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Liflerin üretiminde toplayıcıdan kolay bir şekilde alınmasını sağlamak için pamuklu bez üzerine toplanmıştır. Geliştirilen nanolif formülasyonlarına ait üretim parametreleri Bölüm 3.7'de verilmiştir.

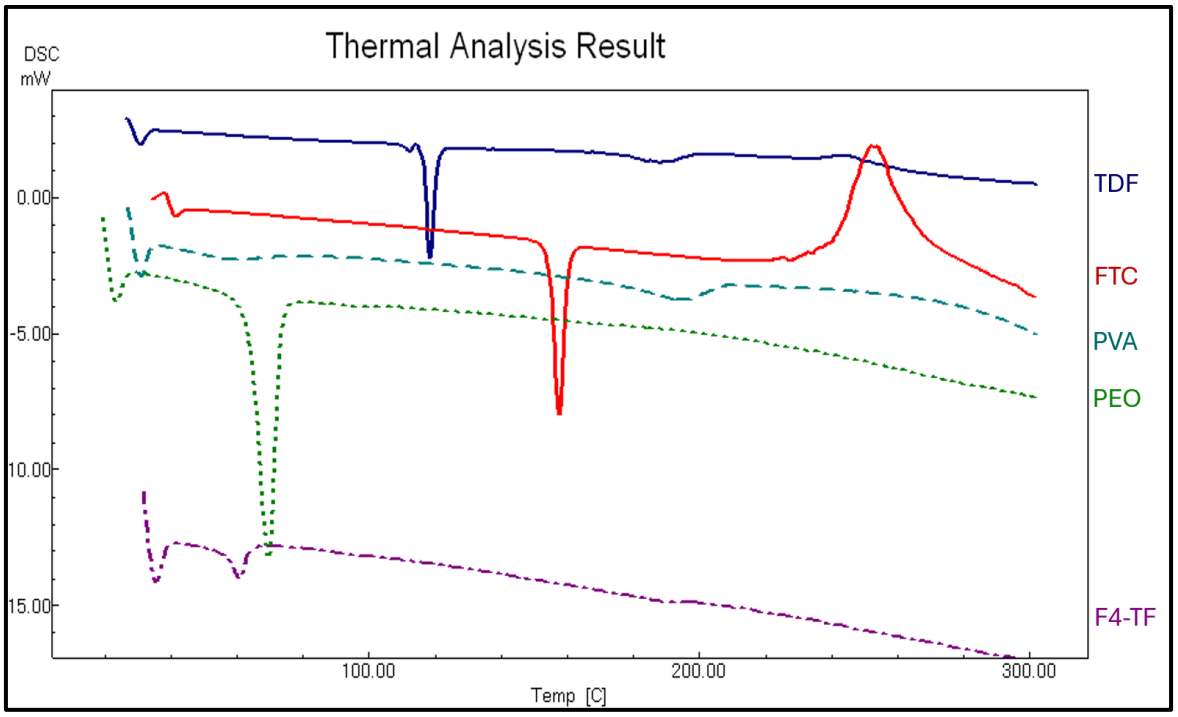
4.6. Nanolif Formülasyonlarının Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları

4.6.1. Nanolif formülasyonlarının DSC ile karakterizasyonu

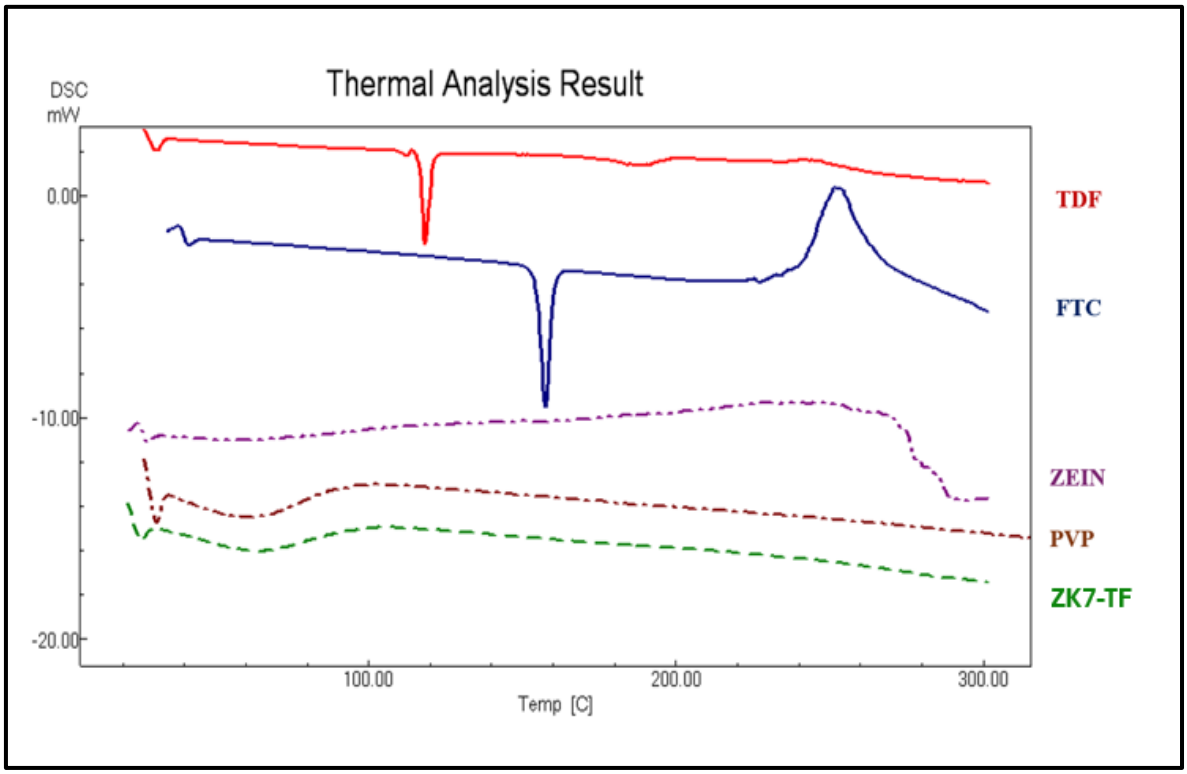
Geliştirilen nanolif formülasyonlarının DSC ile yapılan yapısal karakterizasyon sonuçları Şekil 4.39-4.43 arasında verilmiştir.



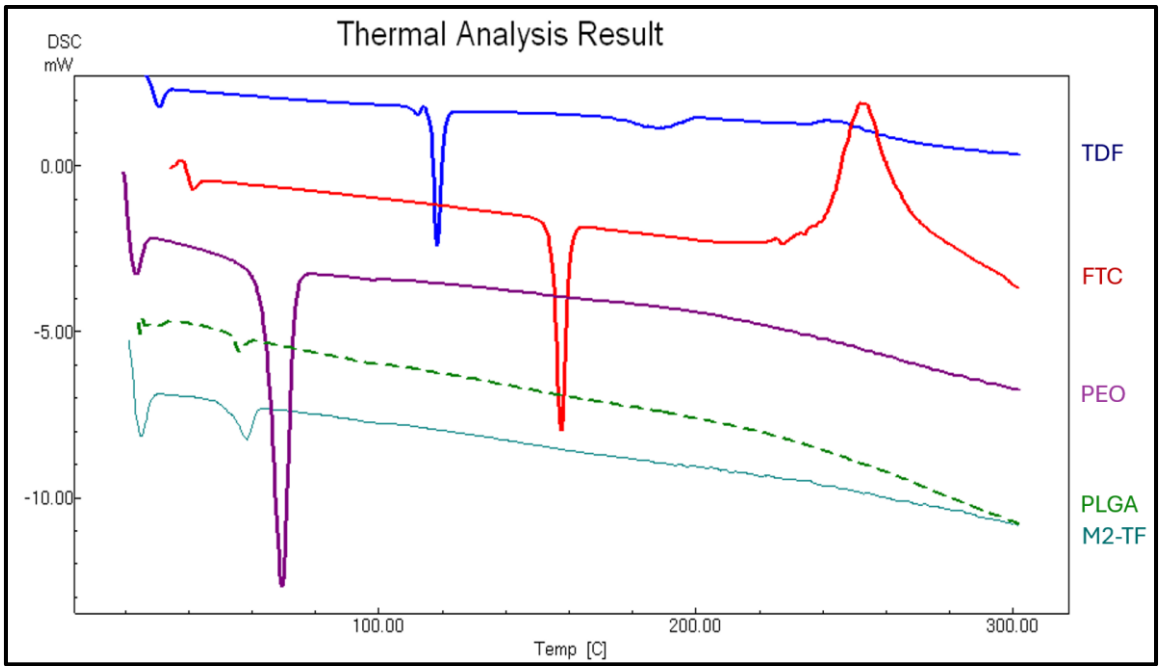
Şekil 4.39. PVA polimerleri (Polyviol 13/140 (PVA-K), Polyviol 26/140 (PVA-O) ve Polyviol 40/140 (PVA-B)), and PVA nanolif formülasyonlarının (P2-P5-P8) DSC termogramı



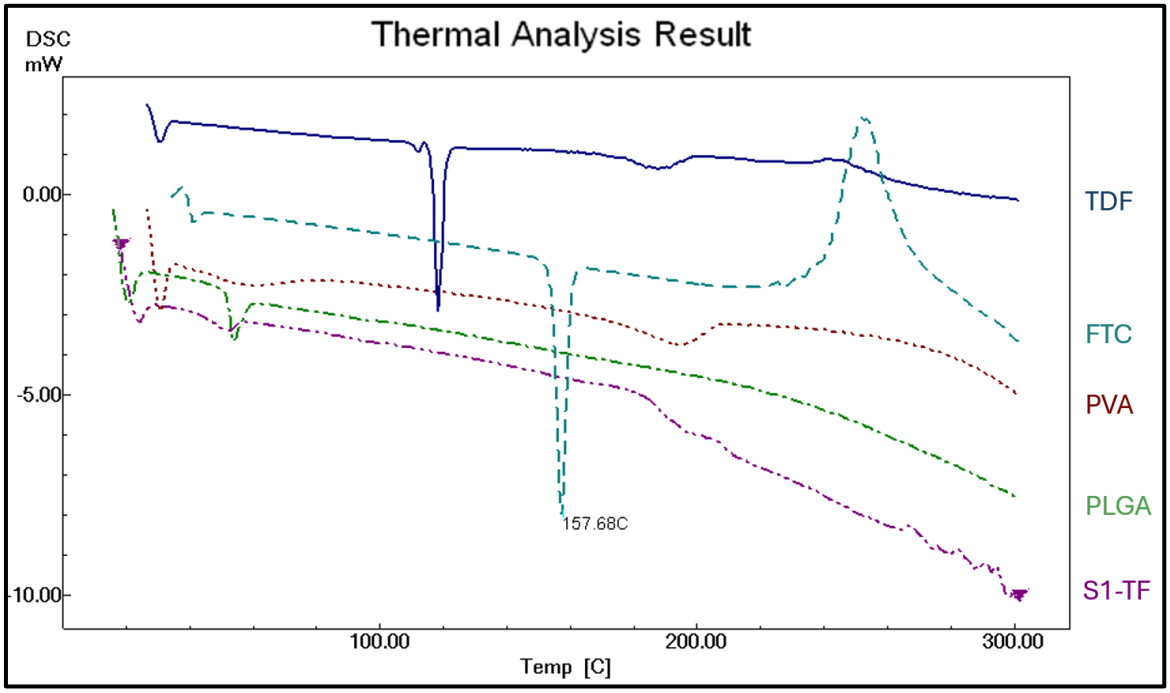
Şekil 4.40. TDF, FTC, PVA, PEO ve F4-TF (in vivo E Grubu) formülasyonunun DSC termogramı



Şekil 4.41. TDF, FTC, Zein ve K7-TF nanolif formülasyonlarının DSC termogramı



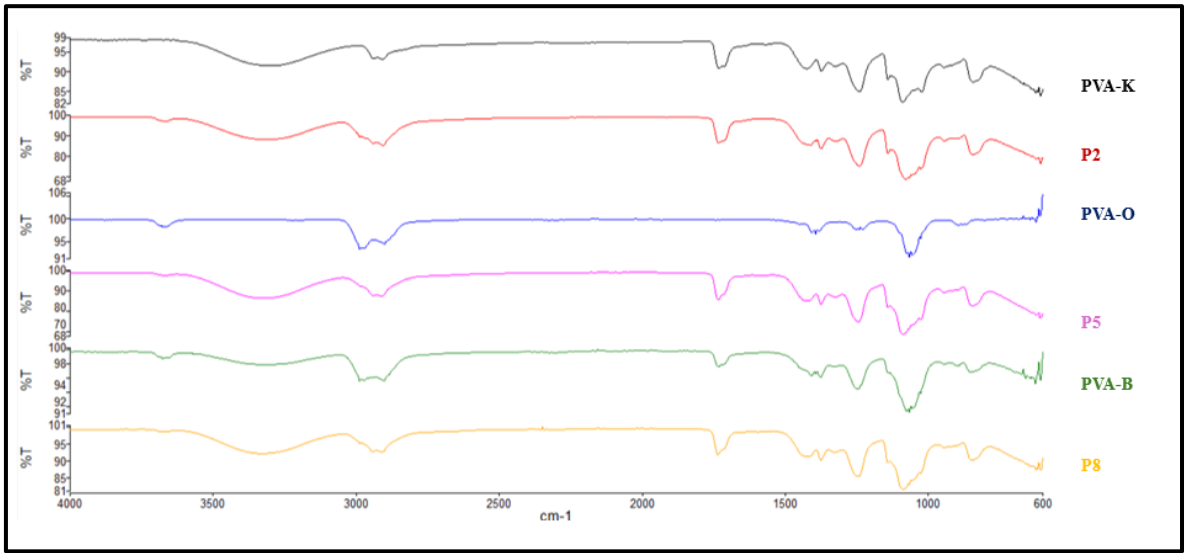
Şekil 4.42. TDF, FTC, PLGA, PEO ve M2-TF (in vivo F Grubu) formülasyonunun DSC termogramı



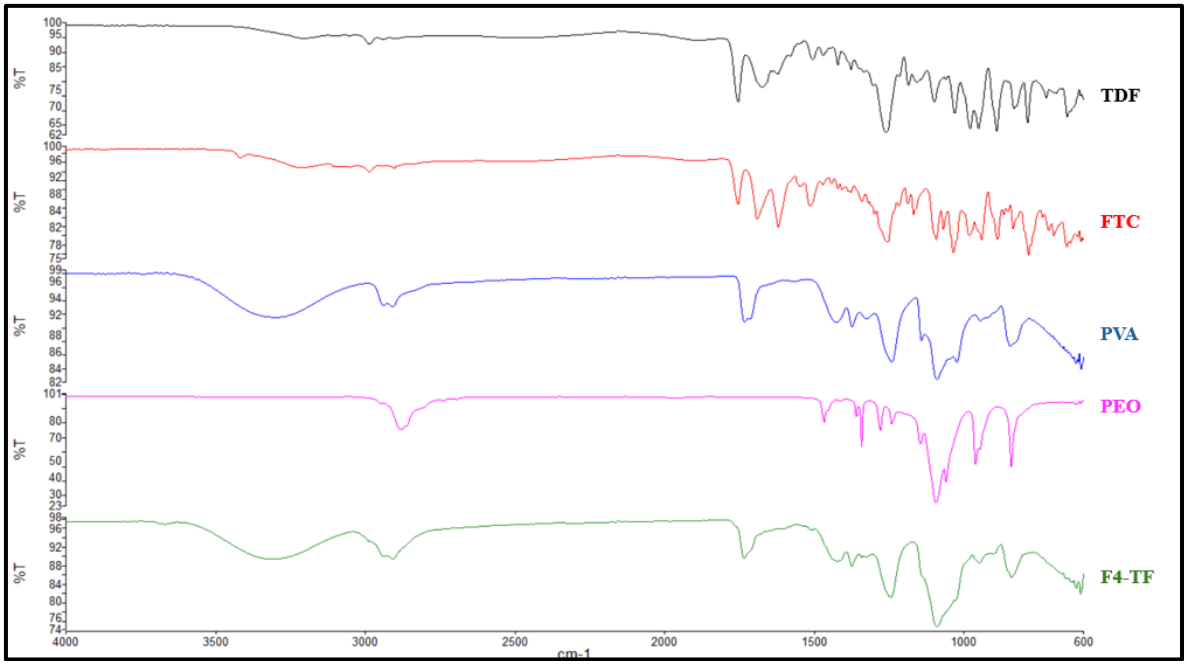
Şekil 4.43. TDF, FTC, PLGA, PVA ve S1-TF (in vivo D Grubu) formülasyonunun DSC termogramı

4.6.2. Nanolif formülasyonlarının FTIR ile karakterizasyon

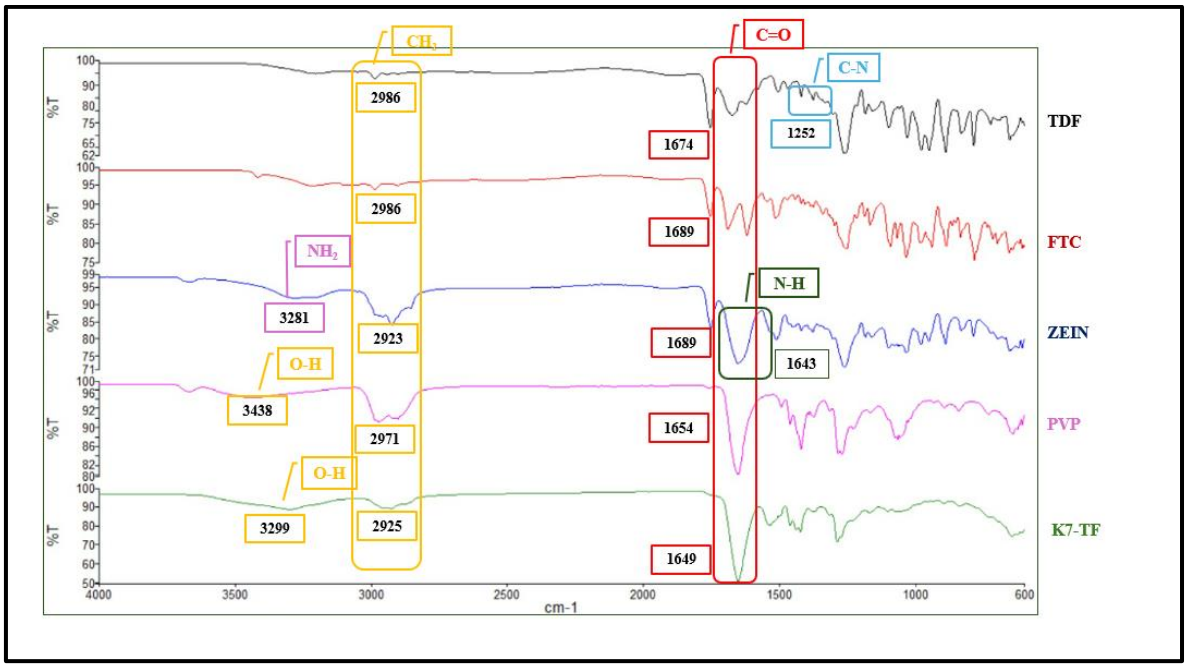
Geliştirilen nanolif formülasyonlarının FTIR ile yapılan yapısal karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.44-4.48 arasında verilmiştir.



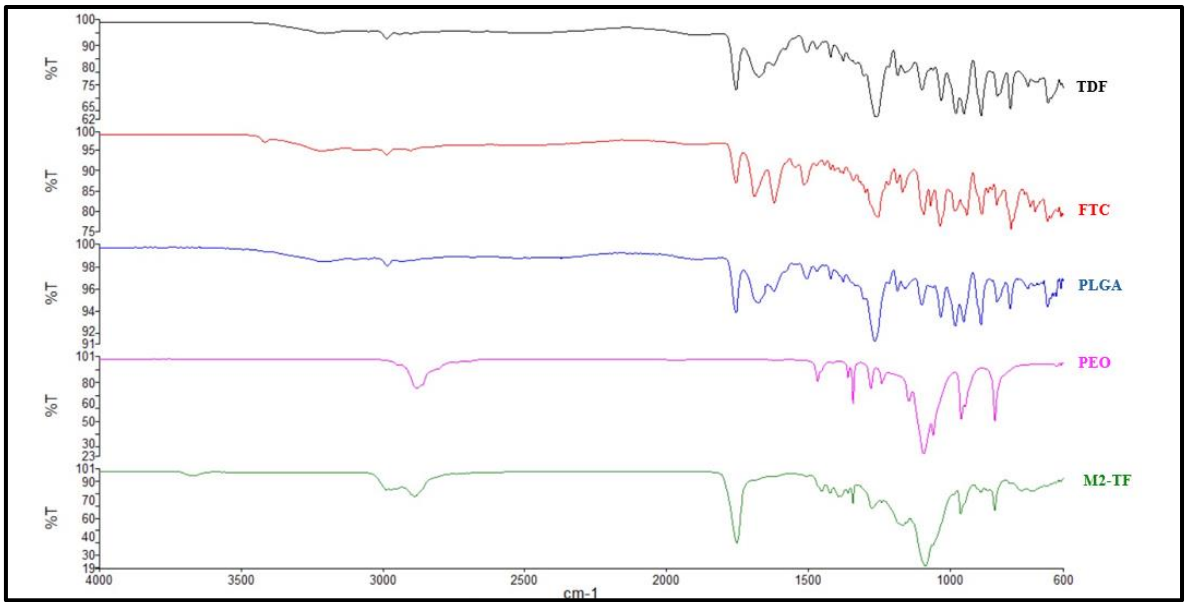
Şekil 4.44. PVA polimerleri (Polyviol 13/140 (PVA-K), Polyviol 26/140 (PVA-O) ve Polyviol 40/140 (PVA-B)), and PVA nanolif formülasyonlarının (P2-P5-P8) FTIR spektrumu



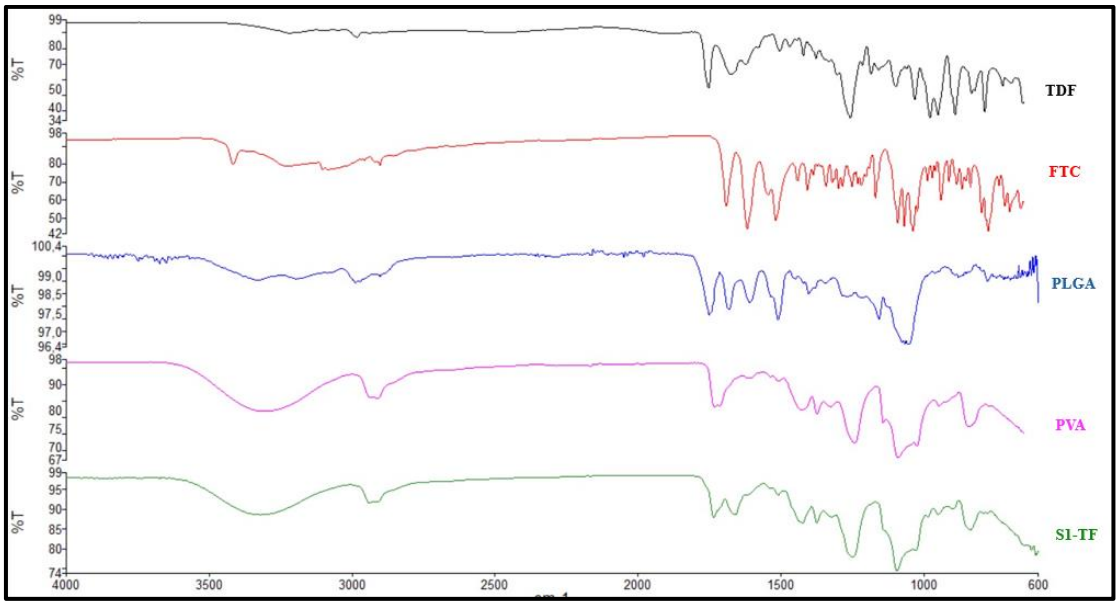
Şekil 4.45. TDF, FTC, PVA, PEO ve F4-TF (in vivo E Grubu) formülasyonunun FTIR spektrumu



Şekil 4.46. TDF, FTC, Zein ve K7-TF nanolif formülasyonlarının FTIR spektrumu



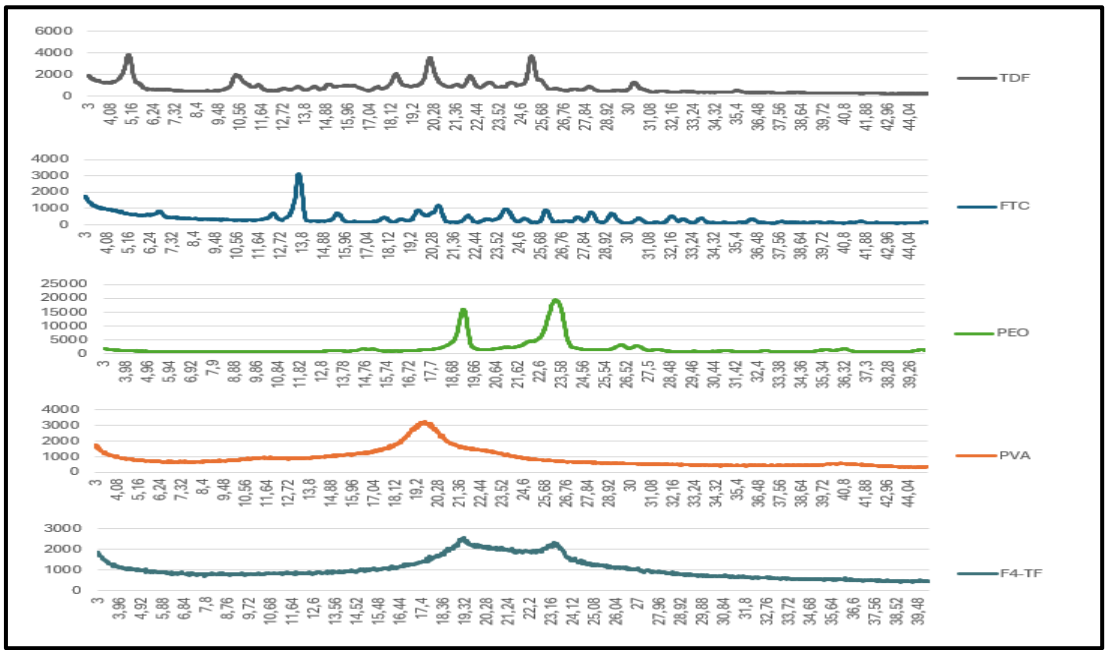
Şekil 4.47. TDF, FTC, PLGA, PVA ve M2-TF (in vivo F grubu) nanolif formülasyonlarının FTIR spektrumu



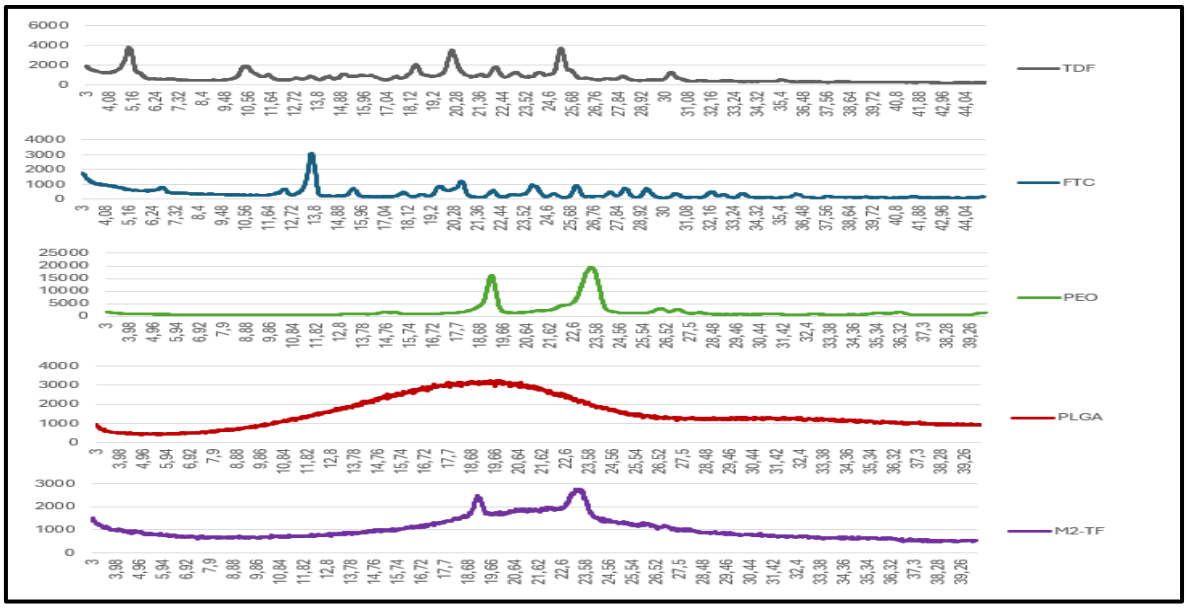
Şekil 4.48. TDF, FTC, PLGA, PVA ve S1-TF (in vivo D grubu) nanolif formülasyonlarının IR spektrumu

4.6.3. Nanolif formülasyonlarının XRD ile karakterizasyonu

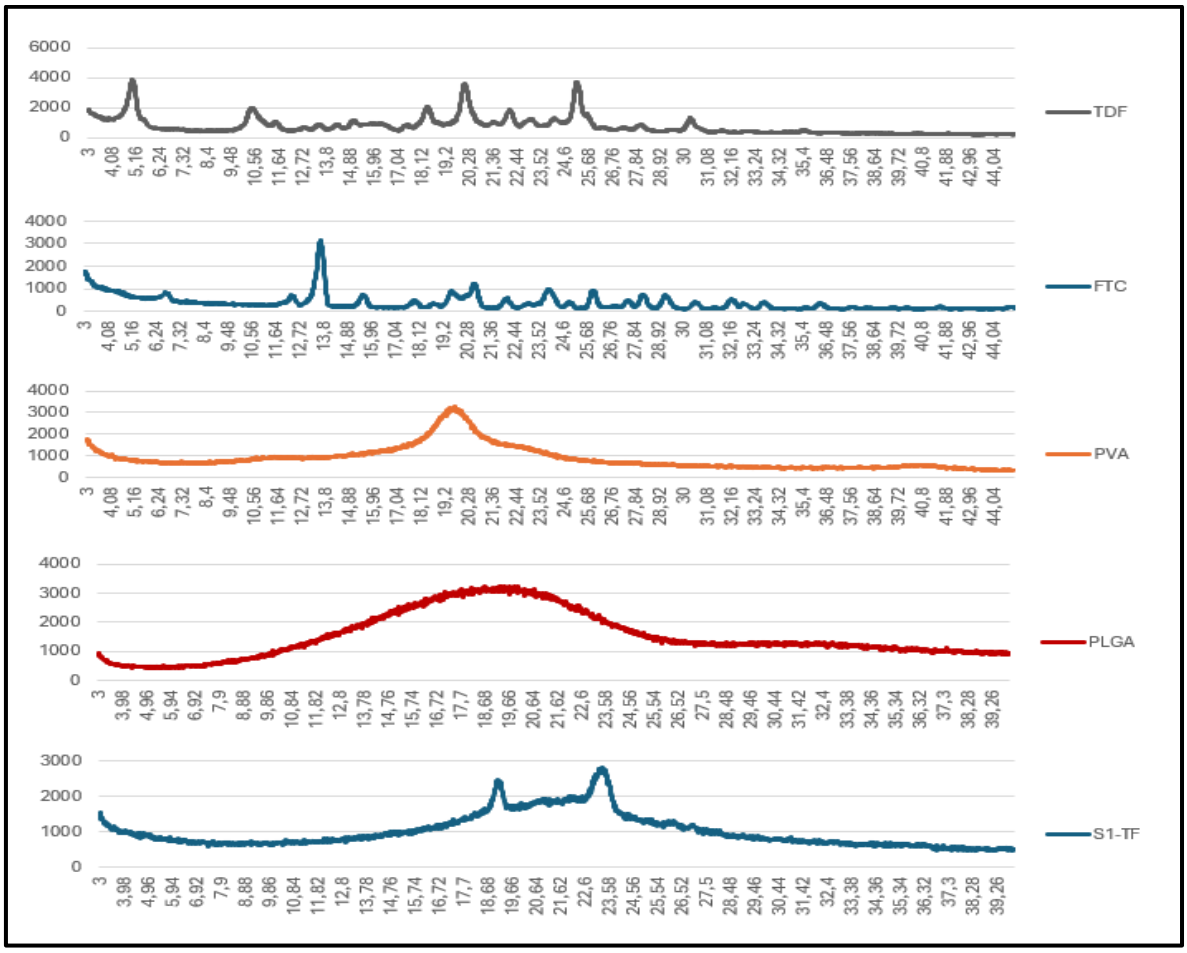
Geliştirilen nanolif formülasyonlarından in-vivo çalışmalarda kullanılmak üzerer seçilen optimum formülasyonların XRD ile yapılan yapısal karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen difraktogramlar Şekil 4.49-4.51 arasında verilmiştir.



Şekil 4.49. TDF, FTC, PVA, PEO ve F4-TF (in vivo E Grubu) formülasyonunun XRD difraktogramları



Şekil 4.50. TDF, FTC, PLGA, PEO ve M2-TF (in vivo F Grubu) formülasyonunun XRD difraktogramları



Şekil 4.51. TDF, FTC, PLGA, PVA ve S1-TF (in vivo D Grubu) formülasyonunun XRD difraktogramları

4.7. Nanolif Formülasyonlarının In vitro Karakterizasyon Çalışmaları

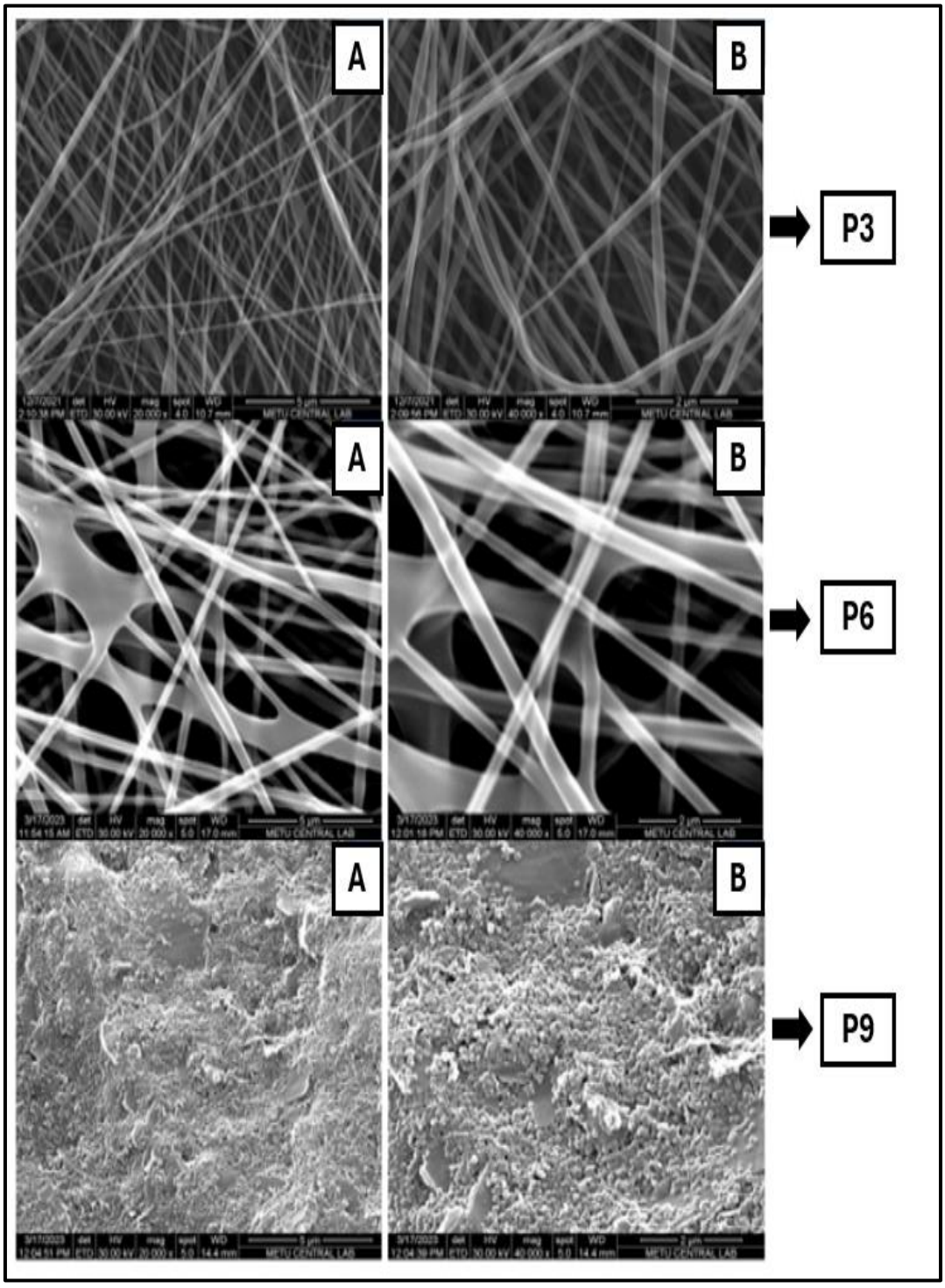
Geliştirilen vajinal nanolif formülasyonların istenilen özellikleri ve yapısal gerekliliklerini değerlendirmek için in vitro karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.7.1. Nanolif formülasyonlarının morfolojik özellikleri

Nanoliflerinin yapılarını ve yerleşimlerini gözlemek amacıyla nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri Bölüm 3.9.1'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

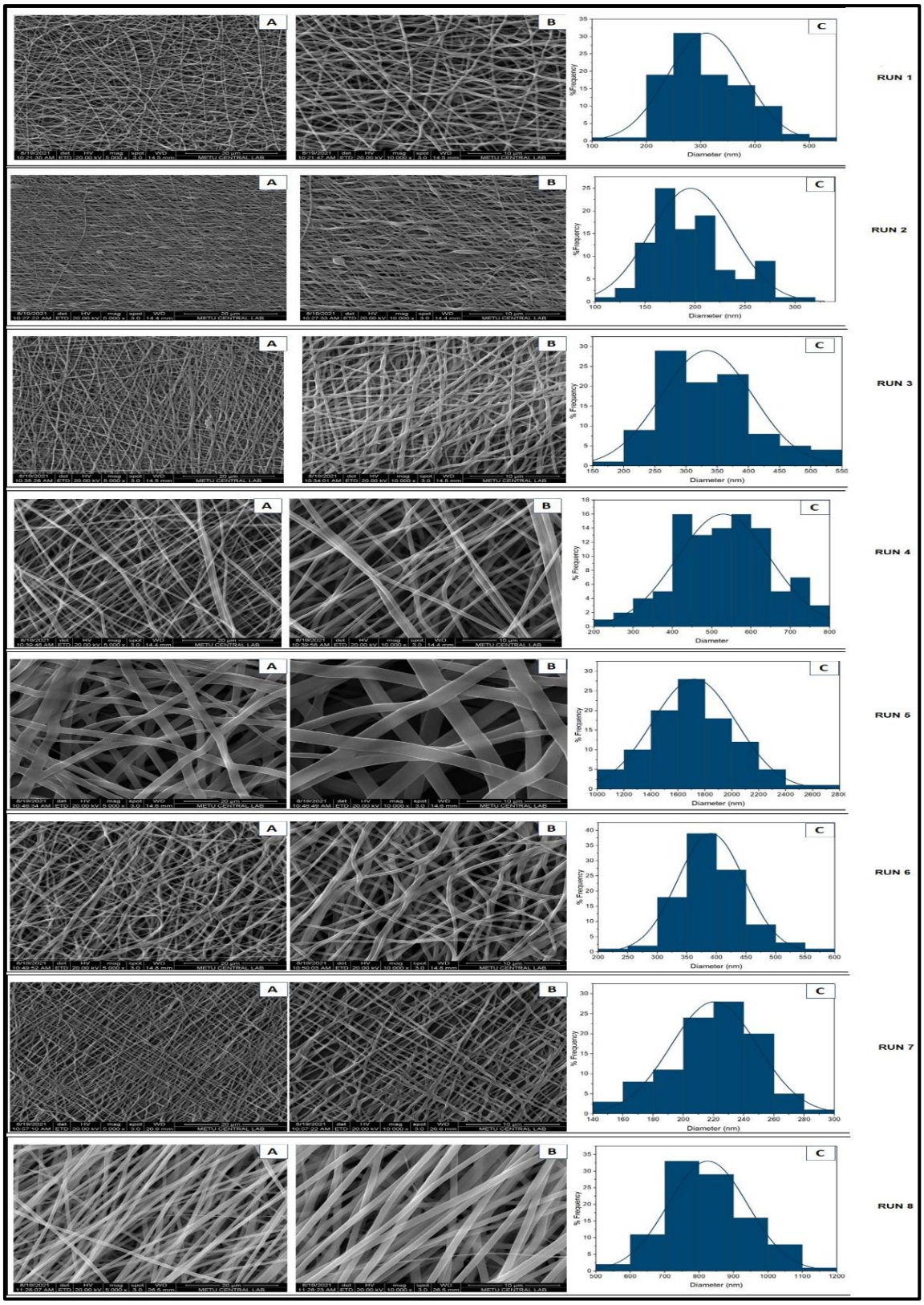
PVA önformülasyon nanolif formülasyonlarının SEM Görüntüleri

Farklı PVA tipleri ile geliştirilen formülasyonların SEM görüntüleri Resim 4.1'de verilmiştir.



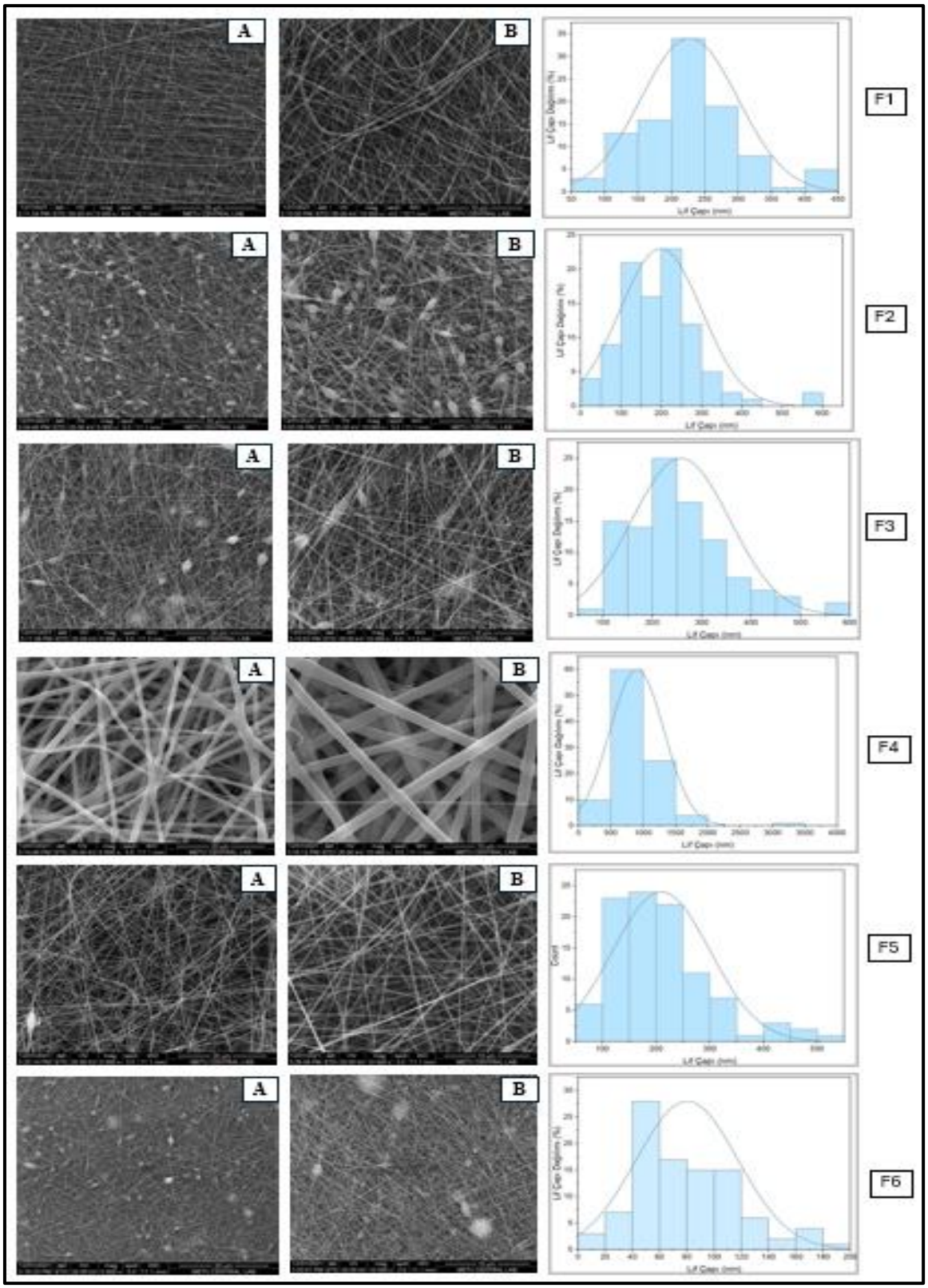
Resim 4.1. P3, P6 ve P9 formülasyonuna ait liflerin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri (A:20000X, B: 40000X)

Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri

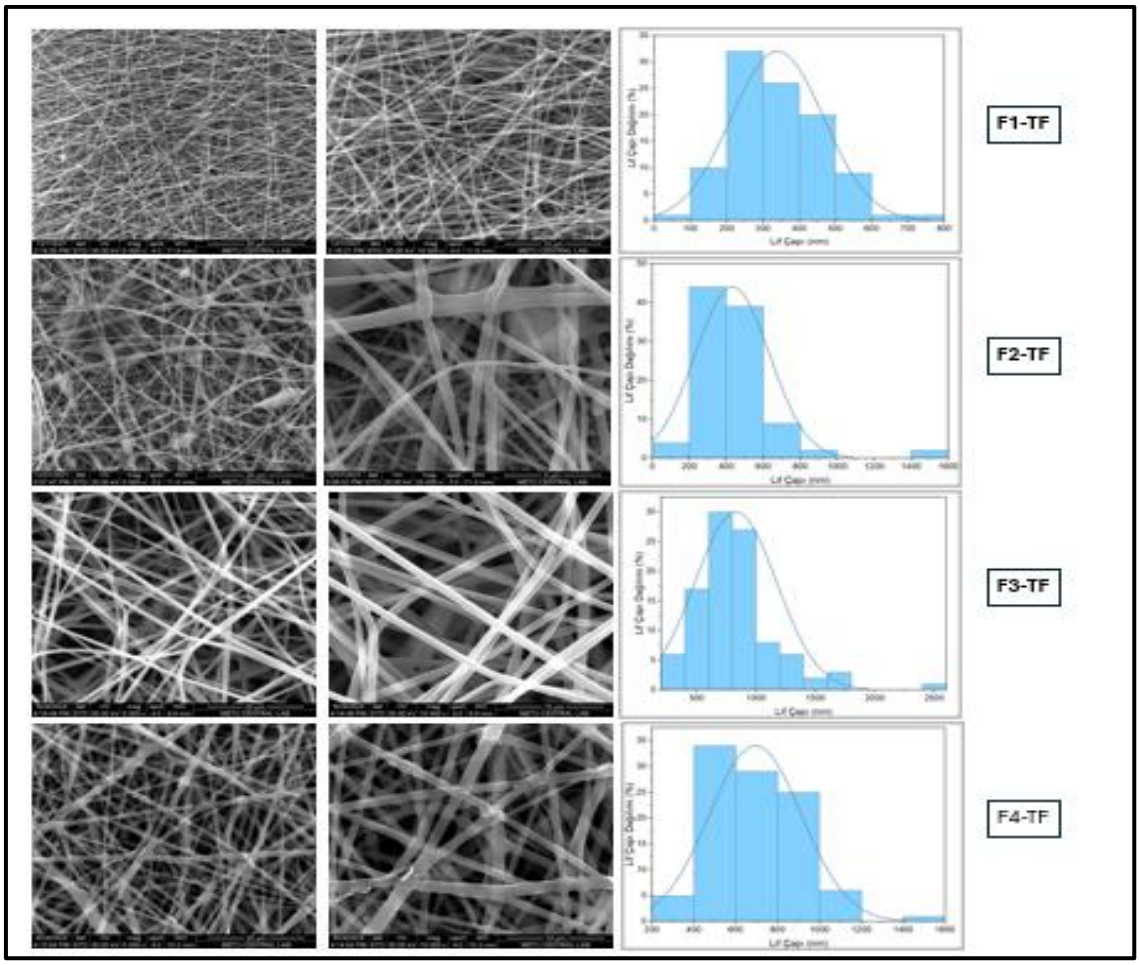


Resim 4.2. Tasarım ile geliştirilen PVA nanoliflerinin SEM görüntüleri (A:5000X, B: 10000X)

PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

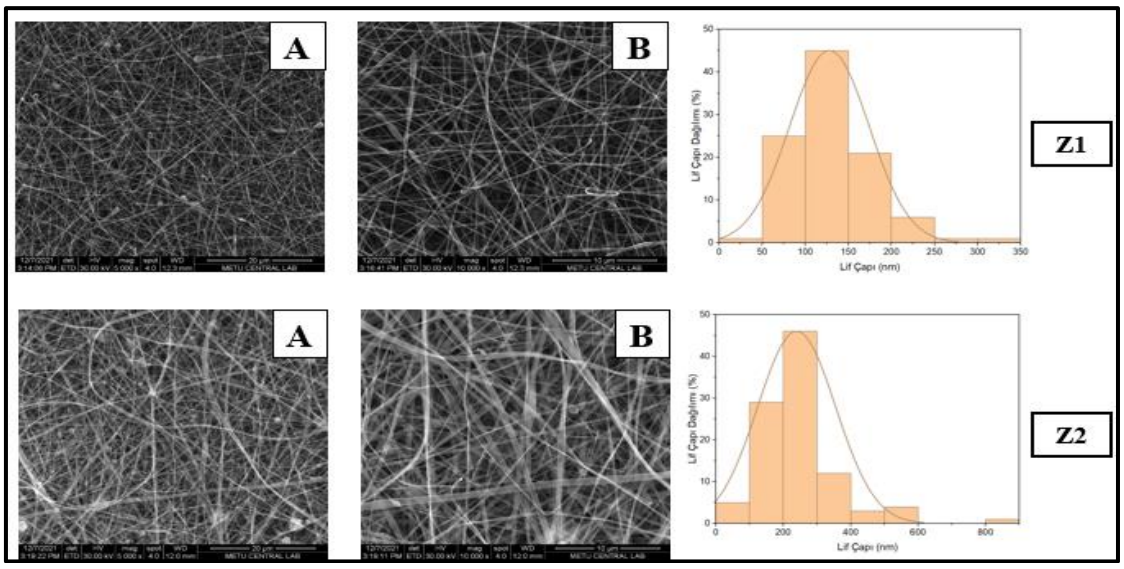


Resim 4.3. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri (A:5000X, B: 10000X)

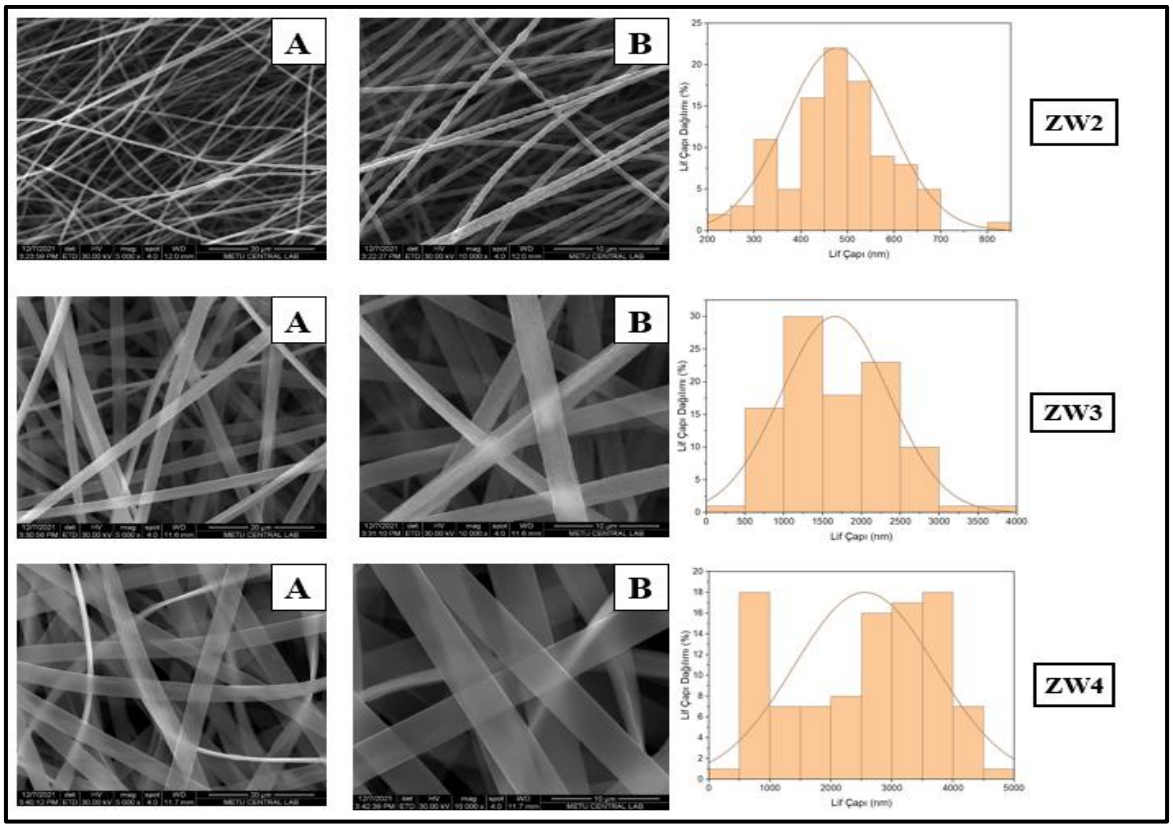


Resim 4.4. TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri (A:5000X, B: 10000X) (F4-TF *in-vivo E grubu)

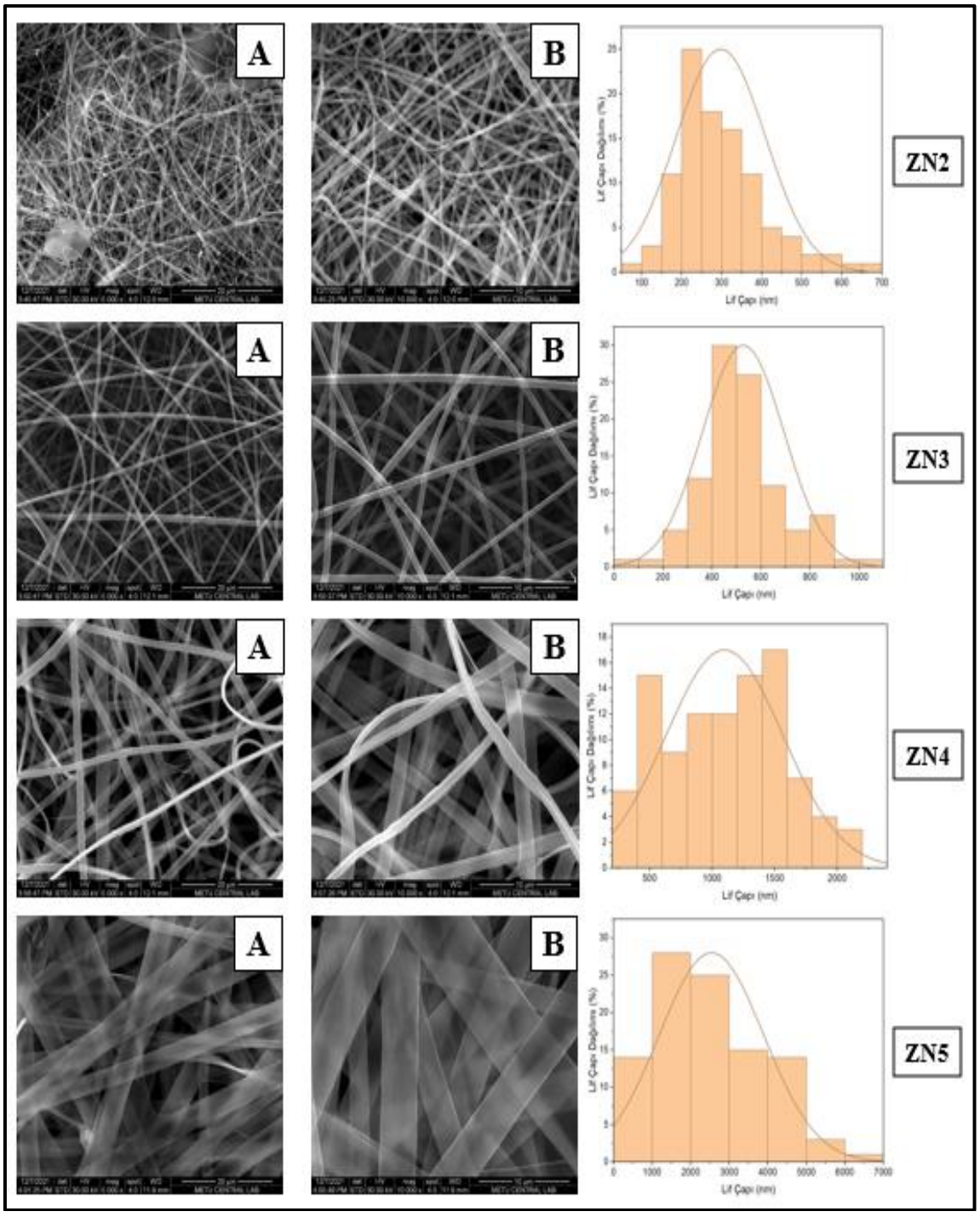
Zein-bazlı nanolif formülasyonlarının SEM görüntüleri



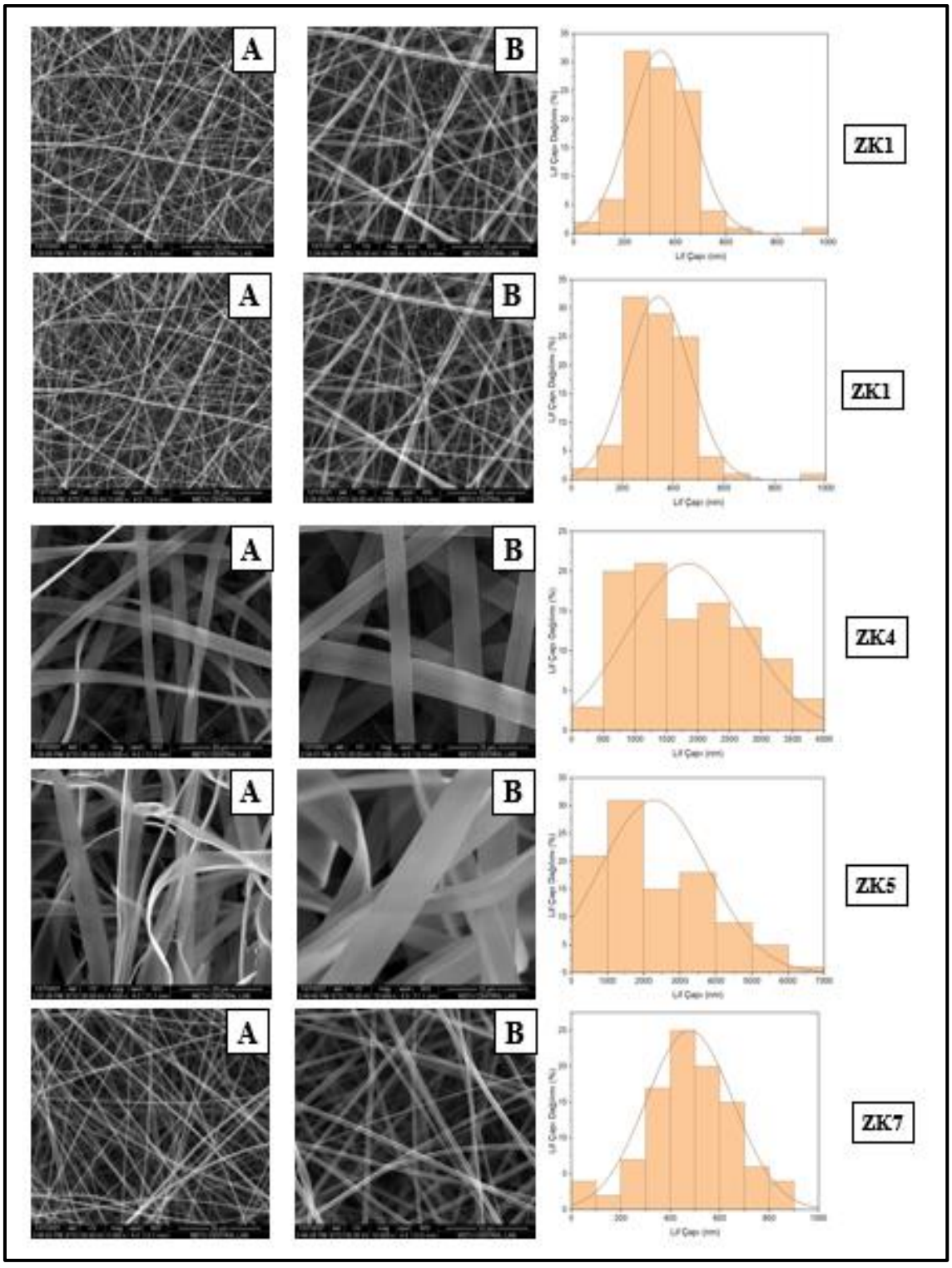
Resim 4.5. Zein nanoliflerinin SEM görüntüleri (A:5000X, B: 10000X)



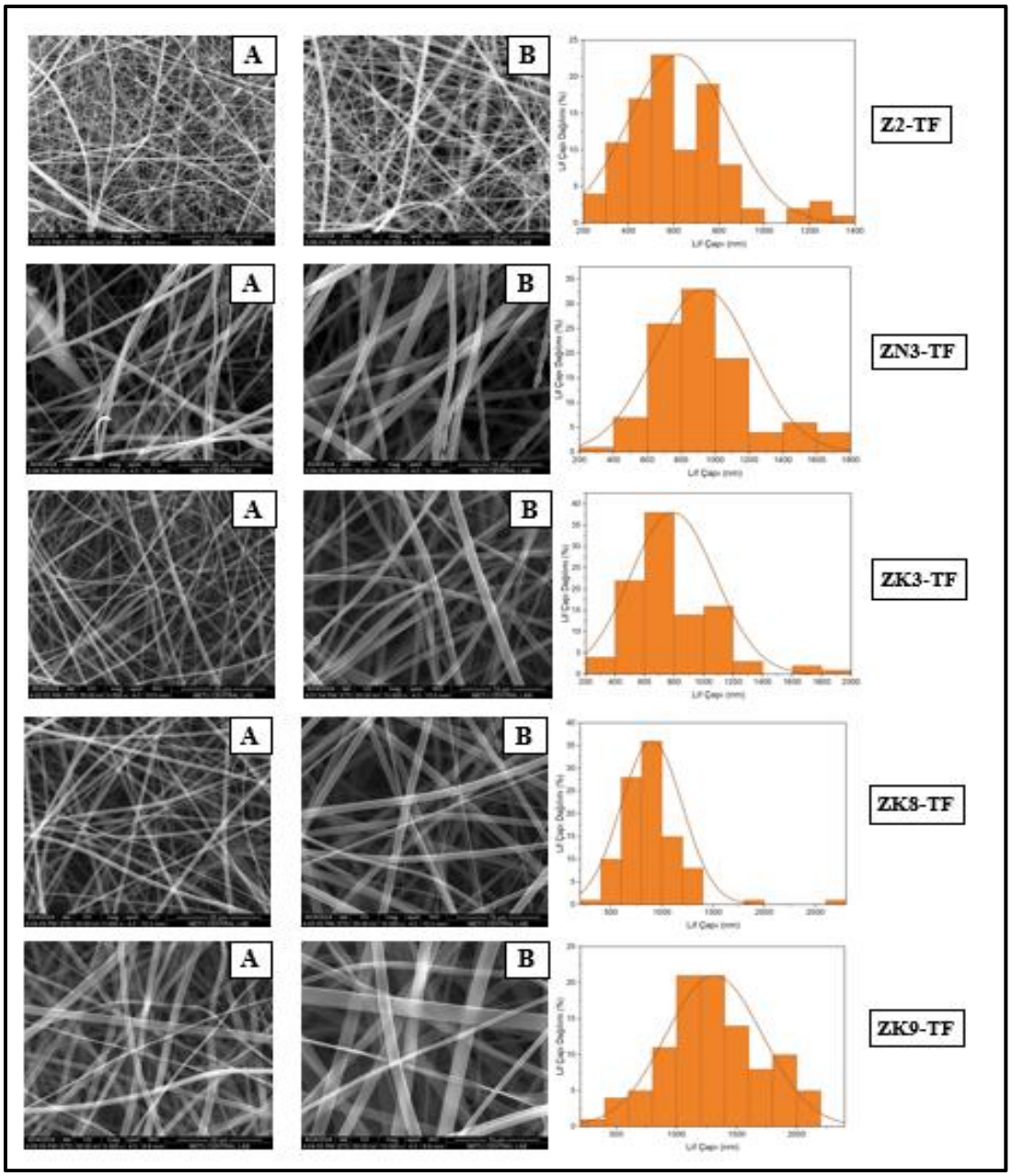
Resim 4.6. Zein-PEO WSR 205 nanoliflerinin SEM görüntüleri (A:5000X, B: 10000X)



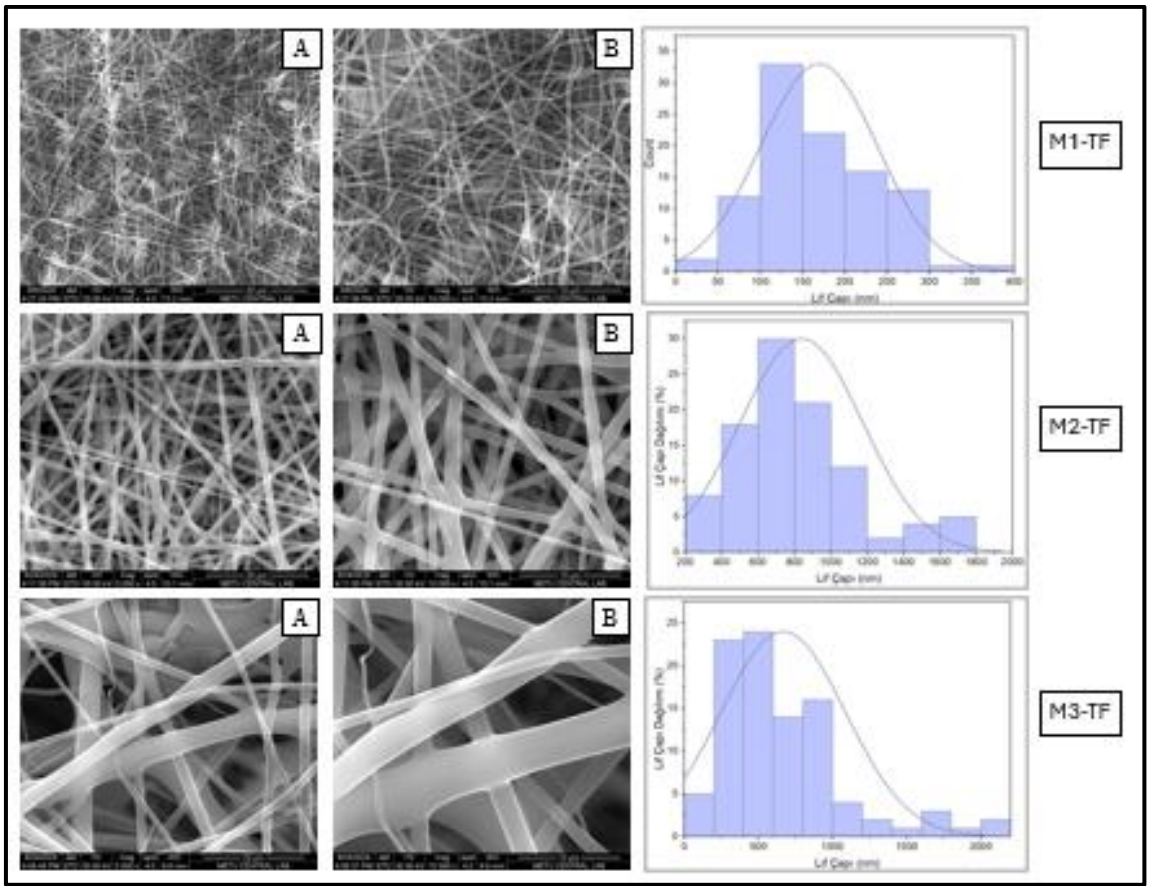
Resim 4.7. Zein-PEO WSR 205 nanoliflerinin SEM görüntüleri (A:5000X, B: 10000X)



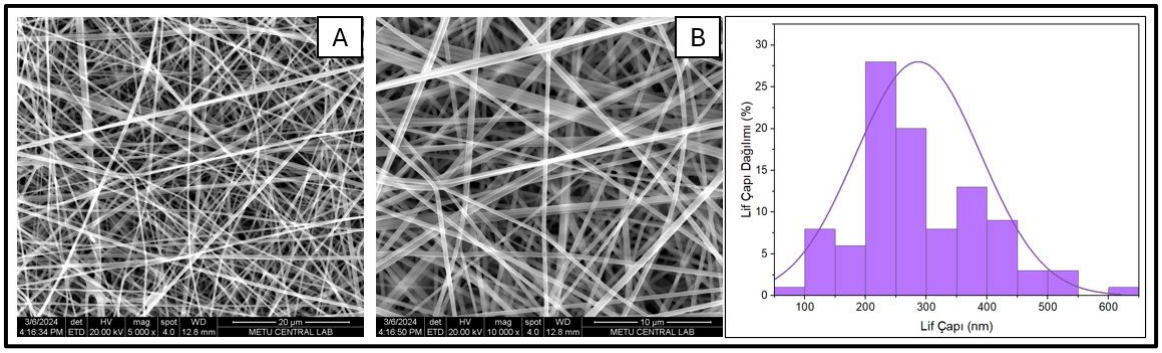
Resim 4.8. Zein-PVP bazlı nanoliflerinin SEM görüntüleri ve lif çapı dağılımları (A:5000X, B: 10000X)



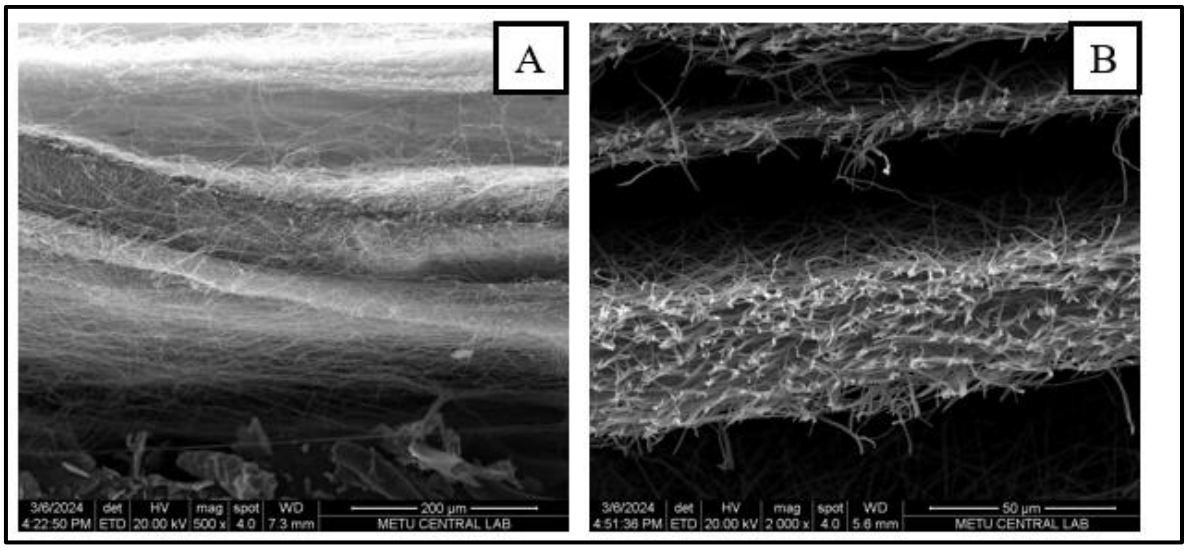
Resim 4.9. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanoliflerinin SEM görüntüleri ve lif çapı dağılımları (A:5000X, B: 10000X)



Resim 4.10. PLGA karışım nanoliflerinin SEM görüntüleri ve lif çapı dağılımları (A:5000X, B: 10000X)



Resim 4.11. S1-TF nanolif formülasyonunun üst tabakasının SEM görüntüsü, PVA (%10) (A:5000X, B: 10000X)



Resim 4.12. Tabakalı PLGA nanoliflerinin tabakalarının SEM görüntüleri (A:500X, B: 2000X)

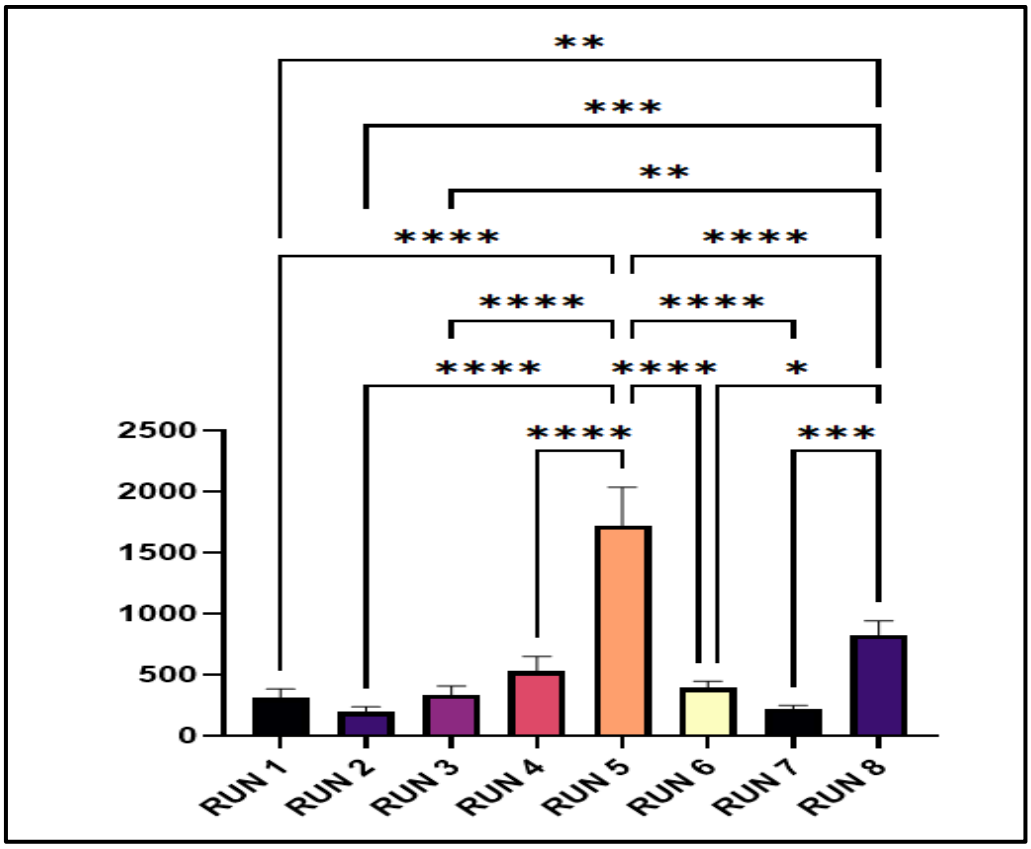
Lif çapı ve porozite ölçümleri

Nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite ölçümleri Bölüm 3.9.1'de belirtildiği gibi hesaplanmıştır ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17 arasında verilmiştir.

PVA önformülasyon nanolif formülasyonları

Çizelge 4.17. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanoliflerinin lif çapları ve porozite değerleri

Formülasyon Kodu	Nanolif Çapı (Ort±SS)	Porozite (%)
RUN 1	310,018±71,326	88,01
RUN 2	195,712±41,159	73,92
RUN 3	333,469±73,874	61,57
RUN 4	529,335±119,254	65,45
RUN 5	1721,085±113,579	57,18
RUN 6	390,637±56,537	68,76
RUN 7	219,574±29,017	75,98
RUN 8	825,067±115,789	78,61



Şekil 4.52. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanoliflerinin lif çapları ve porozite değerlerinin istatistiksel değeerlendirilmesi

PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

PVA bazlı geliştirilen nanolif formülasyonlarının içeriği Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. PVA temelli mukoadezif polimer içeren nanolif formülasyonların lif çapları ve porozite değerleri (*:ölçülmedi)

Formülasyon Kodu	Lif Çapı (nm)	Porozite Ölçümleri (%)
F1	141,461±44,064	83,10
F2	174,16±71,26	82,59
F3	173,06±75,03	88,68
F4	665,46±144,67	75,28
F5	247,24±84,04	91,12
F6	143,58±75,90	87,99
F7	*	*

TDF ve FTC içeren PVA temelli mukoadezif nanolif formülasyonları Çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. TDF ve FTC içeren PVA temelli kombine mukoadezif polimer içeren nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri

Formülasyon Kodu	Lif Çapı (nm)	Porozite Ölçümleri (%)
F1-TF	339,795±128,164	83,23
F2-TF	432,293±201,126	58,99
F3-TF	828,685±44,081	48,24
F4-TF	693,402±120,695	49,33

Zein bazlı nanolif formülasyonları

Çizelge 4.20. Zein bazlı nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri

Formülasyon Kodu	Lif Çapı (nm)	Porozite Ölçümleri (%)
Z1	127,896±46,212	62,16
Z2	239,684±115,792	55,78
ZW2	477,617±110,466	69,62
ZW3	1658,242±695,677	60,54
ZW4	2553,760±1158,028	42,32
ZN2	297,843±111,473	51,26
ZN3	527,214±167,178	66,03
ZN4	1098,421±468,775	60,95
ZN5	2538,829±1356,231	51,45
ZK1	341,141±124,654	71,78
ZK3	581,682±268,433	58,52
ZK4	1836,530±933,900	56,06
ZK5	2285,209±1489,735	53,98
ZK7	477,611±176,885	64,18
ZK9	977,988±500,015	59,58

Çizelge 4.21. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri

Formülasyon Kodu	Lif Çapı (nm)	Porozite Ölçümleri (%)
Z2-TF	622,186±224,595	49,93
ZN3-TF	930,562±288,658	50,35
ZK3-TF	790,959±289,828	59,53
ZK8-TF	898,048±300,838	60,03
ZK9-TF	1312,144±402,374	43,77

PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonları

Çizelge 4.22. PLGA bazlı nanolif formülasyonlarının lif çapları ve porozite değerleri

Formülasyon Kodu	Lif Çapı (nm)	Porozite Ölçümleri (%)
M1-TF	179,327±75,213	52,98
M2-TF	738,995±138,147	45,88
M3-TF	633,922±434,378	42,53

Tabakalı nanolif formülasyonları

Çizelge 4.23. Tabakalı PLGA nanolif formülasyonunun lif çapı ve porozite değerleri

Formülasyon Kodu	Lif Çapı (nm)	Porozite Ölçümleri (%)
S1-TF	286,102±52,617	47,26

4.7.2. Nanolif formülasyonlarında etkin madde yükleme etkinliğinin belirlenmesi

Nanoliflerde bulunan etkin maddelerin miktar tayini Bölüm 3.9.2'de anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.24'te verilmiştir.

Çizelge 4.24. TDF ve FTC yükleme etkinliği

Formülasyon Kodu	TDF	FTC
F1-TF	91,32±9,10	90,99±9,46
F2-TF	71,05±1,92	71,90±1,77
F4-TF	85,41±11,97	85,14±12,45
ZK7-TF	74,96±14,21	104,88±21,74
ZK10-TF	82,02±13,52	101,30±23,71
Z2-TF	97,11±3,45	84,61±12,32
M2-TF	102,43±24,6	73,61±10,93
S1-TF	75,90±9,45	87,05±34,30

4.7.3. Nanolif formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi

Nanoliflerin mekanik özellikleri Bölüm 3.9.3.'te anlatıldığı gerçekleştirilmiştir.

PVA önformülasyon nanolif formülasyonları

Çizelge 4.25. Farklı PVA tipleri ile geliştirilen nanolif formülasyonlarının karakterizasyon sonuçları (*: ölçülemedi)

Formülasyon Kodu	Gerilme Direnci (MPa)	Kopma Uzaması (%)
P1	*	*
P2	4,106±1,104	48,546±30,590
P3	3,488±0,560	65,746±15,013
P4	1,910±0,416	31,043±7,454
P5	1,383±0,065	125,423±36,801
P6	5,438±1,062	170,677±73,885
P7	2,747±0,158	69,030±13,643
P8	3,450±0,248	93,190±23,450
P9	6,438±1,467	100,267±36,447

Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolif formülasyonları

Çizelge 4.26. Deneysel tasarım ile belirlenen formülasyonların karakterizasyon sonuçları

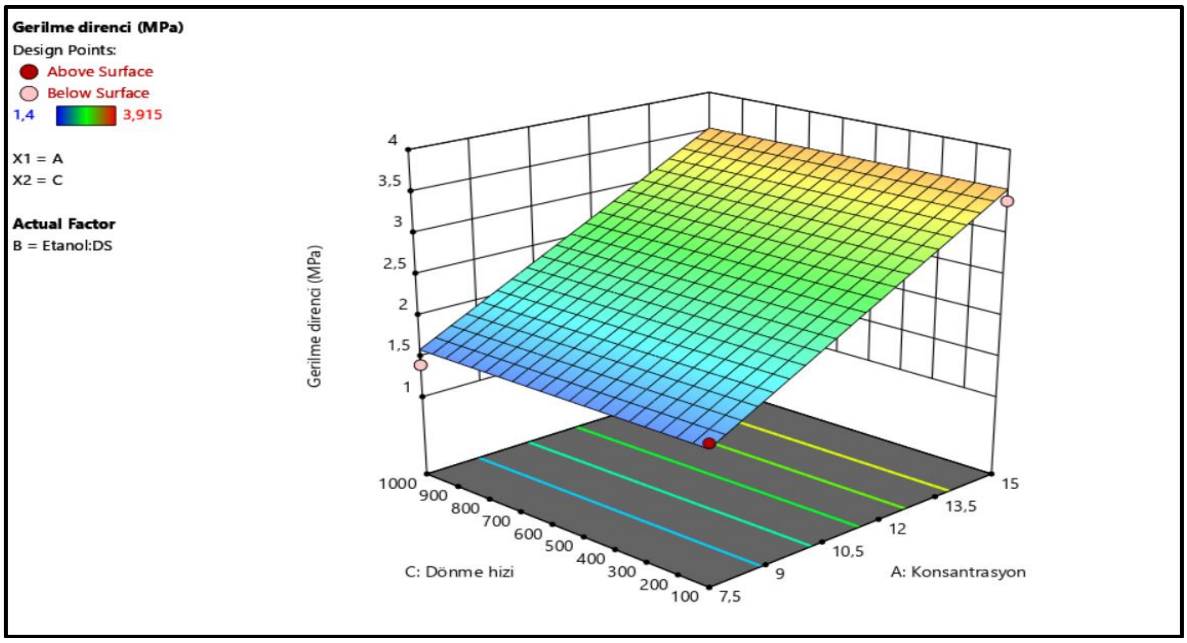
Formülasyon Kodu	Gerilme Direnci (MPa)	Kopma Uzaması (%)
RUN 1	1,412±0,065	96,207±21,496
RUN 2	1,761±0,023	23,953±2,120
RUN 3	1,657±0,133	73,124±6,156
RUN 4	1,55±0,04	26,897±7,988
RUN 5	3,363±0,177	95,128±19,326
RUN 6	3,915±0,140	94,77±2,74
RUN 7	3,396±0,404	121,727±21,956
RUN 8	3,469±0,379	124,773±9,779

Deney tasarımı kullanılarak nanoliflerin işlem parametrelerinin belirlenmesine ilişkin bulgular

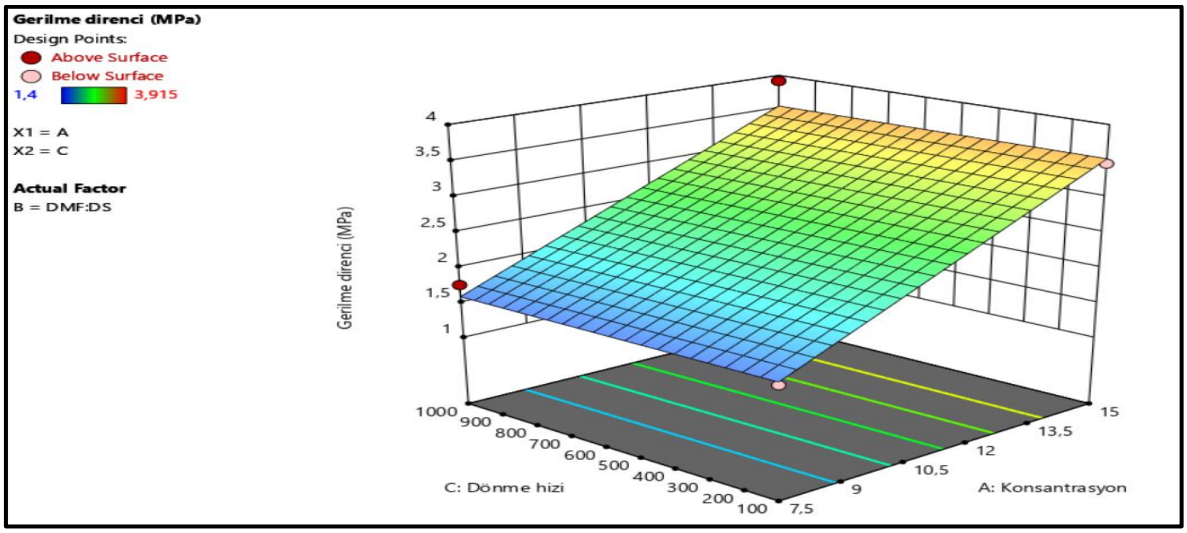
Bölüm 3.5.2'de anlatıldığı gibi her bir formülasyon için en uygun işlem parametrelerini belirlemek amacıyla Design Expert yazılımı kullanılarak 2^3 (2 seviye 3 faktör) faktöriyel tasarım yapıldı ve 8 formülasyon hazırlandı. Bu tasarım sonucunda elde edilen formülasyonların gerilme direnci ve kopma uzaması değerleri Çizelge 4.26'da gösterilmektedir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek, bağımsız değişkenlerin nanolif formülasyonlarının mekanik özellikleri üzerine etkileri incelendi. Yapılan deneysel tasarım sonucu programın yazılımı ile tüm parametrelerin analizi modele uygun anlamlılık göstermemiştir. Anlamlı sonuç veren parametreler için grafikler Şekil 4.53-4.56 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.27. PVA nanolif formülasyonlarının işlem parametrelerinin gerilme direnci üzerine etkisinin varyans analizi ile incelenmesi

PB				
Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama kare	F değeri	Anlamlılık(p)
Model	5843,72	5843,72	7,65	0,0326
A-Konsantrasyon	5843,72	5843,72	7,65	



Şekil 4.53. PVA nanolif formülasyonunda gerilme direnci üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği (Çözücü sistemi: Etanol-Distile su)

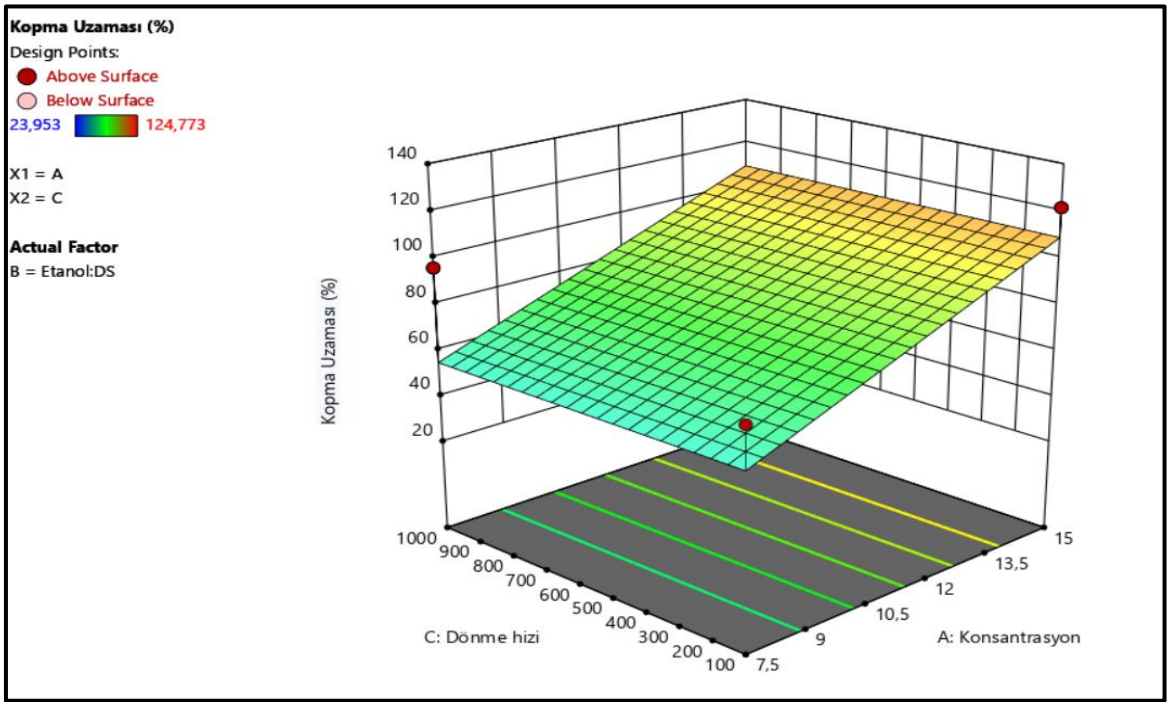


Şekil 4.54. PVA nanolif formülasyonunda gerilme direnci üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği (Çözücü sistemi: DMF-Distile su)

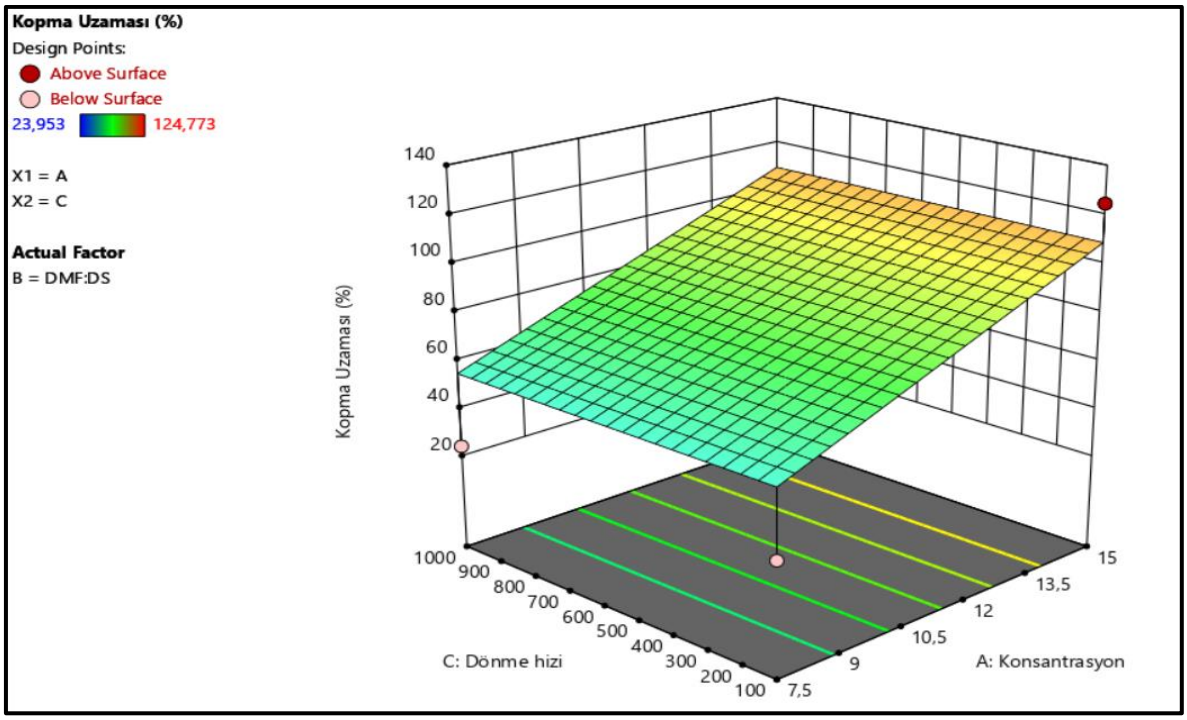
PVA ile 2^3 faktöriyel tasarım sonucunda gerilme direnci için 'Gerilme direnci =2,563875 +0,971875A' olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.28. PVA nanolif formülasyonlarının işlem parametrelerinin kopma uzaması üzerine etkisinin varyans analizi ile incelenmesi

PB				
Kaynak	Kareler Toplamı	Ortalama kare	F değeri	Anlamlılık (p)
Model	5843,72	5843,72	7,65	0,0326
A-Konsantrasyon	5843,72	5843,72	7,65	



Şekil 4.55. PVA nanolif formülasyonunda kopma uzaması üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği (Çözücü sistemi: Etanol-Distile su)



Şekil 4.56. PVA nanolif formülasyonunda kopma uzaması üzerinde işlem parametrelerinin etkisini gösteren 3D yüzey grafiği (Çözücü sistemi: DMF-Distile su)

PVA ile 2^3 faktöriyel tasarım sonucunda gerilme direnci için 'Gerilme direnci =0,991000+7,20723*A' olarak bulunmuştur.

Çözücü sistemi ve solvan sisteminin nanoliflerin mekanik özellikleri üzerine etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

Çizelge 4.29. Mukoadezif nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Gerilme Direnci (MPa)	Kopma Uzaması (%)
F1	5,839±0,462	100,513±15,836
F2	4,514±0,196	113,237±4,293
F3	3,698±0,535	104,207±2,113
F4	6,428±0,104	66,887±0,857
F5	7,122±0,035	41,533±3,285

Çizelge 4.30. TDF ve FTC içeren mukoadezif nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Gerilme Direnci (MPa)	Kopma Uzaması (%)
F1-TF	5,419±0,500	101,007±5,654
F2-TF	3,299±0,123	16,043±0,652
F4-TF	3,168±0,320	41,050±14,141

Zein bazlı Nanolif Formüaslyonlarının mekanik karakterizasyonu

Zein bazlı nanolif formülasyonlarının karakterizasyon sonuçları Çizelge 4.31'te verilmiştir.

Çizelge 4.31. Zein bazlı nanolif formülasyonlarının karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Gerilme Direnci (MPa)	Kopma Uzaması (%)
Z1	*	*
Z2	0,501±0,132	0,780±0,439
ZW0	*	*
ZW1	*	*
ZW2	*	*
ZW3	0,691±0,088	2,273±1,239
ZW4	0,644±0,228	0,623±0,031
ZN0	*	*
ZN1	0,989±0,055	43,660±2,983
ZN2	0,650±0,190	4,877±0,206
ZN3	0,8085±0,033	5,583±0,437
ZN4	0,634±0,190	0,210±0,026
ZN5	0,503±0,064	0±0
ZK0	2,866±0,145	17,067±1,508
ZK1	1,471±0,120	3,243±0,585
ZK2	0,302±0,029	0,900±0,329
ZK3	0,607±0,053	2,943±1,639
ZK4	0,396±0,154	0,140±0,242
ZK5	0,682±0,029	0,010±0
ZK6	4,538±0,307	25,823±4,070
ZK7	3,160±0,217	4,950±0,279
ZK8	1,847±0,084	6,417±0,666
ZK9	1,345±0,112	0,357±0,161

***:** Ölçüm alınamadı.

Çizelge 4.32. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Gerilme Direnci (MPa)	Kopma Uzaması (%)
Z2-TF	0,45±0,11	1,423±2,457
ZN3-TF	0,172±0,041	1,603±0,140
ZK3-TF	0,439±0,059	2,010±0,555
ZK7-TF	1,510±0,501	2,617±0,977
ZK8-TF	1,525±0,090	4,223±2,002
ZK9-TF	1,143±0,220	1,757±0,796

PLGA ile geliştirilen karışım nanolif formülasyonları

Çizelge 4.33. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı katlı nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Gerilme (MPa)	Kopma Uzaması (%)
M1-TF	2,644±0,233	78,82±16,81
M2-TF	3,741±0,343	80,13±10,14
M3-TF	*	*

PLGA ile geliştirilen tabakalı nanolif formülasyonları

Çizelge 4.34. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı katlı nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Gerilme (MPa)	Kopma Uzaması (%)
S1-TF	2,37±0,32	26,877±5,249
S2-TF	1,262±0,056	16,363±0,545
S3-TF	1,954±0,219	10,513±3,197
S4-TF	1,330 ± 0,038	19,123 ± 2,055

4.7.4. Nanolif formülasyonlarının temas açılarının ölçülmesi

Hazırlanan nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri Bölüm 3.9.4'te belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

PVA önformülasyon nanolif formülasyonları

Farklı PVA tipleri ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.35'te verilmiştir.

Çizelge 4.35. PVA önformülasyon nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri

Formülasyon Kodu	Temas Açısı (°)
P1	ND*
P2	17,29±2,69
P3	0±0
P4	0±0
P5	11,07±5,52
P6	19,62±5,21
P7	15,73±1,27
P8	24,78±0,71
P9	38,98±10,62

Tasarımla geliştirilen nanolif formülasyonları

Tasarım ile geliştirilen PVA nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri tamamı 0 bulunmuştur. Kullanılan PVA polimerine bağlı olarak üretilen nanolifler hidrofilik özelliktedir.

PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

PVA ile geliştirilen mukoadezif formülasyonlarda ise, kullanılan polimerlerin hidrofilik özellikte olmasından dolayı temas açıları 0° bulunmuştur. İn vivo çalışmalarda seçtiğimiz F4-TF'nin temas açısı ölçümleri de 0° bulunmuştur.

Zein bazlı nanolif formülasyonları

Zein bazlı nanolif formülasyonları ile elde edilen temas açıları sonuçları Çizelge 4.36'da verilmiştir.

Çizelge 4.36. Zein bazlı nanolif formülasyonlarının temas açısı karakterizasyonu (*:ölçülemedi)

Formülasyon Kodu	Temas Açısı
Z1	29,15±10,97
Z2	41,39±3,27
ZW0	*
ZW1	0
ZW2	*
ZW3	48,40±1,90
ZW4	63,20±2,53
ZN0	0
ZN1	0
ZN2	63,67±4,73
ZN3	73,19±1,71
ZN4	79,67±4,02
ZN5	51,94±2,24
ZK0	0
ZK1	0
ZK2	49,85±1,09
ZK3	76,76±3,13
ZK4	100,69±3,06
ZK5	20,99±1,94
ZK6	0
ZK7	0
ZK8	0
ZK9	74,41±5,17

Seçilen zein bazlı nanolif formülasyonlarına TDF ve FTC yüklenerek hazırlanan nanolif formülasyonlarının temas açıları sonuçları Çizelge 4.37'de verilmiştir.

Çizelge 4.37. TDF ve FTC içeren zein bazlı nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri

Formülasyon Kodu	Temas Açısı (°)
Z2-TF	25±2
ZN3-TF	0
ZK3-TF	0
ZK8-TF	0
ZK9-TF	0

PLGA ile hazırlanan karışım nanolif formülasyonları

PLGA ile hazırlanan karışım nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri Çizelge 4.38'de verilmiştir.

Çizelge 4.38. PLGA ile hazırlanan karışım nanolif formülasyonlarının temas açısı ölçümleri

Formülasyon Kodu	Temas Açısı (°)
M1-TF	30±1
M2-TF	0
M3-TF	0

PLGA ile geliştirilen tabakalı nanolif formülasyonları

PLGA bazlı tabakalı nanolifler ise dış katman hidroilik özellikte PVA olduğu için temas açısı ölçümleri 0° olarak elde edilmiştir. İn vivo çalışmalarda kullandığımız S1-TF formülasyonunun temas açısı 0° bulunmuştur.

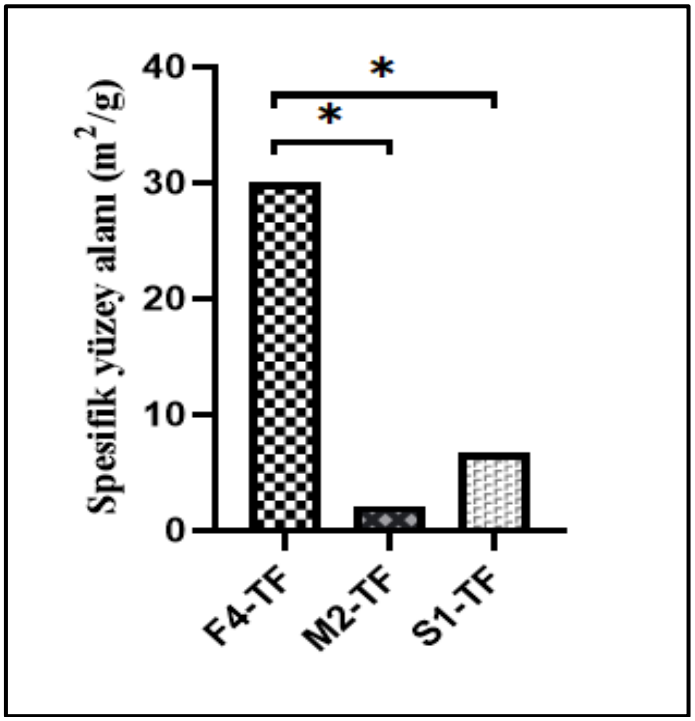
4.7.5. Nanoliflerin BET ile yüzey alanı analizi

Geliştirilen nanolif formülasyonlarından in-vivo çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen optimum formülasyonların BET analizi Bölüm 3.9.5'te anlatıldığı gibi yapılmıştır. Spesifik yüzey alanı ölçüm sonuçları Çizelge 4.39'da verilmiştir.

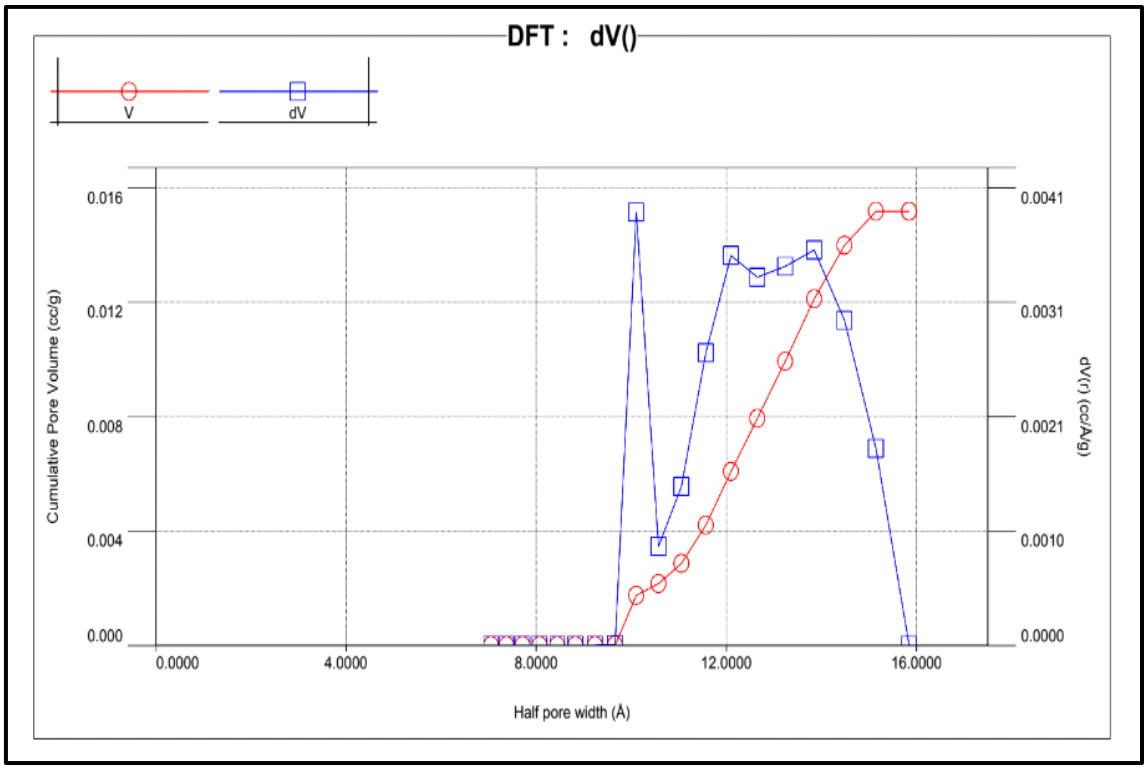
Çizelge 4.39. Nanolif formülasyonlarının çok noktalı BET analizi sonuçları

Formülasyon Kodu	Spesifik yüzey alanı (m^2/g)
F4-TF	30,099
M2-TF	2,143
S1-TF	6,745

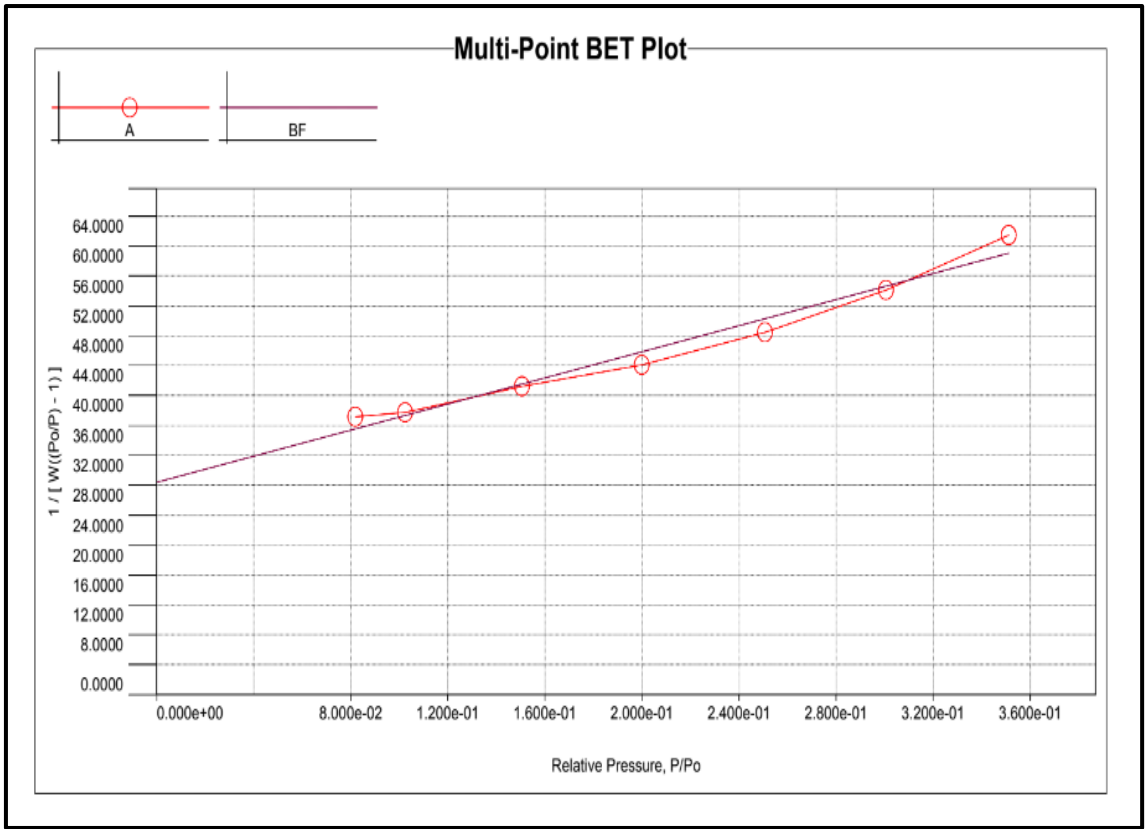
BET analizi ile elde edilen spesifik yüzey alanlarının karşılaştırılması Şekil 4.57'de verilmiştir.



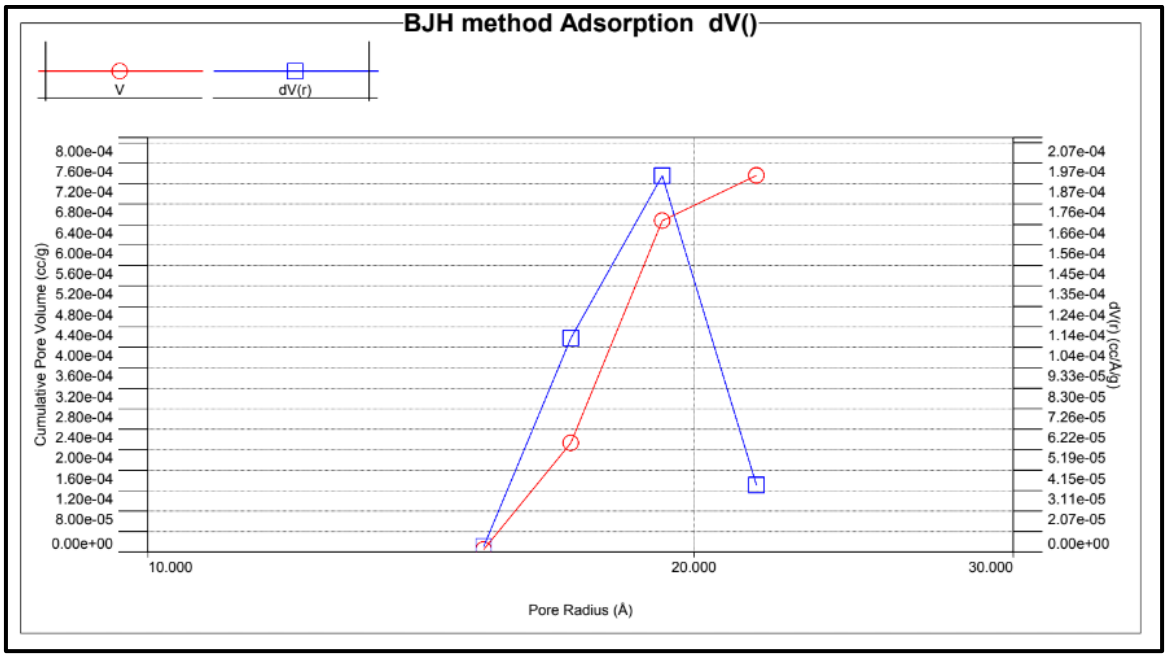
Şekil 4.57. F4-TF, M2-TF ve S1-TF spesifik yüzey alanı değerleri (*: $p<0,05$)



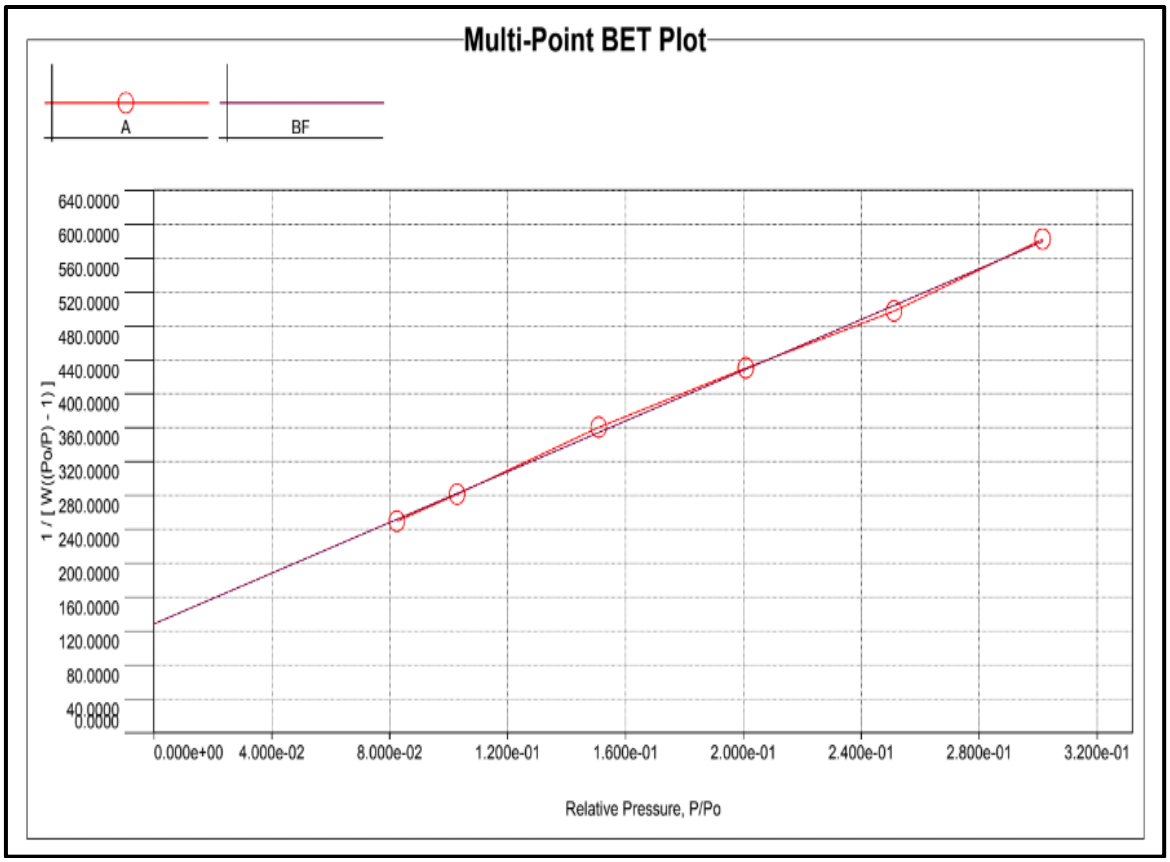
Şekil 4.58. F4-TF formülasyonunun por çapı genişliği – kümülatif por hacmi grafiği



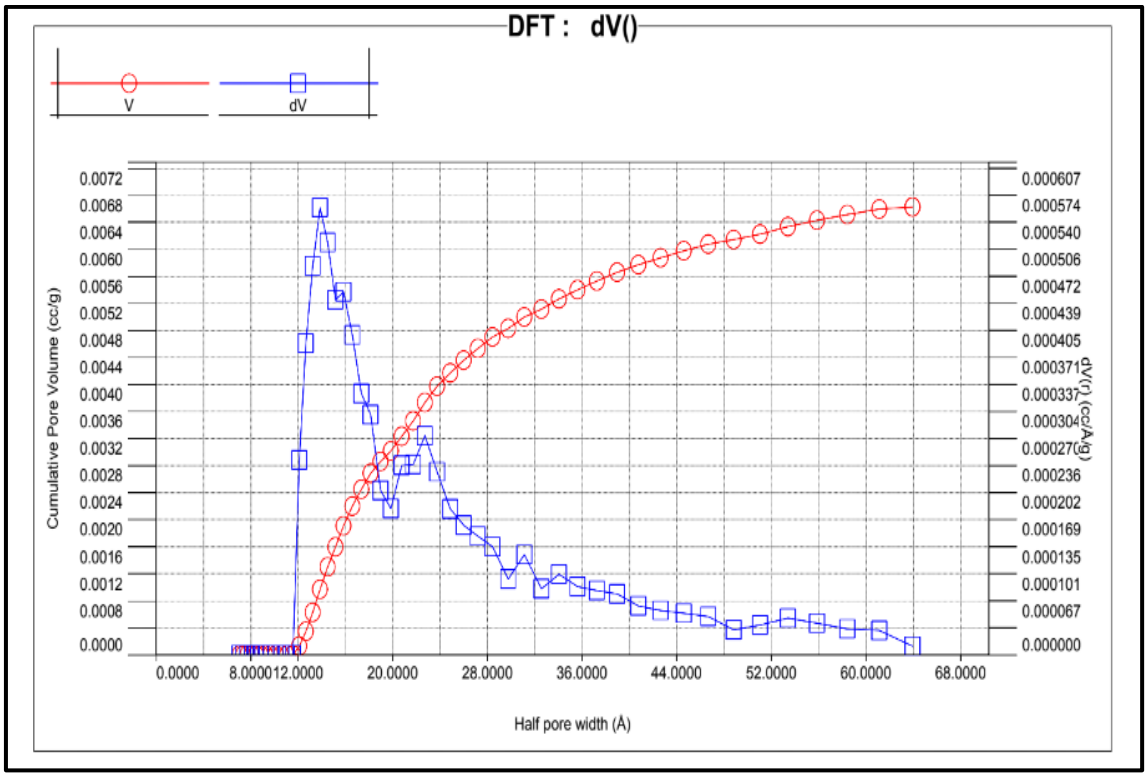
Şekil 4.59. F4-TF formülasyonunun adsorpsiyon-dezorpsiyon izotermi



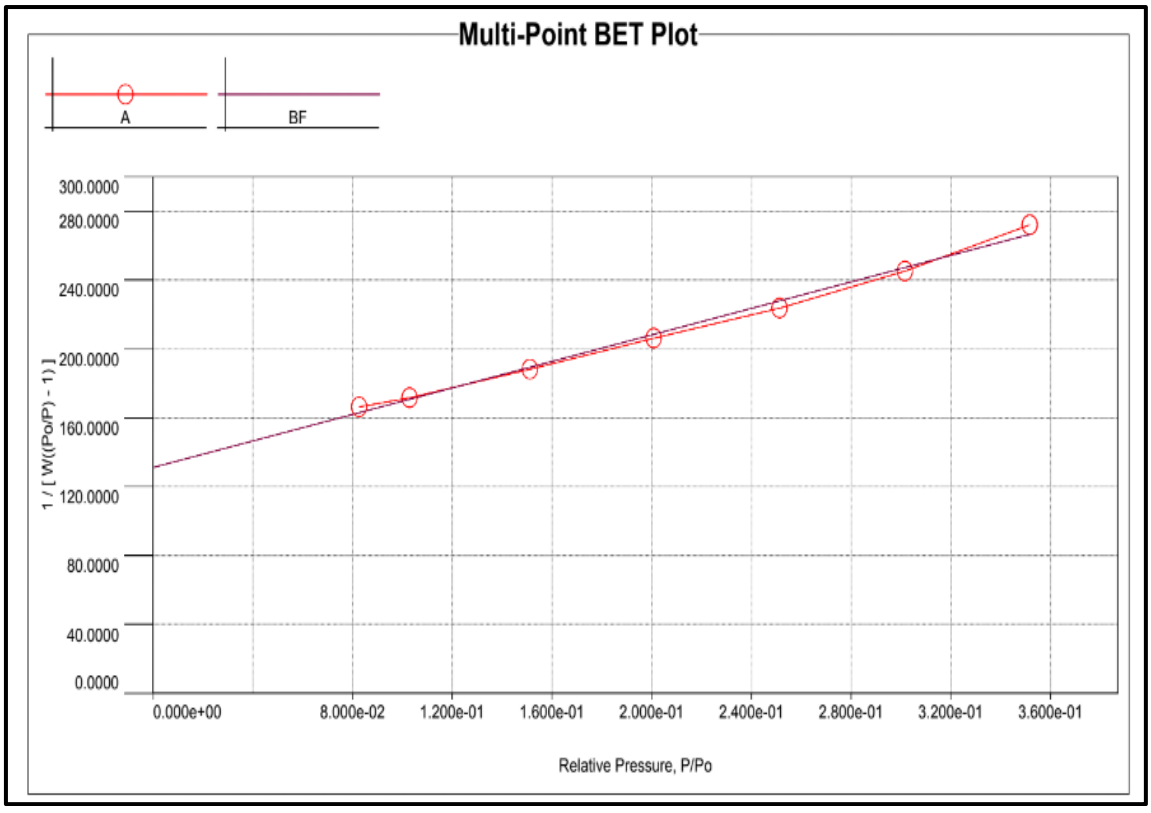
Şekil 4.60. M2-TF formülasyonunun por çapı genişliği – kümülatif por hacmi grafiği



Şekil 4.61. M2-TF formülasyonunun adsorpsiyon-dezorpsiyon izotermi



Şekil 4.62. S1-TF formülasyonunun por çapı genişliği – kümülatif por hacmi grafiği

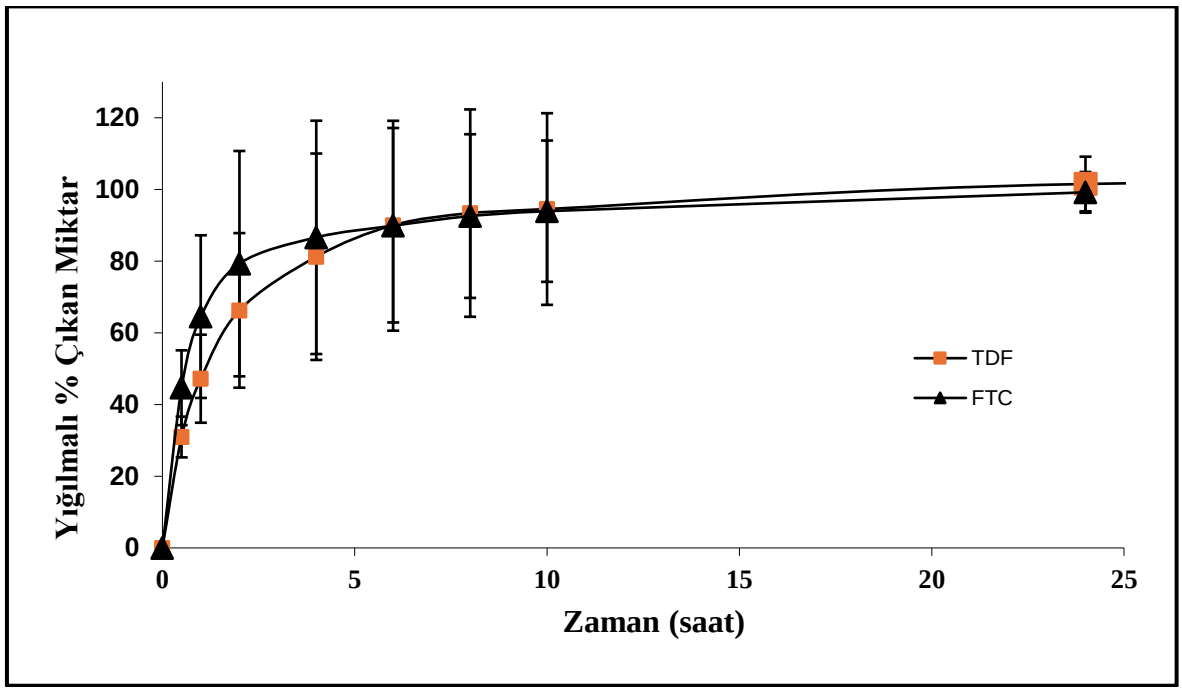


Şekil 4.63. S1-TF formülasyonunun adsorpsiyon-dezorpsiyon izotermi

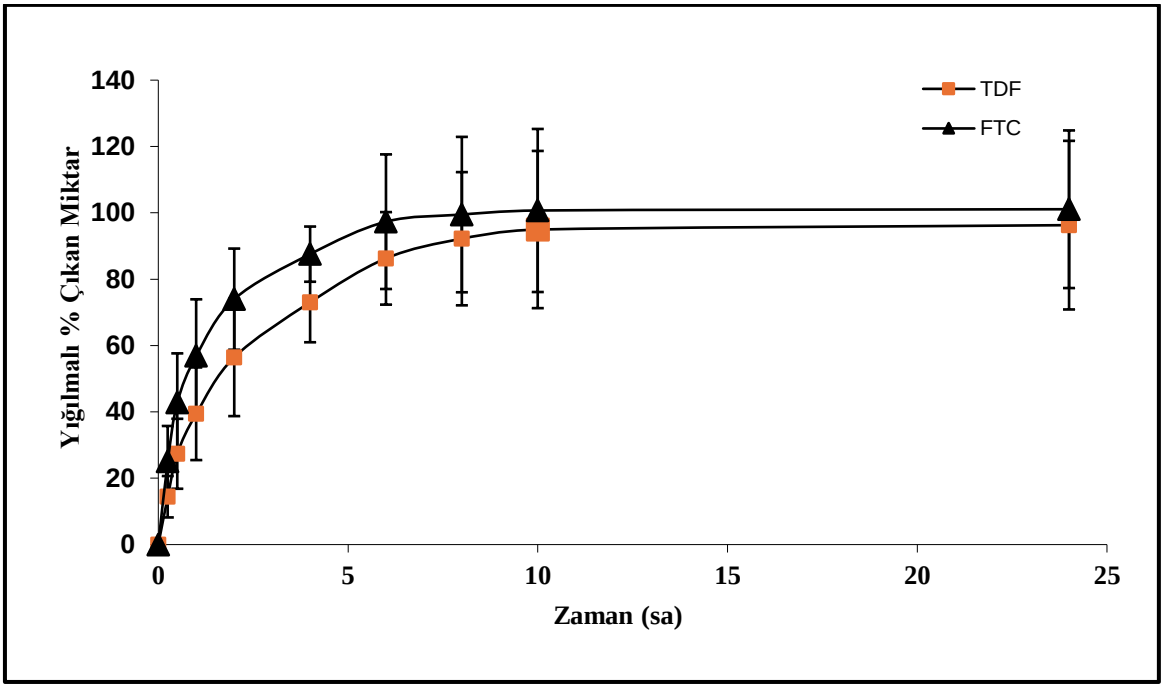
4.7.6. Franz difüzyon hücresinde yapılan in vitro salım çalışmaları

Bölüm 3.9.6.'da anlatıldığı gibi SVS ortamında yapılan ve diyaliz membrandan etkin maddelerin geçişlerine ait profiller Şekil 4.64 – 4.77 arasında ve Çizelge 4.40'te verilmiştir.

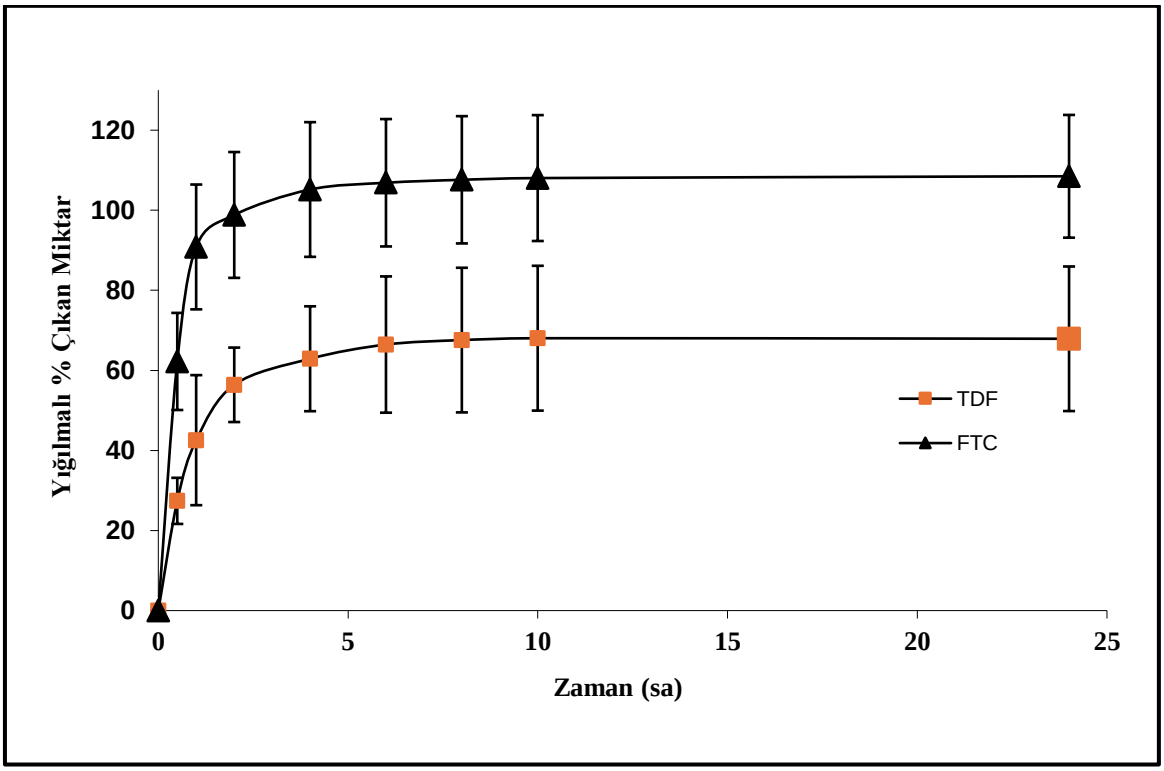
PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonlarının diyaliz membrandan salım profilleri



Şekil 4.64. F1-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

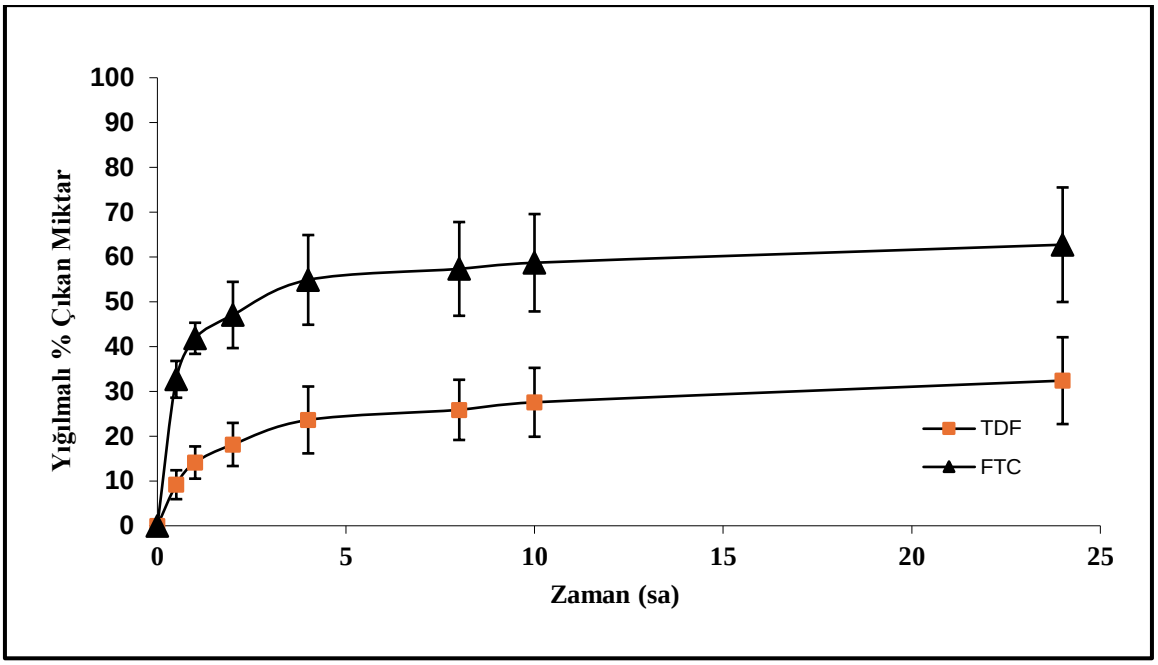


Şekil 4.65. F2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

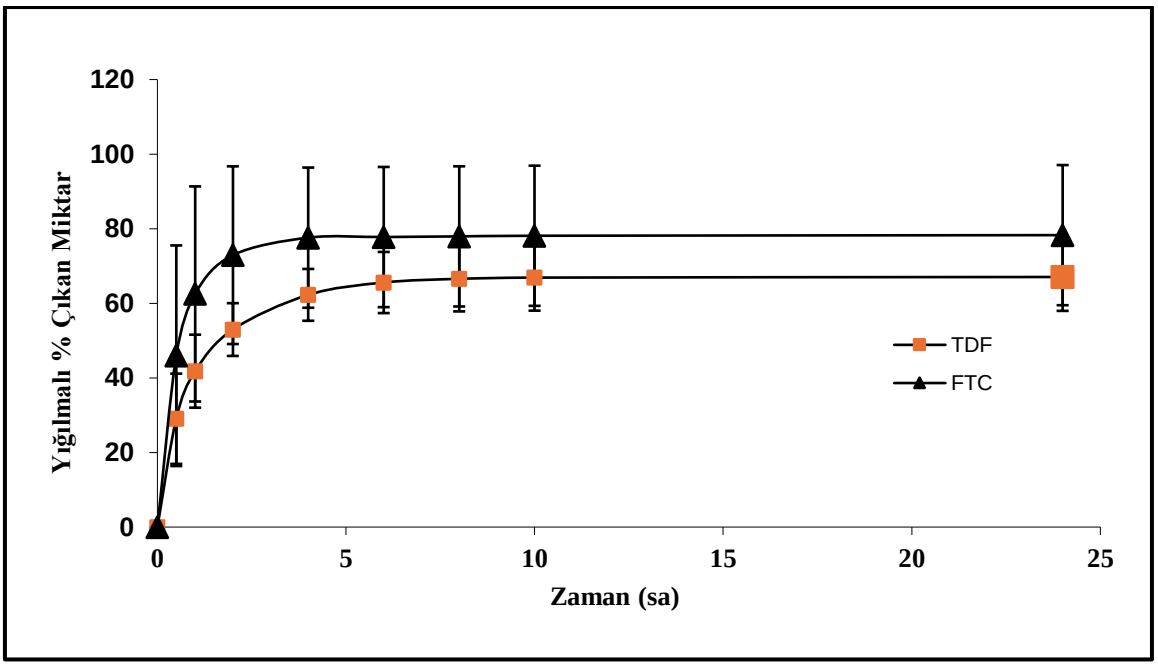


Şekil 4.66. F4-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

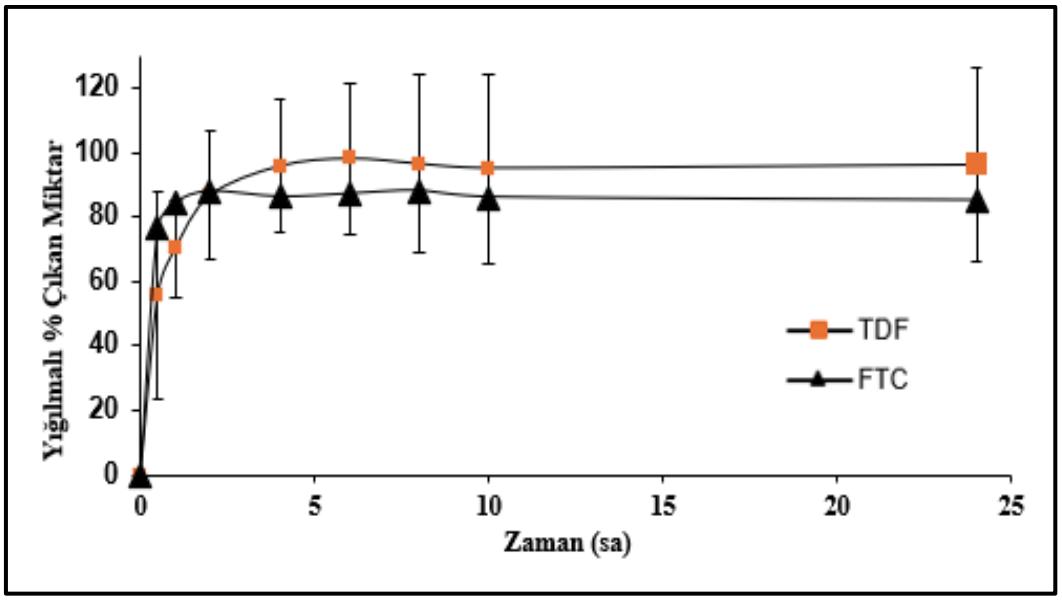
Zein bazlı nanolif formülasyonlarının diyaliz membrandan salım profilleri



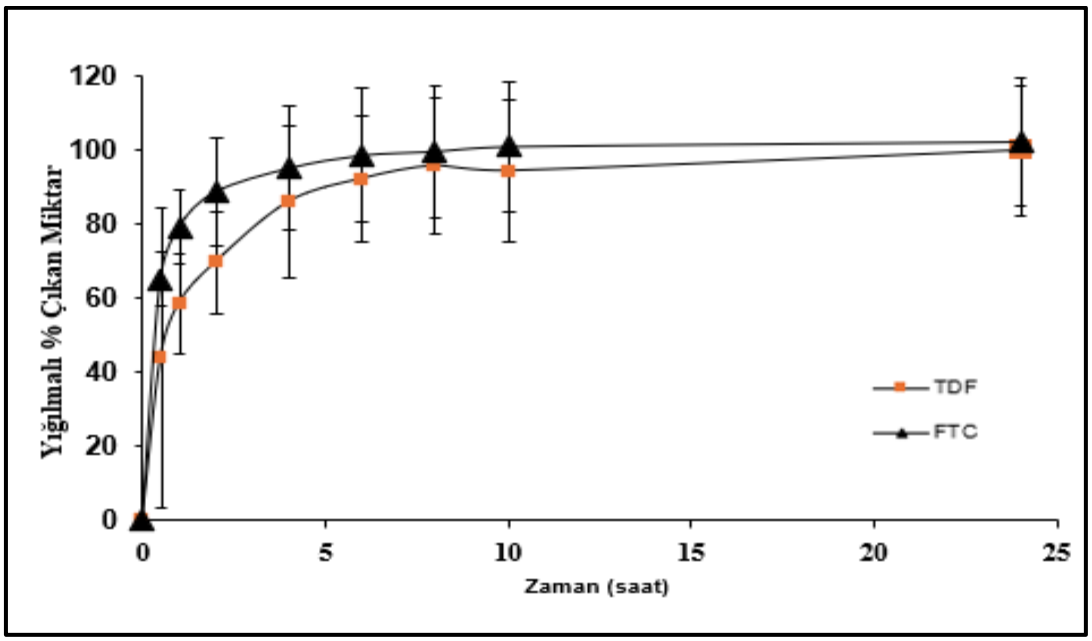
Şekil 4.67. Z2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)



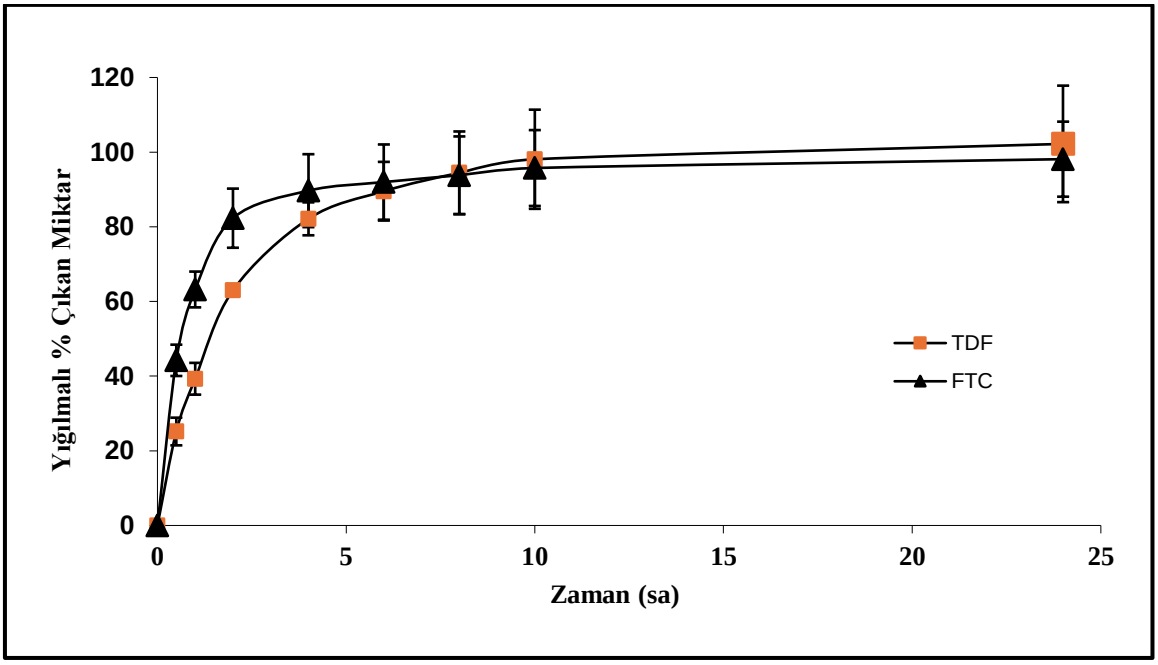
Şekil 4.68. ZK7-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.69. ZK8-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

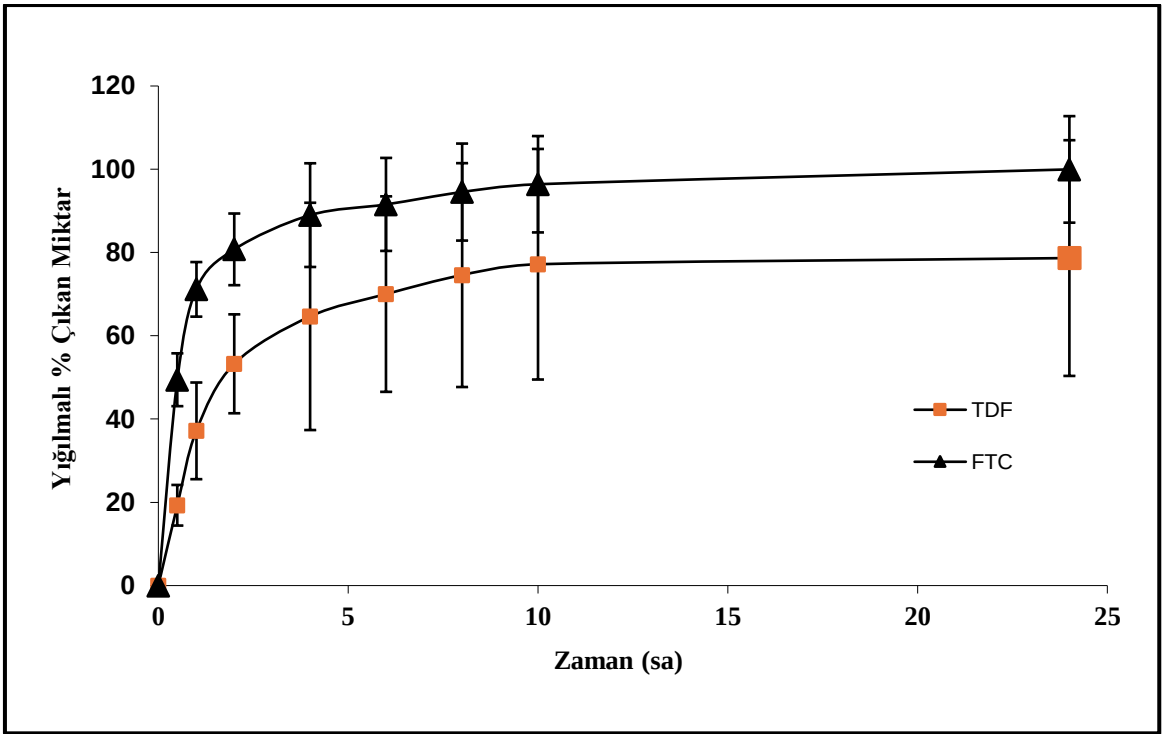


Şekil 4.70. ZK9-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

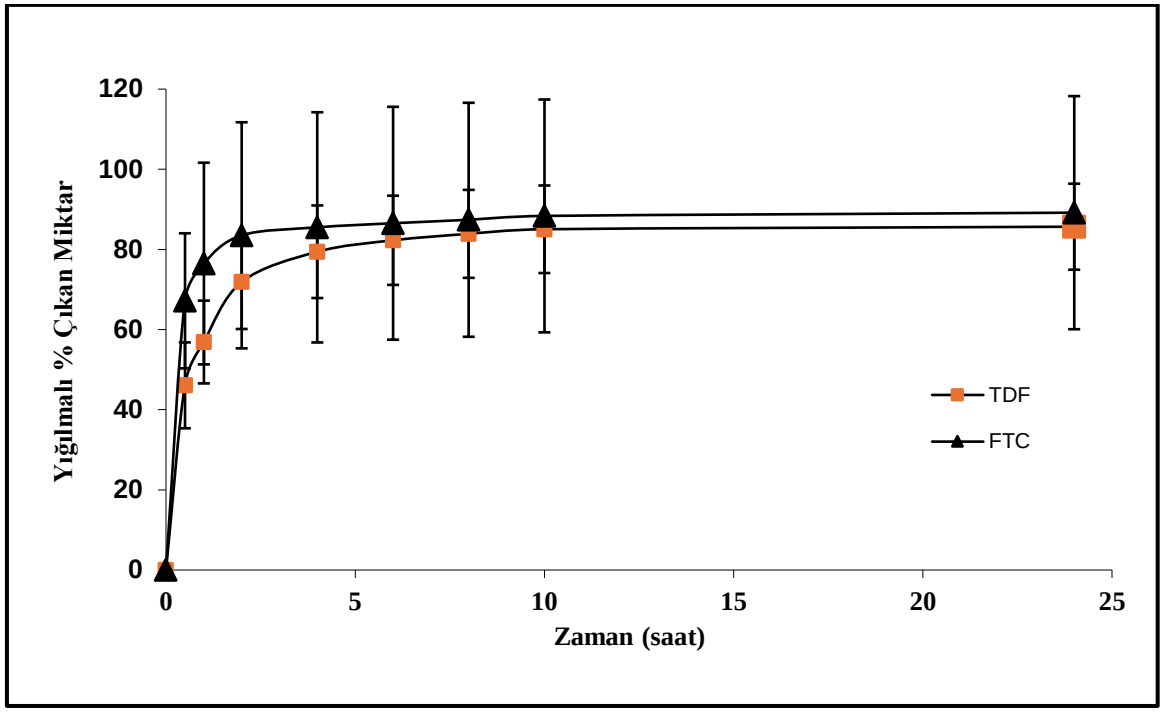


Şekil 4.71. ZK10-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonlarının diyaliz membrandan salım profilleri

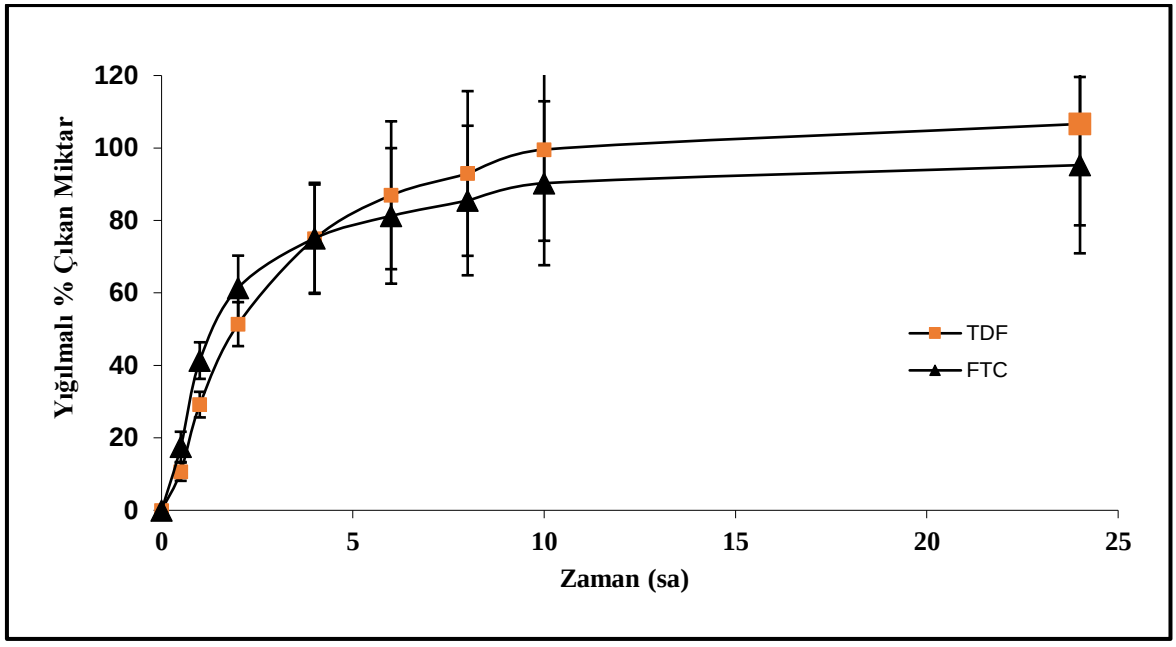


Şekil 4.72. M1-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

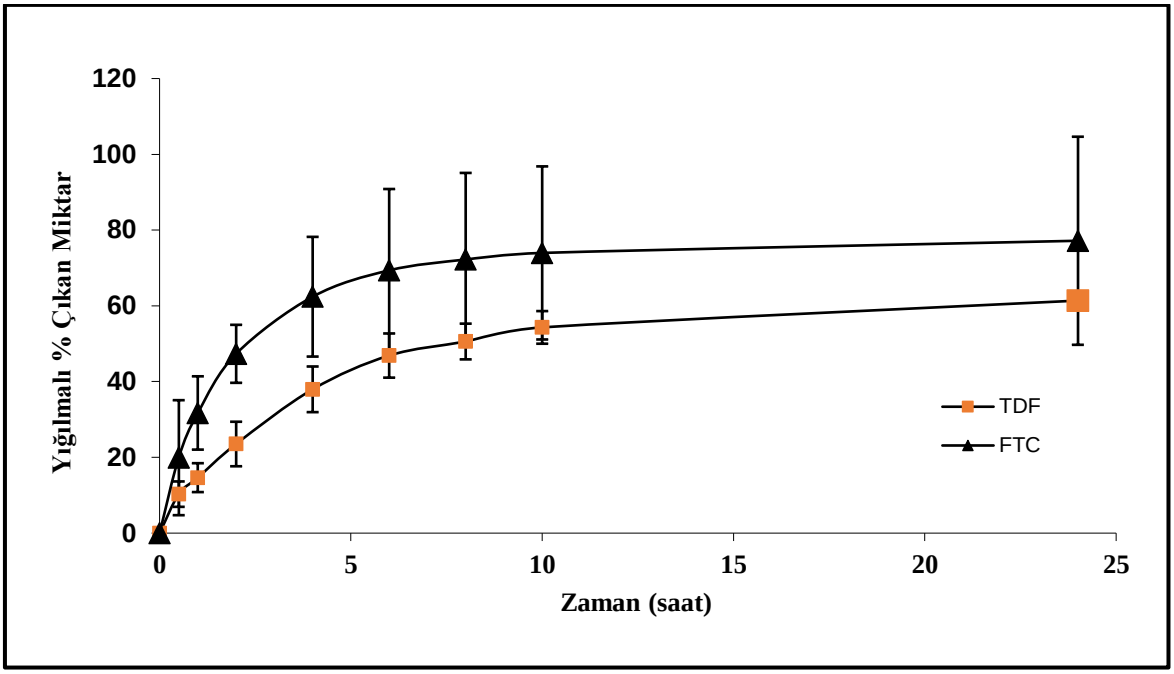


Şekil 4.73. M2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

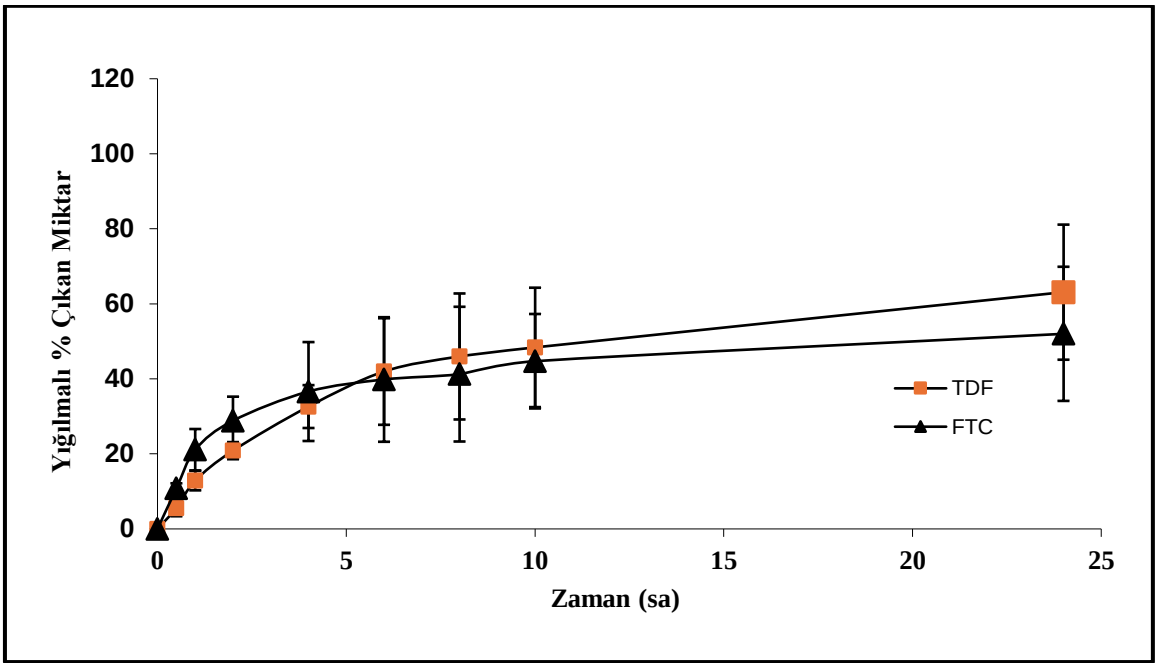
Tabakalı PLGA nanolif formülasyonlarının diyaliz membrandan salım profilleri



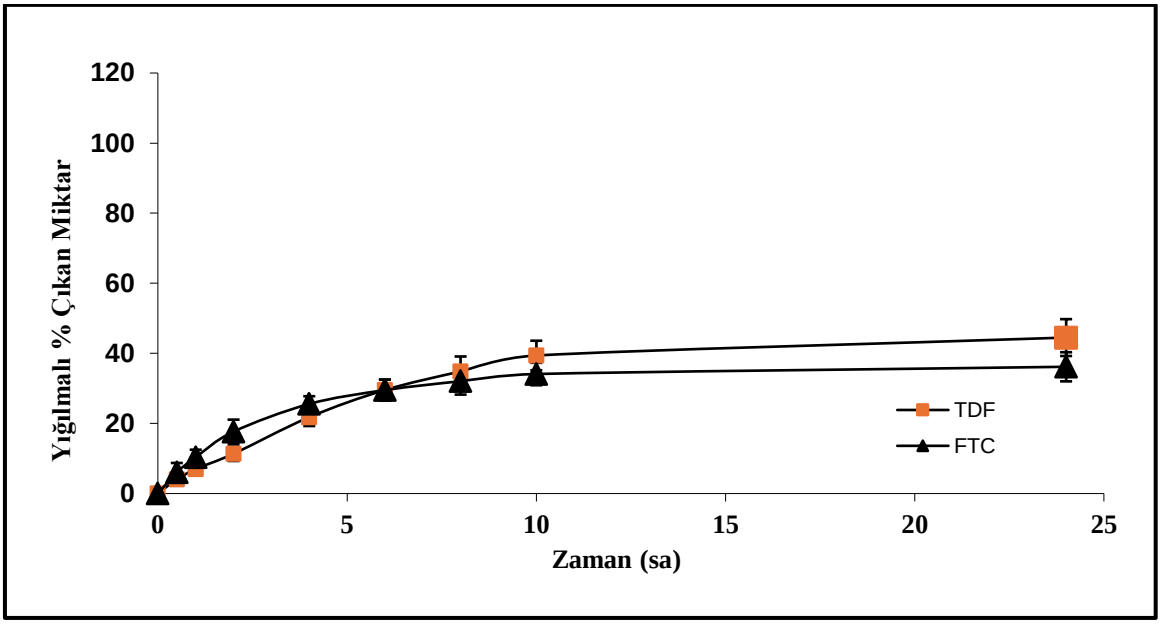
Şekil 4.74. S1-TF (in vivo D grubu) nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.75. S2-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.76. S3-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.77. S4-TF nanolif formülasyonundan etkin maddelerin salım profilleri (n=3, Ort±SS)

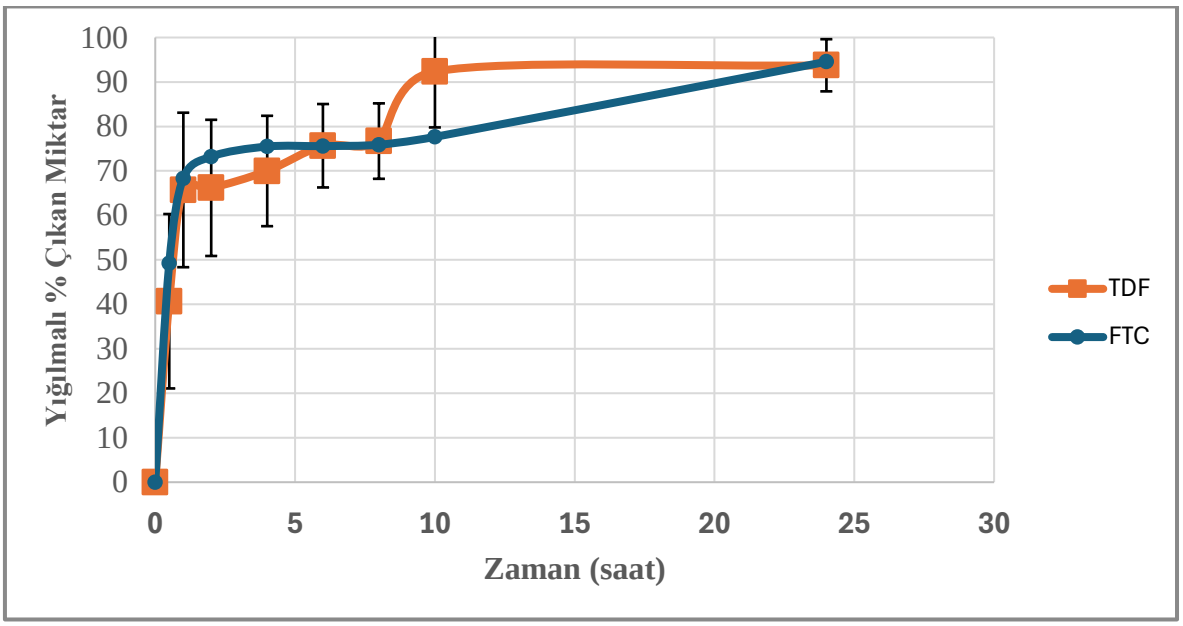
Çizelge 4.40. Franz difüzyon hücresi ile salım çalışması yapılan formülasyonların 8. saat ve 24. saatte % yığılmalı çıkan miktarları

Formülasyon Kodu	İlk 8 saatlik % yığılmalı çıkan miktar		24 saatlik % yığılmalı çıkan miktar	
	TDF	FTC	TDF	FTC
F1-TF	93,404±17,156	92,578±13,541	101,525±4,522	99,191±3,386
F2-TF	92,199±11,908	99,745±13,893	96,292±15,077	101,087±11,094
F4-TF	90,078±18,013	95,365±16,822	94,602±18,663	98,845±16,773
Z2-TF	25,872±3,985	57,329±6,205	32,397±5,748	63,732±7,582
ZK7-TF	66,565±5,181	77,944±11,148	67,058±5,389	78,282±11,150
ZK8-TF	88,101±6,455	88,02±10,42	89,121±14,256	89,116±10,679
ZK9-TF	95,816±10,947	99,937±10,413	99,937±10,413	102,422±10,324
ZK10-TF	93,812±6,167	94,449±3,578	98,118±5,962	102,210±9,256
M1-TF	74,578±15,947	85,501±12,241	78,669±16,792	95,267±14,433
M2-TF	83,878±6,511	87,389±17,316	85,662±6,365	89,165±17,251
S1-TF	67,488±4,988	93,55±6,86	79,849±9,745	99,575±6,598
S2-TF	45,971±4,789	60,963±5,667	57,443±4,613	65,465±4,985
S3-TF	45,971±9,960	41,259±10,651	63,112±10,679	52,006±10,604
S4-TF	34,838±2,536	32,058±2,265	44,507±3,121	36,172±2,466

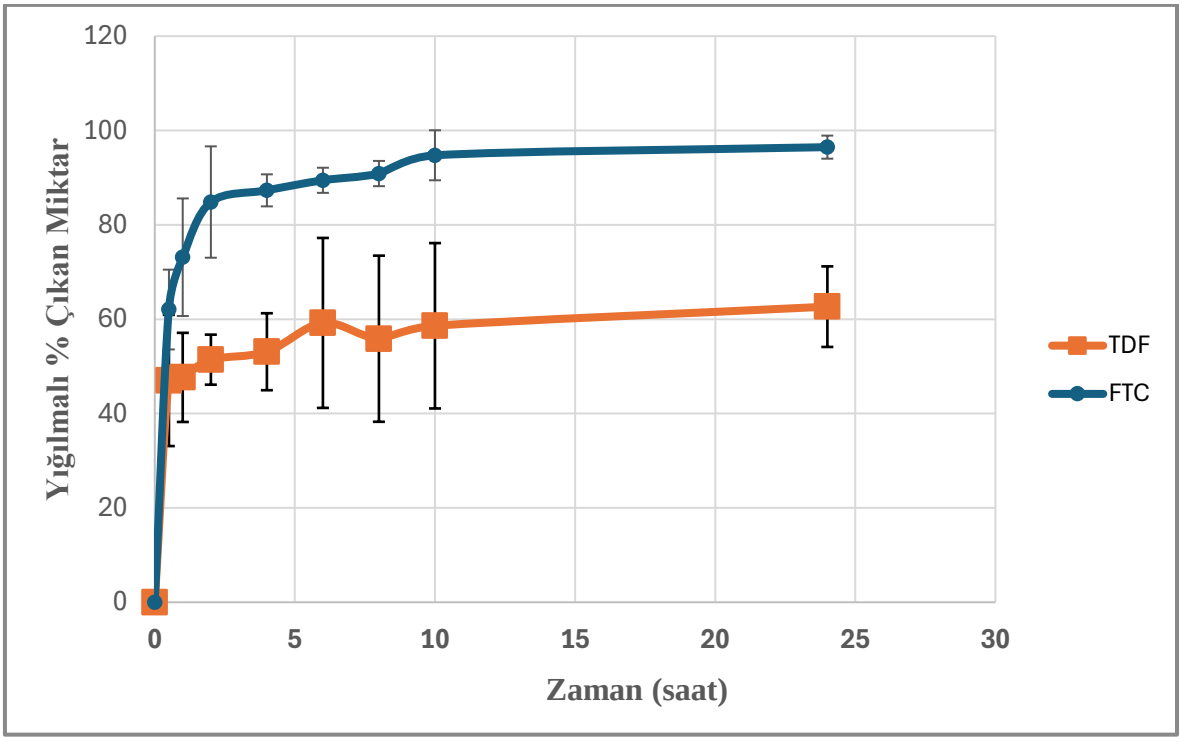
4.7.7. USP sepet yöntemi ile yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları ve salım kinetiklerine göre değerlendirmeler

Seçilen optimum formülasyonda USP Aparatus I (Sepet yöntemi) kullanılarak çözünme hızı çalışmaları Bölüm 3.9.7'de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Salım sonuçları Şekil 4.78-4.80 arasında ve Çizelge 4.41'te verilmiştir.

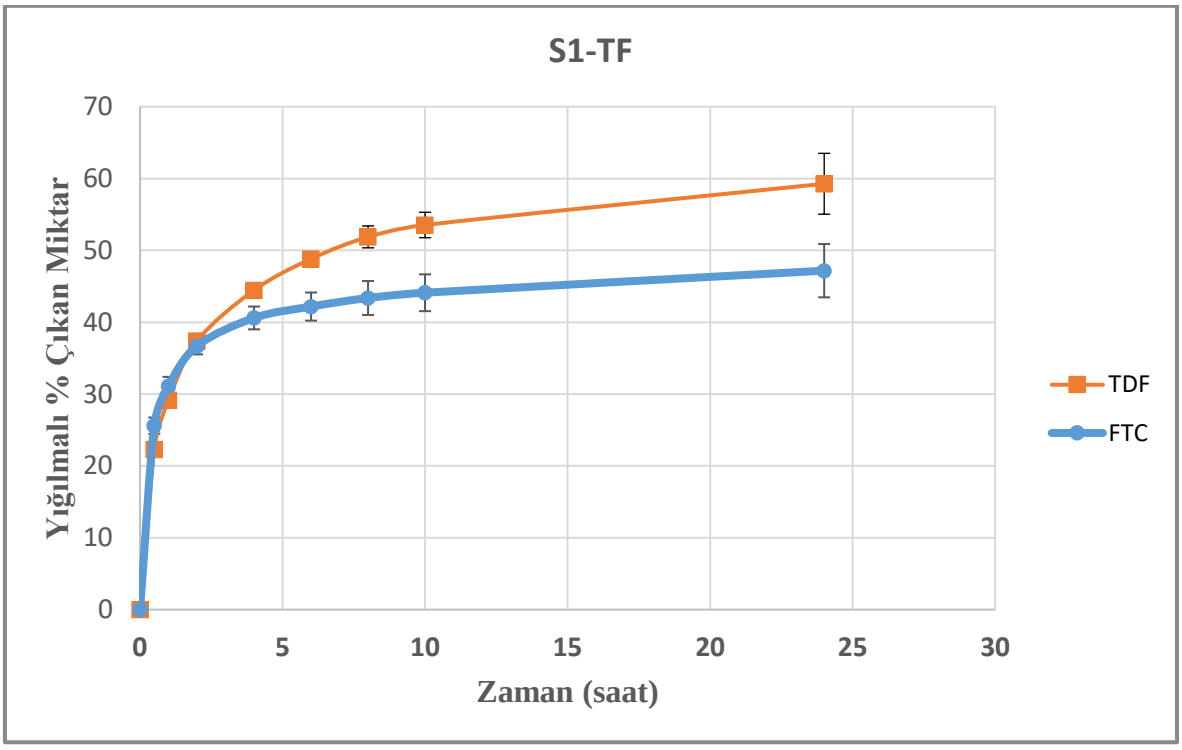
USP sepet yöntemi ile in vitro salım çalışmaları



Şekil 4.78. F4-TF formülasyonundan TDF ve FTC'nin in vitro çözünme hızı profili (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.79. M2-TF formülasyonundan TDF ve FTC'nin in vitro çözünme hızı profili (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.80. S1-TF formülasyonundan TDF ve FTC'nin in vitro çözünme hızı profili (n=3, Ort±SS)

Çizelge 4.41. Sepet yöntemi ile çözünme hızı çalışması ile yapılan formülasyonların 8. saat ve 24. saatte % yığılmalı çıkan miktarları

Formülasyon Kodu	İlk 8 saatlik % yığılmalı çıkan miktar		24 saatlik % yığılmalı çıkan miktar	
	TDF	FTC	TDF	FTC
F4-TF	76,708±8,480	75,886±8,396	93,755±5,865	94,645±31,974
M2-TF	55,867±17,604	90,872±2,675	62,661±8,537	96,470±2,445
S1-TF	51,88±1,52	43,375±2,359	59,272±4,235	47,173±3,709

Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

Formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ile salım kinetikleri Bölüm 3.9.7.'de belirtildiği gibi kinetik modellere göre analizleri yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.42 ve Çizelge 4.43'te verilmiştir.

Çizelge 4.42. TDF'nin nanolif formülasyonların farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları

Kinetik Model-TDF	Değerlendirme Kriteri	F4-TF	M2-TF	S1-TF
Sıfırıncı Derece	r^2	1,40	2,66	0,8478
	r^2_{adj}	1,40	2,66	0,84
	AIC	89,13	85,29	78,91
	MSC	2,08	3,233	1,58
Birinci Derece	r^2	0,35	1,082	0,14
	r^2_{adj}	0,39	1,082	0,14
	AIC	76,73	80,22	72,08
	MSC	0,70	2,67	0,82
Higuchi	r^2	0,31	0,36	0,59
	r^2_{adj}	0,31	0,35	0,59
	AIC	77,94	76,35	65,55
	MSC	77,94	2,24	0,093
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,95	0,99	0,972
	r^2_{adj}	0,95	0,99	0,968
	AIC	55,43	28,62	43,27
	MSC	1,67	3,062	2,383
Hixson-Crowell	r^2	0,15	1,37	0,069
	r^2_{adj}	0,15	1,37	0,069
	AIC	79,72	81,36	74,08
	MSC	1,03	2,79	1,040
Weibull	r^2	0,96	0,99	0,993
	r^2_{adj}	0,95	0,99	0,991
	AIC	55,66	32,30	32,69
	MSC	1,64	2,65	3,559

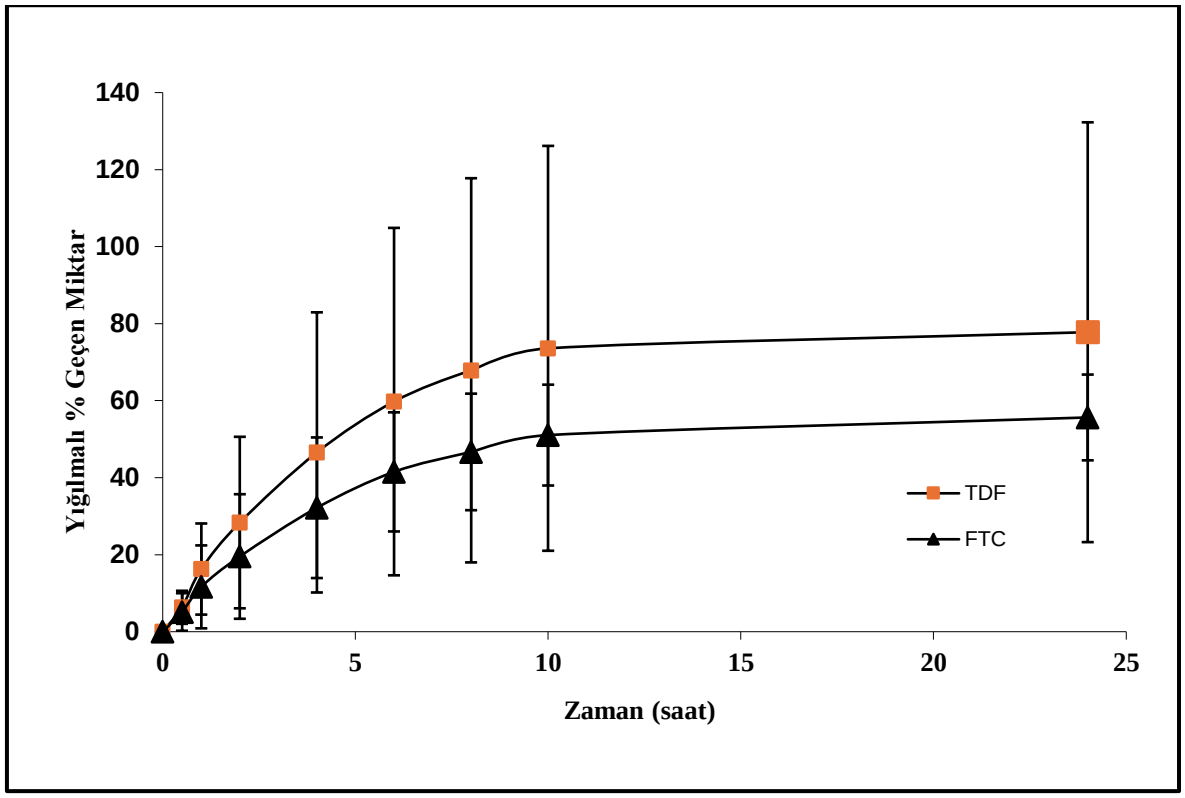
Çizelge 4.43. FTC'nin nanolif formülasyonların farklı salım kinetiklerine göre değerlendirme sonuçları

Kinetik Model-FTC	Değerlendirme Kriteri	F4-TF	M2-TF	S1-TF
Sıfırıncı Derece	r^2	1,95	2,659	1,861
	r^2_{adj}	1,95	2,659	1,861
	AIC	89,93	85,292	78,48
	MSC	2,59	3,233	2,465
Birinci Derece	r^2	0,00	0,098	0,856
	r^2_{adj}	0,006	0,098	0,856
	AIC	80,12	81,197	74,58
	MSC	1,51	1,604	2,032
Higuchi	r^2	0,011	0,212	0,114
	r^2_{adj}	0,011	0,212	0,114
	AIC	80,08	83,858	67,93
	MSC	1,50	1,900	1,293
Korsmeyer-Peppas	r^2	0,975	0,983	0,983
	r^2_{adj}	0,963	0,981	0,980
	AIC	51,14	47,239	34,52
	MSC	1,712	2,169	2,418
Hixson-Crowell	r^2	0,304	0,344	1,167
	r^2_{adj}	0,304	0,344	1,167
	AIC	82,568	84,785	75,978
	MSC	1,779	2,005	2,186
Weibull	r^2	0,969	0,997	0,992
	r^2_{adj}	0,959	0,996	0,989
	AIC	52,79	32,81	29,652
	MSC	1,528	3,77	2,9605

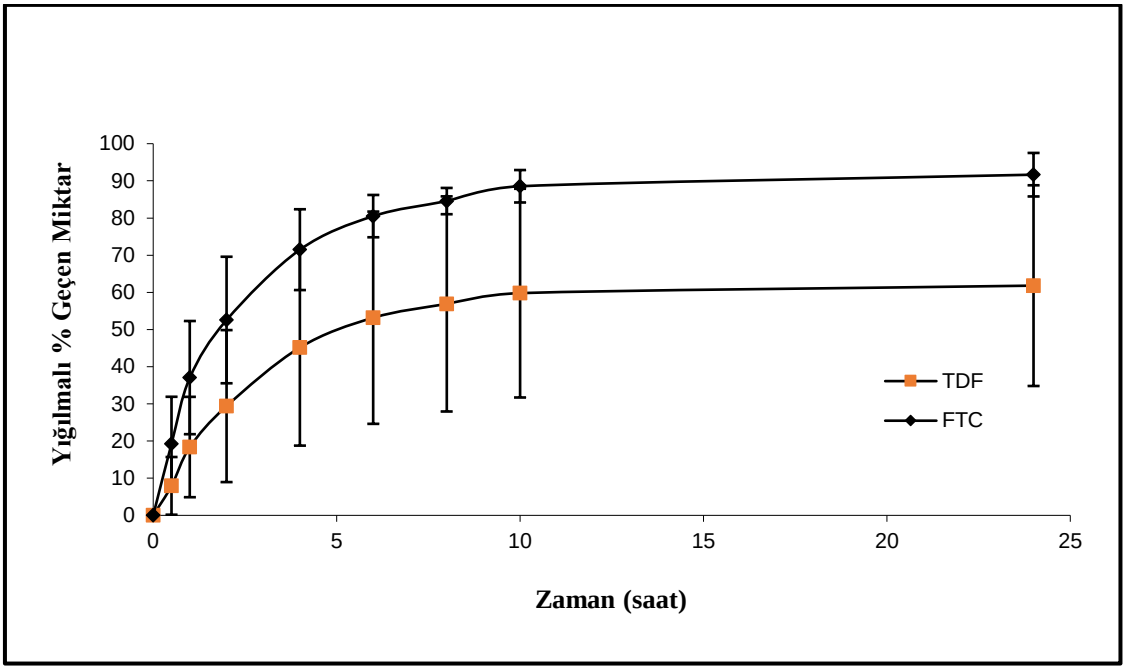
4.8. Nanolif Formülasyonlarında Yapılan Ex-vivo Çalışmalar

4.8.1. Ex-vivo permeabilite çalışmaları

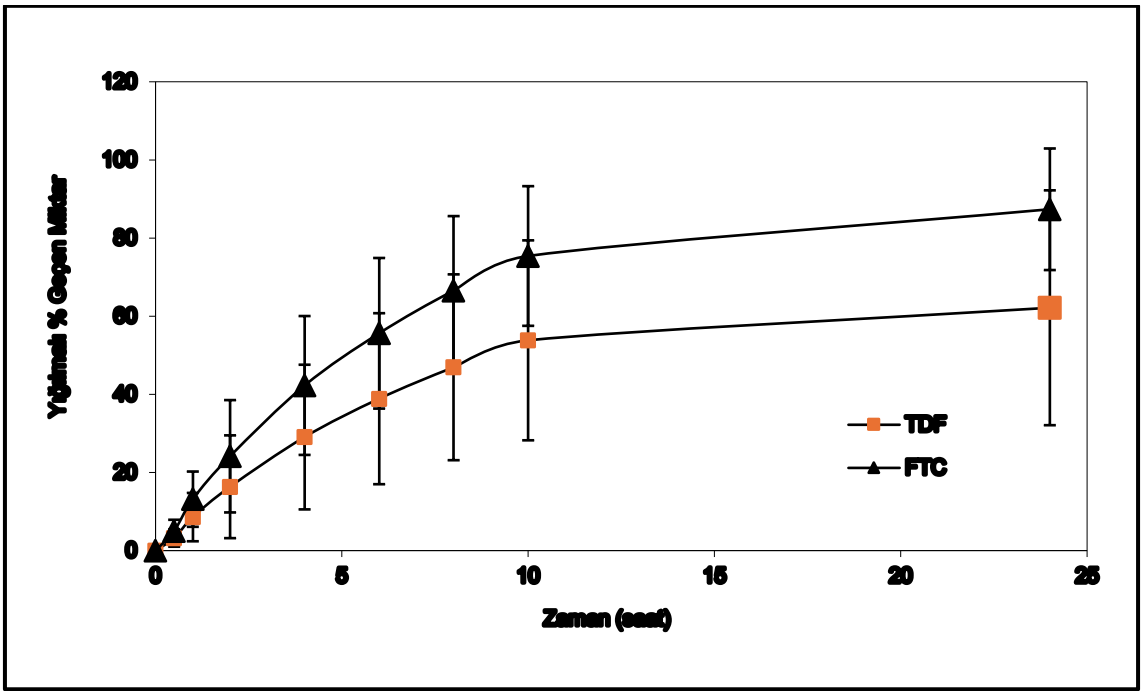
Seçilen formülasyonlarda gerçekleştirilen ex-vivo permeabilite çalışmaları Bölüm 3.10.1'de belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir ve permeabilite profilleri Şekil 4.81-4.83 arasında verilmiştir. Permeabilite ve akı değerleri hesaplanarak Çizelge 4.45'te gösterilmiştir.



Şekil 4.81. F4-TF nanolif formülasyonundan inek vajinal dokusundan permeabilite profili (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.82. M2-TF nanolif formülasyonundan inek vajinal dokusundan permeabilite profili (n=3, Ort±SS)



Şekil 4.83. S1-TF nanolif formülasyonundan inek vajinal dokusundan permeabilite profili (n=3, Ort±SS)

Çizelge 4.44. Ex-vivo permeabilite çalışmaları sonucunda formülasyonların 8. saat ve 24. saatte yığılmalı % geçen miktarları

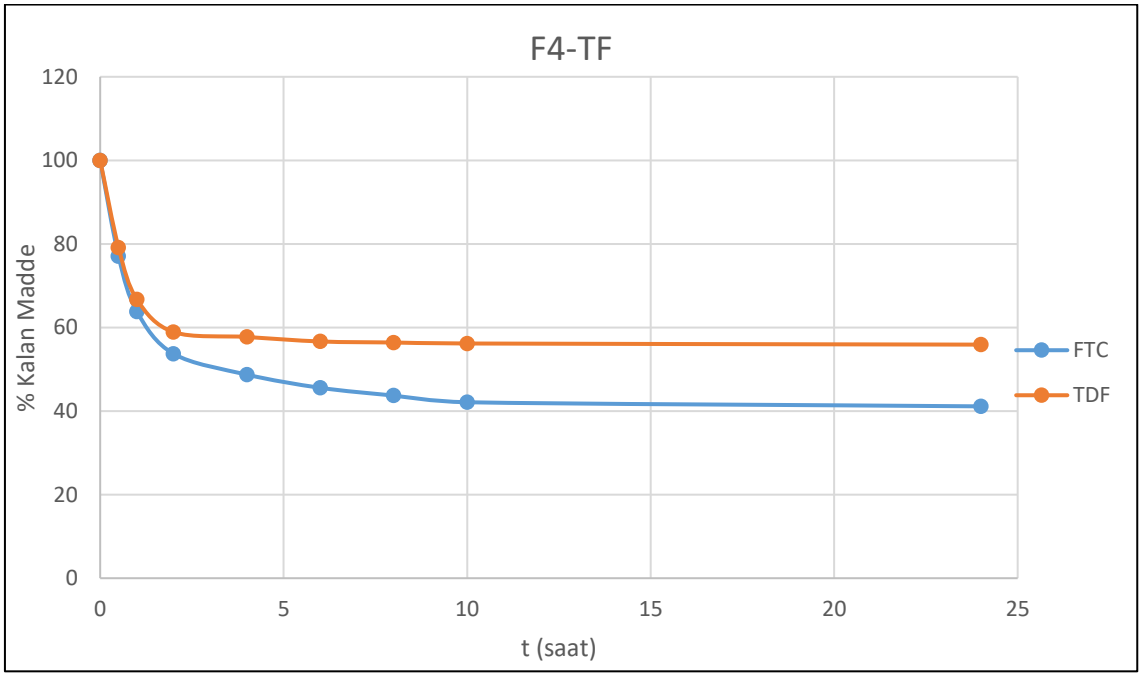
Formülasyon Kodu	İlk 8 saatlik % yığılmalı çıkan miktar		24 saatlik % yığılmalı çıkan miktar	
	TDF	FTC	TDF	FTC
F4-TF	67,876±29,588	46,685±8,978	77,773±32,335	55,635±6,601
M2-TF	56,879±17,166	84,552±2,096	61,805±16,016	91,653±3,472
S1-TF	46,925±14,107	66,546±11,313	62,16±17,83	87,371±9,228

Çizelge 4.45. Etkin maddelerin geçişinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen akı ve permeabilite katsayısı değerleri

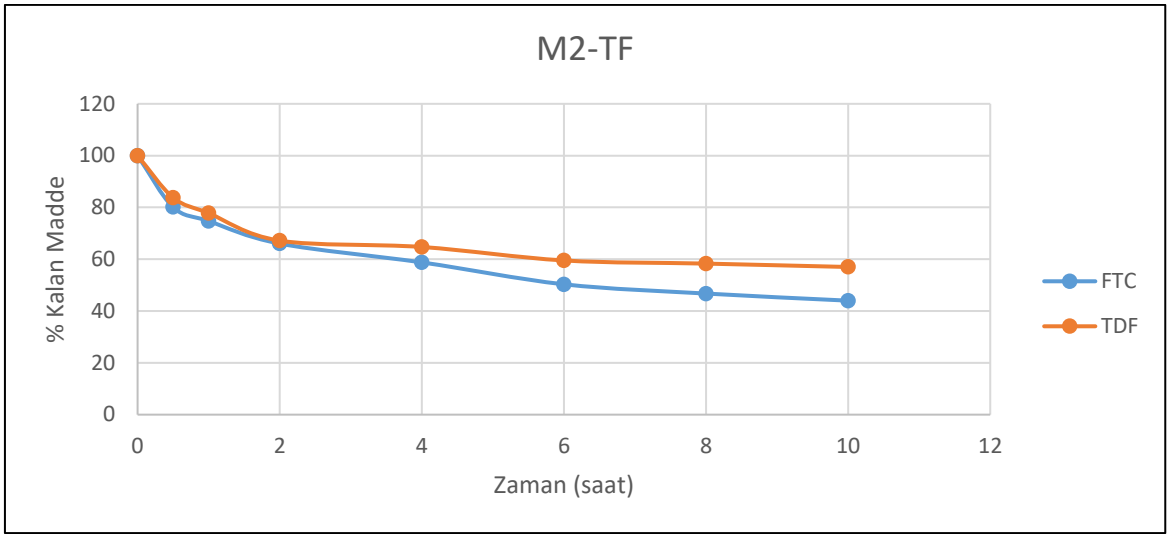
Formülasyon Kodu	Permeabilite Katsayısı ($cm.h^{-1}$)		Akı ($\mu g.cm^{-2}.h^{-1}$)	
	TDF	FTC	TDF	FTC
F4-TF	0,044±0,016	0,061±0,006	23,883±8,587	21,885±2,209
M2-TF	0,058±0,011	0,092±0,016	20,100±3,979	21,236±3,643
S1-TF	0,043±0,007	0,078±0,009	19,951±3,351	24,094±2,771

4.8.2. Ex vivo alıkonma çalışmaları

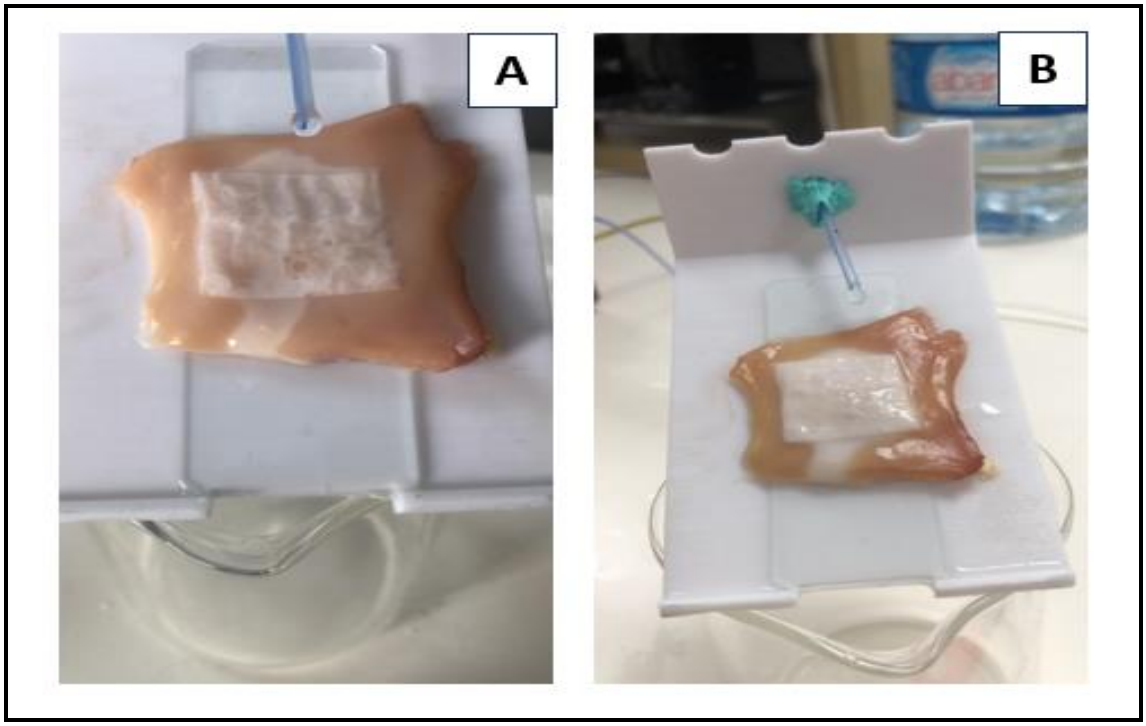
Alıkonma çalışmaları Bölüm 3.10.2'de anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.84-4.85 arasında verilmiştir (Resim 4.13).



Şekil 4.84. F4-TF Nanolif formülasyonu vajinal alıkonma çalışma sonuçları



Şekil 4.85. M2-TF Nanolif formülasyonundan vajinal alıkonma çalışma sonuçları



Resim 4.13. Alıkonma çalışması 1. saat (A) ve 10. saat (B) görüntüleri

4.8.3. Ex-vivo mukoadezyon çalışmaları

Ex-vivo mukoadezyon çalışmaları Bölüm 3.10.3'de belirtildiği şekilde gösterilmiştir.

PVA önformülasyon çalışmaları

Farklı PVA tipleri ile geliştirilen nanolif formülasyonlarının mukoadezyon işi sonuçları Çizelge 4.46'da verilmiştir.

Çizelge 4.46. Önformülasyon çalışmalarında hazırlanan formülasyonların mukoadezyon işi sonuçları

Formülasyon Kodu	Mukoadezyon İşi (mJ/cm^2)
P1	0,033±0,005
P2	0,118±0,097
P3	0,054±0,007
P4	0,075±0,005
P5	0,039±0,005
P6	0,144±0,030
P7	0,025±0,005
P8	0,027±0,005
P9	0,090±0,024

Deneysel tasarım ile geliştirilen PVA nanolif formülasyonları

Çizelge 4.47. Tasarım ile hazırlanan PVA nanolif formülasyonların mukoadezyon işi sonuçları

Formülasyon Kodu	Mukoadezyon İşi (mJ/cm^2)
RUN 1	0,014±0,010
RUN 2	0,037±0,009
RUN 3	0,194±0,060
RUN 4	0,029±0,010
RUN 5	0,054±0,016
RUN 6	0,086±0,003
RUN 7	0,052±0,019
RUN 8	0,123±0,016

PVA ile geliştirilen mukoadezif nanolif formülasyonları

PVA ile farklı polimerlerin kombinasyonu ile geliştirilen nanolif formülasyonların mukoadezyon sonuçları Çizelge 4.48'de verilmiştir.

Çizelge 4.48. PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

Formülasyon Kodu	Mukoadezyon İşi (mJ/cm^2)
F1	0,164±0,035
F2	0,136±0,022
F3	0,202±0,024
F4	0,225±0,011

TDF ve FTC üretilerek geliştirilen PVA bazlı nanolif formülasyonlarının mukoadezyon sonuçları Çizelge 4.49'da verilmiştir.

Çizelge 4.499. TDF ve FTC içeren PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyonları

Formülasyon Kodu	Mukoadezyon İşi (mJ/cm^2)
F1-TF	0,120±0,021
F2-TF	0,105±0,050
F3-TF	0,084±0,021
F4-TF	0,104±0,034

Zein bazlı nanolif formülasyonları

Zein ile hazırlanan nanolif formülasyonlarının mukoadezyon sonuçları Çizelge 4.50'de verilmiştir.

Çizelge 4.50. TDF ve FTC içeren zein bazlı formülasyonlardan seçilen optimum formülasyonların mukoadezyon sonuçları

Formülasyon Kodu	Mukoadezyon İşi (mJ/cm^2)
Z2-TF	0,048±0,0122
ZN3-TF	0,092±0,005
ZK3-TF	0,119±0,033
ZK8-TF	0,121±0,014
ZK9-TF	0,079±0,062

PLGA ile geliştirilen karışım nanolif formülasyonları

Çizelge 4.51. TDF ve FTC içeren PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonlarının mekanik karakterizasyonu

Formülasyon Kodu	Mukoadezyon İşi (mJ/cm^2)
M1-TF	0,041±0,008
M2-TF	0,122±0,033
M3-TF	0,065±0,012

PLGA ile geliştirilen tabakalı nanolif formülasyonları

PLGA ile hazırlanan tabakalı nanolif formülasyonlarının mukoadezyon sonuçları Çizelge 4.52'de verilmiştir.

Çizelge 4.52. PLGA bazlı formülasyonlardan mukoadezyon sonuçları

Formülasyon Kodu	Mukoadezyon İşi (mJ/cm^2)
S1-TF	0,159±0,214
S2-TF	0,130±0,025
S3-TF	0,147±0,09
S4-TF	0,148±0,017

4.9. Stabilite Çalışmaları

Tez çalışmalarımızda hazırlanan nanolif formülasyonlarının 4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nem ortamlarında saklanmış ve 1 ay boyunca görünüş, temas açısı, etkin madde miktar tayini ve mekanik özellikleri incelenmiştir. Stabilite çalışmaları sonuçları Çizelge 4.53-4.55 arasında yer almaktadır.

Çizelge 4.53.F4-TF nanolif formülasyonuna ait stabilite sonuçları

		Görünüş	Temas Açısı (°)	Miktar Tayini (µg/cm^2)	
				TDF	FTC
4°C/ortam nemi	Başlangıç	Beyaz	0	99,1±2,5	57,4±2,3
	1.ay	Beyaz	0	94,7±4,8	56,53±5,2
25° C/%60 bağıl nem	Başlangıç	Beyaz	0	99,1±2,5	57,4±2,3
	1.ay	Beyaz	0	101,6±1,2	54,53±2,8
40° C/%75 bağıl nem	Başlangıç	Beyaz	0	99,1±2,5	57,4±2,3
	1.ay	Beyaz	0	101,2±0,9	60,9±1,4

Çizelge 4.54. M2-TF nanolif formülasyonuna ait stabilite sonuçları

		Görünüş	Temas Açısı (°)	Miktar Tayini (µg/cm^2)	
				TDF	FTC
4°C/ortam nemi	Başlangıç	Beyaz	35,2±2,5	83,2±1,4	69,8±1,3
	1.ay	Beyaz	32,5±1,3	86,7±8,1	68,7±1,9
25° C/%60 bağıl nem	Başlangıç	Beyaz	35,2±2,5	83,2±1,4	69,8±1,3
	1.ay	Beyaz	34,5±1,3	84,4±2,6	68,5±1,1
40° C/%75 bağıl nem	Başlangıç	Beyaz	35,2±2,5	83,2±1,4	69,8±1,3
	1.ay	Beyaz	36,3±1,3	85,2±0,5	67,5±5,4

Çizelge 4.55.S1-TF nanolif formülasyonuna ait stabilite sonuçları

		Görünüş	Temas Açısı (°)	Miktar Tayini	
				TDF	FTC
4°C/ortam nemi	Başlangıç	Beyaz	0	106,4±1,8	86,4±8,1
	1.ay	Beyaz	0	107,5±2,6	85,7±6,4
25° C/%60 bağıl nem	Başlangıç	Beyaz	0	106,4±1,8	86,4±8,1
	1.ay	Beyaz	0	105,7±4,9	84,3±4,2
40° C/%75 bağıl nem	Başlangıç	Beyaz	0	106,4±1,8	86,4±8,1
	1.ay	Beyaz	0	103,9±6,5	87,6±2,4

4.10. İn-Vivo Deneyler

İn vivo çalışmalarda uygulanacak sonuç formülasyon seçilirken, TDF ve FTC ile yapılan formülasyon çalışmaları değerlendirilmiş ve şu sonuçlar ortaya çıkmıştır:

- Mukoadezif ve mekanik özellikleri vajinal uygulama için en uygun olan formülasyon F4-TF formülasyonu olduğu için in-vivo çalışmalarda değerlendirilmeye karar verildi.
- Vajinal dokudan geçiş çalışmalarında M2-TF formülasyonun akı değeri en yüksek olduğu için in-vivo çalışmalarda değerlendirilmesine karar verildi.
- Nanolif formülasyonlarının Franz difüzyon hücrelerinden salım çalışmaları değerlendirildiğinde ilk 8. saat ve 24. saat boyunca kontrollü salım sağlayan formülasyonun S1-TF formülasyonu olduğu bulunmuş ve in vivo çalışmalar için seçilmiştir. Ayrıca bu bulguyu dokudan geçiş çalışmalarımızda desteklemektedir. İnek vajinal dokusundan geçişi incelenen formülasyonundan 24 saat süresince etkin maddenin kontrollü geçiş yaptığı bulundu.
- PVA bazlı ve zein bazlı formülasyonlar etkin maddelerin tamamını kısa sürede saldıkları için in vivo çalışmalar için uygun bulunmamıştır. Ayrıca zein bazlı formülasyonunun mekanik özellikleri ve mukozadezyon gücü daha zayıf olduğu bulunmuştur. Bu nedenle in vivo uygulamalar için uygun bulunmamışlardır.
- İn vivo çalışmalarda kontrol amacıyla serum fizyolojik çözeltisi uygulanmıştır. Bu uygulamanın nedeni TDF ve FTC içeren liflerdeki histolojik ve biyokimyasal farklılıkların değerlendirilmesinin istenmesidir.

İn-vivo çalışmalarda:

- C grubuna; TDF ve FTC içeren piyasa preparatı Truvada® oral olarak uygulanmıştır.
- D grubuna; TDF ve FTC içeren katlı lif formülasyonu S1-TF uygulanmıştır.
- E grubuna; TDF ve FTC içeren PVA-PEO lif formülasyonu olan F4-TF uygulanmıştır.
- F grubuna; TDF ve FTC içeren PLGA-PEO lif formülasyonu olan M2-TF uygulanmıştır.

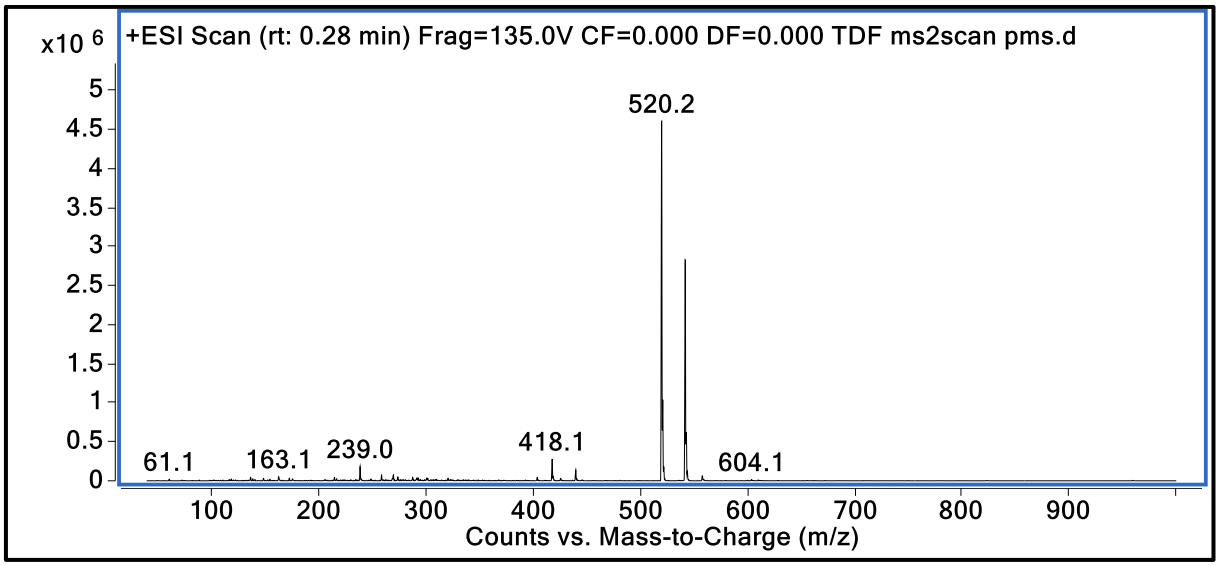
4.10.1. Analiz metot geliştirilmesi

Tenefovir Disoproxil Fumarate, Tenefovir ve Emtricitabine için yapılan optimizasyon sonucunda en uygun parametreler belirlenerek numune analizleri tamamlanmıştır. Kullanılan Çoklu Reaksiyon Takibi, MRM geçişleri ve voltaj değerleri Çizelge 4.56'da verilmiştir.

Çizelge 4.56. Çoklu Reaksiyon Takibi, MRM geçişleri ve voltaj değerleri

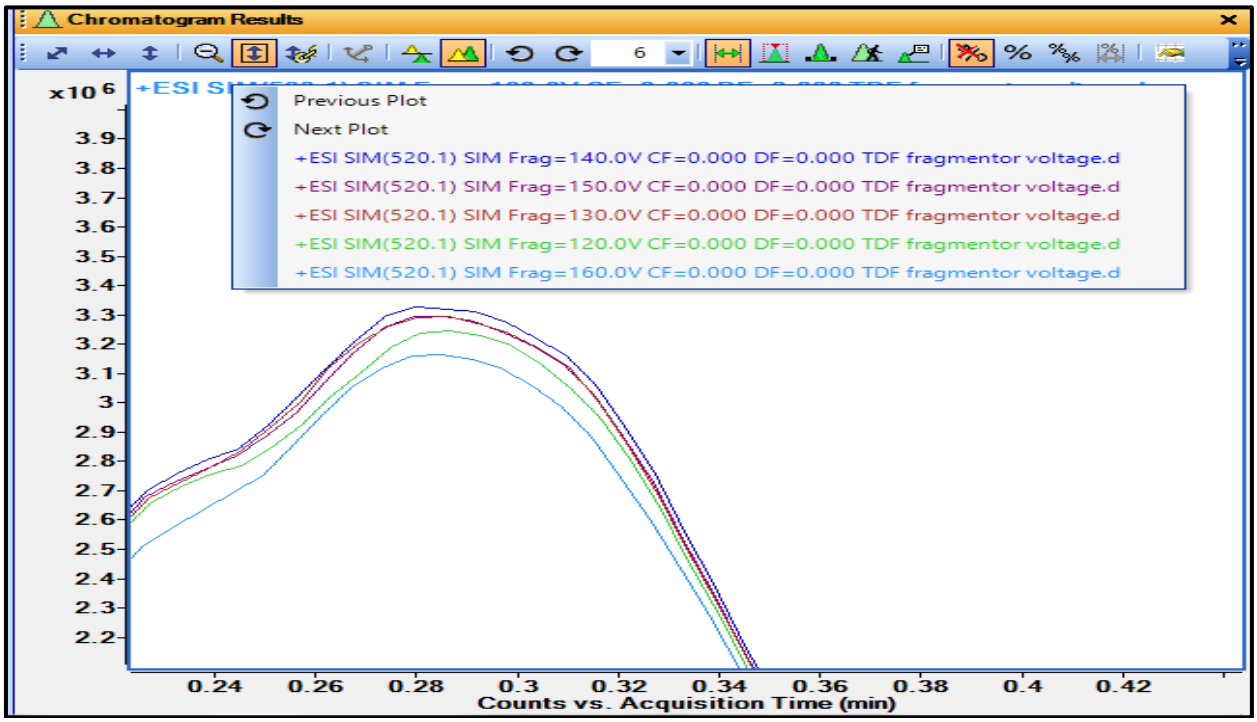
Madde	Ana iyon	Parçalanma iyonu	Okuma süresi, ms	Fragmentor (V)	CE (V)	Polarite
TDF	520	288	25	140	21	Positive
TDF	520	270	25	140	21	Positive
TDF	520	176	25	140	25	Positive
FTC	248	130	25	100	6	Positive
FTC	248	113	25	100	39	Positive
ISTD	220	128	25	90	12	Positive
ISTD	220	82	25	90	30	Positive

Elde edilen bu parametreler için uygulanan enjeksiyon sonuçları sırasıyla Ana iyon, Fragmentor voltaj, Parçalanma (ürün, product) iyonlarının ve bu iyonlar için uygun parçalanma voltajı belirlenmesi aşağıda sırasıyla verilmiştir. TDF ana iyon spektrumu, 520.2 ana iyon olarak belirlenmiştir (Şekil 4.86).



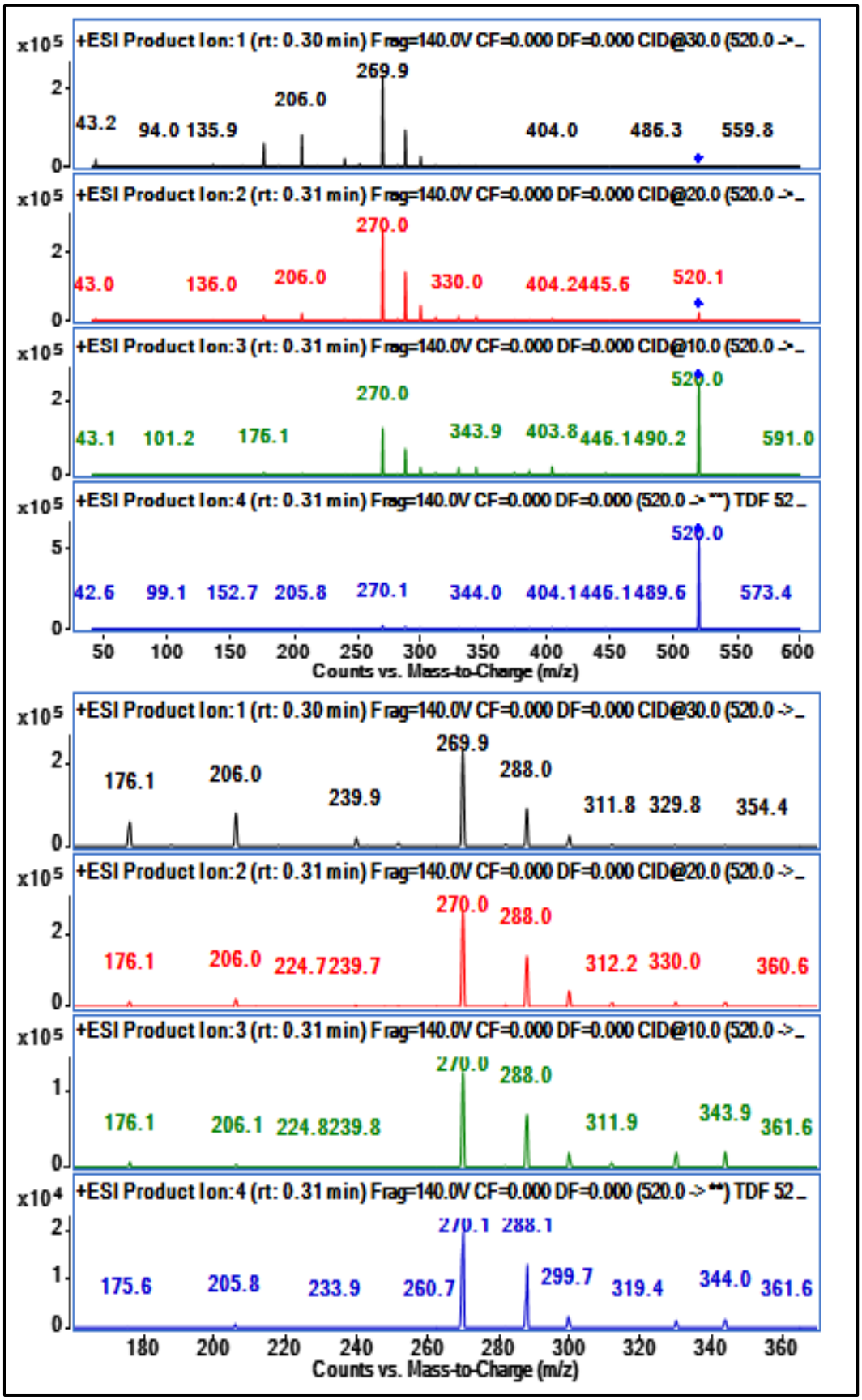
Şekil 4.86. TDF ana iyon spektrumu

TDF analizinde fragmentor voltaj spektrumu, 140V optimum değer olarak belirlenmiştir (Şekil 4.87).



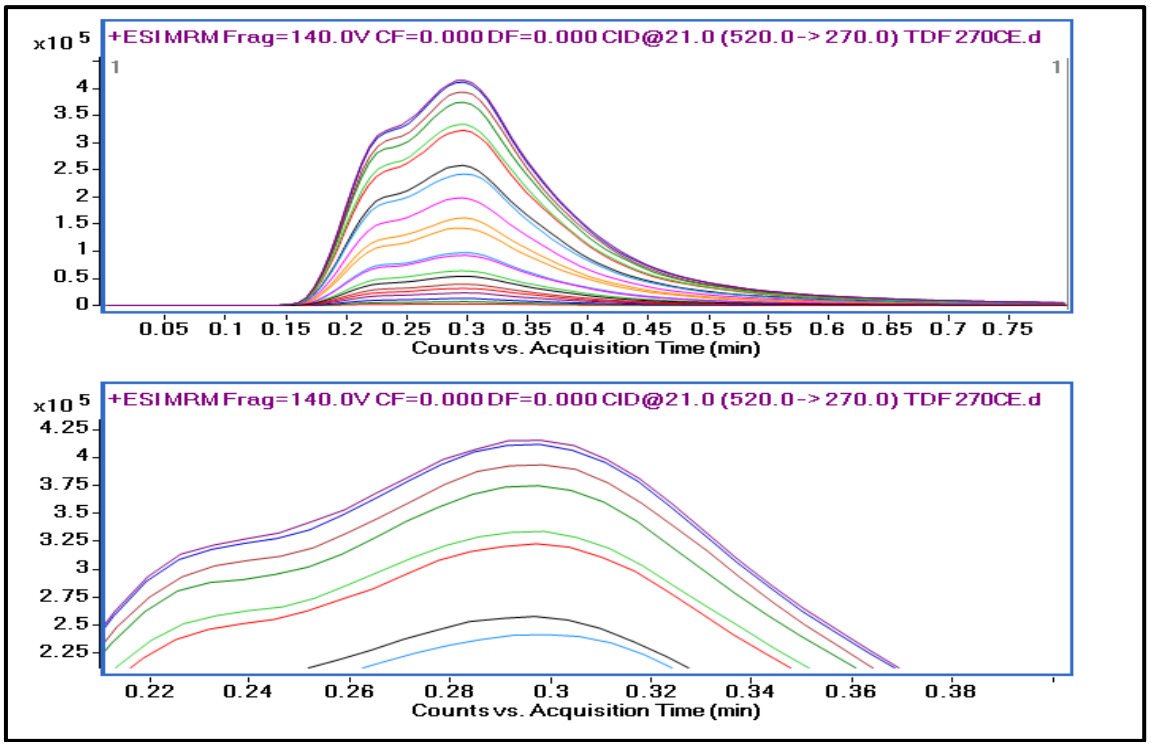
Şekil 4.87. TDF analizinde fragmentor voltaj spektrumu

TDF parçalanma iyonları spektrumu, 270, 288 ve 176 iyonu seçilmiştir (Şekil 4.88).



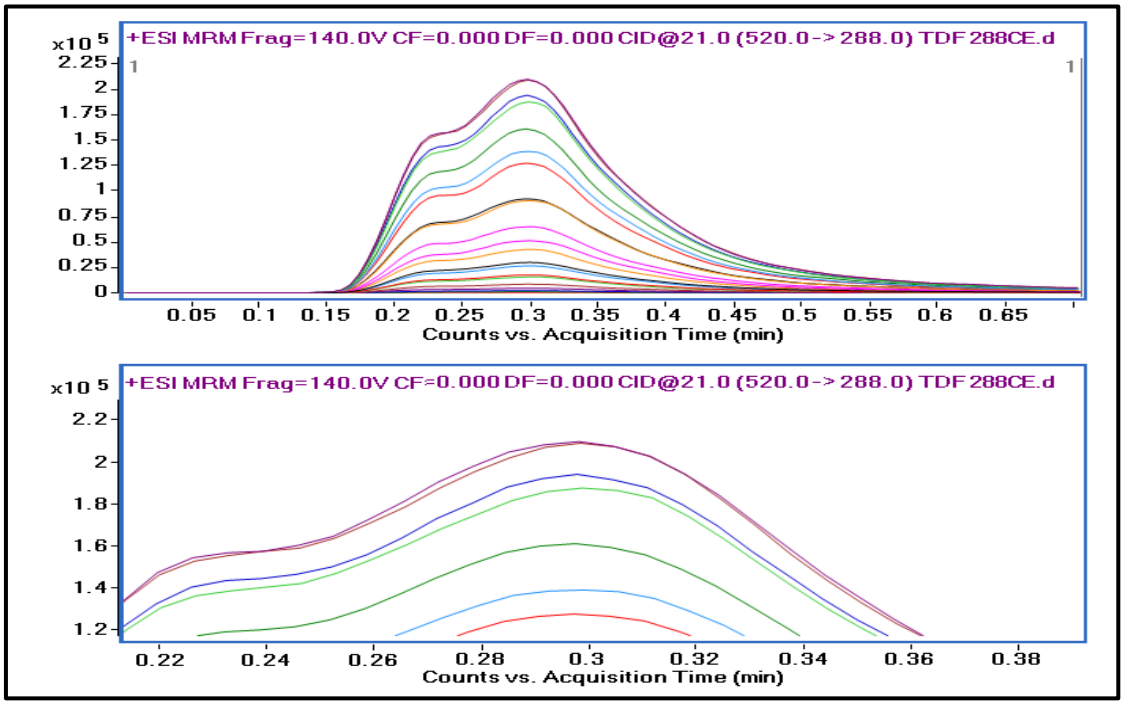
Şekil 4.88. TDF parçalanma iyonları spektrumları

TDF 270 iyonu için parçalanma enerjisi değeri 21 eV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.89).



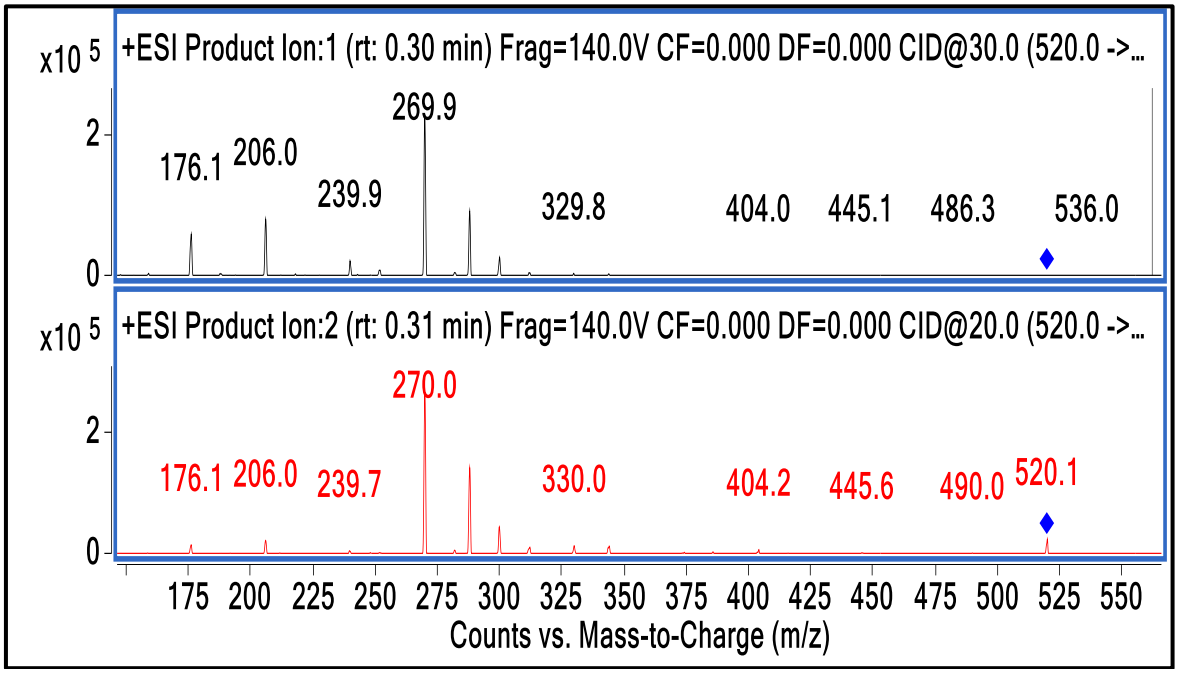
Şekil 4.89. TDF 270 iyonu için parçalanma enerjisi

TDF 288 iyonu için parçalanma enerjisi değeri 21 eV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.90).



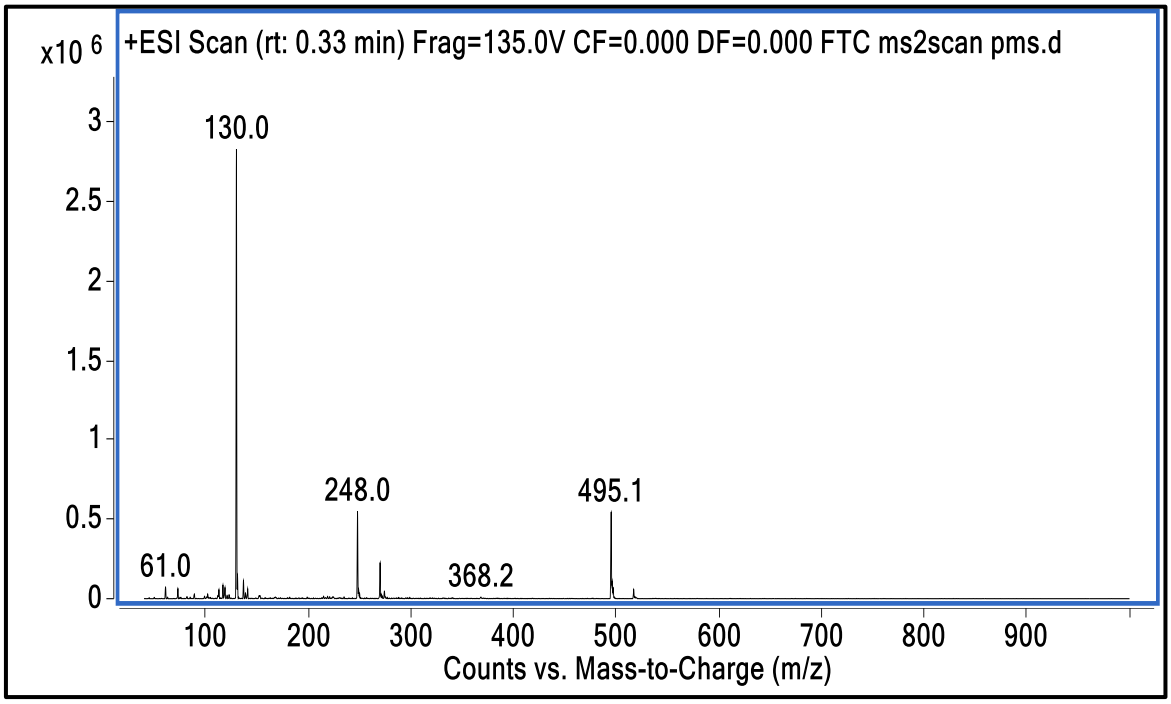
Şekil 4.90. TDF 288 iyonu için parçalanma enerjisi

TDF 176 iyonu için parçalanma enerjisi değeri parçalanma iyon profilinden 25 eV olarak kullanılmıştır (Şekil 4.91).



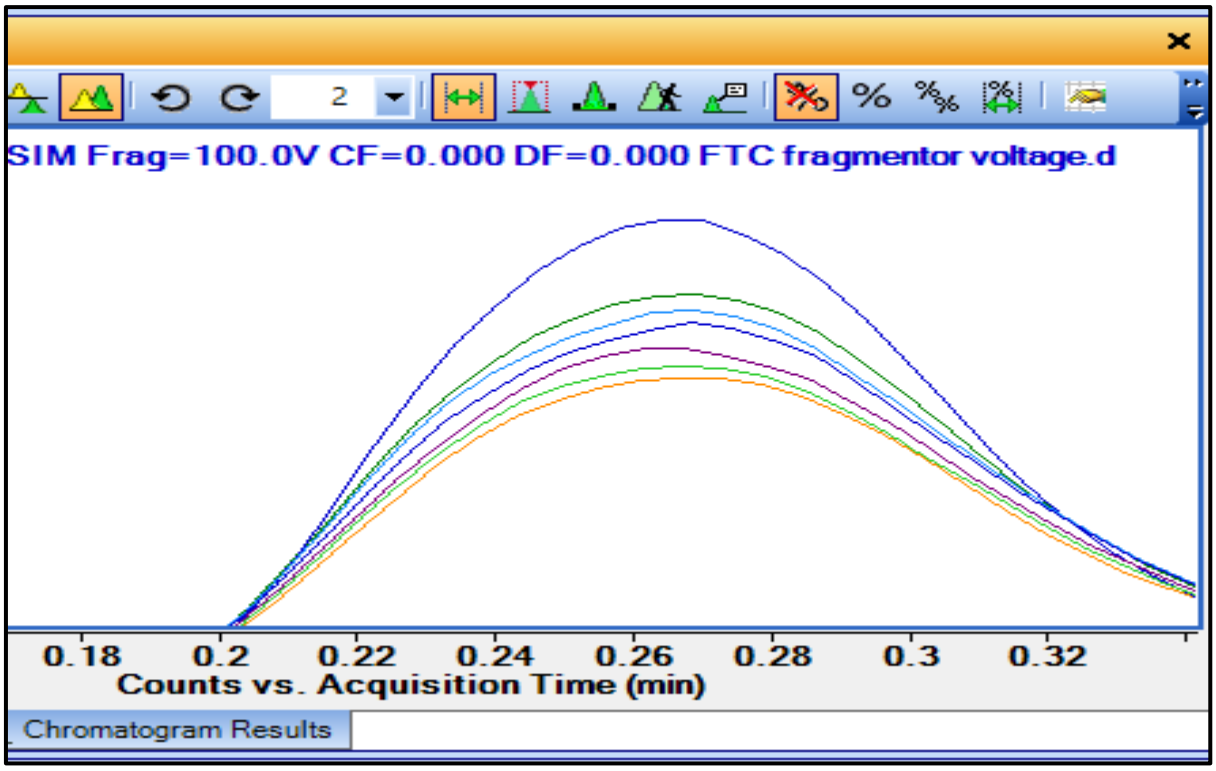
Şekil 4.91. TDF 176 iyonu için parçalanma enerjisi

FTC Ana iyon spektrumu, 248.0 ana iyon olarak belirlenmiştir (Şekil 4.92).



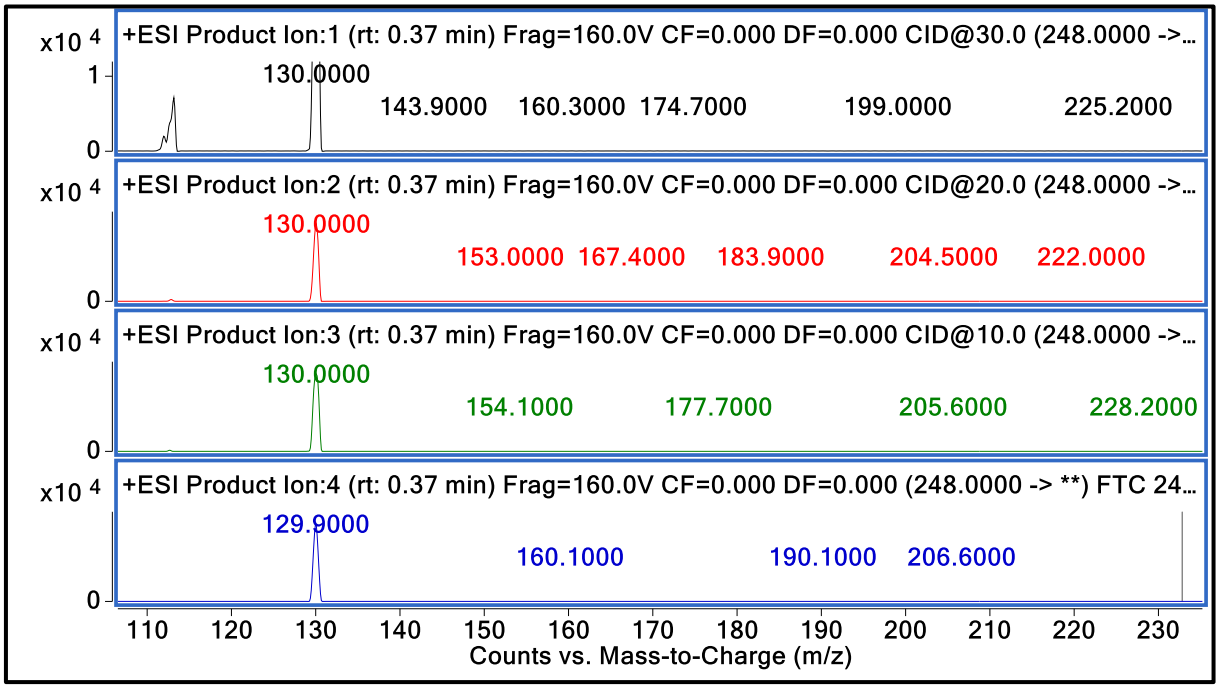
Şekil 4.92. FTC Ana iyon spektrumu

FTC Fragmentor voltaj spektrumu, 100V optimum değer olarak belirlenmiştir (Şekil 4.93).



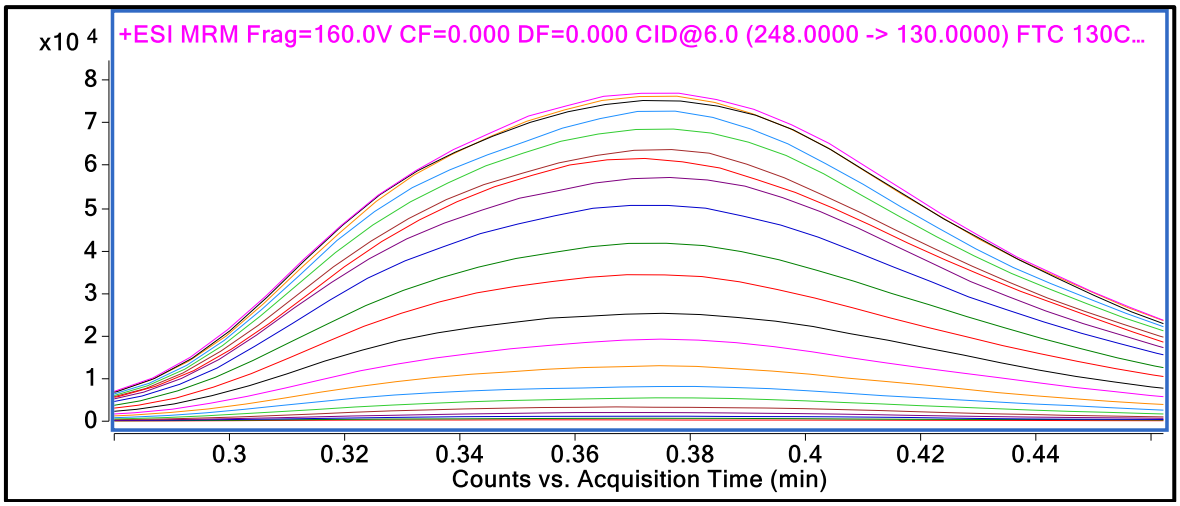
Şekil 4.93. FTC Fragmentor voltaj spektrumu

FTC parçalanma iyonları spektrumu, 130 ve 113 iyonu seçilmiştir (Şekil 4.94).



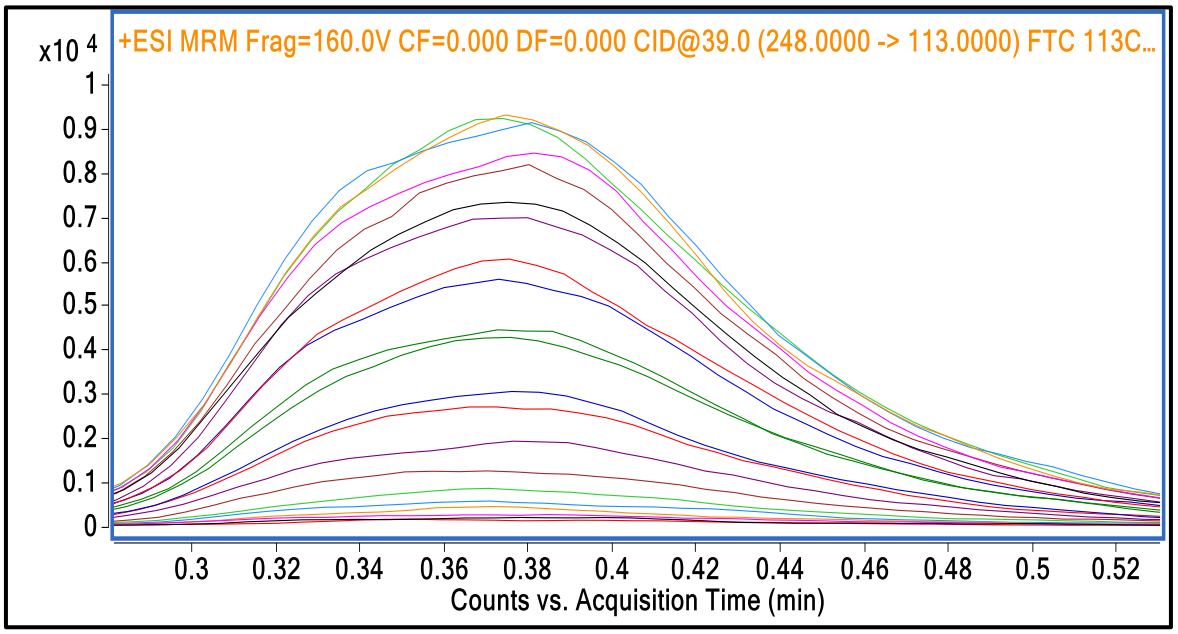
Şekil 4.94. FTC parçalanma iyonları spektrumu

FTC 130 iyonu için parçalanma enerjisi değeri 6 eV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.95).



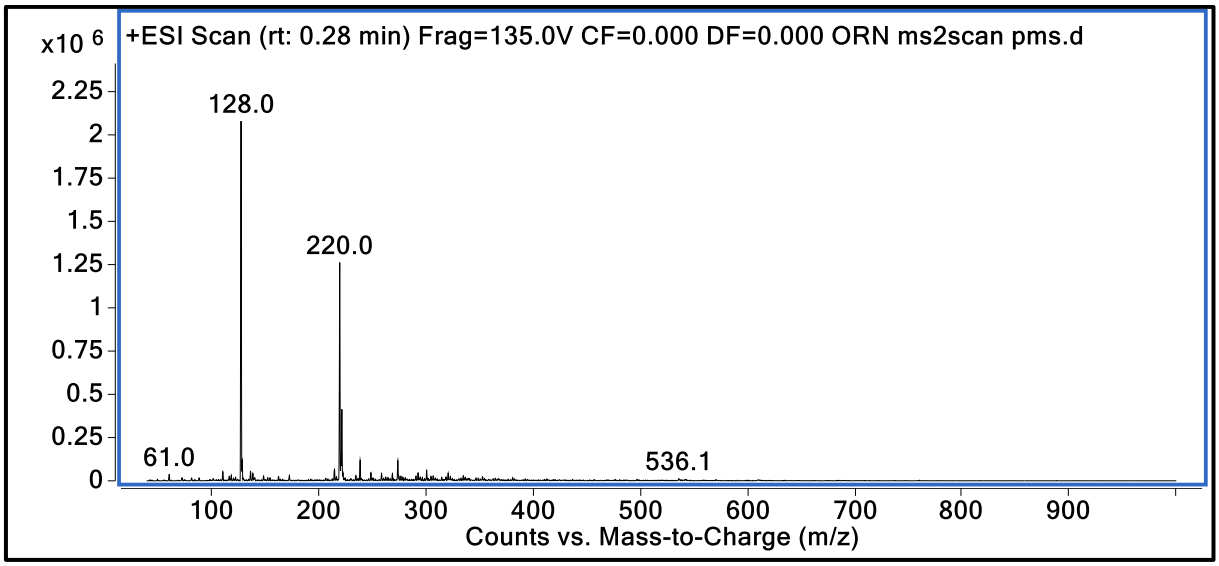
Şekil 4.95. FTC 130 iyonu için parçalanma enerjisi

FTC 113 iyonu için parçalanma enerjisi değeri 39 eV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.96).



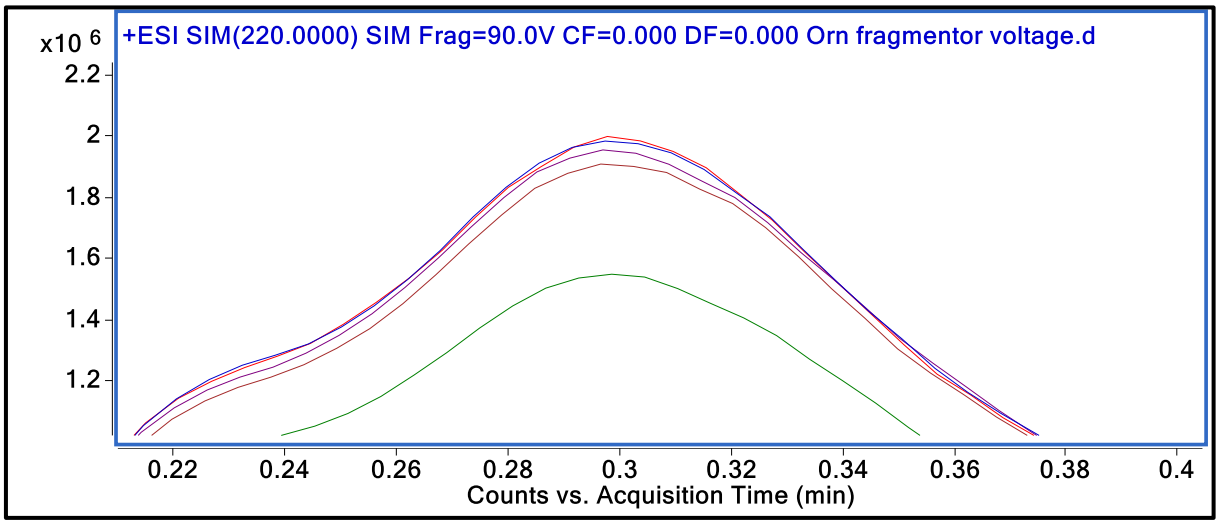
Şekil 4.96. FTC 113 iyonu için parçalanma enerjisi

İç Standart, Ornidazol Ana iyon spektrumu, 220 ana iyon olarak belirlenmiştir (Şekil 4.97).



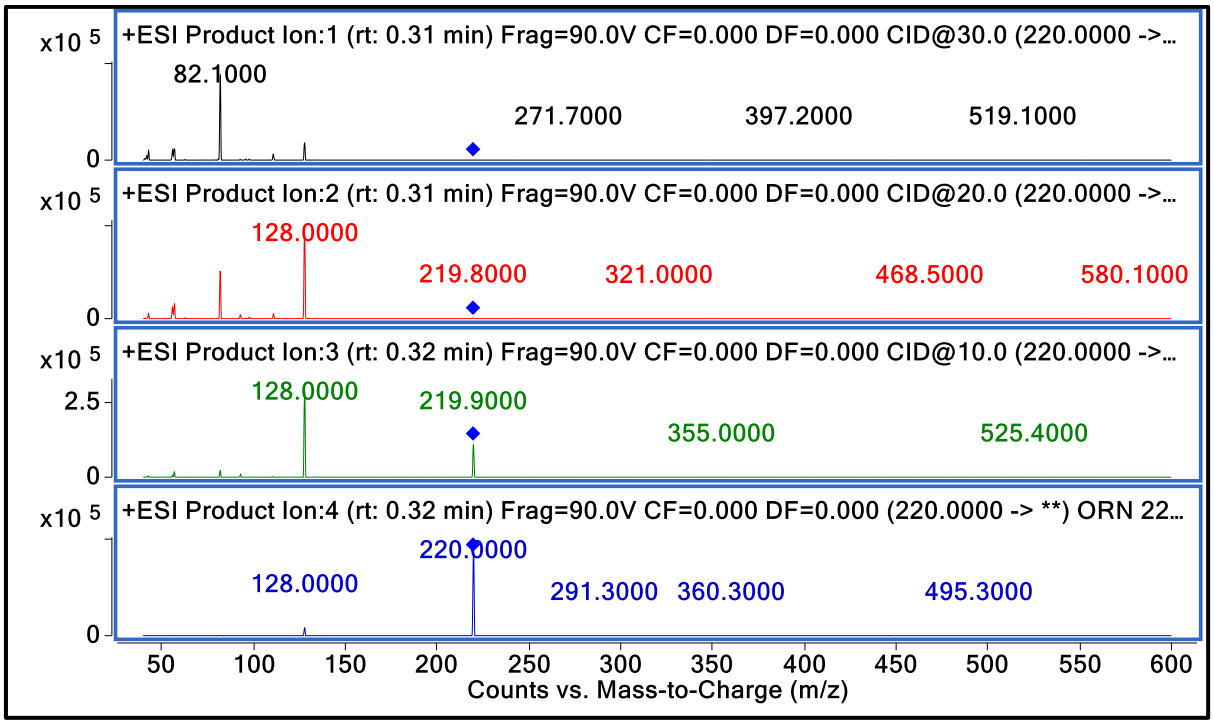
Şekil 4.97. Ornidazol Ana iyon spektrumu

Ornidazol Fragmentor voltaj spektrumu, 90V optimum değer olarak belirlenmiştir (Şekil 4.98).



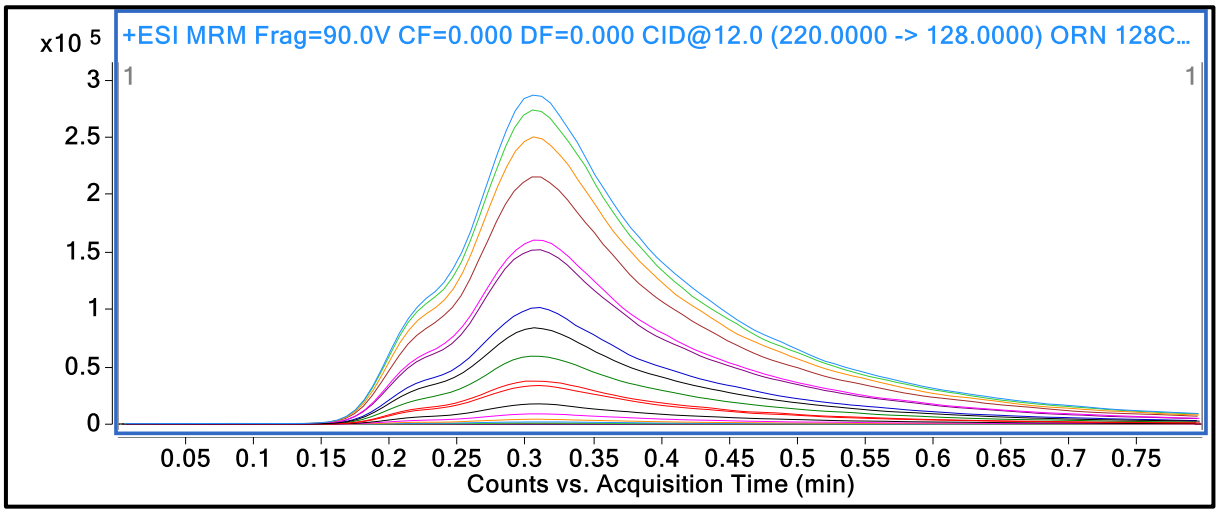
Şekil 4.98. Ornidazol Fragmentor voltaj spektrumu,

Ornidazol parçalanma iyonları spektrumu, 128 ve 82 iyonu seçilmiştir (Şekil 4.99).



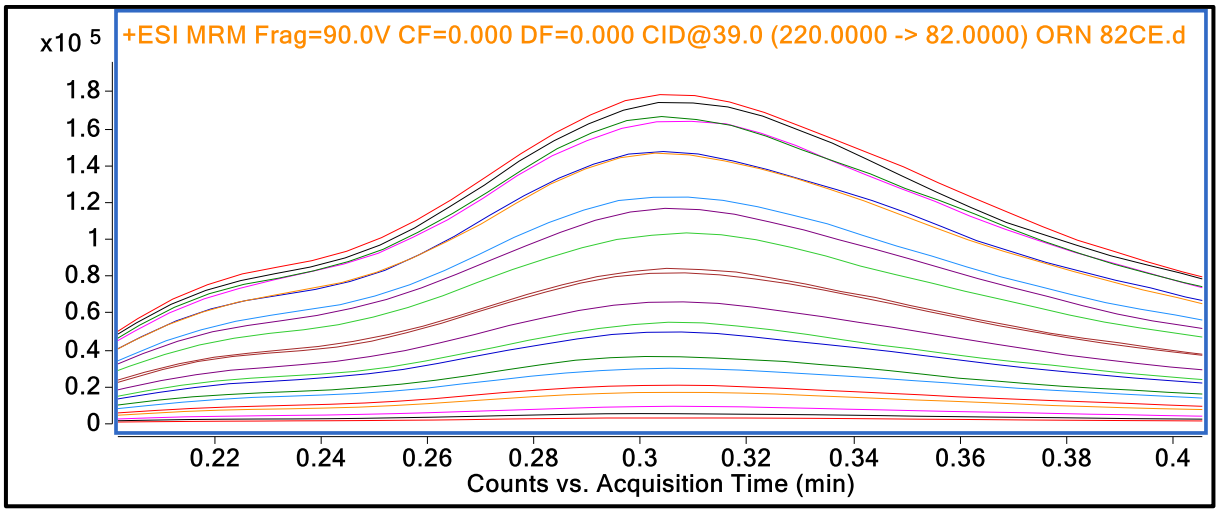
Şekil 4.99. Ornidazol parçalanma iyonları spektrumu

Ornidazol 128 iyonu için parçalanma enerjisi değeri 12 eV seçilmiştir (Şekil 4.100).



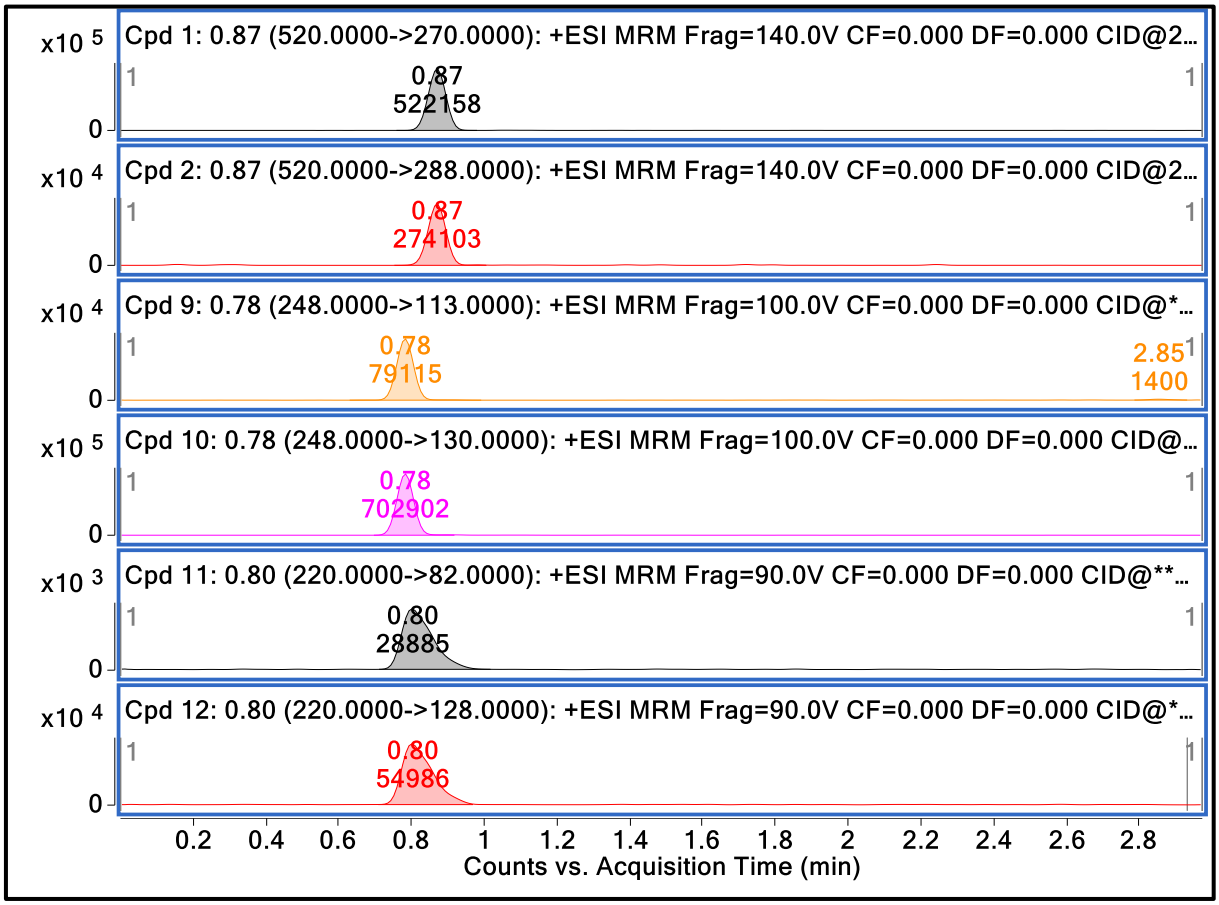
Şekil 4.100. Ornidazol 128 iyonu için parçalanma enerjisi değeri (12 eV).

Ornidazol 82 iyonu için parçalanma enerjisi değeri 39 eV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.101).



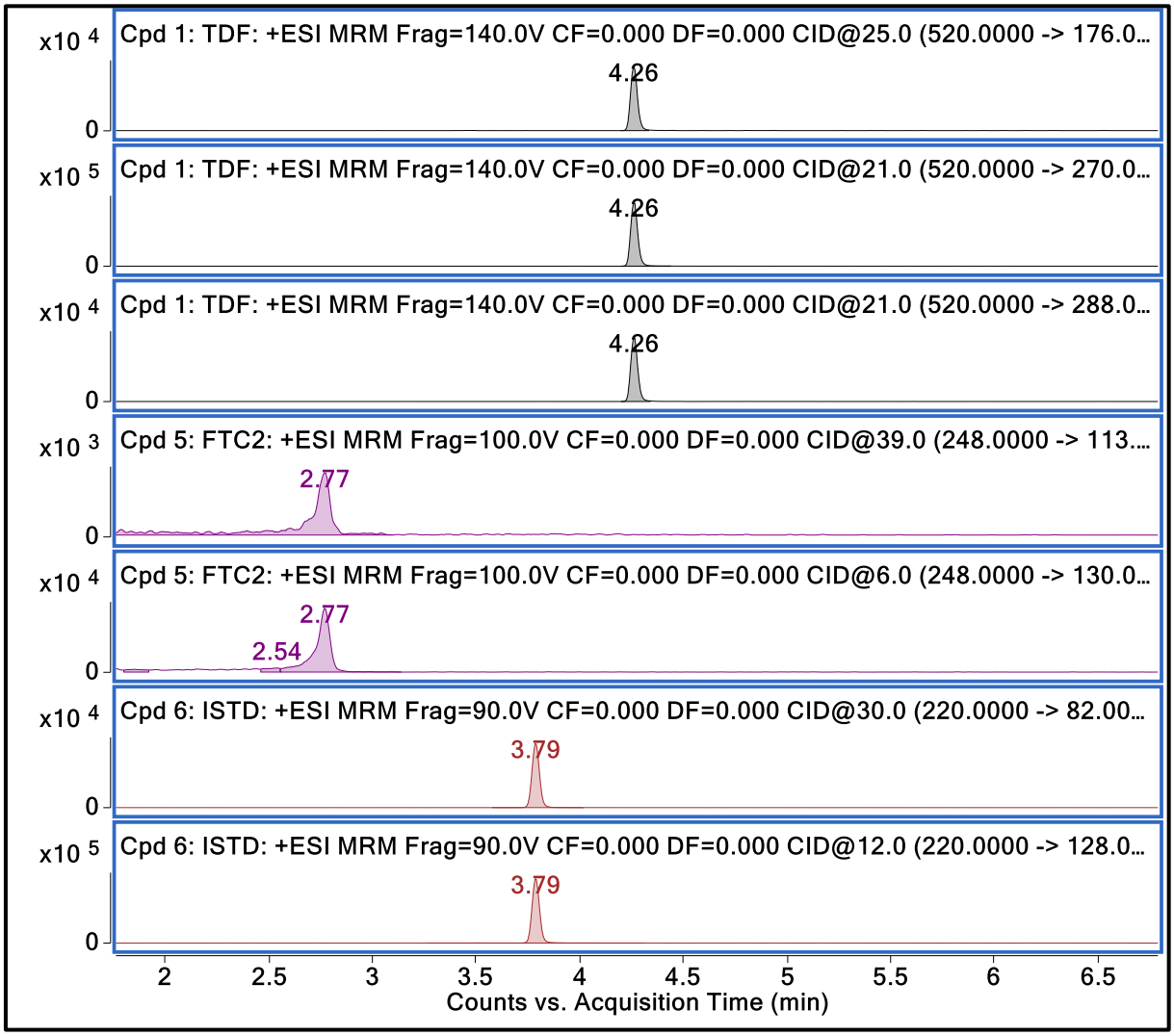
Şekil 4.101. Ornidazol 82 iyonu için parçalanma enerjisi

Optimizasyonlar sonunda geçişlerin kontrolü için maddelerin karışımını içeren enjeksiyon yapılmıştır. Optimize edilen parametreler sonucunda elde edilen izokratik kromatogramlar Şekil 4.102'de gösterilmiştir.



Şekil 4.102. Etkin madde karışımlarının izokratik kromatogramları

Uygulanan akış metodu ile de kromtaografik ayrım sağlanmıştır ve elde edilen kromatogram Şekil 4.103'te gösterilmiştir.



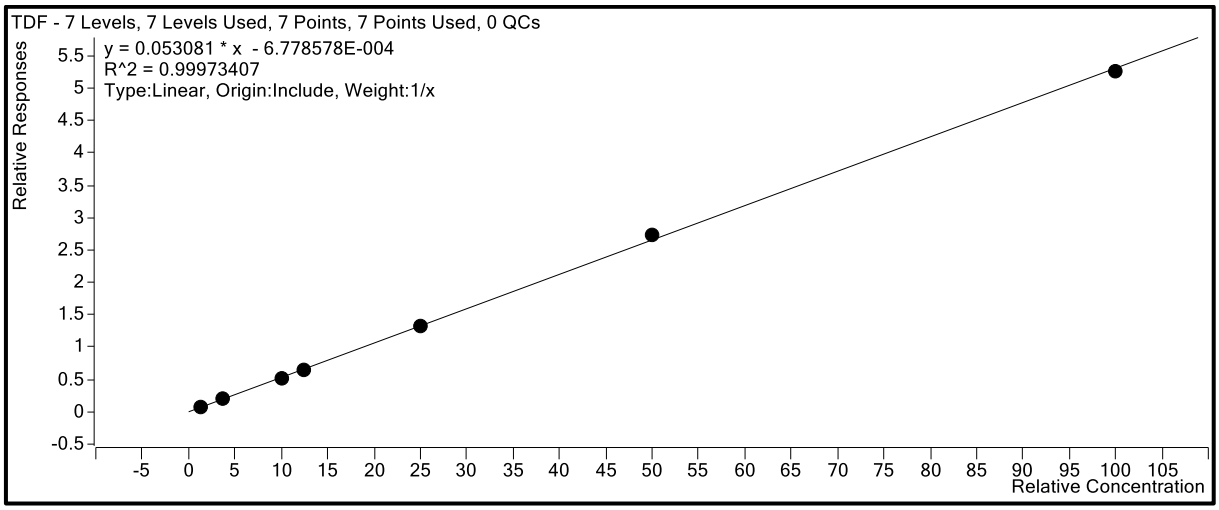
Şekil 4.103. Uygulanan akış metodu ile elde edilen kromatogramlar

Seçilen metod ile gerçekleştirilen analiz validasyonu

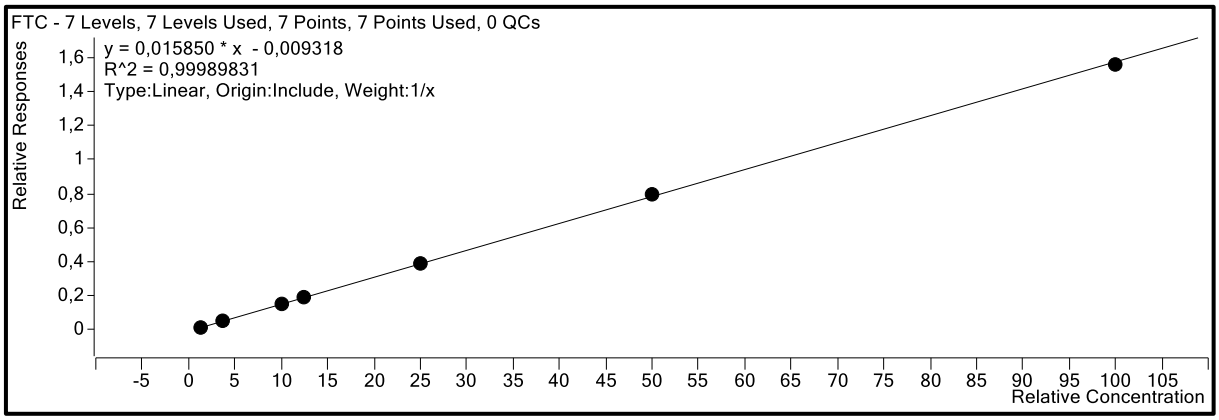
- Doğrusalllık
- Carry-Over (Taşınma)
- Gün İçi Doğruluk ve Kesinlik
- Günler Arası Doğruluk ve Kesinlik
- En Düşük Miktar Saptama Alt Sınırı (LLOQ)
- Matriks Etkisi
- Seçicilik-Seçimlilik

Doğrusallık

TDF ve FTC'nin farklı derişimlerine karşı elde edilen cevaplar cihazın yazılımı ile hesaplanmıştır ve standart doğru denklemi oluşturuldu. Bu analizler sonucu elde edilen kalibrasyon denklemi TDF için Şekil 4.104'da ve FTC için Şekil 4.105'te gösterilmiştir.



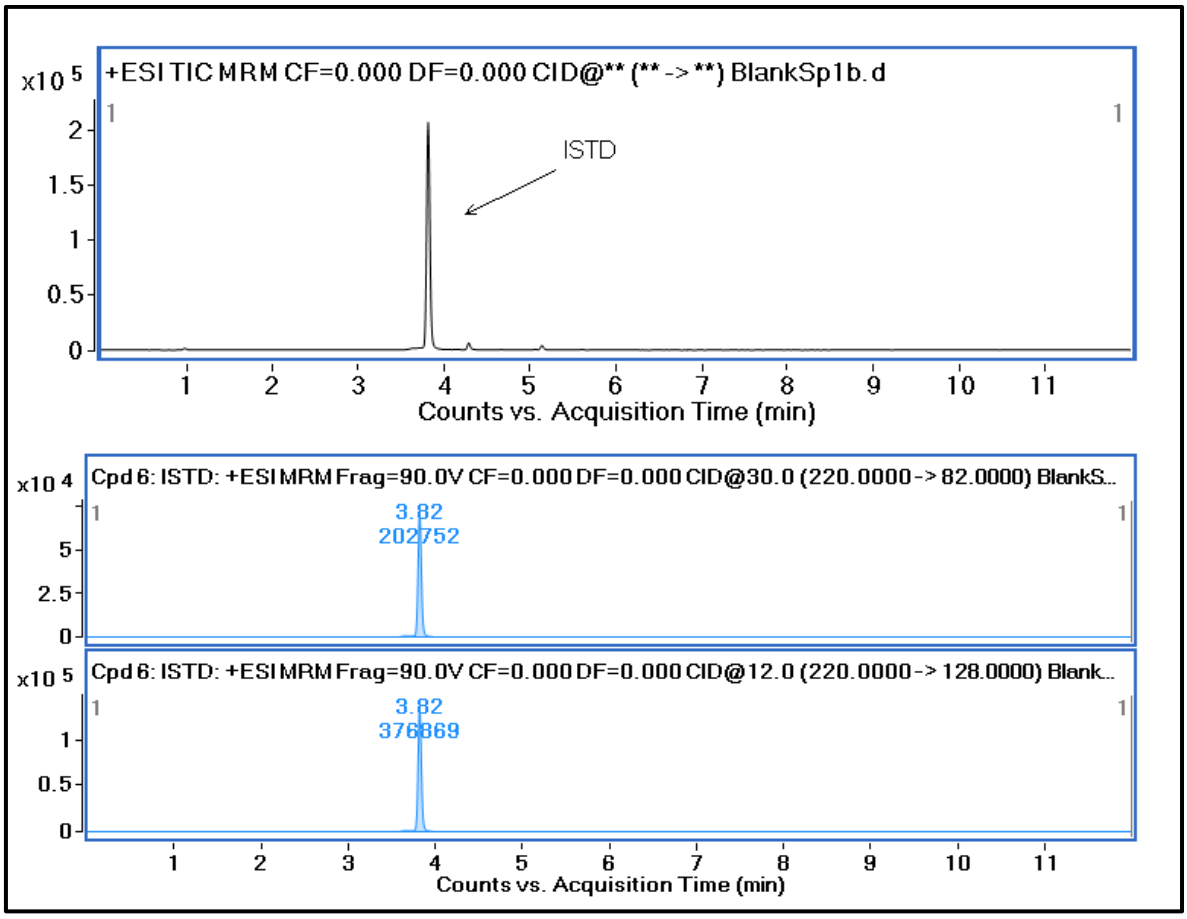
Şekil 4.104. TDF'nin LC-MSMS ile geliştirilen metodla elde edilen kalibrasyon doğrusu



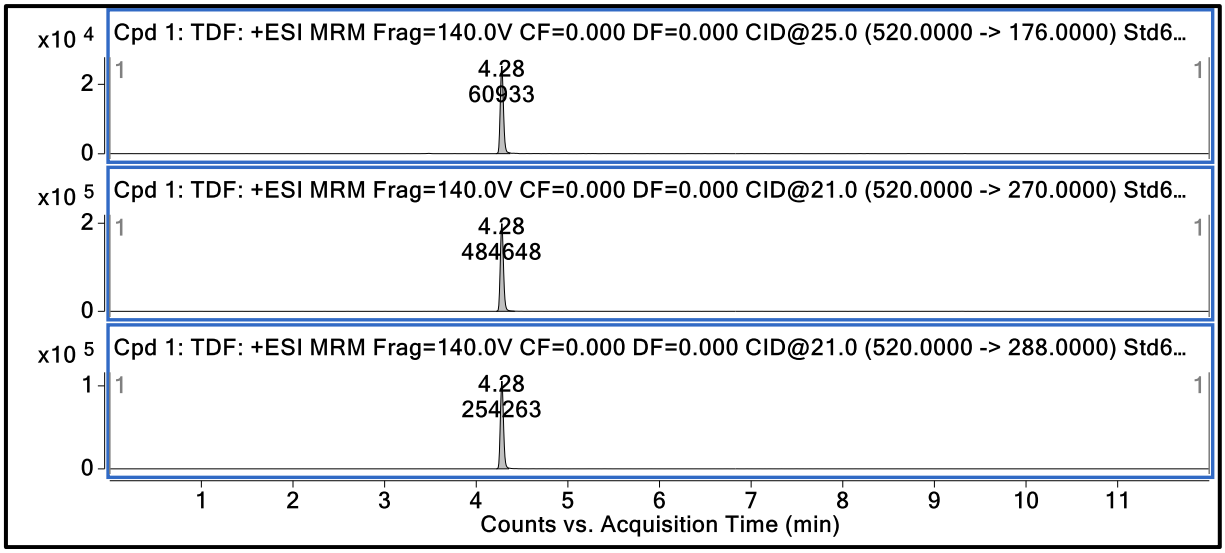
Şekil 4.105. FTC'nin LC-MSMS ile geliştirilen metodla elde edilen kalibrasyon doğrusu

Seçicilik- Seçimlilik

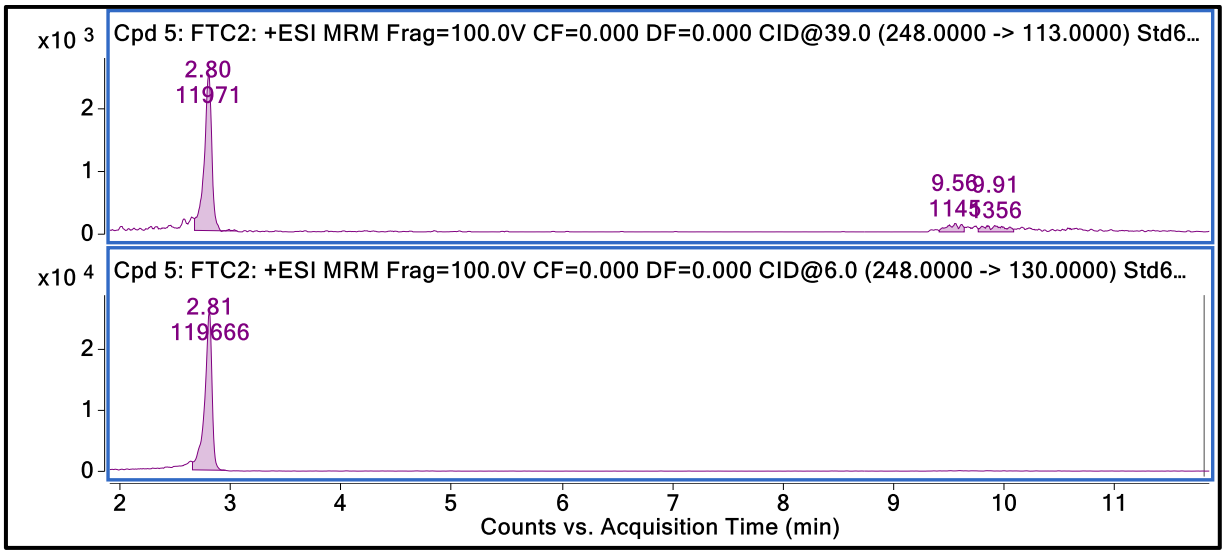
Her etken madde için en az 2 iyon geçişi sağlanarak metod seçiciliği sağlanmıştır. Bu geçişlerin oranları ve alıkonma süresi bilgileriyle miktarlandırma yapılmıştır. Spike için kullanılan boş matriks örneği ana kromatogram örneğinde sadece internal standart sinyali gözlenmiştir (Şekil 4.106).



Şekil 4.106. Spike analizi ile elde edilen kromatogramdaki internal standart



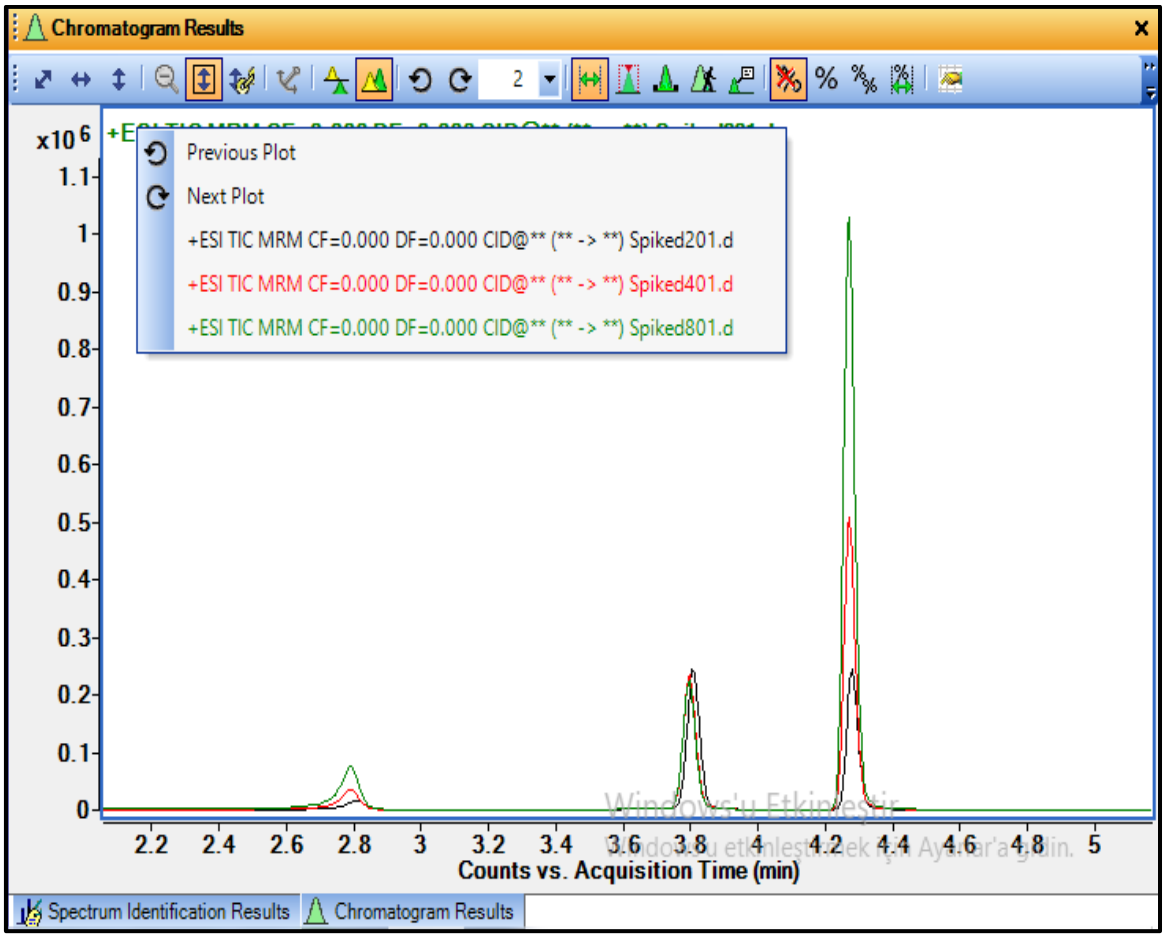
Şekil 4.107. Madde standartlarının karışımı ile elde edilen TDF geçişleri



Şekil 4.108. Madde standartlarının karışımı ile elde edilen FTC geçişleri

Güniçi Doğruluk ve Kesinlik

TDF ve FTC için gün için doğruluk ve kesinlik verileri aşağıda verilmiştir. 20, 40 ve 80 ng/mL spike yapılmış örnekler çalışılmıştır.



Şekil 4.109. TDF ve FTC için gün için doğruluk ve kesinlik kromatogramı

Çizelge 4.57. FTC'nin gün içi kesinlik sonuçları

FTC	Hesaplanan Miktar (ng/mL)	% Geri Alma	Ortalama	SS	% RSD
Spiked201	18,46	92,28	95,78	5,21	5,44
Spiked202	18,38	91,91			
Spiked203	20,63	103,14			
Spiked401	38,83	97,08	97,12	0,33	0,34
Spiked402	38,69	96,74			
Spiked403	39,01	97,54			
Spiked801	75,18	93,98	95,24	1,23	1,29
Spiked802	77,53	96,91			
Spiked803	75,87	94,84			

Çizelge 4.58. TDF'nin gün içi kesinlik sonuçları

TDF	Hesaplanan Miktar (ng/mL)	% Geri Alma	Ortalama	SS	% RSD
Spiked201	17,37	86,86	88,70	4,87	5,49
Spiked202	16,78	83,88			
Spiked203	19,07	95,36			
Spiked401	38,91	97,27	96,40	2,93	3,04
Spiked402	39,79	99,48			
Spiked403	36,98	92,45			
Spiked801	82,96	103,69	102,26	1,81	1,77
Spiked802	82,71	103,39			
Spiked803	79,77	99,71			

Günlerarası doğruluk ve kesinlik

Çizelge 4.59. FTC'nin günler arası kesinlik sonuçları

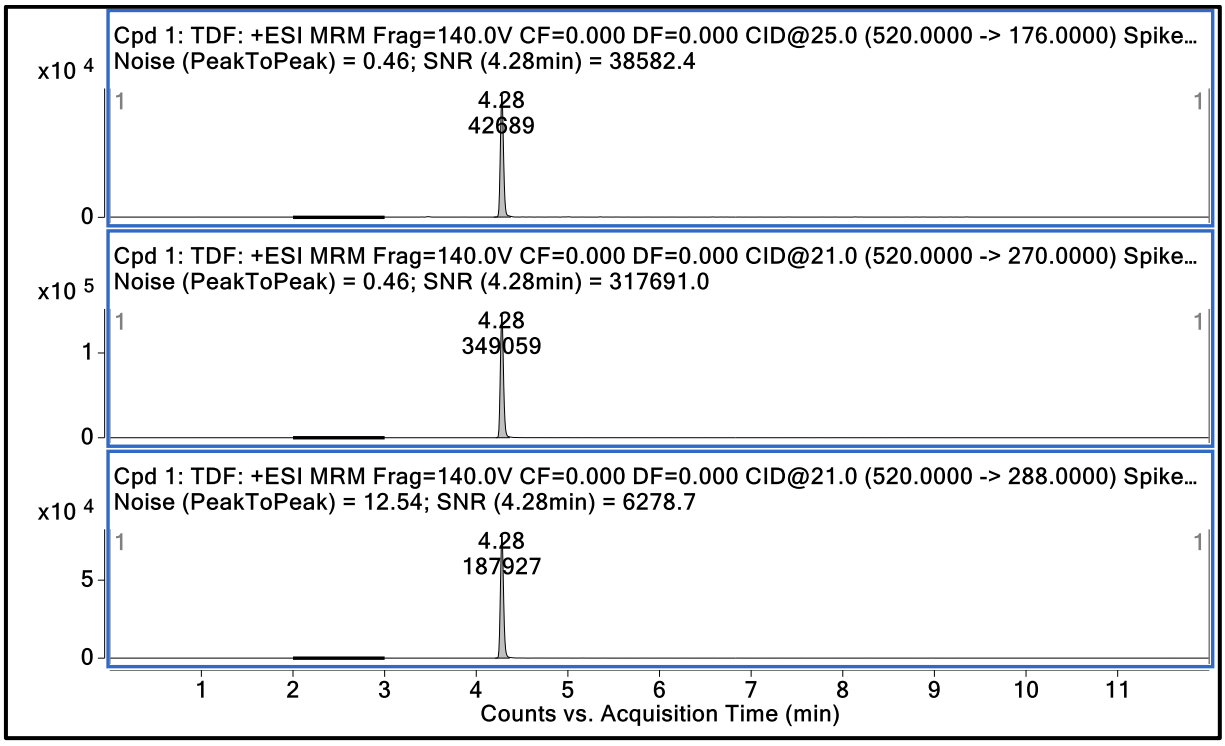
FTC	Hesaplanan Miktar (ng/mL)	% Geri Alma	Ortalama	SS	% RSD
Spiked201	18,16	90,78	94,10	3,18	3,38
Spiked202	18,63	93,13			
Spiked203	19,68	98,38			
Spiked401	38,43	96,08	96,68	1,10	1,13
Spiked402	38,29	95,74			
Spiked403	39,29	98,22			
Spiked801	76,85	96,06	95,88	0,49	0,51
Spiked802	77,11	96,38			
Spiked803	76,17	95,21			

Çizelge 4.60. TDF'nin günler arası kesinlik sonuçları

TDF	Hesaplanan Miktar	% Geri Alma	Ortalama	SS	% RSD
Spiked201	17,98	89,91	91,62	2,86	3,12
Spiked202	17,86	89,32			
Spiked203	19,13	95,65			
Spiked401	37,91	94,77	95,01	2,53	2,67
Spiked402	39,29	98,23			
Spiked403	36,82	92,04			
Spiked801	79,16	98,95	99,72	2,14	2,14
Spiked802	82,11	102,64			
Spiked803	78,07	97,58			

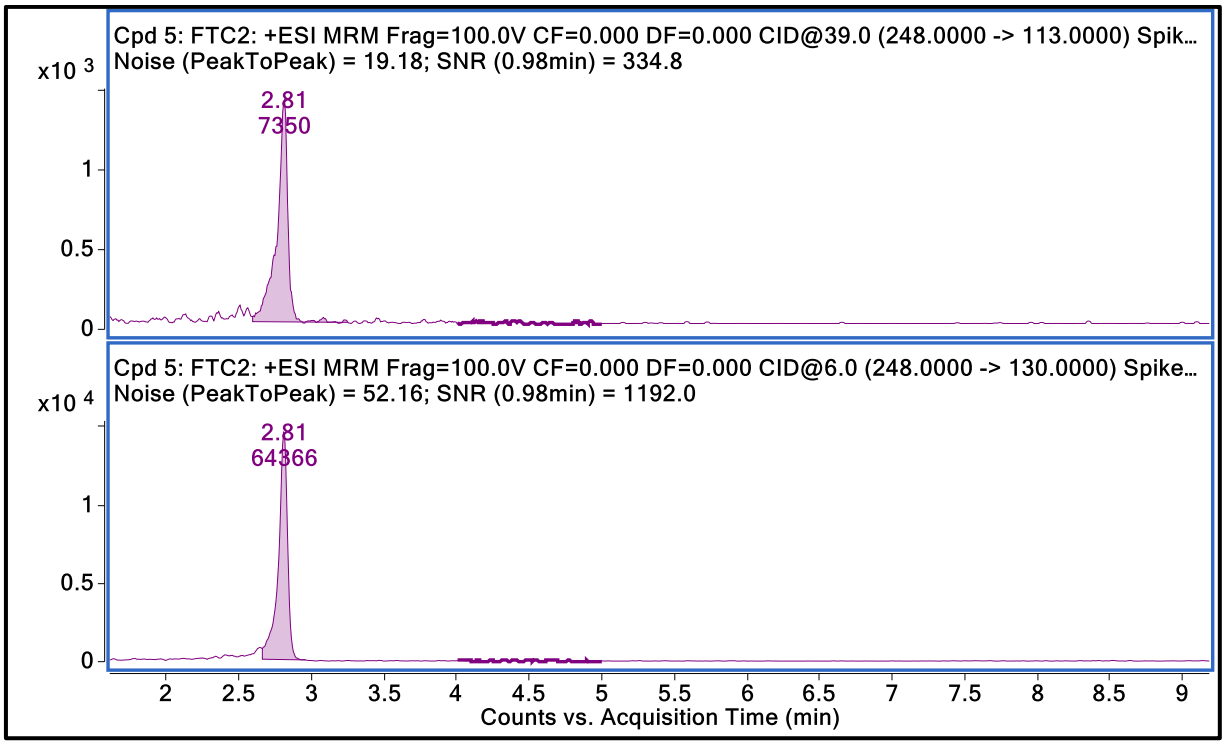
En düşük miktar saptama alt sınırı (LLOQ)

20 ppb spiked yapılmış örneklerde S/N değerleri aşağıda verilmiştir. TDF için 20ppb enjeksiyonunda en düşük 6278 S/N elde edilmiştir. S/N 10 değeri için hesaplanan değer LOQ 0.032 µg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.110. TDF için en düşük miktar saptama sınırı sonuçları

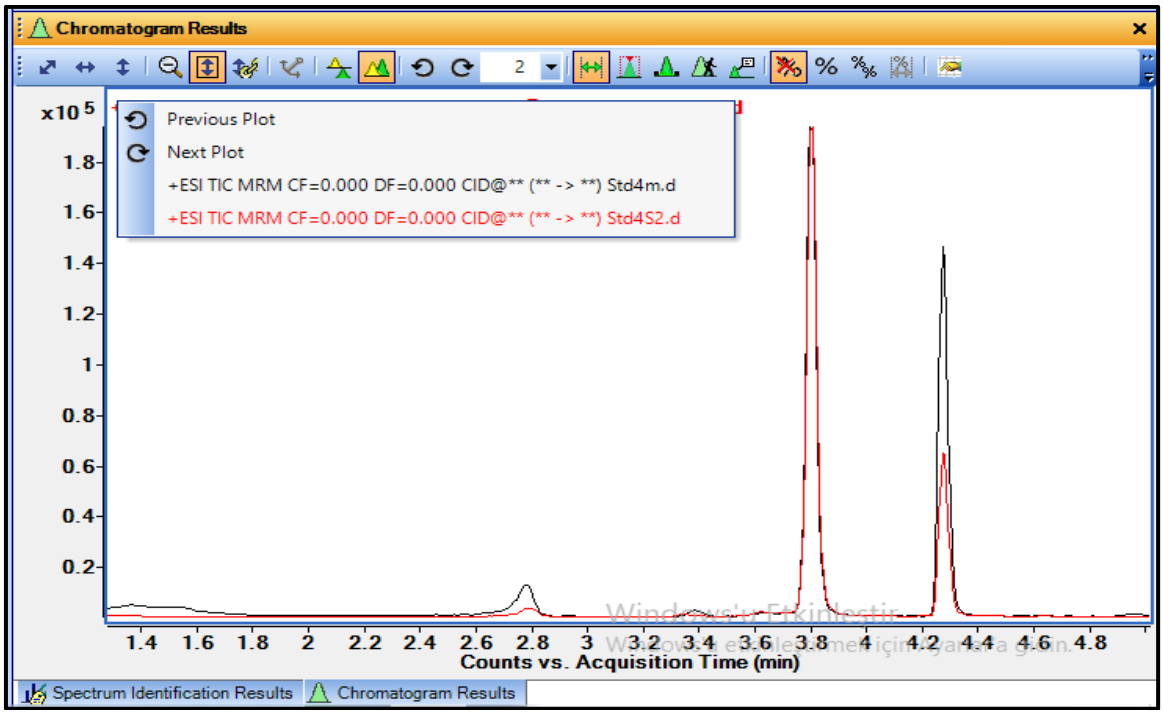
FTC için 20ppb enjeksiyonunda en düşük 334 S/N elde edilmiştir. S/N 10 değeri için hesaplanan değer LOQ 0.599 µg/mL olarak bulunmuştur.



Şekil 4.111. FTC için en düşük miktar saptama sınırı sonuçları

Matriks etkisi

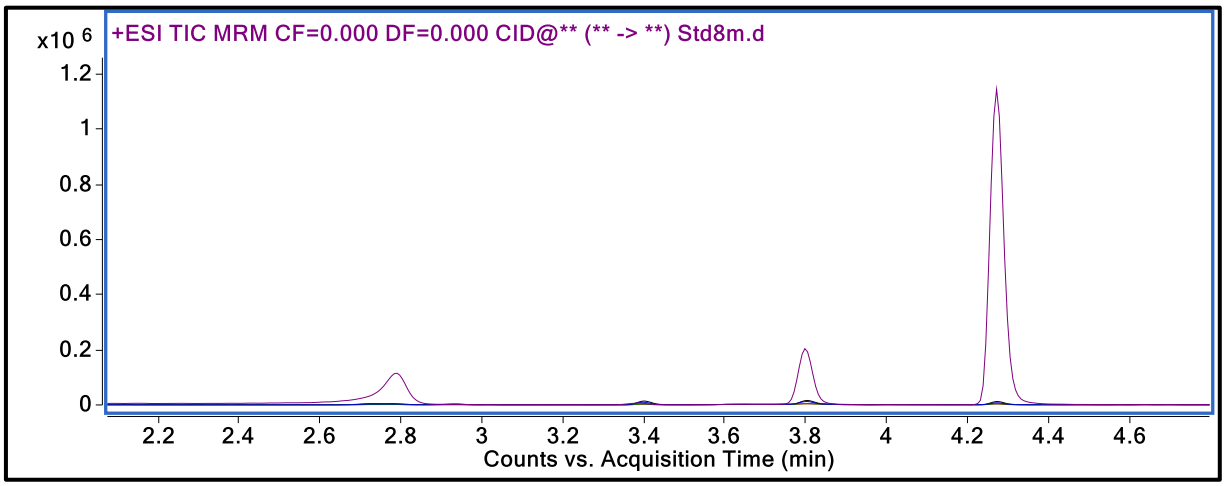
Boş matriks ekstraktı ve solvent içerisinde hazırlanan kalibrasyon eğrileri karşılaştırılmıştır. Matriks içerisinde hazılanan çözeltilerde sinyal şiddetleri farklı olduğu için, planlandığı üzere kalibrasyon çözeltileri matriks eşleşmiş olarak hazırlanıp kullanılmıştır.



Şekil 4.112. Matris etkisi sonuçları

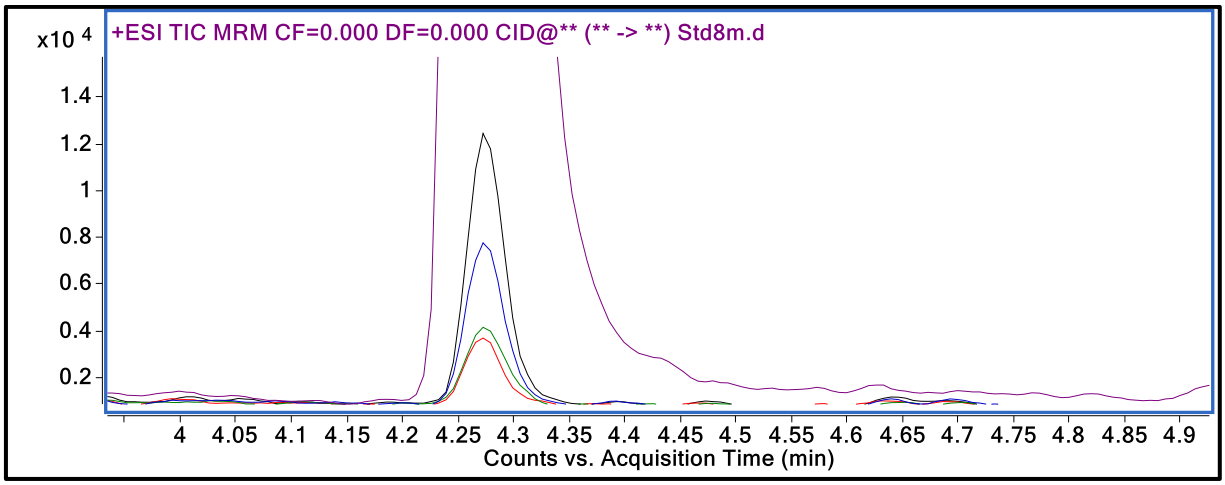
Carry over (Taşınma)

Kalibrasyon 100ppb derişimi sonrası analiz edilen 10 adet çözücü ile taşınma etkisi araştırılmıştır.



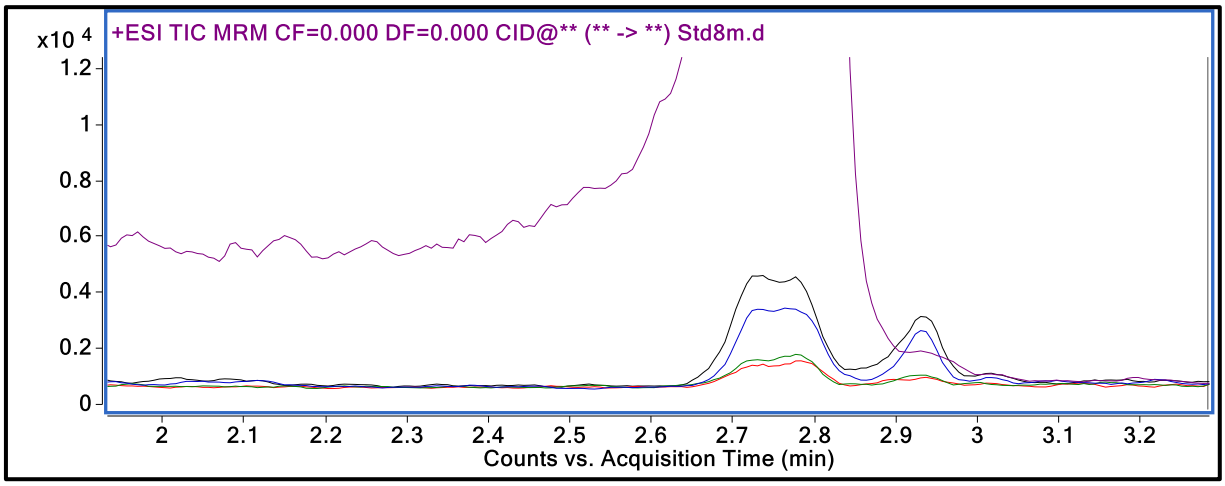
Şekil 4.113. Carry over analiz sonuçları

TDF için s sonrası çözücü sinyallerinin baseline seviyesinde olduğu görülmektedir.



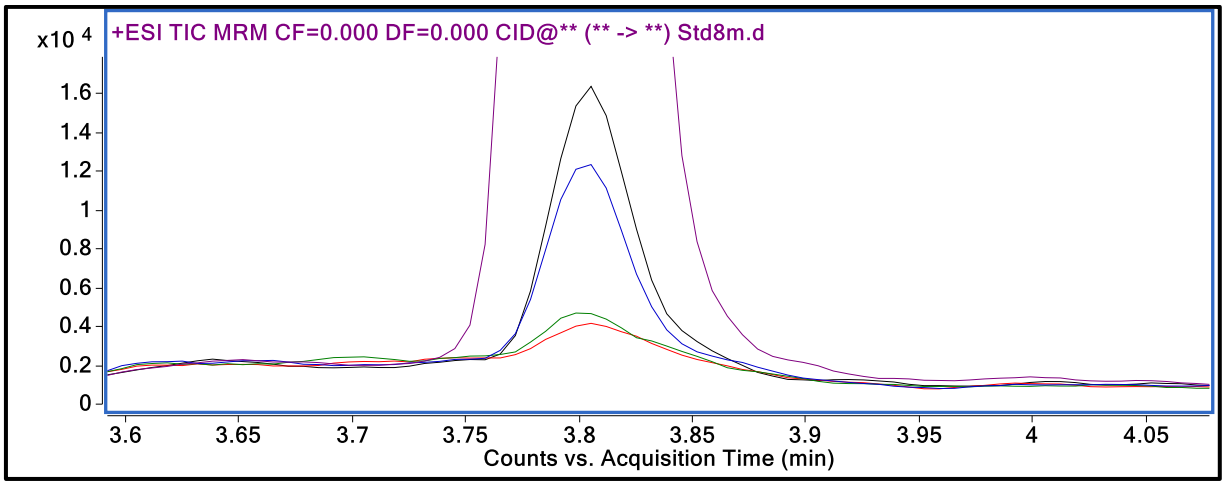
Şekil 4.114. TDF için carry over analiz sonuçları

FTC için std sonrası çözücü sinyallerinin baseline seviyesinde olduğu görülmektedir



Şekil 4.115. FTC için carry over analiz sonuçları

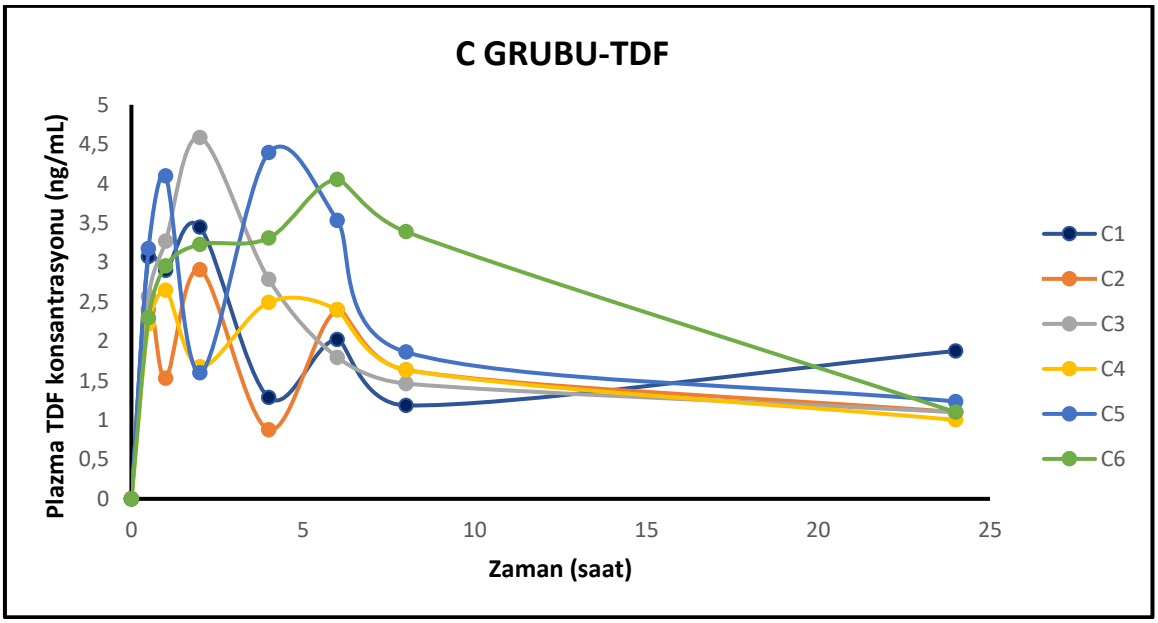
Internal standart için standart enjeksiyon sonrası çözücü sinyallerinin baseline seviyesinde olduğu görülmektedir



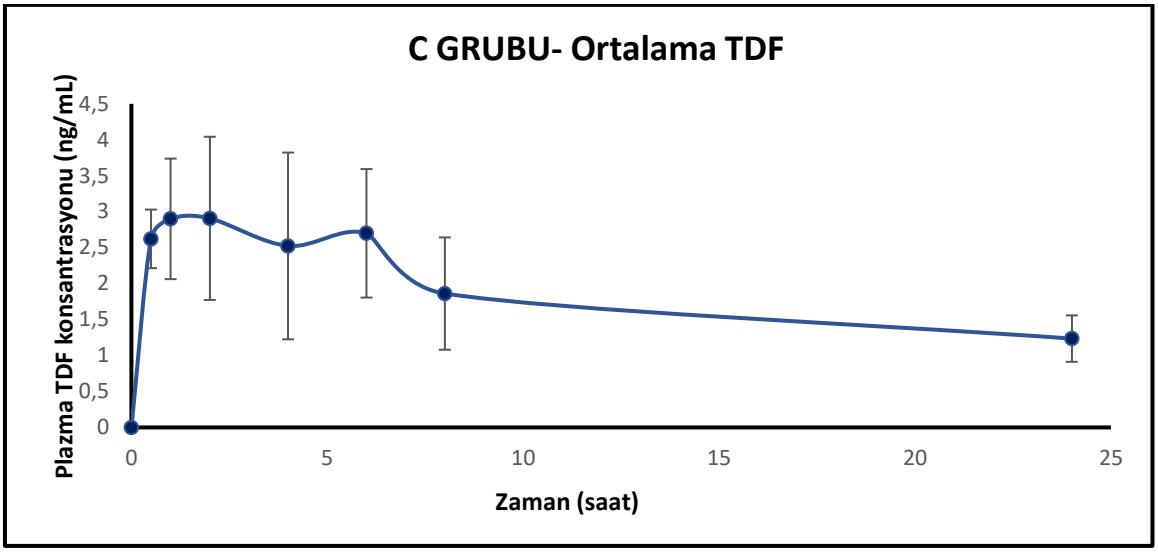
Şekil 4.116. Ornidazol için carry over analiz sonuçları

4.10.2. Farmakokinetik çalışmalar

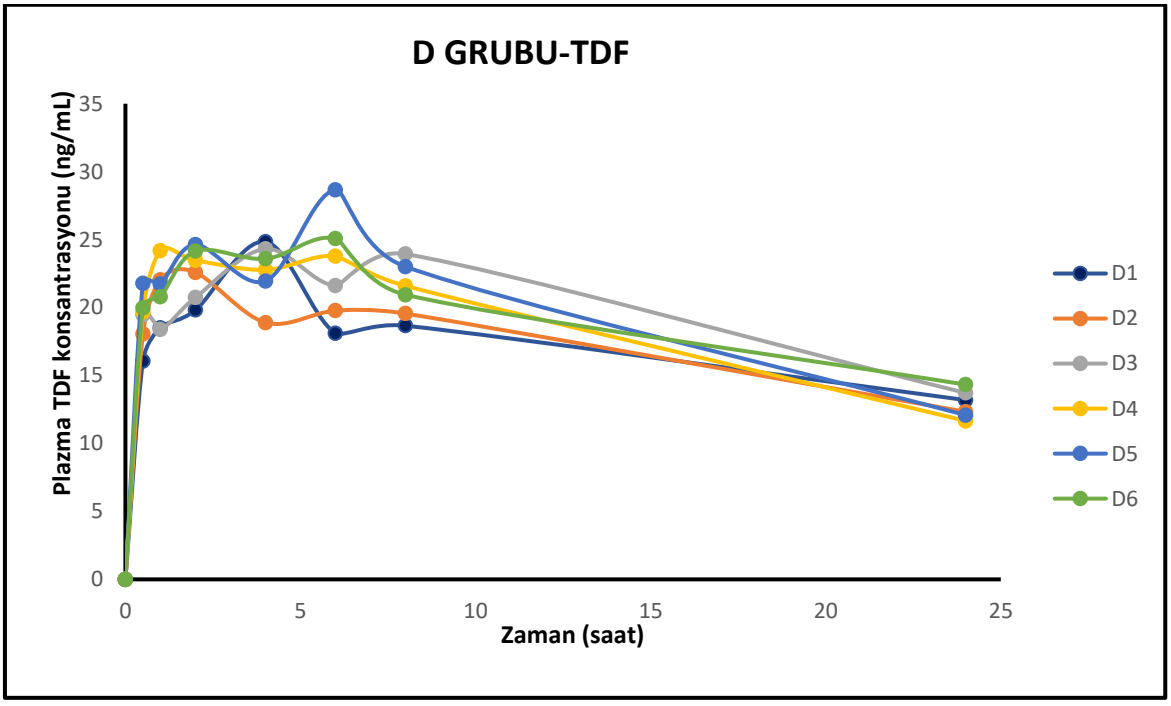
Truvada®, S1-TF, F4-TF ve M2-TF formülasyonları vajinal yoldan uygulanarak plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri Şekil 4.117 - 4.134 arasında verilmiştir. Trapez yöntemi kullanılarak Excel'de hesaplamalar yapılarak farmakokinetik analize ait parametreler Çizelge 4.61 ve 4.62'de verilmiştir. Ayrıca, PKSolver® programı kullanılarak NCA ile farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır.



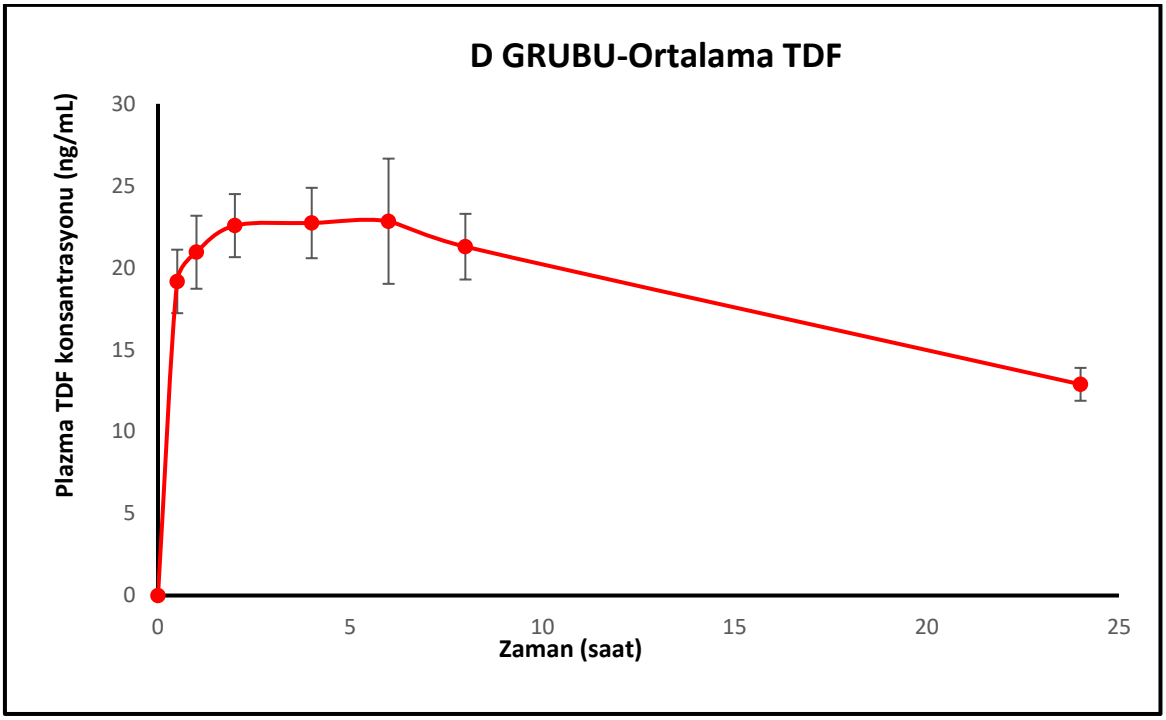
Şekil 4.117. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



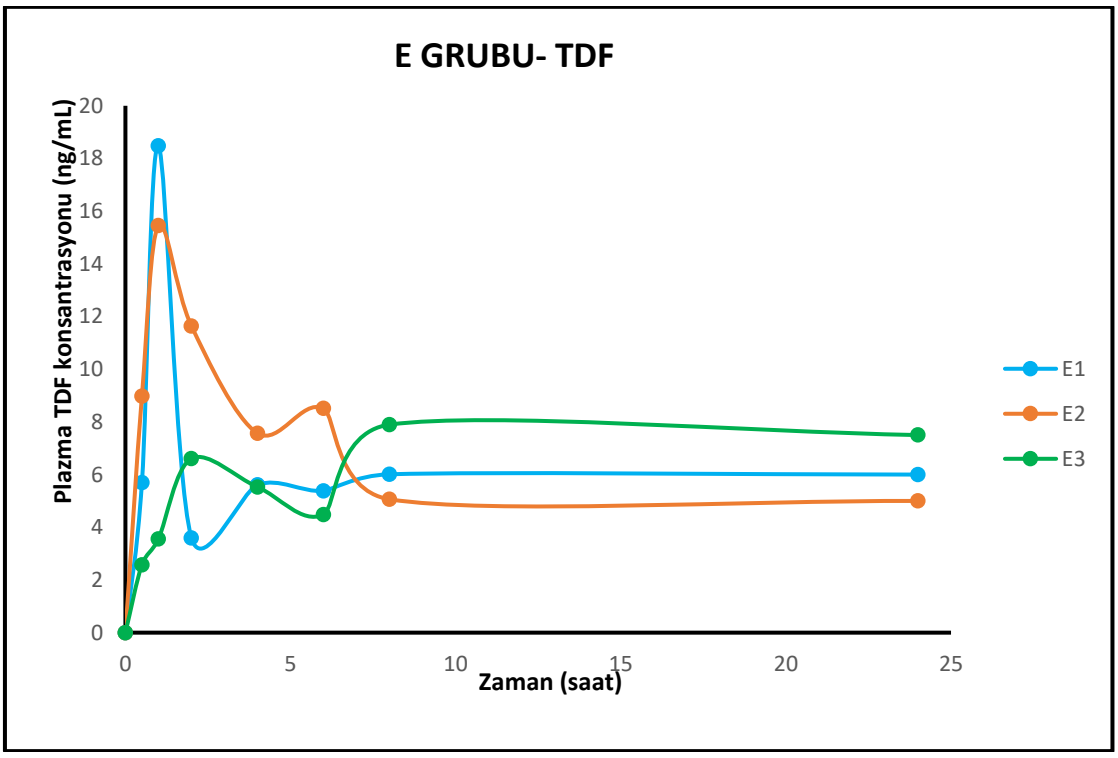
Şekil 4.118. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



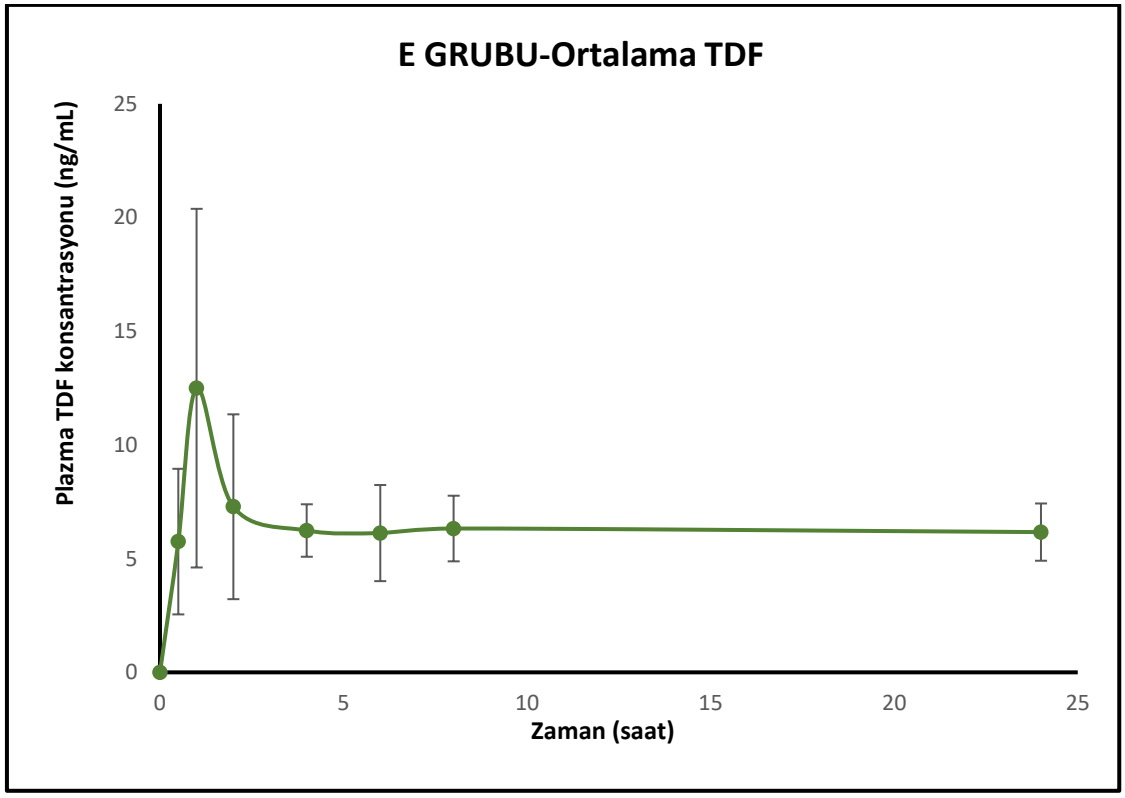
Şekil 4.119. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



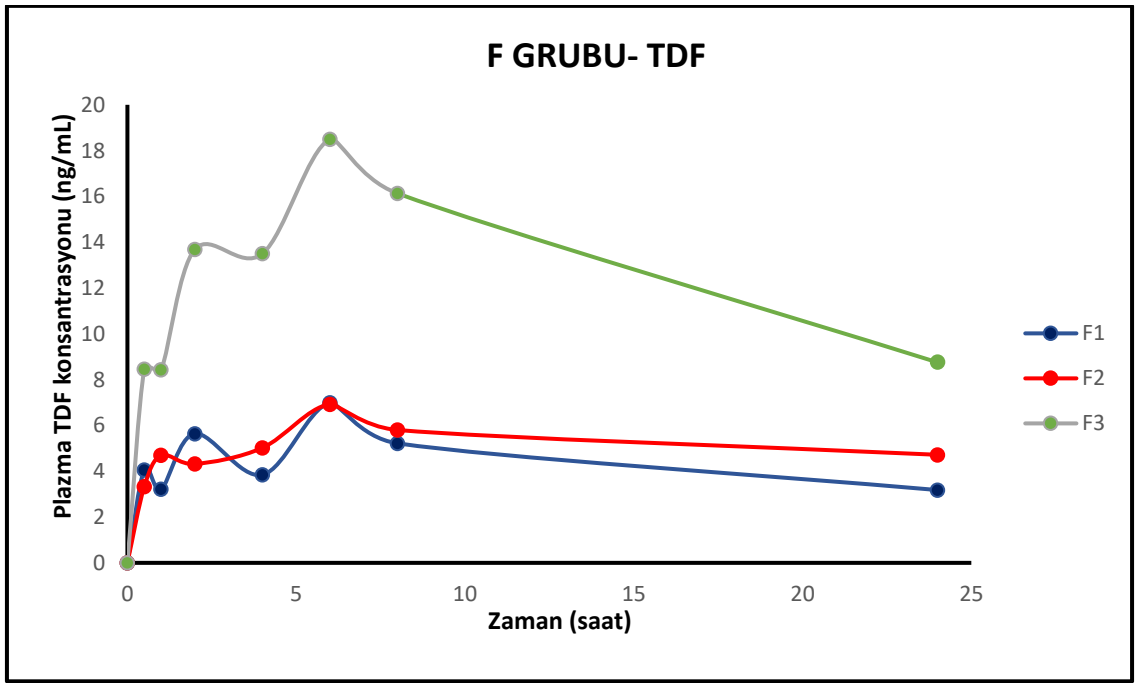
Şekil 4.120. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



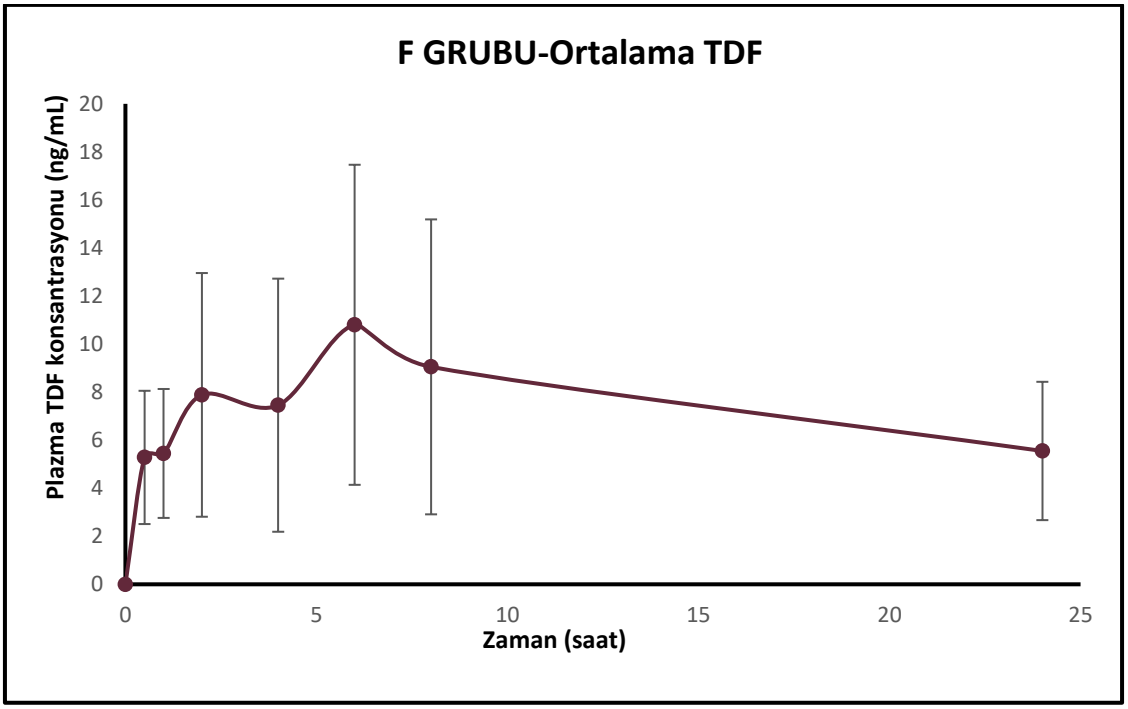
Şekil 4.121. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



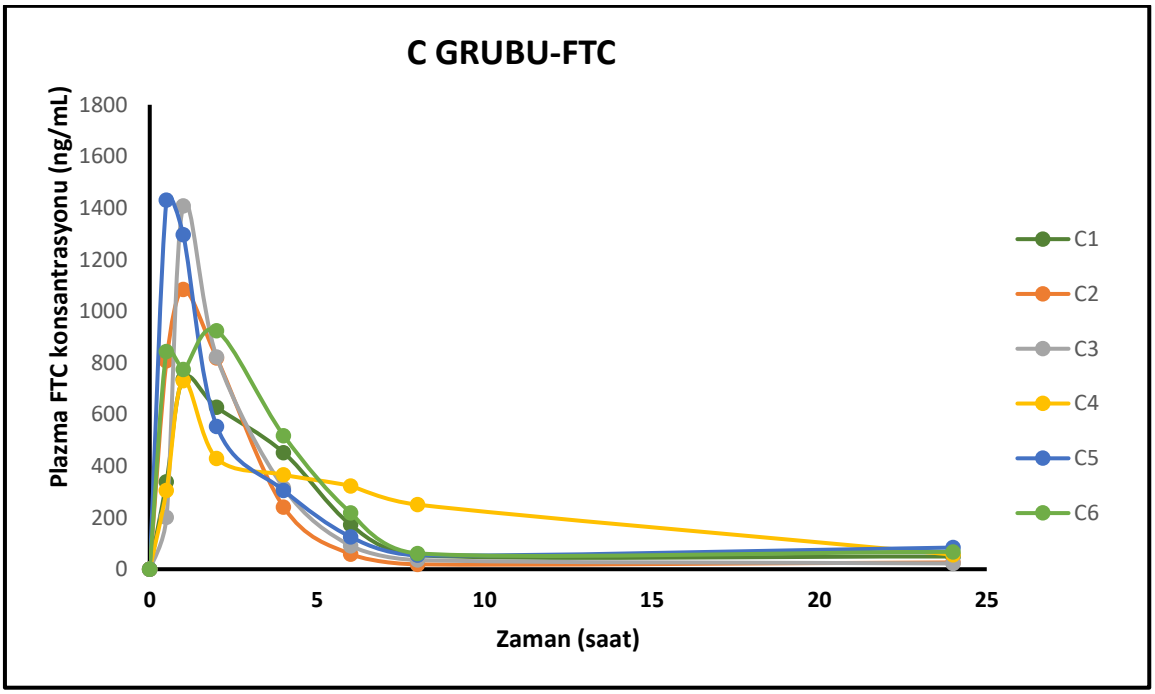
Şekil 4.122. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



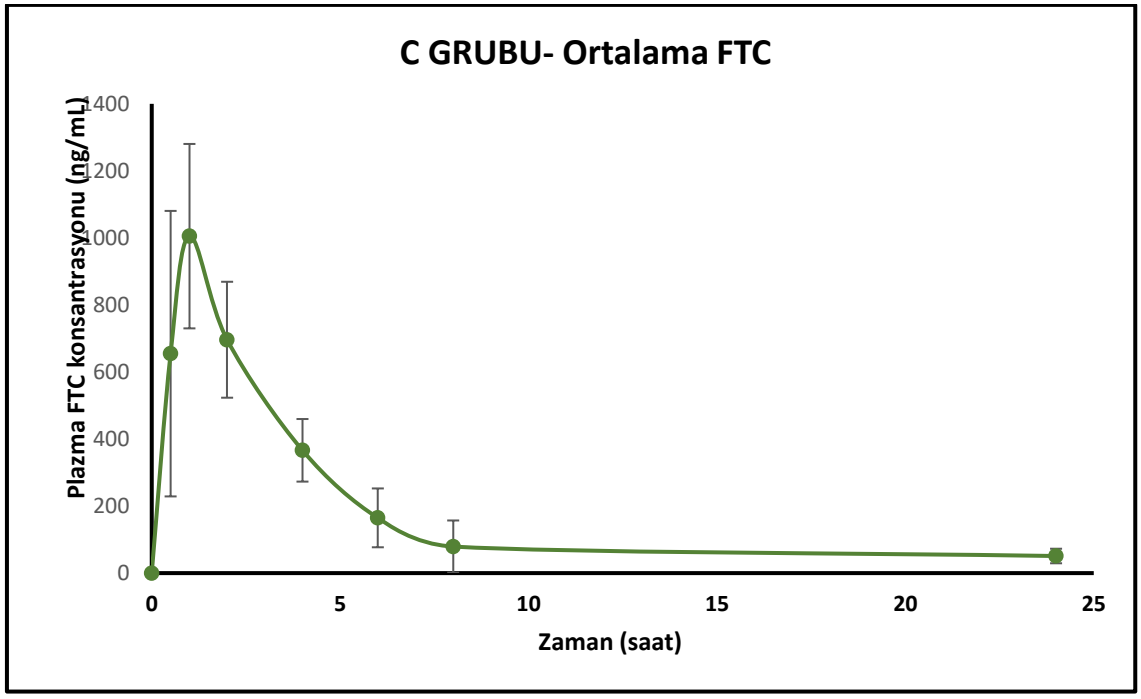
Şekil 4.123. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



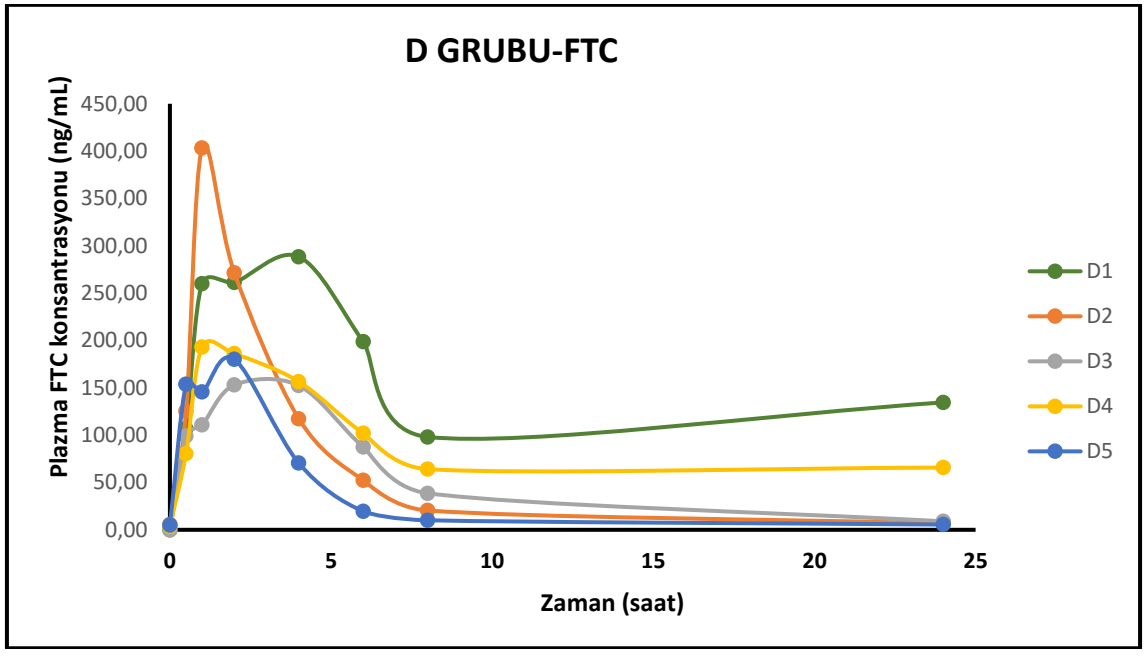
Şekil 4.124. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



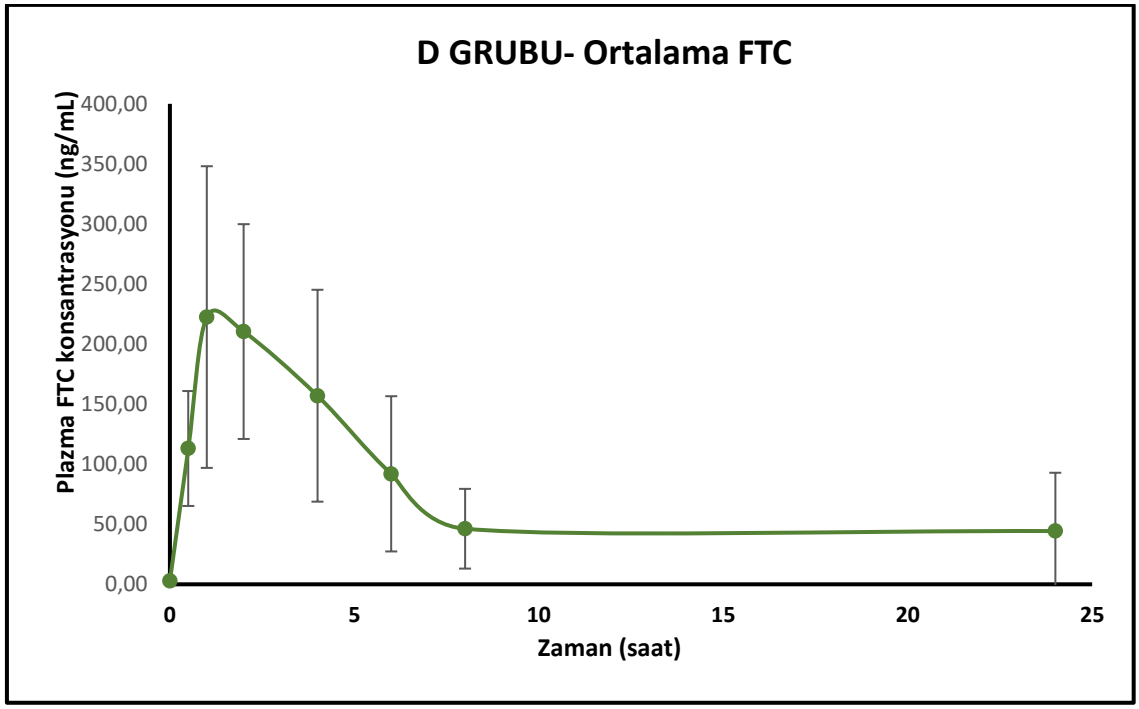
Şekil 4.125. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



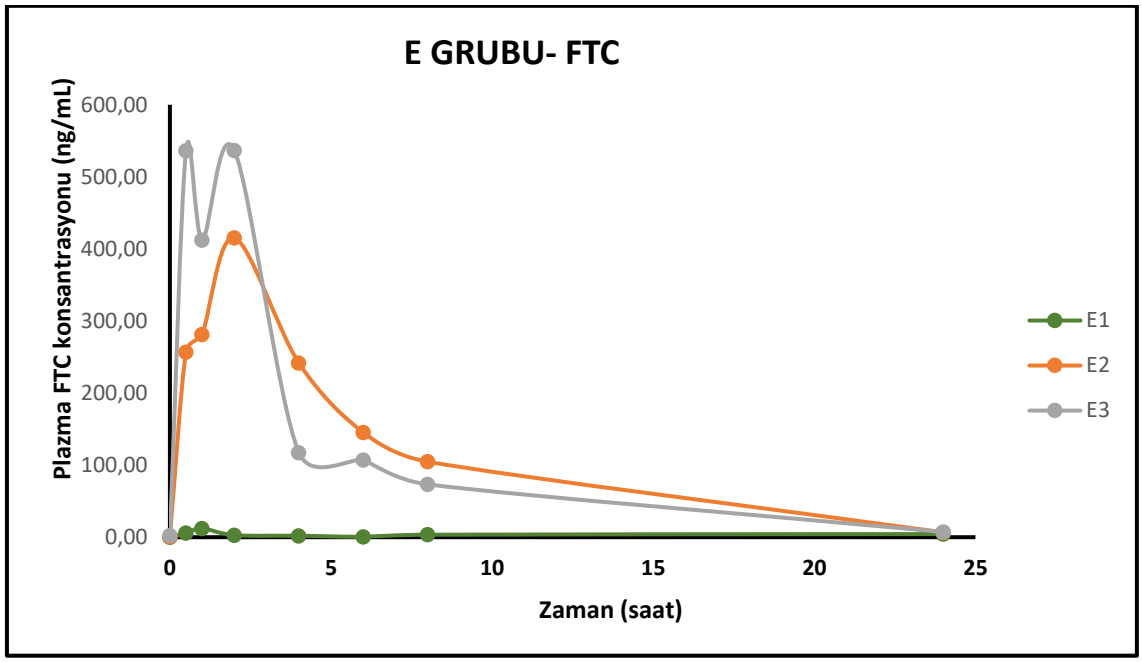
Şekil 4.126. C grubu (Truvada®) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



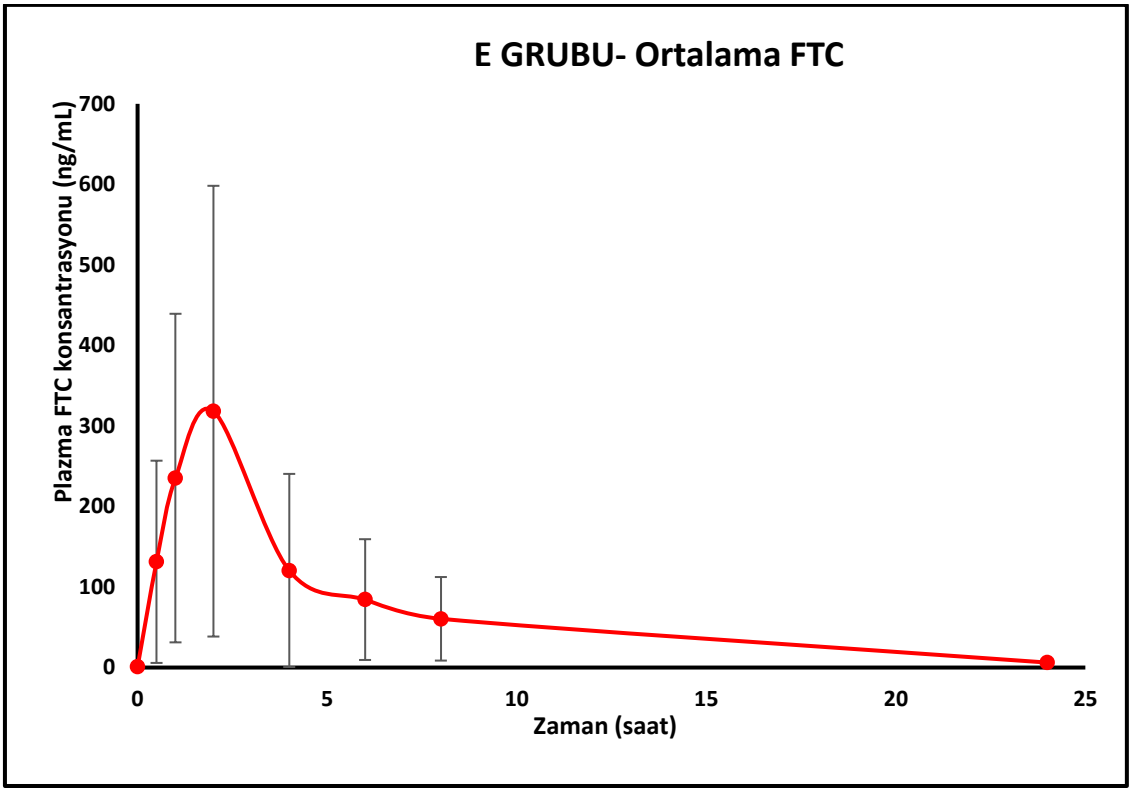
Şekil 4.127. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



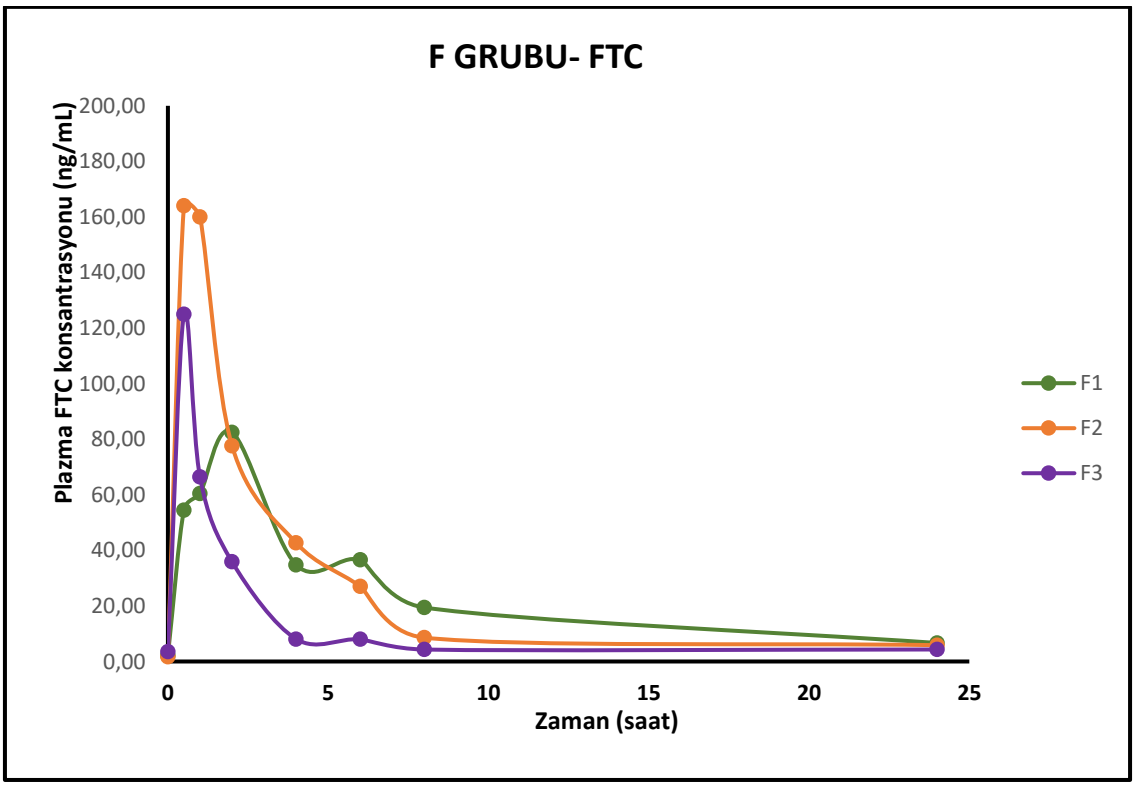
Şekil 4.128. D grubu (S1-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=6)



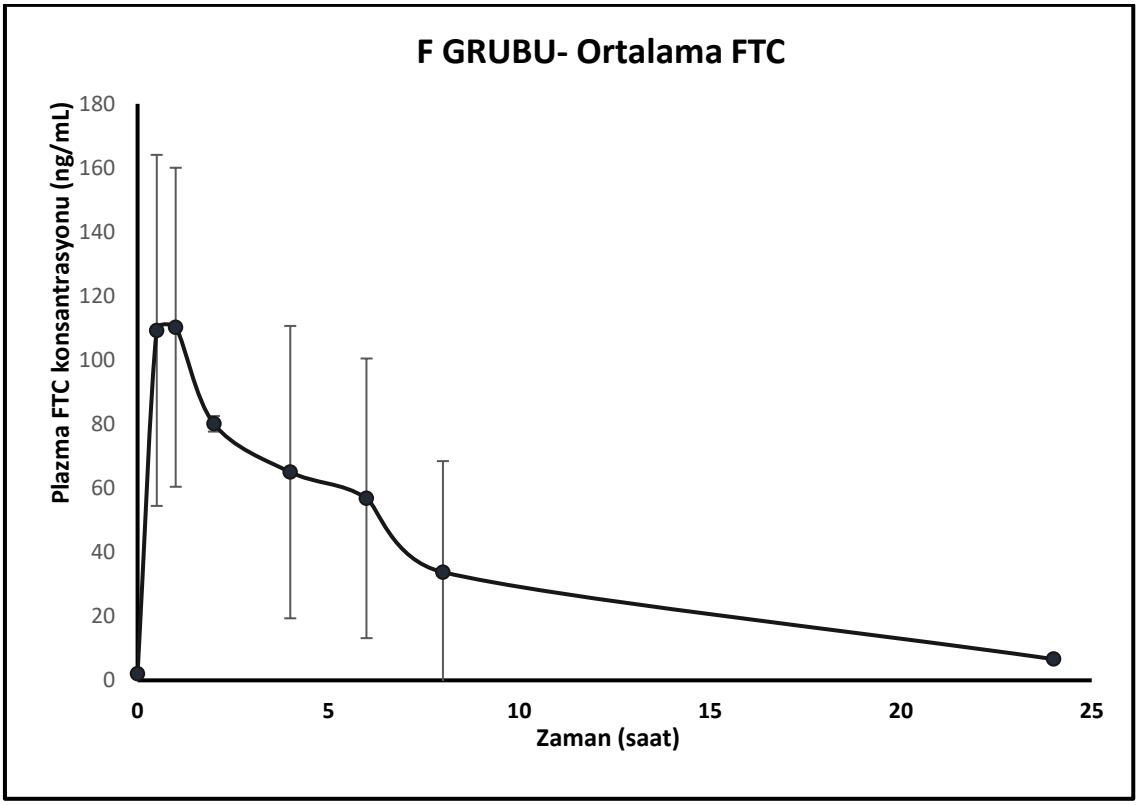
Şekil 4.129. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



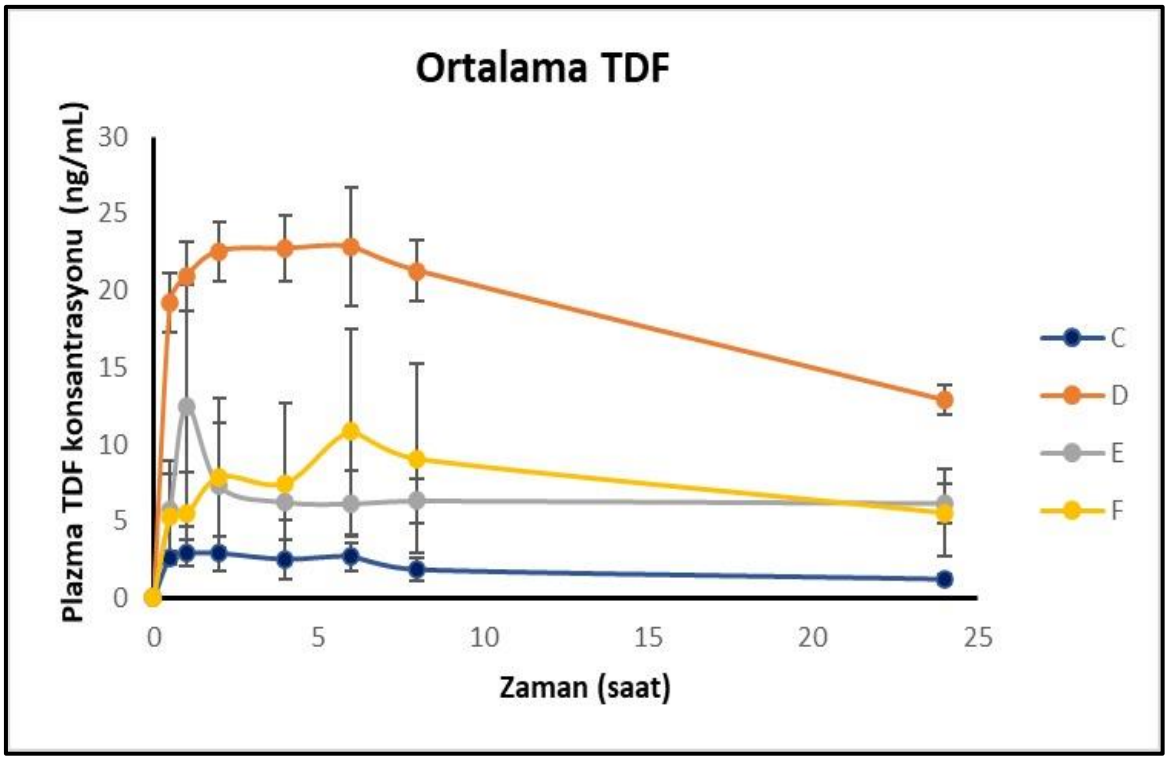
Şekil 4.130. E grubu (F4-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



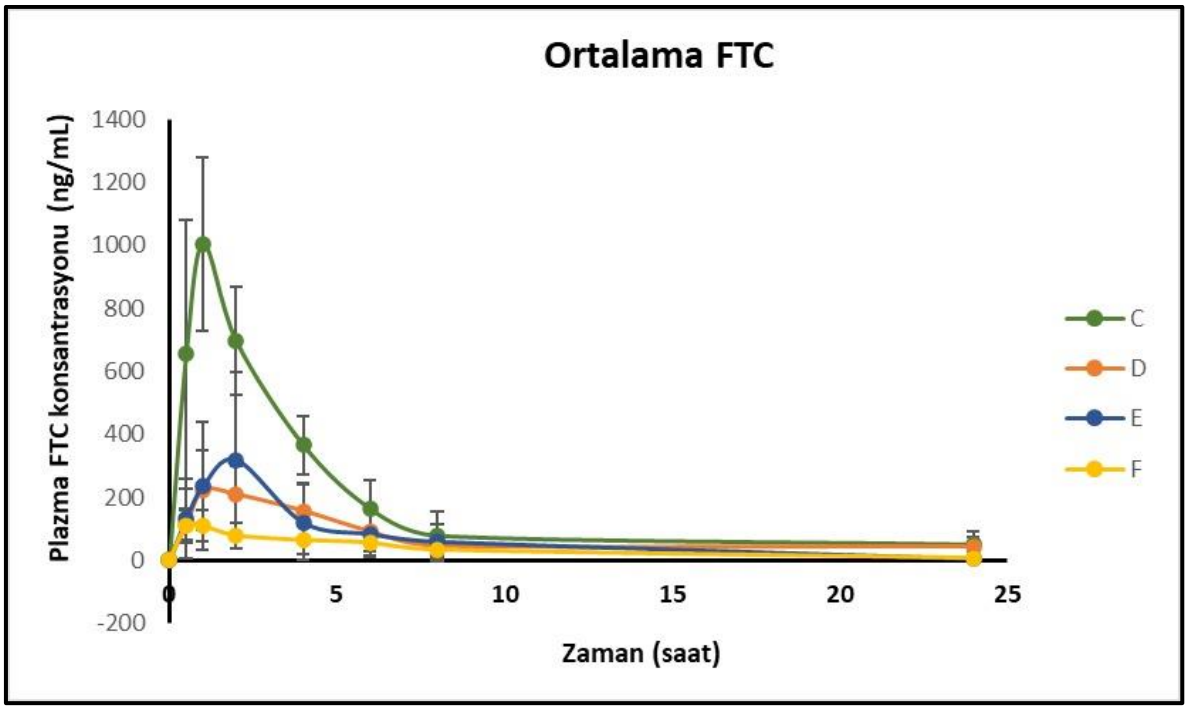
Şekil 4.131. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



Şekil 4.132. F grubu (M2-TF) tavşanlarına ait ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili (n=3)



Şekil 4.133. C, D, E ve F gruplarının ortalama TDF plazma konsantrasyonu-zaman profili



Şekil 4.134. C, D, E ve F gruplarının ortalama FTC plazma konsantrasyonu-zaman profili

Çizelge 4.61. Uygulanan nanolif ve ticari ürün sonucunda elde edilen TDF'nin Trapez yöntemi ile hesaplanan C_{max}, t_{max} ve AUC değerleri

FORMÜLASYON KODU	AUC $_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	C_{maks} (ng/mL)	t_{maks} (saat)
C GRUBU	57,95±16,56	18,37±3,08	2,17±1,94
D GRUBU	596±162	24,95±2,01	3,33±2,04
E GRUBU	224±115	21,5±6,7	3,33±4,04
F GRUBU	403±115	27,68±2,18	6±9

Çizelge 4.62. Uygulanan nanolif ve ticari ürün sonucunda elde edilen FTC'nin Trapez yöntemi ile hesaplanan C_{max}, t_{max} ve AUC değerleri

FORMÜLASYON KODU	$AUC_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	C_{maks} (ng/mL)	t_{maks}(saat)
C GRUBU	4316 ±789	1052±313	1,8±0,5
D GRUBU	1822±109	243±102	2±1
E GRUBU	2654±134	476±85	2±0
F GRUBU	484±167	123±40	1,17±0,76

Kan profillerine göre elde edilen farmakokinetik parametreler Çizelge 4.63 ile Çizelge 4.64 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.63. İn-vivo çalışmalarda TDF'ye ait farmakokinetik parametreler

Grup	Emilim hız sabiti (1/sa)	$t_{1/2}$ (saat)	t_{maks} (saat)	C_{maks} (ng/mL)	AUC $_{0-t}$ (ng.h/mL)	AUC $_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	MRT 0-inf (h)	Cl/F (mg)/(ng/ml)/h	Vz/F (mg)/(ng/ml)
C Grubu	0,039±0,023	30,961±34,247	2,833±1,835	18,672±0,798	44,931±9,571	112,665±97,349	45,389±50,442	0,364±0,141	10,778±3,602
D Grubu	0,031±0,009	23,912±7,249	3,833±2,041	24,946±2,017	444,906±27,822	893,841±140,891	34,686±10,071	0,034±0,005	1,139±0,184
E Grubu	0,026±0,019	39,171±30,619	3,333±4,041	21,942±5,450	154,139±9,710	475,157±279,349	58,990±43,880	0,0763±0,0449	3,322±0,836
F Grubu	0,0324±0,0124	24,462±12,025	6±0	27,802±6,661	180,932±112,409	367,659±170,237	37,018± 17,619	0,0978±0,0540	3,264±1,608

*MRT: Ortalama yaşam süresi, Vz/F: Sanal dağılım hacmi, Cl/F: Oral klirens

Çizelge 4.64. İn-vivo çalışmalarda FTC'ye ait farmakokinetik parametreler

Grup	Emilim hız sabiti (1/sa)	$t_{1/2}$ (saat)	t_{maks} (saat)	C_{maks} (ng/mL)	AUC $_{0-t}$ (ng.h/mL)	AUC $_{0-\infty}$ (ng.h/mL)	MRT 0-inf (h)	Cl/F (mg)/(ng/ml)/h	Vz/F (mg)/(ng/ml)
C Grubu	0,121±0,026	5,942±1,192	1,083±0,492	1052,514±313,068	4308,175±791,665	4771,668±1010,637	7,782±2,296	0,0065±0,0014	0,054±0,005
D Grubu	0,0845±0,0603	13,219±10,136	2±1,225	243,538±102,825	1808,539±1092,545	3278,749±3508,553	17,972±16,997	0,0181±0,0124	0,245±0,199
E Grubu	0,159±0,017	4,388±0,461	2±0	476,059±85,923	2541,29±273,28	2586,071±266,156	5,33±0,23	0,012±0,001	0,074±0,015
F Grubu	0,123±0,034	6,011±1,947	2,17±40,91	121,367±40,914	858,599±490,912	915,96±484,44	8,024±1,847	0,038±0,016	0,347±0,207

*MRT: Ortalama yaşam süresi, Vz/F: Sanal dağılım hacmi, Cl/F: Oral klirens

TDF için biyoyararlanım;

Bağıl Biyoyararlanım= $AUC_{DGrubu}/AUC_{CGrubu}$ x100
=893,841/112,665x100
=793,4
Bağıl Biyoyararlanım= $AUC_{EGrubu}/AUC_{CGrubu}$ x100
=475,157/112,665x100
=421,7
Bağıl Biyoyararlanım= $AUC_{FGrubu}/AUC_{CGrubu}$ x100
=367,659/112,665x100
=326,3

FTC için biyoyararlanım;

Bağıl Biyoyararlanım= $AUC_{DGrubu}/AUC_{CGrubu}$ x100
=3278,749/4771,668x100
=68,7
Bağıl Biyoyararlanım= $AUC_{EGrubu}/AUC_{CGrubu}$ x100
=2586,071/4771,668x100
=54,2
Bağıl Biyoyararlanım= $AUC_{FGrubu}/AUC_{CGrubu}$ x100
=915,96/4771,668x100
= 19,2

Vajinal dokudan miktar tayini

Bölüm 3.11.1'de belirtilen şekilde hazırlanan vajinal doku örneklerinden 24. saatteki miktar tayini sonuçları Çizelge 4.65'te verilmştir.

Çizelge 4.655. Vajinal dokuda TDF ve FTC miktarları (Ort±SS)

Grup	TDF (ng/g)	FTC (ng/g)
C GRUBU	109±38	466±65
D GRUBU	188±31	506±14
E GRUBU	41,2±23,5	104±11
F GRUBU	48,6±18,7	215±12

4.10.3. Biyokimyasal ve immunolojik çalışmalar

Dokular üzerinde gerçekleştirilen biyokimyasal çalışmalar Bölüm 3.11.3'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Karaciğer dokusu üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar

Tavşanlar feda edildikten sonra karaciğer dokusu üzerinde gerçekleştirilen MDA, GSH ve NOx biyokimyasal parametreler Çizelge 4.66-4.68 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.66. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	MDA Düzeyleri (nmol/g doku)
A Grubu	16,32±2,92
C Grubu	10,01± 0,84
D Grubu	27,28± 2,34
E Grubu	9,56±0,14
F Grubu	10,86± 0,49

Karaciğer dokusunda MDA düzeyleri birbirleri ile kıyaslanmıştır. Kontrol grubu ile uygulama grupları kıyaslandığında, tüm gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, B, C, E ve F gruplarının MDA düzeyleri anlamlı ölçüde azaldığı, D grubunun ise MDA düzeylerinin istatistiksel olarak arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gruplar arasında en yüksek MDA düzeyi D grubunda gözlemlenmiştir. C grubu ile E grubu ve F grubu arasında anlamlı farklılık gözlemlenmemektedir ($p>0,05$).

Çizelge 4.67. Karaciğer dokusu GSH düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	GSH Düzeyleri (nmol/g doku)
A Grubu	9,72±1,08
C Grubu	10,08± 0,94
D Grubu	4,35± 0,32
E Grubu	11,08±0,29
F Grubu	11,99± 0,85

Karaciğer dokusu GSH düzeylerinde, A kontrol grubu ile D, F grupları arasında anlamlı farklılık gözlemlenmektedir ($p<0,05$). C grubu ile E ve F grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$). En düşük GSH düzeyleri D grubunda tespit edilmiştir. Bu grupta MDA düzeyindeki artış, GSH tükenmesine neden olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.68. Karaciğer dokusu NOx düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	NOx Düzeyleri (µmol/g doku)
A Grubu	108,00±6,12
C Grubu	138,28 ±6,82
D Grubu	147,21±2,91
E Grubu	98,64±3,46
F Grubu	98,72± 2,10

Karaciğer dokusu NOx düzeyleri karşılaştırıldığında; A kontrol grubu ile C ve D grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). E grubu ve F grubu gruplarının NOx düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Gruplar arası en yüksek NOx düzeyi D grubunda saptanmıştır ($p<0,05$). Formülasyonların uygulanması, C grubu ve D grubunda nitrozatif stresin artmasına yol açmışken, E ve F grubunda ise baskıladığı düşünülmektedir.

Böbrek dokusu üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar

Tavşanlar feda edildikten sonra böbrekdokusu üzerinde gerçekleştirilen MDA, GSH ve NOx biyokimyasal parametreler Çizelge 4.69-4.71 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.69. Böbrek dokusu MDA düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	MDA Düzeyleri (nmol/g doku)
A Grubu	49,36±2,31
C Grubu	73,84 ±3,71
D Grubu	50,72 ± 4,40
E Grubu	33,08 ±4,93
F Grubu	32,41 ±2,19

Böbrek dokusu MDA düzeyleri karşılaştırıldığında; A kontrol grubu ile C, E ve F grupları arasında anlamlı farklılık gözlemlenmektedir ($p<0,05$). Böbrek dokusu en yüksek MDA düzeyi C grubunda saptanmıştır ($p<0,05$). E grubu ve F grubu uygulamaları arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 4.70. Böbrek dokusu GSH düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	GSH Düzeyleri (nmol/g doku)
A Grubu	15,28±1,46
C Grubu	9,27±0,94
D Grubu	8,14±0,61
E Grubu	18,71±1,37
F Grubu	20,03±1,44

Böbrek dokusu GSH düzeyleri karşılaştırıldığında, A kontrol grubu ile C, D, E ve F grupları arasında anlamlı farklılık gözlemlenmektedir ($p<0,05$). A kontrol grubuna kıyasla C ve D gruplarında GSH düzeyleri azalırken, E ve F gruplarında GSH düzeyleri artmıştır ($p<0,05$). E grubu ile F grubu uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemektedir ($p>0,05$). Gruplar arasında GSH düzeyi en yüksek grup F grubunda iken GSH düzeyi en düşük D grubunda olarak tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.71. Böbrek dokusu NOx düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	NOx Düzeyleri (µmol/g doku)
A Grubu	67,31±2,40
C Grubu	36,10±2,61
D Grubu	39,98±1,84
E Grubu	71,66±1,54
F Grubu	72,29±1,88

Böbrek dokusu NOx düzeyleri karşılaştırıldığında; A kontrol grubu ile kıyaslandığında B, C ve D grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). B grubu ile kıyaslandığında diğer uygulama grupları arasında istatistiksel anlamda farklılık gözlemlenmektedir ($p<0,05$). C grubu ile kıyaslama yapıldığında D grubu ile arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemektedir ($p>0,05$). Ancak C grubu ile E ve F grupları kıyaslandığında E ve F gruplarında NOx düzeylerinde anlamlı artış gözlemlenmektedir ($p<0,05$). E ve F grupları arasında anlamlı farklılık gözlemlenmemektedir ($p>0,05$).

Vajina dokusu üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar

Tavşanlar feda edildikten sonra vajinal doku üzerinde gerçekleştirilen MDA, GSH ve NOx biyokiyasal parametreler Çizelge 4.72-4.74 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.72. Vajina dokusu MDA düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	MDA Düzeyleri (nmol/g doku)
A Grubu	34,51±3,03
C Grubu	19,26±1,16
D Grubu	53,58±4,14
E Grubu	26,11±1,55
F Grubu	24,21±2,22

Vajina dokusunda MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, A kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında tüm gruplarla arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gruplar arasında en yüksek MDA düzeyi D grubunda tespit edilmiş olup, en düşük MDA düzeyi C

grubunda tespit edilmiştir (p<0,05). E ve F uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemektedir (p>0,05).

Çizelge 4.73. Vajina dokusu GSH düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	GSH Düzeyleri (nmol/g doku)
A Grubu	4,32±0,91
C Grubu	5,94±0,25
D Grubu	4,51±0,30
E Grubu	5,56±0,59
F Grubu	5,90±1,60

Vajina dokusu GSH düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmemektedir (p>0,05).

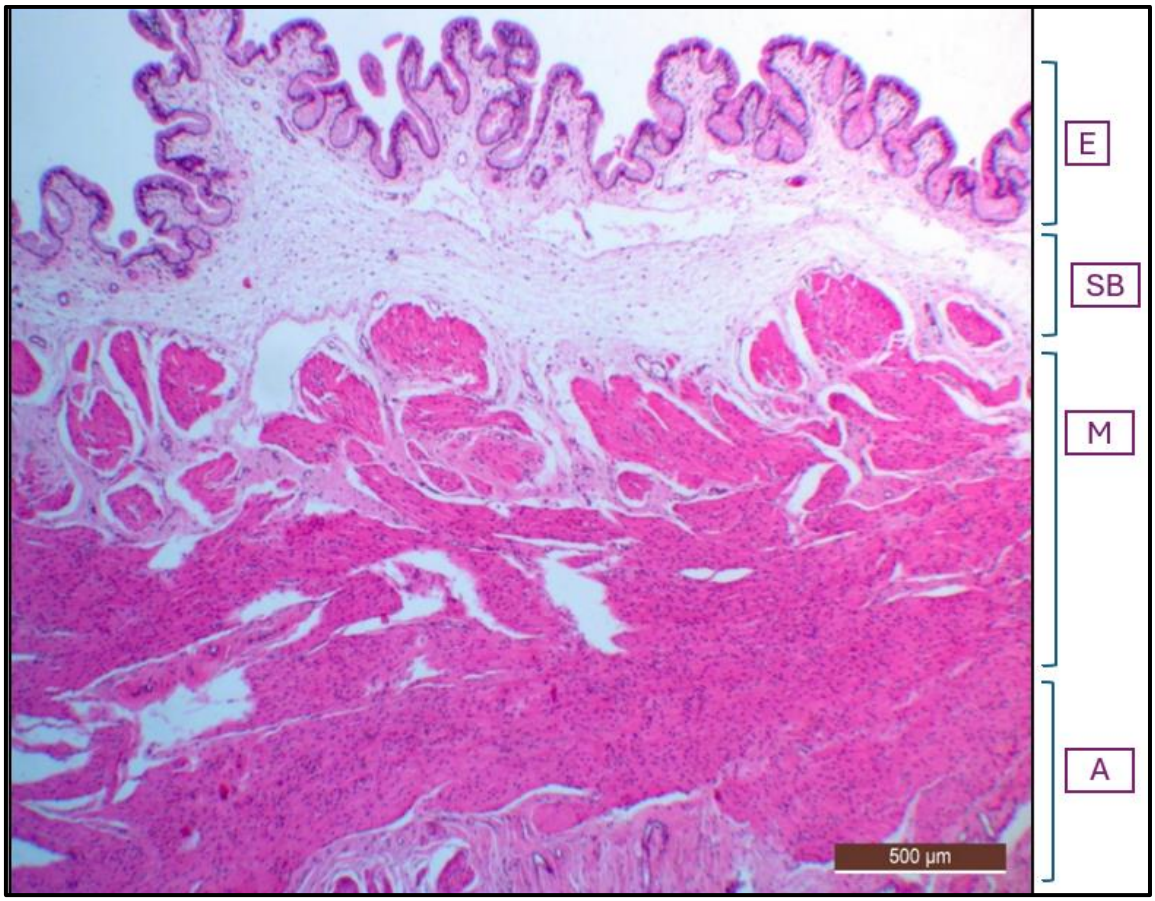
Çizelge 4.74. Vajina dokusu NOx düzeyleri (Ort±SS)

Gruplar	NOx düzeyleri (µmol/g doku)
A Grubu	43,03±3,48
C Grubu	51,04±2,53
D Grubu	58,30±2,90
E Grubu	42,53±2,52
F Grubu	40,34±1,66

Vajina dokusu NOx düzeyleri değerlendirildiğinde; A kontrol grubu ile C ve D grubu arasında anlamlı farklılık gözlemlenmektedir (p<0,05). Tüm gruplar arasında C ve D gruplarında vajina dokusu NOx düzeyleri artmıştır (p<0,05). Tüm gruplar arasında en yüksek NOx düzeyi D grubunda gözlemlenmiştir (p<0,05). Tüm gruplar arasında en düşük NOx düzeyi F uygulama grubunda tespit edilmiştir (p<0,05).

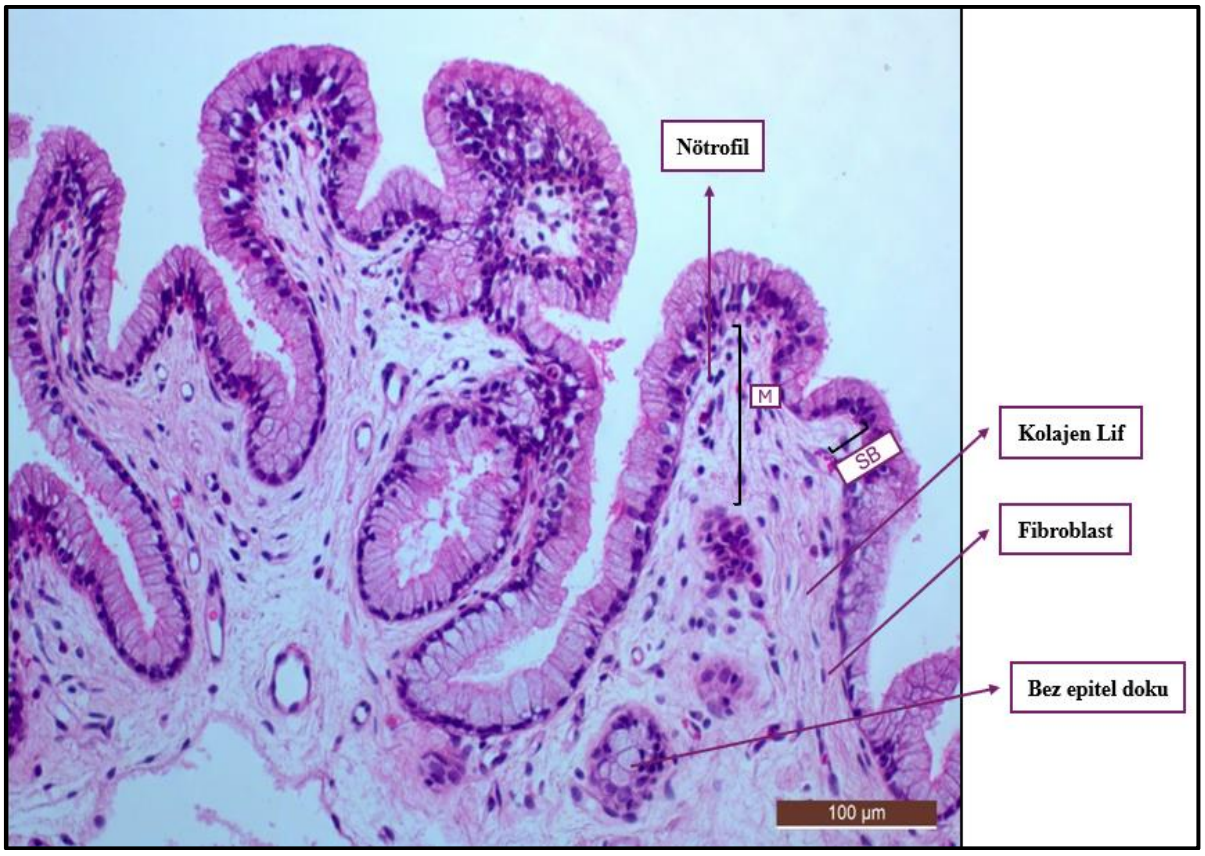
4.10.4. Histopatolojik değerlendirmeler

Histopatolojik değerlendirmeler Bölüm 3.11.4'te belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Dokulardan alınan kesitler Resim 4.14-4.21 arasında verilmiştir.



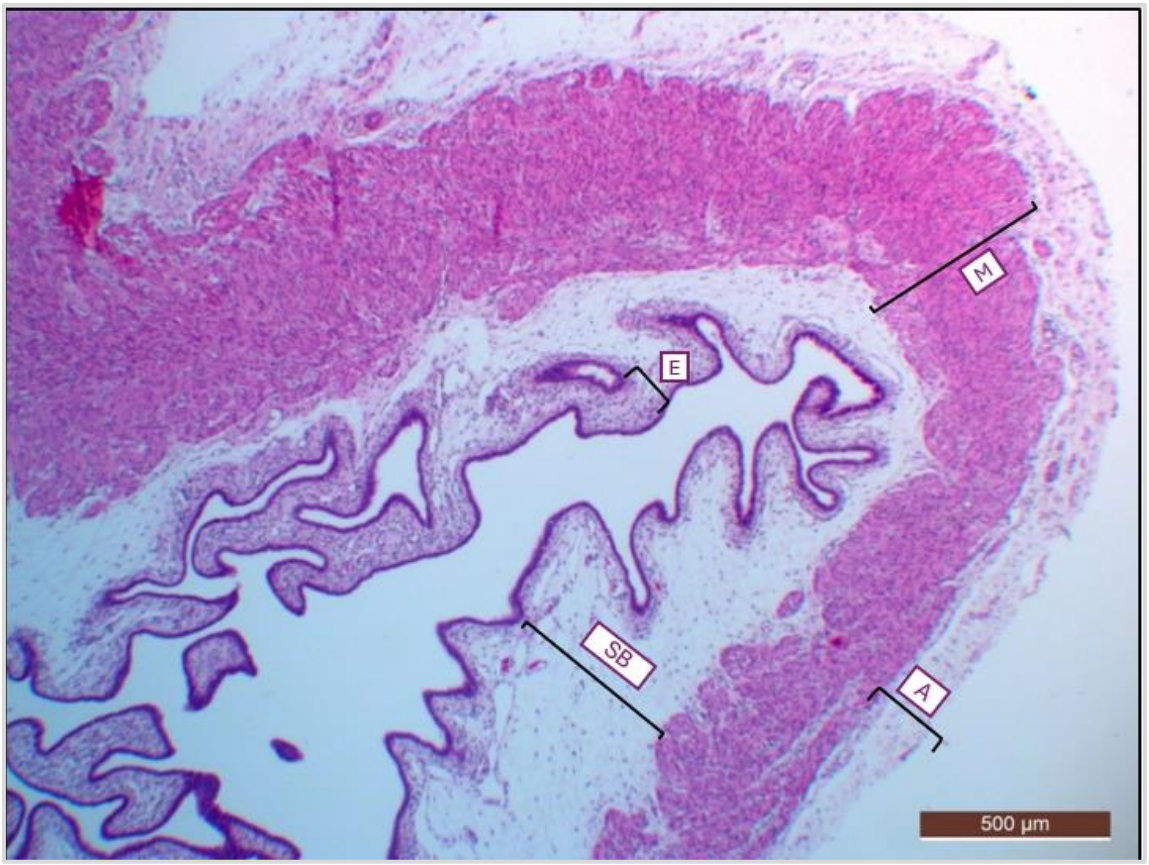
Resim 4.14. A grubu vajina dokusunun genel görüntüsü. E: En dışta mukaza tabakası (Tunica mucosa), M: Gevşek bağ dokusu, müsküler tabaka (Tunica muscularis, A: Adventisya tabakası normal. X4.

En dış kısımda E ile gösterilen çok tabakalı yassı epitel mukoza tabası normal ve şekil bütünlüğünü korumuştur. M ile gösterilen bölgede enine ve boyuna düz kas tabakaları yer almaktadır. A ile belirtilen tabaka ise sıkı bağ dokusudur ve vajinayı çevre dokulara bağlamaktadır ve herhangi bir farklılık gözlenmemektedir.



Resim 4.15. A grubu vajina histolojik değerlendirilmesi. E: Epitelyal mukoza tabakası, SB: submukoza tabası, M: Müsküler tabaka, A: Adventisya tabaka. X20

Resim 4.15'te M ile gösterilen müsküler tabaka normal görünümdedir. Submukozada bulunan bez epiteli normal, bağ dokusu normal, hücreler (fibroblast+nötrofiller+kollagen lifler) normal görünümdedir.



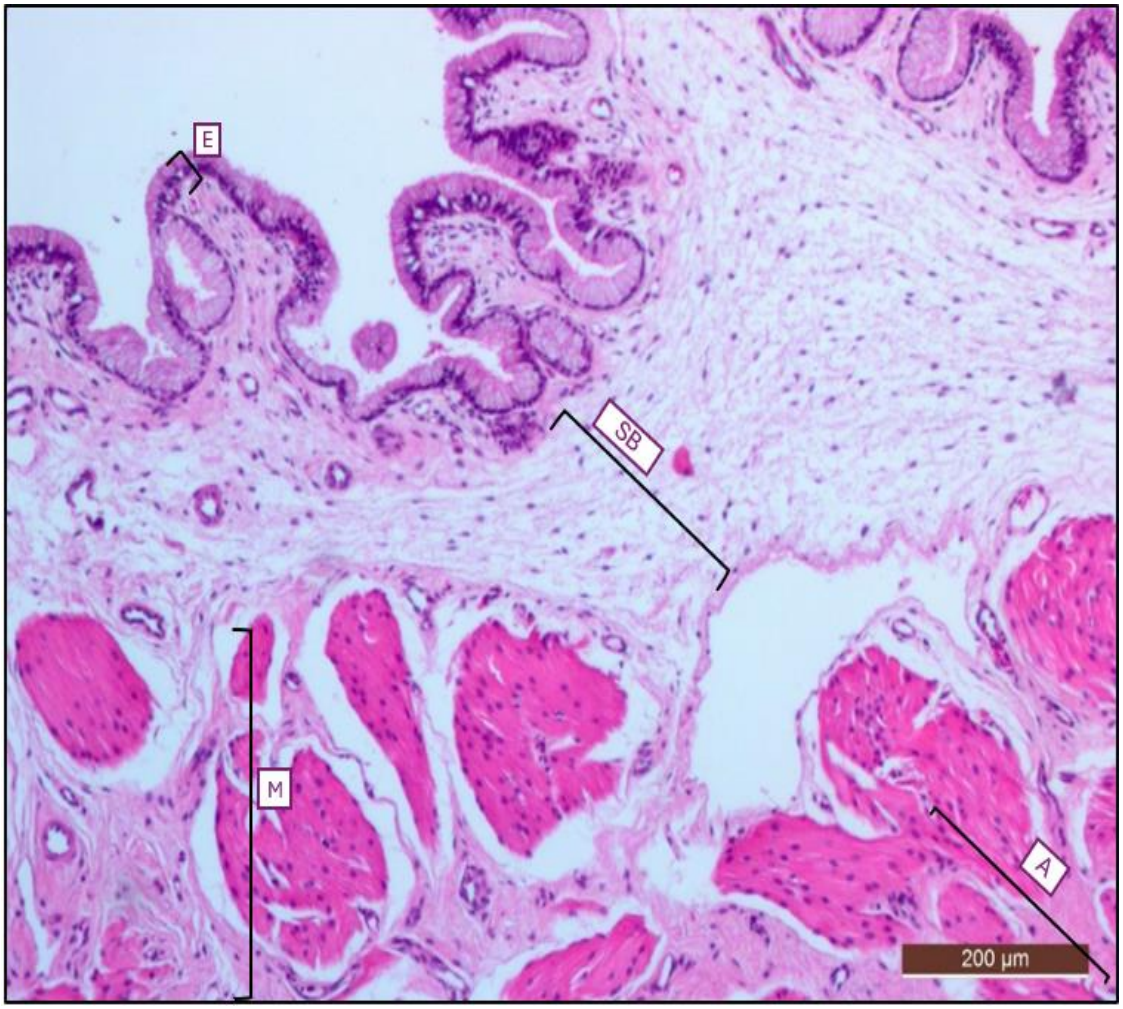
Resim 4.16. C grubu vajina histolojik değerlendirilmesi. E: Epitelyal mukoza tabakası, SB: submukoza tabası, M: düz kas hücreleri enine boyuna normal, A: Adventisya tabaka. x4

C grubunun, E ile gösterilen mukoza tabakası normal, çok katlı yassı epitel dokusu normal olarak gözlenmiştir. SB ile gösterilen bölgedeki bağ dokusu hücre (lenfosit-nötrofil-kollagen lif) yapıları normal gözlenmiştir. Adventisya tabakası normal görünümdedir.

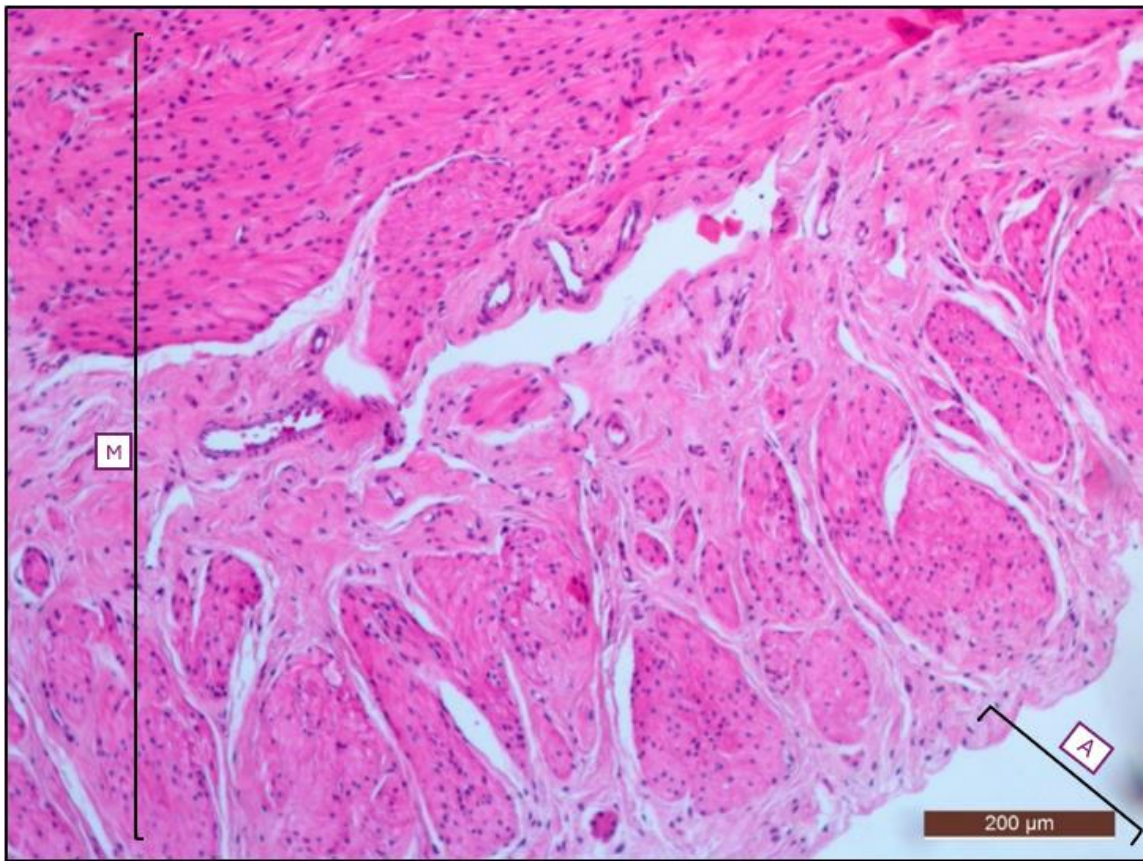


Resim 4.17. C grubunun vajinal histolojik incelenmesi E: Epitelyal mukoza tabakası, SB: submukoza tabası, M: düz kas hücreleri enine boyuna normal, A: Adventisya tabaka.X10

C grubunun histolojik sonuçlarında mukoza tabakası ve çok katlı yassı epitel normal, submukoza tabası ve submukozal bezler normal görünümdedir. Bağ dokusu hücre (lenfosit-nötrofil-kollagen lif) yapısı normal, M ile gösterilen enine ve boyuna düz kas hücreleri normal, Advensiye tabakası normal normal görünümdedir.

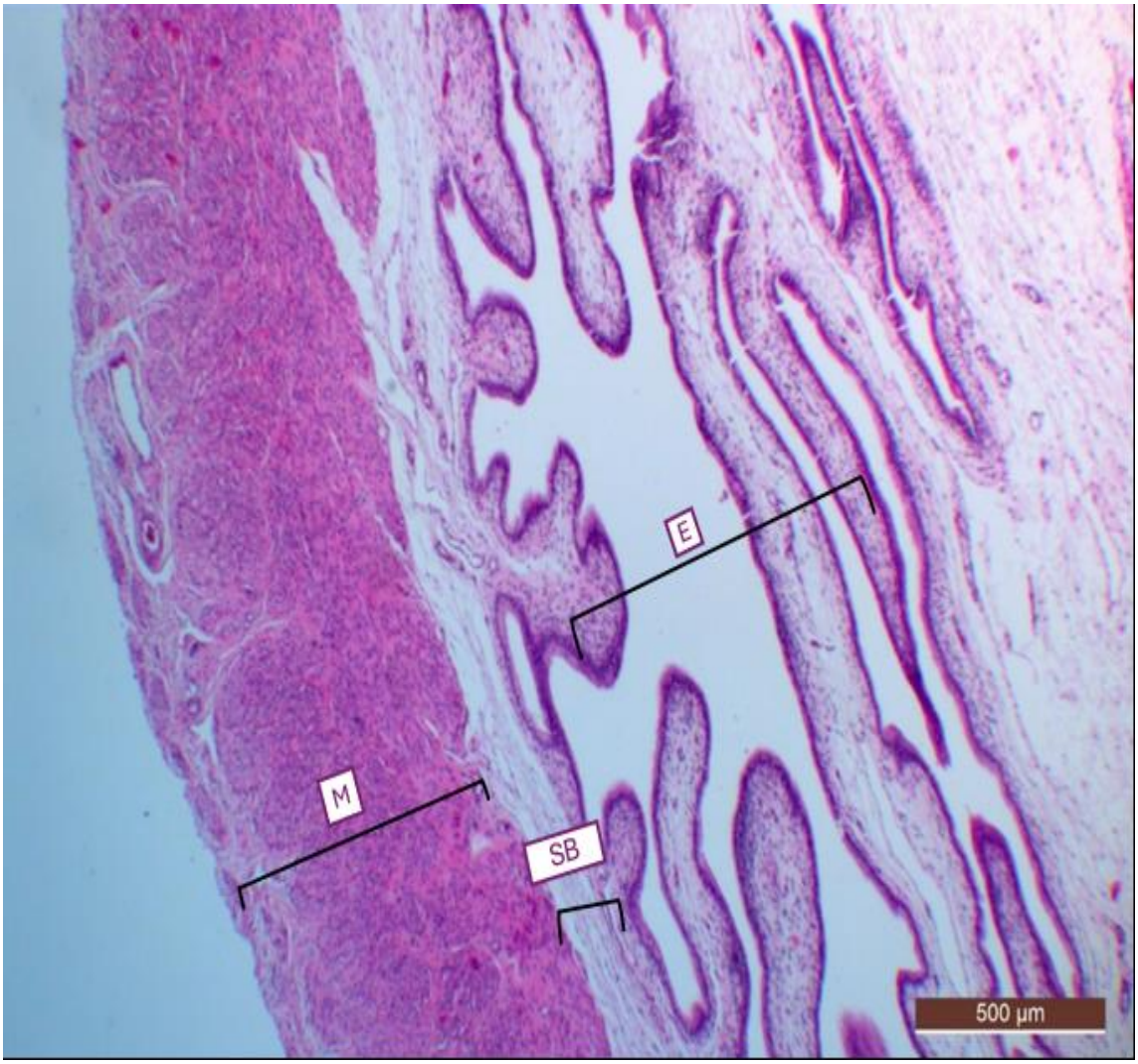


Resim 4.18. D grubunun vajinal histolojik incelenmesi E: Epitelyal mukoza tabakası, SB: submukoza tabası, M: Müsküler tabaka, A: Adventisya tabaka. X10



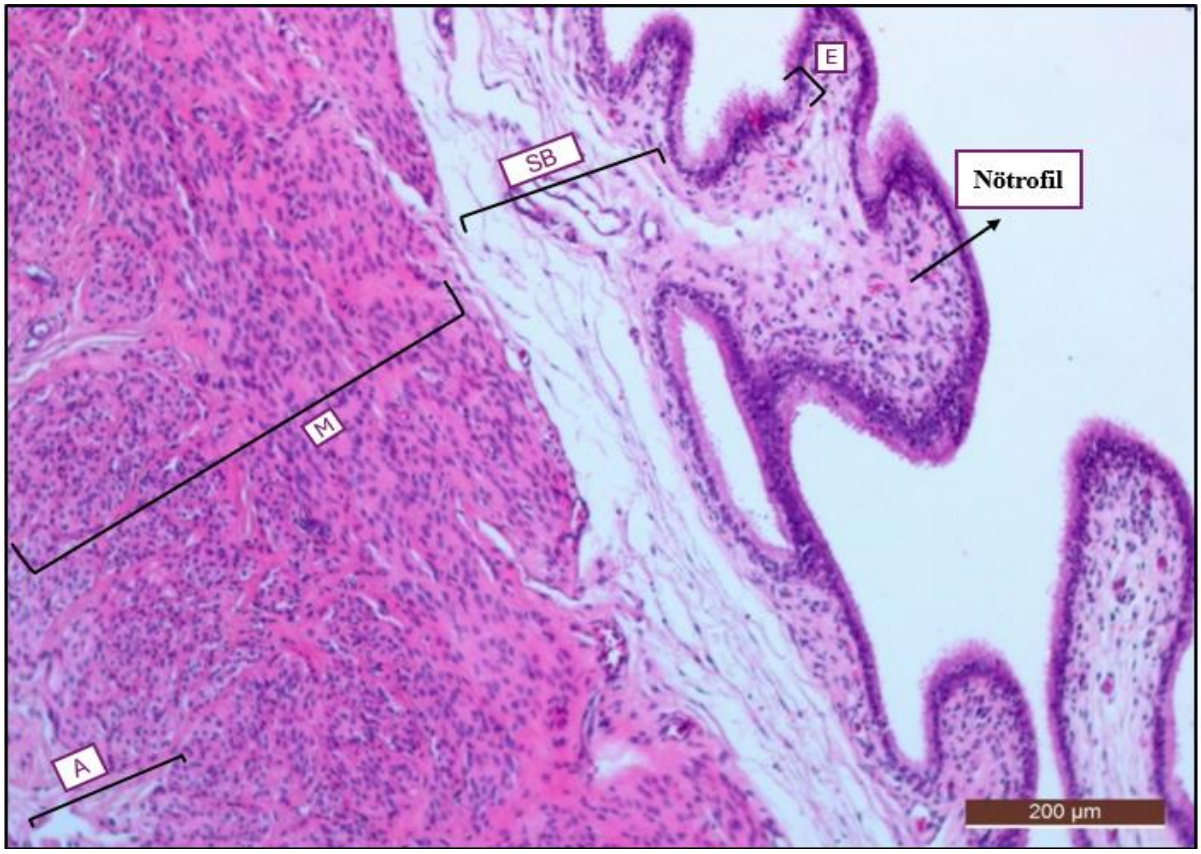
Resim 4.19. D grubunun vajinal histolojik incelenmesi. M: Müsküler tabaka, A: Adventisya tabaka. X10

Resim 4.19'da gösterilen D grubunun çok katlı yassı epitel yapısı ve kollagen lifler ve bağ dokusu hücreleri (lenfosit- nötrofil-kollagen lif) normal görünümdedir. Müsküler tabakada düz kas enine ve boyuna normal gözlemlenmiştir. Adventisya tabakası normal görünümdedir.



Resim 4.20. E grubunun vajinal histolojik incelenmesi E: Epitelyal mukoza tabakası, SB: submukoza tabası, M: Müsküler tabaka, A: Adventisya tabaka. X4

Resim 4.20'de gösterilen E grubunun çok katlı yassı epitel yapısı ve kollagen lifler ve bağ dokusu hücreleri (lenfosit- nötrofil-kollagen lif) normal görünümdedir. Müsküler tabakada enine ve boyuna düz kaslar normal gözlemlenmiştir. Adventisya tabakası normal görünümdedir.



Resim 4.21. E grubunun vajinal histolojik incelenmesi E: Epitelyal mukoza tabakası, SB: submukoza tabası, M: Müsküler tabaka, A: Adventisya tabaka. X4

Resim 4.21'de gösterilen E grubunun çok katlı yassı epitel yapısı ve kollagen lifler ve bağ dokusu hücreleri (lenfosit- nötrofil-kollagen lif) normal görünümdedir fakat nötrofil infiltrasyonu mevcuttur. Müsküler tabakada enine ve boyuna düz kaslar normal gözlemlenmiştir. Adventisya tabakası normal görünümdedir.

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasının amacına yönelik olarak HIV/AIDS profilaksi ve tedavisine yönelik kombine antiretroviral ilaç içeren nanolif formülasyonları geliştirilmiştir. İlk olarak, PVA polimeri kullanılarak ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı moleküler ağırlıklarında PVA tipleri kullanılarak nanolif formülasyonları üretilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları ile düşük molekül ağırlığında PVA ile kesintisiz ve homojen lifler elde edildiği ve farklı polimerler ile özelliklerinin geliştirilmesi için elektroçekim yöntemi ile modifikasyonlara daha uygun olduğu belirlenmiştir. PVA bazlı nanolif formülasyonlarının üretim parametrelerinin ve polimer çözelti özelliklerinin üretilen nanolif formülasyonlarının özelliklerine etkisini incelemek için deney tasarımı gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarına dayanarak %10 PVA içeren çözelti ile hazırlanan nanolif formülasyonları optimum özelliklerinden dolayı baz formülasyon olarak belirlenmiştir. Baz PVA formülasyonunun mukoadezyon özelliklerini artırmak için çeşitli polimerler kullanarak PVA bazlı mukoadezif nanolif formülasyon grubu hazırlanmış ve uygun mekanik ve mukoadezif özellik gösteren formülasyonlara TDF ve FTC yüklenerek karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. PVA bazlı nanolif formülasyonları kontrollü salım özelliği sağlamadığı için zein bazlı nanolif grubu hazırlanmış ve karakterizasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda zeinin mekanik özelliklerini geliştirmek için PVP ve PEO gibi vajinal uygulamalar için kullanılan mukoadezif ve iyi mekanik özellik gösteren polimerler ile üretilmiştir. Bu formülasyon grubunda uygun çözücü sistemi geliştirilemediği için PVA kullanılamamıştır. Zein-PVP veya Zein-PEO nanolifleri sadece zein ile hazırlanan nanoliflerden daha iyi mekanik ve mukoadezif özelliklere sahip olsa da vajinal uygulama için uygun bulunmamıştır.

Daha sonraki çalışmalarda, PLGA'nın kontrollü salım özelliğinden dolayı kompozit nanolif formülasyonlarının hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu kapsamda sadece PLGA ve PLGA ile mukoadezif polimerlerin (PVP ve PEO) birlikte kullanıldığı nanolifler üretilmiştir.

Formülasyon çalışmalarının sonunda mukoadezif özellikleri artırmak ve kontrollü salım özelliklerini artırmak için tabakalı nanolifler PLGA ve PVA polimleri kullanarak hazırlandı. PLGA ile hazırlanan tabakalı nanolif formülasyonları orta kısımda TDF ve FTC içeren PLGA nanolifini içerek şekilde geliştirilmiştir. Alt ve üst tabakalarında mukoadezif PVA nanolifleri ile hazırlanmıştır. Orta tabakada kontrollü salım yapan PLGA nanoliflerinden

oluşmaktadır. Nanoliflerin in vitro karakterizasyon çalışmalarında; yapısal karakterizasyonlar, morfolojik özellikleri, etkin madde yükleme etkinlikleri, mekanik özellikleri, temas açıları, BET ile yüzey analizleri, Franz hücresi ile in vitro salım özellikleri ve USP sepet yöntemi ile çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Seçilen nanolifde; ex-vivo alıkonma, ex-vivo permeabilite ve mukoadezyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimum formülasyonlar Yeni Zelanda tipi tavşanlara uygulanarak farmakokinetik çalışmalar, biyokimyasal ve histopatolojik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

5.1. Etkin Maddelerin Karakteristik Özellikleri

5.1.1. DSC analizleri

Formülasyonlarda kullanılan etkin madde ve polimerler arasında herhangi bir geçimsizlik ya da etkileşim olup olmadığının incelenmesi amacıyla DSC çalışmaları yapılmıştır. TDF ve FTC'nin yapısal karakterizasyon çalışmaları DSC ile yapılmıştır.

TDF'nin DSC'de tespit edilen erime noktası (118,29 °C), literatürdeki erime derecesi aralığı ile uyumlu olarak bulunmuştur. Literatürlerde elde edilen TDF pikleri, birincisinin α-polimorfu 112-114°C arasında ve ikincisi β-polimorfu 117-118°C arasında iki pik göstermiştir (E. H. Lee, Smith, Fanwick ve Byrn, 2010; J. P. A. Silva ve diğerleri, 2017). TDF'nin kristal formlarının erime entalpileri, çözünürlükleri ve içsel çözünme hızları ayırt edilememektedir. Bu nedenle bu katı hal farklılıklarının istenmeyen formülasyon veya klinik sonuçlara yol açma olasılığı düşüktür.

FTC'nin DSC termogramında, FTC'nin termal ayrışmadan önce eridiğini göstermektedir. Literatürde, FTC'nin DSC pikleri 149,7°C ve erime ısısı (tepe alanı) 96,1 g^{-1} olarak belirtilmiştir. FTC'nin, termal bozunma işlemlerinin ilk aşaması hem moleküller arası hem de molekül içi oksidasyon reaksiyon süreçlerini içermektedir. FTC'nin ilk DSC eğrisi endotermik bir tepe noktasıdır, bu da bunun esas olarak termal bir parçalama işlemi olduğu anlamına gelmektedir. DSC'deki ikinci FTC eğrisi ekzotermik bir tepe noktasıdır, bu da bunun bir oksidasyon bozunma süreci olduğu anlamına gelmektedir. Benzer şekilde Fathima ve ark., saf FTC'nin DSC termogramı, sırasıyla erime noktasını ve bozunma seviyesini gösteren 153,40°C'de keskin bir endotermik pik ve 256,81°C'de ekzotermik bir pik göstermiştir (Fathima, Hari ve Devi, 2014). Al-Majed ve arkadaşları ise FTC'nin

yaklaşık 154°C'de zirve yapan bir endotermik erime geçişine ve yaklaşık 220°C'de başlayan bir ekzotermik ayrışma geçişine sahip olduğunu belirtmişlerdir (Al-Majed ve diğerleri, 2020).

5.1.2. FTIR analizleri

Maddelerin FTIR analizi değerlendirildiğinde literatür ile uyumlu pikler ve titreşimler elde edildiği gözlenmiştir.

TDF FTIR Analizi

TDF'nin FTIR spektrumunda elde edilen pikler yapısal olarak bulunan gruplarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Patil ve arkadaşları TDF'nin FTIR analizinde; 3322,75, 2985,27, 1736, 1689, 1267,97, 1103,88, 727,996, 681,22 ve 627,77 cm^{-1}'de karakteristik zirveler gözlemlemişlerdir (S. Patil, Kadam ve Pokharkar, 2017). 1689 ve 1736 cm^{-1}'deki FTIR pikleri, TDF'nin fumarat kısmından C=O gerilmesini belirtmektedir, 3322,75 cm^{-1}'deki pik NH_2 gerilme titreşimini, 1267,97 ve 1103,88 cm^{-1}'deki pikler ise sırasıyla aromatik halkadaki C=C gerilmesinden ve C-O grubu/CH_2OH gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Çalışmada elde edilen 2985,27, 727,996 ve 627,77 cm^{-1} civarındaki zirveler sırasıyla CH alifatik gerilmesine, düzlem dışı CH_2 bükülmesine ve CH bükülmesine karşılık gelmektedir. 681,22 cm^{-1}'deki pik düzlem bükülmesi olmayan aromatik halkayı belirtmektedir.

Bashir Khan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada TDF'nin intravajinal uygulanması için kitosan nanopartikül geliştirmişlerdir (Bashir Khan ve Sharnagat Thakur, 2014). FTIR analizlerinde TDF'nin pikleri çalışmamıza benzer olarak; 1373 cm^{-1} (CH_3-zayıf pik), 1170 (P=O gerilmesi), 829 ve 979 cm^{-1}'da (R-CH=CH_2 bükülmesi) ve 721 cm^{-1}'da (C-H bükülme) olacak şekilde gözlenmiştir.

Silva ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise TDF'nin FTIR'da absorpsiyon bantları; 3600–3200 cm^{-1}'de aromatik ikincil aminde bir gerilme, 1400–1200 cm^{-1} ve 1650–1580 cm^{-1}'de N-H birincil amin bükülmesi, 1250–1020 cm^{-1}'de alifatik tersiyer aminden C–N bükülmesi, 1800-1600 cm^{-1}'de esterden C=O gerilmesi olarak gözlenmiştir. Çalışmamızda yapılan çalışmalarla uyumlu pikler Bölüm 4.1.2'de verilen Şekil 4.3'te gösterilmiştir. TDF'nin yapısal karakteristik pikleri FTIR analizlerinde gözlenmiştir.

FTC-FTIR analizi

Literatürde FTC'nin FTIR analizinde, hidroksi grubunun geniş absorpsiyon bandı 2710-2965 cm^{-1}'de, NH absorpsiyon bandı 3280 cm^{-1}'de, amid (C=O) grubu 1640-1690 cm^{-1} bölgesinde, C-F grubu 1000-1400 cm^{-1} bölgesinde, alkenil C-H grubu 3100-3010 cm^{-1} bölgesinde ve alkenil C=C grubu 1680-1620 cm^{-1}'de bölgesinde gözlenmiştir (Al-Majed ve diğerleri, 2020).

Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada da benzer şekilde FTC'nin FTIR analizlerinde 1,3-oksatiyolan halkasına ait yapısal pikleri 1053 cm^{-1}'de C-OH bandı ve 1105 cm^{-1}'de C-O-C bandı olacak şekilde bulunmuştur (X.-J. Wang ve diğerleri, 2015).

Fathima ve arkadaşları ise FTC'nin FTIR spektrumları, 1154,4 cm^{-1}'de C-N gerilmesinin, 1629,28 cm^{-1}'de C=O gerilmesinin ve 3421,27 cm^{-1}'de O-H gerilmesi olacak şekilde gözlemişlerdir (Fathima ve diğerleri, 2014).

Mulik ve arkadaşları, FTC'nin yapısal iskeletiyle ilişkili O−H, C=N ve C=C'ye karşılık gelen 3336 cm^{-1}, 2111 cm^{-1} ve 1637 cm^{-1}'deki karakteristik sinyalleri göstermişlerdir (Mulik, Dhumal, Harale, Kharat ve Sathe, 2018).

Çalışmamızda yapılan çalışmalarla uyumlu pikler Bölüm 4.1.2'de Şekil 4.4'te gösterilmiştir. FTC'nin yapısal karakteristik pikleri FTIR analizlerinde gözlenmiştir.

5.1.3. XRD analizleri

XRD analizi maddelerin kristalografik yapısı, kristal fazlarının belirlenmesi, kimyasal bileşim hakkında bilgi veren mikroyapısal analiz yöntemlerinden biridir. XRD analizlerinde kristal özellikteki maddeler karakteristik pikleri gözlenirken amorf yapıdaki maddelerin pikleri gözlenmemektedir. Kristallik derecesi, maddelerin elastik özellikleri ve mekanik özelliklerini belirlediği için en önemli özelliklerden birisidir. XRD verileri ayrıca üretim teknolojilerini, kullanımlarını ve değişikliklerini araştırmak için de kullanılabilmektedir (Quinn ve Benzonelli, 2018). Farklı çalışmalar, ön formülasyon aşamasında ilaç-eksipiyan uyumluluğunu aydınlatmak için XRD analizini kullanmaktadır (Tiţa, Fuliaş, Bandur, Marian ve Tiţa, 2011).

TDF’nin kristal yapı analizinde, literatür ile uyumlu olarak 10,29° ila 25,07° 2θ bölgesi arasında karakteristik tepe noktaları gözlenmiştir. TDF'nin kristalin yapısını belirten tepe noktaları litertürde; 10.29 (1339), 10.59 (2540), 13.48 (1954), 14.17 (1361), 18.32 (3212), 18.80 (3258), 19.95 (4172), 21.36 (2438), 22.02 (3077), 25.07 (4419) bölgelerinde açı (2θ ± 2) ve pik yoğunlukları şeklinde belirtilmiştir (Avlani ve diğerleri, 2024). XRD analizinde, TDF'nin karakteristik pikleri 24.43°'deki ana tepe noktasının ve 4.96°, 10.29°, 19.89° ve 24.29°'deki ikincil tepe noktalarının gözlenmiştir (J. P. A. Silva ve diğerleri, 2017). FTC’nin kristal yapı analizinde, literatür ile uyumlu olarak 13.61±0.2, 15.54±0.2, 19.49±0.2, 20.55±0.2, 25.89±0.2, 28.09±0.2 ve 29.10 karakteristik piklerinin açısal konumlarını gösterilmiştir (Fonseca, Tenorio Clavijo, Alvarez, Ellena ve Ayala, 2018). XRD analizleri her iki ilacında kristal yapıda olduğunu göstermektedir.

5.2. Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

TDF ve FTC’yi analiz etmek için literatürde UV spektrofotometre, UPLC, HPLC, HPLC-kütle spektrometrisi gibi çeşitli analiz yöntemleri kullanılmıştır (Soni, 2013). Kombine TDF ve FTC’nin UV spektrofotometrede oranlarının türevi, birinci dereceden türev ve absorbansı düzeltilme gibi yöntemlerle spektrofotometrik olarak analiz edilebilmektedir (Choudhari ve diğerleri, 2011).

Ultraviyole, fotodiyot dizisi dedektörleri, kütle spektrofotometresi dedektörleri ile birleştirilmiş HPLC yöntemi bu ilaçların, safsızlıkların belirlenmesi ve ayrılması için kullanılan hızlı, güvenli ve hassas teknolojilerden biridir (R. K. Mishra ve diğerleri, 2020). Çalışmalarımızda TDF ve FTC’nin analizi için HPLC yöntemi kullanılmıştır.

TDF ve FTC’nin SVS ortamındaki HPLC yöntemi için kullanılan dalga boyu maksimum absorbans verdiği dalga boyu değeri seçilerek kullanılmıştır. Şekil 4.7’de ise TDF’in 260 nm’de, Şekil 4.8’de ise FTC’nin ise 280 nm’de maksimum absorbans verdiği tespit edilmiştir. Hamarapurkar ve arkadaşları, FTC’nin ve bozunma ürünlerinin analizi için geliştirdikleri HPLC yönteminde analizi 280 nm’de gerçekleştirmişlerdir (Hamarapurkar ve Parate, 2013). TDF’nin HPLC analizi için geliştirilen metot 260 nm’de gerçekleştirilmiştir (Ashenafi ve diğerleri, 2010). Çalışmalarımızda seçilen dalga boyu literatür ile uyumlu olarak seçilmiştir.

TDF ve FTC'nin analizi HPLC'de farklı yöntemler kullanarak gerçekleştirilmiştir. Analiz çalışmalarında her iki yöntem için asetonitril ve 1 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Ashenafi ve arkadaşları FTC'nin HPLC ile analizinde, gradyan akış yönteminde mobil faz olarak asetonitril, fosfat tamponu ve su kullanmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dk ve 280 nm'de analiz gerçekleştirmişlerdir (Ashenafi, Ungerböck, Hoogmartens ve Adams, 2013). Reddy ve arkadaşları da benzer şekilde fosfat tamponu ve asetonitril kullanarak TDF ve FTC'nin HPLC ile analizini gerçekleştirmişlerdir (B. Reddy, Reddy ve Reddy, 2015).

TDF ve FTC için 0,5–50 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusal bir yanıt elde edilmiştir. Kullanılan metot TDF ve FTC'nin seçici olarak analiz edilmesini sağlamıştır. TDF ve FTC'nin SVS ortamında hazırlanan standart doğrusunda, doğrunun kesişim değerinin sıfır noktasından geçtiği bulunmuş ve bu noktalara ait doğrunun eğimi kullanılmıştır.

Doğruluk ve geri elde değeri TDF ve FTC için üç farklı konsantrasyon seviyesinde kontrol edilmiştir. Kullanılan yöntem için ortalama yüzde geri kazanımlar hesaplanmıştır. Geri kazanımı TDF için %96,542±0,0721 ile %102,33±0,0577 aralığında; FTC için %102,92±0,083 ile %107,83±0,057 aralığında bulunmuştur. Sonuçlara dayanarak, kullanılan yardımcı maddelerin formülasyonlarındaki TDF ve FTC analizine etkisi olmadığı görülmüştür. Hesaplanan derişim değerinin birbirine yakın olması yani olması ICH Q2 (R1) klavuzunda yer alan % bağıl sapma değerinin %2'nin altında olması gerekmektedir. Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4 yer alan bütün bağıl sapma değerlerinin %2'nin altında olduğu görülmüştür ve yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

Kesinlik çalışmaları sonuçları deney içi ve deneyler arası kesinlik için % bağıl standart sapma değerleri %2'den az bulunmuştur. Derişimlerin yakın olması ICH Q2 (R1) klavuzunda yer alan % bağıl sapma değerinin %2'nin altında olup olmamasına göre değerlendirilmiştir. TDF için Çizelge 4.5'te yer alan deney içi kesinlik bulguları BSS değer %0,1; FTC için Çizelge 4.6'de %0,112 olarak bulunmuştur. TDF ve FTC'nin deneyler arası kesinlik bulguları Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi bağıl sapma değeri %2'nin altında bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kullanılan analiz yöntemi deneylerin tekrarlanabilir olduğunu kanıtlamıştır.

Her iki madde ile yapılan seçicilik çalışmalarında yardımcı maddelerin gerçekleştirilen HPLC analizinde herhangi bir pik vermediği görülmüştür. Kullanılan analitik yöntemin TDF ve FTC'ye özgü olduğu gösterilmiştir.

TDF ve FTC için hazırlanan stok çözeltiler, 25°C ve 37°C'de 24 saatlik beklemenin ardından alıkonma süresi ve TDF ve FTC'nin pik alanlarında değişiklik gözlenmemiştir. Etkin maddelerin pH 4,2 SVS ile 25°C'de ve 37°C'de yapılan çözelti kararlılığı çalışmalarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Stabilite çalışmalarında kullanılan başlangıç ve 24. saat değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

Validasyon çalışmaları sonucunda elde edilen LOD ve LOQ değerleri, kalibrasyon doğruları elde edilirken kullanılan konsantrasyonlardan daha düşük bulunmuştur. Böylelikle yapılan analiz çalışmaları boyunca ölçülen değerlerin, metodun duyarlılık sınırından daha düşük olmadığı ve metodun, TDF ve FTC miktar tayininde güvenle kullanılabileceği gösterilmiştir.

Vajinal ortamın pH'sının taklidi amacıyla TDF'nin ve FTC'nin pH 4,2 olacak şekilde SVS içerisinde kalibrasyon doğruları ve denklemleri belirlenmiştir. TDF ve FTC için SVS içerisinde gerçekleştirilen analitik yöntem validasyon çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde, elde edilen bağıl sapma sonuçlarının %2'den küçük olduğu görülmüştür.

TDF ve FTC'nin HPLC ile analizi başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yöntemin doğrusal, doğru, tekrarlanabilir, kesin, seçici ve spesifik olduğu, yöntemin güvenilirliğinin kanıtlandığı gösterilmiştir. Maddeler için önerilen yöntem analizde başarıyla uygulanmıştır.

5.3. TDF ve FTC ve Kullanılan Polimerlerin Geçimlilik Çalışmaları

Formülasyonlarda kullanılan TDF, FTC ve polimerler arasında herhangi bir geçimsizlik ya da etkileşim olup olmadığının incelenmesi amacıyla DSC, XRD ve FTIR çalışmaları yapılmıştır.

5.3.1. DSC analizleri

Etkin madde ve polimerlerin tek başına ve karışımlarının termogramları alınarak karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.21'de gösterildiği gibi PVA bazlı mukoadezif polimerler için seçilen polimer için gerçekleştirilen DSC analizinde PVA'nın erime noktasına bağlı olarak 193,8 °C'de endotermik bir pik göstermiştir. Sudhamani ve ark. DSC analizinde saf PVA'nın erime noktasını 202°C olarak bulmuştur (Sudhamani, Prasad ve Sankar, 2003). PEO'nun DSC analizinde Reddy ve arkadaşları erime derecesini 72 °C'de bulmuşlardır (M. R. Reddy ve diğerleri, 2016). Çalışmamızda kullanılan polimerin DSC termogramında erime derecesi 75 °C'de gözlenmiştir. TDF, FTC ve polimerler ile hazırlanan karışımlarda PEO için elde edilen pik termogramlarda gözlenmiştir.

Zein bazlı nanolif formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik kullanılacak polimerler ile gerçekleştirilen DSC analizlerinde zeinin etkin madde ve polimer ile karışımında maddelerin karakteristik piklerini etkilemediği gözlenmiştir (Luo, Zhang, Whent, Yu ve Wang, 2011). PVP'nin 150-180 derece arasında camsı geçiş sıcaklığı olmasına rağmen, 150-200 derece arasında saf PVP'de herhangi bir endotermik pik gözlemlenmemiştir (Şekil 4.22). PVP'nin 50 ile 100 derece arasında hafif ve geniş bir piki bulunmaktadır (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2020).

PLGA kopolimerleri amorf yapıdadır ve camsı geçiş özelliği gösterir (yaklaşık 45°C), ancak erime noktaları yoktur (Hausberger ve DeLUCA, 1995). Sun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PLGA'nın 52 °C'de endotermik pikini gözlemlemişlerdir (S.-B. Sun, Liu, Shao ve Miao, 2015). PLGA, PEO ve etkin maddelerin karışımının maddelerin karakteristik piklerinde hernagi bir değişim oluşturmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.23).

Tabakalı nanolif formülasyonları için kullanılan PLGA ve PVA polimerlerinin birlikte ve etkin maddelerle kullanımı için fiziksel karışımları Şekil 4.24'te incelenmiştir. Maddelerin karakteristik pikleri karışımda gözlenmiştir ve herhangi bir değişiklik oluşmamıştır.

TDF ve FTC ile hazırlanan nanolif formülasyonların kullanılan polimer ile etkin maddelerin 1:1 oranındaki fiziksel karışımlarından elde edilen DSC termogramlarında, TDF ve FTC

miktarındaki azalmaya bağlı olarak piklerde küçülme meydana gelmiştir ve bunun dışında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum her iki polimerin karıştırılmasıyla elde edilecek formülasyonlarda geçimsizlik olmayacağını göstermektedir.

5.3.2. FTIR analizleri

FTIR, maddelerin fonksiyonel gruplarının kimyasal yapısını aydınlatmak için kullanılan bir yöntemdir. Moleküllerin enerji seviyeleri hakkında bilgi vermektedir. Bileşenlerin kimyasal yapısı belirlenir ve kalite kontrolleri için kullanılabilmektedir. Ayrıca formülasyon geliştirildikten sonra meydana gelen yapısal değişikliklerde belirlenebilmektedir.

Bir spektrumun yorumlanmasında moleküllerin fonksiyonel grupları için 4000 ila 1500 cm^{-1} aralığında bantlar gözlenmektedir; ikili ve üçlü bağlar, tekli bağlardan daha yüksek dalga boyu göstermektedir (Schmitt ve Flemming, 1998). 1500 cm^{-1}'in altındaki aralık deformasyon, bükülme ve halka titreşimleri açısından önemlidir. Bu bölge, maddeye göre spesifiktir ve spektrumun "parmak izi bölgesi" olarak adlandırılmaktadır. Formülasyonda kullanılan maddelerin fiziksel karışımlarının FT-IR spektrum analizinde maddelere ait karakteristik pikler görülmektedir.

PVA-FTIR analizi

Yapılan çalışmalarda, PVA'nın spektrumundaki hidroksil bandı 3354 cm^{-1}'de bulunmuştur (Kadir, Aspanut, Majid ve Arof, 2011). Mansur ve arkadaşları, PVA'nın karakteristik FTIR bantlarında; O–H moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağlarını 3550–3200 cm^{-1}'de, C-H alkil gruplarını 2840-3000 cm^{-1}'de, C=O bantlarını 1750-1735 cm^{-1}'de, C-O kristal bantlarını 1141 cm^{-1}'de, C-O-C bantlarını 1150-1085 cm^{-1}'de ve CH_2 gruplarını 1461-1417 cm^{-1}'de gözlemlemişlerdir (Mansur, Sadahira, Souza ve Mansur, 2008). Doğan ve arkadaşları PVA'nın karakteristik FTIR piklerini 2938 cm^{-1}'de ve 2906 cm-1'de alkil gruplarının C-H gerilimini gözlemlemişlerdir (Doğan ve Sezer, 2020). Kharazmi ve arkadaşları, 3280 cm^{-1}'de O-H gerilimini, 2917 cm-1'de CH2 asitmetrik gerilimini, 1690 cm^{-1}'de C=O karbonil gerilimini, 1425 cm^{-1}'de CH_2 bandını, 1324 cm^{-1}'de C-H deformasyonunu, 1081 cm^{-1}'de C-O gerilimini, 839 cm^{-1}'de C-C gerilimini gözlemlemişlerdir (Kharazmi ve diğerleri, 2015). Çalışmamızda sonucunda elde edilen

gerilim bantları Bölüm 4.1.2'de verilen Şekil 4.25'te gösterilmiştir ve literatürler ile uyumlu bulunmuştur.

PLGA FTIR analizi

Singh ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, 2948 ve 2998 cm^{-1}'deki karakteristik piklerin PLGA'nın C–H, C–H_3 ve C–H_2 fonksiyonel grubunun gerilme titreşiminden kaynaklandığını ayrıca spektrumda gözlemlenen 1397, 1426 ve 1454 cm^{-1}'deki zirvelerin C=O gruplarıyla bağlantılı spektrumla ilişkili bulunmuştur (R. Singh ve diğerleri, 2015).

PLGA'nın yapısındaki 1770 ile 1750 cm^{-1} arasındaki bölgede gözlenen yoğun bantlar, iki monomerde bulunan karbonil gruplarının gerilme titreşimine bağlanmaktadır. 1300 ile 1150 cm^{-1} arasındaki orta şiddetteki bantlar sırasıyla asimetrik ve simetrik C-C(=O)-O gerilmelerle ilişkili bulunmuştur. Bu bölgelerdeki bantlar esterlerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Laktit ve glikolit için FTIR spektrumundaki 3500 cm^{-1} ve 3450 cm^{-1} bantları, OH grubunun esneme titreşimlerini belirtmektedir (Erbetta, Alves, Magalh, de Souza Freitas ve de Sousa, 2012; G. Singh, Kaur, Kaur ve Kaur, 2014)

Gaspar ve arkadaşları PLGA'nın FTIR analizinde; alifatik CH gerilmesine (2918.50 cm^{-1}), CO esterine (1746,44 cm^{-1}), karbonil CO gerilmesine (827,47 cm^{-1}) ve de C–O eter grubuna karşılık gelen bantları (1082,79 cm^{-1}) gözlemlemişlerdir (Gaspar ve diğerleri, 2018).

Çalışmamızda PLGA'nın gerilme bantları Şekil 4.26'da gösterilmiş ve literatürle uyumlu bulunmuştur.

Zein-FTIR Analizi

Deng ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, C=O gerilme titreşimine ve C-N bağının gerilmesine karşılık gelen, yaklaşık 1650 cm^{-1} (amid I) ve 1540 cm^{-1}'de (amid II) protein bantları gözlemlemişlerdir (Deng ve diğerleri, 2018).2960 cm^{-1} civarındaki soğurma bantları, alifatik grupların C-H esneme titreşimlerini belirtmektedir. 1454 cm^{-1}, 1406-1412 cm^{-1}, 1336 cm^{-1} ve 1245 cm^{-1}'deki absorpsiyon bantları, N-H bükülmesi ve C-N gerilmesi kombinasyonuna, C-N bağının gerilmesi, metil grubunun C-H deformasyonunu, C-N gerilmesini ve N-H bükülmesini belirtmektedir. 3500 cm^{-1} ile 3100 cm^{-1} arasında gözlemlenen geniş absorpsiyon bandı, N-H gerilme titreşimini ifade etmektedir.

Bancila ve arkadaşları zein üzerine yaptıkları FTIR analizinde; karboksil gruplarını spektrumda 3443 cm^{-1} ila 3434 cm^{-1} ve yaklaşık 2936 ila 2927 cm^{-1} aralığında ve bu tür bantların sudaki hidrojen bağına veya N-H gruplarına etki edebileceğini; 1633-1641 cm^{-1} arasındaki amid I bandı önemli bir bant olduğu ve temel olarak C=O gerilme titreşimi ile ilişkili bulunmuştur (Bancila, Ciobanu, Murariu ve Drochioiu, 2016). Amit II bandı genellikle N-H bükülme titreşiminden ve C-N gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. Çeşitli peptid konformasyonlarıyla ilişkili önemli bantlar da 1400 cm^{-1}'in altında bulunmuştur. Ali ve arkadaşları, zeinin spektrumunda sırasıyla 1643 (C=O gerilmesi), 1531 (N-H bükülmesi ve C-N gerilmesi) ve 1240 cm^{-1}'de amid I, II ve III'e karşılık gelen karakteristik bantları göstermiştir (Ali, Khatri, Oh, Kim ve Kim, 2014). Forato ve arkadaşları, zein ftır spektrumunda benzer olarak karakteristik protein bantlarını, 3600 ila 3100 cm^{-1} arası amid A, 1750 ila 1600 cm^{-1} arası amid I ve 1500 ila 1400 cm^{-1} arası amid II olarak belirtmişlerdir (Forato, Bicudo ve Colnago, 2003).

Çalışmamızda zeinin'nın gerilme bantları Şekil 4.27'de gösterilmiş ve literatürle uyumlu bulunmuştur.

PVP-FTIR analizi

Zidan ve arkadaşları PVP'nin FTIR spektrumunda karakteristik bantlarını; 3455 cm^{-1} OH gerilmesi, 2955 cm^{-1} CH_2 asimetrik gerilme, 1660 cm^{-1} C=O gerilmesi, 1500 cm^{-1} C=N'nin (piridin halkası) karakteristik titreşimi, 1460 cm^{-1} CH_2'nin CH bükülmesi ve/veya OH bükülmesi, 1435 cm^{-1} CH_2 titreşimleri, 1374 cm^{-1} CH_2 bükülmesi, 1288 cm^{-1} CH_2 bükülmesi veya sallanması, 1224 C-C gerilmesi ve/veya CH_2 deformasyonu, 846 cm^{-1} CH_2 bükülmesi ve 733 cm^{-1} CH_2 sallanması olarak bulmuşlardır (Zidan, Abdelrazek, Abdelghany ve Tarabiah, 2019).

Baganizi ve arkadaşları, PVP'nin, pirolidon C=O grubuna karşılık gelen 1659 cm^{-1}'de gerilme bandı gözlenmiştir (Baganizi, Nyairo, Duncan, Singh ve Dennis, 2017) Çalışmalar, güçlü hidrojen bağının genellikle 1664 cm^{-1}'in altında C=O gerilme bandı ile gösterilmiştir (Rahma, Munir, Prasetyo, Suendo ve Rachmawati, 2016). Diğer PVP bantları, 1284 cm^{-1}, 1421 cm^{-1} ve 1458 cm^{-1}'deki C–N gerilme titreşimleri ve PVP'nin $–CH_2$ emilimini içermektedir ve PVP'deki C–H bağına bağlı olarak absorpsiyon zirvesi 1371 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Ayrıca, PVP spektrumu 2950 cm^{-1}'de bulunan net absorpsiyon tepe noktaları

ve sırasıyla –OH simetrik gerilme ve –CH asimetrik gerilme titreşim tepe noktalarına bağlı olarak 3434 cm^{-1}'de ortalanan geniş bir tepe noktası göstermektedir (Edikresnha, Sriyanti ve Munir, 2017). Mireles ve arkadaşlarının çalışmasında, PVP'nin FTIR spekturumunda 3400 cm^{-1} (O–H gerilmesi), 2900 cm^{-1} (C–H gerilmeleri), 1645 cm^{-1} (amid I) ve 1490–1420 cm^{-1} (C–H deformasyonları) gibi bazı pikler belirtilmiştir (Mireles, Wu, Saadeh, Yahia ve Sacher, 2020).

PVP'nin karakteristik pikleri literatürde verilen pikler uyumlu olarak çalışmamızda Şekil 4.28'de gösterilmştir.

PEO-FTIR analizi

PEO'nun spektrumunda 400 cm^{-1}– 4000 cm^{-1} aralığındaki en belirgin iki absorpsiyon kompleksi göstermektedir (Pucić ve Jurkin, 2012). İlki, 2960 cm^{-1} ile 2890 cm^{-1} arasında metilen gerilmesinden kaynaklanır, diğeri ise yaklaşık 1100 cm^{-1}'de eter grubu ve metilen grubu gerilmesinin kombinasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan, ayrıca –C–O–C– soğurma kompleksidir.

Abdelrazek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, PEO spektrumu 2885 cm^{-1}'de metilen grubunun C-H asimetrik gerilmesini gösteren keskin bir bant gözlenmiştir (Abdelrazek, Abdelghany, Badr ve Abdelrahim, 2016). CH_2 asimetrik bükülmesi sırasıyla 1345 cm^{-1}'de açıkça görülmektedir. 1240 cm^{-1}'deki nispeten küçük bant CH_2 simetrik bükülmesinden kaynaklanmaktadır. 1110 cm^{-1}'de yer alan absorpsiyon bandı C-O-C esneme moduna karşılık gelmektedir. 956 ve 840 cm^{-1}'deki bantlar, C–O gerilmesinin etkisiyle CH_2 asimetrik sallanma hareketinden kaynaklanmaktadır.

Şekil 4.25 ile Şekil 4.29 arasında formülasyonda kullanılan etkin madde ve polimerlerin 1:1 karışımlarının IR spektrumları verilmiştir. Bu spektrumlar incelendiğinde formülasyon bileşenlerinin fiziksel karışımlarının gerilim bantlarının bozulmadan yer aldığı gözlenmiştir.

5.4. Elektroçekim İşleminde Kullanılacak Polimer Karışımlarının Çözelti Karakterizasyonu

Elektroçekim işleminde kullanılacak olan etkin madde içeren ve içermeyen polimer çözeltileri, viskozite, iletkenlik ve yüzey gerilimi ölçümleri ile karakterize edilmişlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre sistemlerin elektroçekim işlemi için uygunlukları değerlendirilmiştir

5.4.1. Etkin madde/polimer karışımlarının iletkenlik ölçümleri

İletkenlik, elektroçekim işleminde jetin yüzeyindeki yük yoğunluğunu ve yüklerin itilmesini belirtmektedir ve jetin uzama ve gerilme miktarından sorumludur (Ahmadi Bonakdar ve Rodrigue, 2024). Polimer çözeltisi yüzeyinde bulunan yüklerin itilmesi ile gerildiğinden ve daha yüksek çözelti iletkenliğinde daha fazla yük taşınabildiğinden çözelti iletkenliği elektroçekim işleminde ana parametrelerden biridir.

Çalışmalar, genel olarak çözeltinin elektriksel iletkenliğinin arttırılmasıyla daha küçük çaplı ve daha az boncuklu liflerin üretilebileceğini göstermiştir (Uyar ve Besenbacher, 2008).. Polimer çözeltileri daha yüksek iletkenliğe sahip çözücüler kullanılarak hazırlanır veya iletkenliği arttırmak için çözeltiye tuzlar eklenebilmektedir. Angamma ve arkadaşları yaptıkları çalışmada polimerlerin iletkenliğinin, artan tuz konsantrasyonu seviyelerine karşılık doğrusal bir artış göstermiştir (Angammana ve Jayaram, 2011).

Polimeri bir çözücü içinde çözerken, polimerdeki iyonik türlerin (çoğunlukla safsızlıklar veya katkı maddeleri) bulunması nedeniyle çözeltinin iletkenliği artmaktadır (Amariei ve diğerleri, 2017). Ancak çözeltideki polimer konsantrasyonunun artmasıyla elektriksel iletkenlikte azalma da gözlenebilmektedir. Polimerin kendisi polielektrolit tipi iyonik özelliklere sahipse, elektrik yükü olmayan polimer çözeltileriyle karşılaştırıldığında çözeltinin iletkenliği çok daha yüksek olacaktır. Ayrıca, iletkenlik değeri önemli ölçüde konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Topuz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, intrinsik mikro gözenekli nanolif üretiminde polimer çözeltilerinin iletkenliğinin etkisini araştırmışlardır (Topuz, Satilmis ve Uyar, 2019). Çalışmalarında, elektroçekim ile üretim ile çözelti iletkenliğinin doğrudan ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Çözeltinin iletkenliğinin artması, polimer çözeltisinin yüksek elektrik alanı altında daha fazla gerilmeye maruz kalması nedeniyle boncuksuz, düzgün ve daha ince liflerin üretilmesini sağlamaktadır.

PVA ön formülasyon nanolif formülasyonlarının iletkenlik ölçümlerinde, farklı molekül ağırlıkları ile hazırlanan nanolif formülasyonlarnın iletkenlik değerleri aynı konsantrasyonda farklı molekül ağırlıklarında PVA tiplerinin kullanılması ile değişkenlik göstermiştir. Ayrıca PVA konsantrasyonunun artması ile iletkenlik değerlerinde artış gözlenmiştir (Çizelge 4.9).

Deneysel tasarımla geliştirilen nanolif formülasyonlarının iletkenlik ölçümlerinde iki farklı konsantrasyonda üretilen PVA nanoliflerinin polimer konsantrasyonun artması ile artış göstermiştir ($p<0,05$). Ayrıca aynı konsantrasyonda PVA nanolif üretimi için hazırlanan farklı çözücü sistemleri kullanılan formülasyonlarda da iletkenlik değerleri etanol:distile su veya DMF:distile su kullanımına bağlı olarak farklılık göstermiştir. Distile su:DMF ile hazırlanan polimer çözeltilerinin iletkenliği etanol:distile su ile hazırlanan polimer çözeltilerinden daha yüksek bulunmuştur. (Çizelge 4.10).

Mukoadezif nanolif formülasyonlarının iletkenlik ölçümlerinde ise kullanılan polimer tipine bağlı olarak iletkenlik değerlerinde farklılıklar gözlenmiştir. En yüksek iletkenlik değeri PVA-kitosan ile hazırlanan F6 polimer çözeltisinde elde edilmiştir. Bu polimer çözeltilerine TDF ve FTC eklenmesi ile iletkenlik değerlerinde artış gözlenmiştir. (Çizelge 4.11-4.12).

Zein nanolif formülasyonlarının iletkenlik ölçümlerinde genel olarak elektriksel iletkenlik zein konsantrasyonuyla birlikte artmaktadır, bu da çözeltide bulunan iyonlaşabilir grupların arttığı anlamına gelmektedir. Zein ile geliştirilen formülasyonlarda PEO ve PVP konsantrasyonu sabit iken artan zein konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak iletkenlik değerlerinde artış gözlenmiştir. Aynı zein konsantrasyonu ile hazırlanan polimer çözeltilerine farklı oranlarda PVP eklenmesi ile çözeltilerin iletkenlik değerlerinde azalma gözlenmiştir. Dik ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, polimer çözeltisinin iletkenlik değerinin artan PVP konsantrasyonuna bağlı olarak iletkenlik değerlerinin azaldığını gözlemlenmiştir (Dik, 2020). PVP konsantrasyonunun yükselmesi ile çözelti iletkenliğinin azalması, polimerin iletken olmayan doğası ile ilişkilendirilmiştir. Zein bazlı formülasyonlardan seçilen çözeltilere TDF ve FTC eklenmesi ile iletkenlik değerli genel olarak artış göstermiştir (Çizelge 4.13).

PLGA bazlı nanolif formülasyonlarının iletkenlik ölçümlerinde ise kullanılan çözücü sistemindeki farklılıklara bağlı olarak iletkenlik değerleri değişkenlik göstermiştir.

Kullanılan çözücü sistemi ve polimer konsantrasyonu hazırladığımız çözeltilerin iletkenlik değerlerini doğrudan etkilemektedir. Kullanılan solvan sistemine ve polimerlere bağlı olarak tüm formülasyonlarda farklı iletkenlik değerleri elde edilmiştir. Hazırlanan tüm polimer çözeltilerinin iletkenlik değerleri nanolif üretimi için uygun bulunmuştur.

5.4.2. Etkin madde/polimer karışımlarının yüzey gerilimi ölçümleri

Bir sıvının yüzey gerilimi, genellikle sıvı yüzeyinde birim uzunluktaki herhangi bir çizgiye dik açılarda etki eden kuvvet olarak tanımlanmaktadır. Yüzey gerilimi, elektroçekim işleminde kritik bir rol oynamaktadır ve elektroçekim işleminde önemli bir faktördür. Düşük oranda çözelti konsantrasyonuna bağlıdır ve kimyasal bileşim veya sıcaklıkla değişebilmektedir.

Elektroçekim yöntemi işlemi sırasında uygulanan gerilime karşı çıkan birincil kuvvettir ve elektroçekim yöntemi ile üretilebilirliği göstermektedir (Okutan ve diğerleri, 2014). Düşük yüzey gerilimine sahip polimer çözeltileri ile boncuksuz lif üretilebilmektedir ama düşük yüzey gerilimine sahip tüm çözeltilerin elektroçekim işlemi ile üretilebileceği anlamına gelmemektedir.

Elektroçekim işlemi sırasında yüzey geriliminin elektrik alan kuvvetleri tarafından aşılması gerekmektedir, bu nedenle öncelikle voltaj belirlenmelidir ve dolaylı olarak nanolif özelliklerini etkilemektedir (Lian, Lamprou ve Zhao, 2023). Bir polimer çözeltisinin yüzey gerilimi azaltılarak, boncuksuz lifler elde edilebilmektedir. Aynı polimer çözeltileri, farklı çözücüler ile hazırlandığında yüzey gerilimleri değişmektedir. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolif formülasyonları için hazırlanan polimer çözeltilerinde kullanılan solvan sistemine bağlı olarak bu değişim gözlenmiştir (Çizelge 4.10). Genel olarak literatüre göre yüzey gerilimi değerleri 35-55 dyn/cm^2 olan bir polimer çözeltisinin elektroçekim yöntemi için uygun bir çözelti olduğu düşünülmektedir (Amariei ve diğerleri, 2017)

Yüzey gerilimi temel olarak stabildir ve çoğunlukla sıcaklık ve moleküllerin bağlanma özelliklerini değiştiren kimyasallar tarafından değişmektedir (Valizadeh ve Mussa Farkhani, 2014). Yüzey gerilimi sıcaklık arttıkça veya çözeltiye farklı bir madde eklenmesi ile azalmaktadır.

PVA ön formülasyon için hazırlanan polimer çözeltilerinin yüzey gerilimi ölçümleri tüm polimer çözeltilerinde aynı çözücü sistemi kullanıldığı için birbirine yakın bulunmuştur.

Deneysel tasarımla geliştirilen nanolif formülasyonlarının yüzey gerilimi ölçümleri ise PVA önformülasyon çalışmalarında kullanılan polimer çözeltilerinde DMF ile hazırlanan polimer çözeltilerine benzer bulunmuştur. Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi bu polimer çözeltilerinin DMF: distile su hazırlanması ile etanol: distile su hazırlanması arasında yüzey geriliminde farklılıklar gözlenmiştir. Aynı polimer ve aynı konsantrasyonda hazırlanan polimer çözeltilerinin yüzey gerilimleri etanol:su çözücü sisteminin kullanılması ile daha düşük bulunmuştur. Distile su: DMF ve etanol: distile su ile hazırlanan polimer çözeltilerinin yüzey gerilimlerindeki değişim anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Mukoadezif nanolif geliştirilmesi amacıyla hazırlanan PVA bazlı formülasyonların polimer çözeltilerinde kullanılan polimere bağlı olarak farklı çözücüler kullanılması gerekmiştir. Formülasyonlara etkin madde yüklemesi yüzey gerilimini etkilememiştir.

Zein bazlı formülasyonlarda zeinin çözeltisinin hazırlanması için su ve etanol karışımından oluşan solvan sisteminin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla hazırlanan formülasyonlarda solvan sistemi değiştirmeden bu çözücü içerisinde karışabilecek farklı polimer kullanılmıştır. Zein ile hazırlanan formülasyonların çözücü sistemi aynı olduğu için polimer çözeltilerinin yüzey gerilimleri çok yakın bulunmuştur. Jaworek ve arkadaşlarına göre çalışmalarında elde edilen zein yüzey gerilimi değerleri, elektroçekim işlemi için uygun bulunmuştur (Coelho, Benaut, Laget, Estevinho ve Rocha, 2022; Jaworek, 2007). Bu değer, suyun yüzey gerilimi ile karşılaştırıldığında yüzey gerilimi daha düşük olan bir çözücü olan etanolden kaynaklı olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek yüzey gerilimi durumunda daha güçlü bir elektrik alan gerekmektedir. TDF ve FTC'nin polimer çözeltilerine eklenmesi ile yüzey gerilimlerinde artış gözlenmiştir.

PLGA bazlı nanolif karışım formülasyonlarının polimer çözeltilerinde yüzey gerilimi ölçümlerinde PLGA ile hazırlanan karışım ve tabakalı formülasyonlarda kullanılan çözücü sistemine bağlı olarak farklı yüzey gerilimleri elde edilmiştir.

Kullanılan çözücü sistemi hazırladığımız çözeltilerin yüzey gerilimi değerlerini doğrudan etkilemektedir. Kullanılan solvan sistemine bağlı olarak formülasyonlarda farklı yüzey

gerilimi değerleri elde edilmiştir. Hazırlanan tüm polimer çözeltilerinin yüzey gerilimleri lif üretimini sağlamak için uygun bulunmuştur.

5.4.3. Etkin madde/polimer karışımlarının viskozite ölçümlerinin yapılması

Elektroçekim işlemi üretim oda sıcaklığında gerçekleştiği için, elektroçekim işlemi polimerin konsantrasyonuna önemli bir faktördür. Elektroçekim ile üretilecek nanoliflerin polimer çözeltisinin viskozitesi uygun bir aralık içerisinde yer almalıdır. Çok düşük bir viskoziteye sahip polimer çözeltileri polimer damlacıklarının kesintiye uğramasına neden olabilirken çok yüksek viskozite polimerin akışını önlemektedir.

Viskozite, elektrostatik itme ile sinerjik bir etki ile yüzey geriliminden kaynaklanan kuvvetlerin üstesinden gelebilecek kadar yüksek olmalıdır (Tiwari ve Venkatraman, 2012). Nanolif üretiminde gerekli minimum viskozite değeri için belli bir polimer konsantrasyonu gerekmektedir. Viskozite değeri, polimerin moleküler ağırlığına ve kullanılan çözücünün doğasına bağlı olarak değişmektedir. Çözeltinin viskozitesi genellikle lif çapına ve çözeltilerin elektroçekim ile üretiminin sağlanması için etkili olan önemli parametrelerden biridir (Amariei ve diğerleri, 2017).

Sun ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, polimer konsantrasyonlarının nanoliflerin üretimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir (Q. Sun, Liu, Zhu, Liu ve Shang, 2023). Kullanılan polimer çözeltisinin dönme hızı, voltajı, mesafesi sabitlenmiştir. Sodyum aljinat ve PEO ile geliştirilen liflerin tümü ağırlıkça %2, 3, 4 ve 5'lik konsantrasyonlarda başarıyla elde edilmiştir. SEM görüntülerinde %2'lik konsantrasyondaki lifler üzerinde boncuk oluşumuna gözlenmiş, yüksek konsantrasyona sahip polimer çözelti üzerinde ise liflerde boncuk gözlenmemiştir. Daha yüksek viskozite, boncuksuz lif oluşumunu ve ince nanolif oluşumunu da desteklemektedir (Fong, Chun ve Reneker, 1999).

Uygun çözelti konsantrasyonunun seçimi nanolif elde etmek için kritik parametrelerden biridir. Yüksek viskozite, çözeltilerin enjektör iğnesinden geçerek elektrostatik kuvvet altında nanolif oluşmasını son derece zorlaştırmaktadır (W. Ding ve diğerleri, 2010).

Farklı molekül ağırlıklarında kullanılan PVA ile hazırlanan polimer çözeltilerinde aynı konsantrasyonlarda molekül ağırlığının artması ile viskozite değerlerinde artış gözlenmiştir.

Deneysel tasarım ile geliştirilen nanolif formülasyonlarının iki farklı polimer konsantrasyonu ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Deneysel tasarımla geliştirilen PVA nanolif formülasyonlarının polimer çözeltilerinde etanol-distile su ve DMF-distile su gibi farklı solvan sistemlerine bağlı olarak viskozite değerlerinde farklılıklar gözlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca polimer konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak beklenildiği gibi viskozite değerlerinde artış gözlenmiştir ($p<0,05$). Polimer çözeltilerinde kullanılan solvan sistemindeki değişikliğe bağlı olarak farklı viskozite değerleri elde edilmiştir. PVA konsantrasyonu artması ile viskozite de artmıştır.

PVA ile mukoadezif formülasyonların geliştirilmesi amacıyla hazırlanan formülasyonlarda farklı polimerlerin çözeltilere eklenmesiyle viskozite değerlerinde artış gözlenmiştir. TDF ve FTC'nin eklenmesi ile çözeltilerin viskozite değerleri azalmıştır.

Zein ile hazırlanan formülasyonlarda ise mekanik ve mukoadezif özellikleri artırmak için kullanılan PEO ve PVP'nin formülasyonlara eklenmesi ile viskozite değerleri artmıştır.Zein çözeltilerinin reolojik çalışmalarında, zein konsantrasyonuyla artmasıyla birlikte viskozite artmıştır (Coelho ve diğerleri, 2022).

PLGA ile farklı polimerler ile hazırlanan karışımında kullanılan PVP ve PEO'nun formülasyonlara eklenmesi ile viskozite değerleri artmıştır ($p<0.05$).

Kullanılan çözücü sistemi, polimer konsantrasyonu ve kullanılan polimerin molekül ağırlığına bağlı olarak hazırladığımız çözeltilerin viskozite değerleri değişmektedir. Hazırlanan tüm polimer çözeltilerinin viskozite değerleri nanolif üretimini sağlamak için uygun bulunmuştur.

5.5. Vajinal Nanolif Formülasyonlarının Üretimi

Vajinal formülasyonlar, benzersiz uygulamaları ve tedavi edici avantajları nedeniyle jinekolojik hastalıklarda ve cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle vajinal ilaç verilişi, rahim ağzı kanseri ve yüksek enfeksiyon nedeniyle HIV'in önlenmesi ve kontrolü üzerine yoğunlaşmıştır (Z. Yang ve diğerleri, 2024). PVA, dayanıklılık, suda çözünürlük, gaz geçirgenliği ve termal özellikler gibi özelliklere sahip, oldukça hidrofilik, toksik olmayan ve biyouyumlu bir polimerdir (Park ve ark., 2010).

PVA vajinal nanolif üretiminde mukoadezif özellikleri ile tercih edilmiştir. Öncelikle nanolif üretiminde kullanılacak farklı moleküler ağırlıktaki uygun PVA'nın seçimi için ön çalışmalar yapılarak farklı molekül ağırlıklarına sahip üç farklı PVA tipi incelenmiştir. Kullanılan polimer tipi ve konsantrasyonuna bağlı farklı üretim parametreleri kullanılmıştır. Cengiz ve arkadaşları, PVA polimerinin molekül ağırlığının ve iletkenlik, yüzey gerilimi ve viskozite gibi çözelti özelliklerinin etkisini incelemişlerdir. Çözelti özellikleri hem elektroçekim işlemini hem de lif çapını önemli ölçüde etkilemezken, polimerin molekül ağırlığının elektroçekim işlemi üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır (Cengiz, Dao ve Jirsak, 2010).

PVA önformülasyon çalışmalarında literatürde belirtilen şekilde öncelikle distile su kullanılarak polimer çözeltileri hazırlanmıştır. Ancak kullandığımız elektroçekim cihazı ile belirtilen çözücü sistemi içerisinde lif üretimi gerçekleştilemediği için farklı solvan sistemleri ve farklı çözücü oranları incelenerek DMF:distile su ile nanolif üretimleri denenmiştir. Nanolifler bu çözücü sistemi ile başarıyla geliştirilmiştir.

ICH Q8 kılavuzuna göre QbD, sürecin başlangıç hedeflerini belirlemek ve bu hedeflerin elde edilmesini, anlaşılmasını ve kontrol edilmesini kolaylaştırmak ve aynı zamanda bitmiş ürünün kalitesine ilişkin risk yönetimini kolaylaştırmak için kullanılan bir tekniktir (Bhatt, Kumar, Jain ve Jain, 2023). Tasarım alanı, "kalite güvencesi sağladığı kanıtlanmış girdi değişkenleri (örneğin, malzeme özellikleri) ve süreç parametrelerinin çok boyutlu birleşimi ve etkileşimidir" (ICH Q8). Sürecin her zaman tasarım alanı içinde tutulmasını sağlar ve ürün kalitesinin daha da güvence altına alır (Nazari ve diğerleri, 2019). Sürekli iyileştirme, ürünün kalite güvencesini artırmak için süreç performansında değişiklik yapmak amacıyla kritik kalite özelliklerinin, girdilerin ve ürün kalitesinin sürekli izlenmesini içeren QbD'nin uygulanmasının son adımıdır ve ürün yaşam döngüsü boyunca sürekli olarak uygulanmalıdır.

Önformülasyon çalışmalarından seçilen PVA tipine göre uygun solvan sisteminin seçimi ve üretim parametrelerinin belirlenmesi amacıyla tasarım çalışması yapılmıştır. Bu çalışmalardan seçilen optimum formülasyona TDF ve FTC yüklenerek nanolif üretiminin uygunluğu değerlendirilmiştir.

Nanoliflerin elektroçekim ile üretiminde risk bazlı yaklaşım başarıyla uygulanmıştır. Risk değerlendirmeleri, karakterizasyon testleri ve çok değişkenli istatistiksel analizlerin yardımıyla QbD'nin uygulanması, üretim sürecinin ve formülasyon içeriklerinin ürününün özelliklerine etkisinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Bu tasarım ürün ile ilgili sürecin güvenilirliği ve sağlamlığı en üst düzeye çıkarmıştır.

Tasarım ile değerlendirilen faktörler, yanıtların üzerinde değişkenlik gösterse de polimer konsantrasyonun en önemli faktör olduğu belirlenmiştir. Dönme hızının en az anlamlı ana etki olduğu bulunmuştur. Polimer konsantrasyonunun diğer faktörlerle etkileşimlerinin daha anlamlı olduğu ortaya çıkmıştır. Süreç veya formülasyon değişkenlerindeki her türlü değişiklik kritik kalite özelliklerinde risk oluşturabilmektedir (Bhatt ve diğerleri, 2023).

Nanoliflerin üretimini doğrudan etkileyen mesafe, nozül çapı, uygulanan voltaj, akış hızı gibi üretim parametreleri; molekül ağırlığı, konsantrasyon, iletkenlik, yüzey gerilimi ve viskozite gibi çözelti parametreleri liflerin özelliklerini etkilemektedir. Sıcaklık ve nem gibi çevresel koşullar nanoliflerin üretiminde büyük rol oynamaktadır.

Nazari ve arkadaşları, indometasin ve diklofenak sodyum ile yüklenen liflerin elektroçekim ile üretilmesi için QbD yaklaşımını uygulamışlardır (Nazari ve diğerleri, 2019). Voltaj ve mesafenin yaptıkları tasarımda en önemli faktörler olduğunu bulmuşlardır. Çok değişkenli istatistiksel analitik yazılım, çalışmada değerlendirilen farklı mesafelerin her iki ilaç için uygun iki farklı tasarım alanı oluşturmaya yardımcı olmuştur. Mevcut bulgular ve bunların analizleri, QbD'nin, yüksek kaliteli liflerin üretilmesini güvence altına alınması için elektroçekim yönteminin ürün ve proses anlayışını geliştirmek için uygulanabilir olduğunu doğrulamaktadır. QbD'nin ürün ve süreç anlayışını geliştirmede son derece yararlı olduğu bulunmuştur. Üretim sürecini kendi ihtiyaçlarına göre uyarlayarak tasarım alanları ve kontrol stratejileri geliştirmelerine, tutarlı ve güvenilir ürünler üretmelerine olanak tanımaktadır. Benzer şekilde çalışmamızda QbD ile geliştirdiğimiz nanolif formülasyonları tutarlı ve güvenilir ürünler için etkili bir şekilde kullanılmıştır.

Halder ve arkadaşları, glisirizin yüklü hyaluronik asit nanoliflerini hazırlamak için deneysel koşulların QbD ile optimizasyonu incelemişlerdir (Halder ve diğerleri, 2023). Nanoliflerin optimizasyonunda Box-Behnken tasarım modeli kullanarak yaptıkları çalışmada, bağımsız değişkenler olarak polimer konsantrasyonu (X1; HA %), akış hızı (X2, µL/dak) ve

uygulanan voltajı (X3, kV) belirlemişlerdir. Bağımlı değişkenler, nanolif çapı (Y1, nm), nem tutma kapasitesi (Y2, %) ve içerik tekdüzeliğindeki sapma yüzdesi (Y3, %) olacak şekilde seçilmiştir. Polimer konsantrasyonu ve uygulanan voltaj da tüm bağımlı değişkenleri karşılıklı olarak etkiler. Sonuçta ideal çapın, nem tutma kapasitesinin ve içerik homojenliğinin, incelenen tüm malzeme özelliklerinin orta seviyelerde elde edilebileceğini göstermiştir. Belirli bir uygulama için gerekli nitelikleri elde etmek amacıyla polimer konsantrasyonu, uygulanan voltaj, toplayıcı mesafesi, akış hızı ve diğer çözelti ve işlem faktörleri QbD yaklaşımıyla optimize edilmiştir.

Nanoliflerin üretim sürecini etkileyen parametreleri inceleyen farklı çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Tez çalışmamızda deneysel tasarım ile geliştirilen PVA nanolif formülasyonlarında kullanılan çözücü sisteminin, polimer konsantrasyonunun ve toplayıcı dönme hızının, mekanik özellikleri üzerine etkisini incelemiştir. Nanoliflerin mekanik özellikeri polimer konsantrasyonuna göre anlamlı farklılıklar elde edilmiştir. Konsantrasyon artışı ile kopma uzaması ve gerilme direncinde artış gözlenmiştir. Tasarım ile incelenen toplayıcının dönme hızı ve çözücü sisteminin mekanik özellikler üzerine etkisi anlamlı bulunmamıştır. Bu tasarımın kullanımı için kullanılacak faktör seviyelerinin artırılması, üretime etki eden faktörlerin etkilerinin sabit tutulması ve elde edilen yanıtların artırılması gerekmektedir. Çalışmamızda polimer konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen değişkenler için tasarım sonuçları incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.53-4.56 arasında verilmiştir. Ayrıca incelenen diğer parametreler istatistiksel olarak da analiz edilerek aralarındaki farklılıklar değerlendirilmiştir. Çözücü sistemi olarak etanol:distile su kullanımı ile daha yüksek kopma gerilimi ve gerilme direnci elde edilmektedir. Çalışmalarımıza etanol:distile su ile devam edilmeye karar verilmiştir. Polimer konsantrasyonun artması lif mekanik özelliklerini artırmaktadır. Tasarımda kullanılan polimer konsantrasyonu için seçilen faktör seviyeleri (%7.5-15) lif çekimi için uygun bulunmuştur. Ancak PVA polimerinin salım ve mukoadezyon özelliklerini artırmak için farklı polimerlerle birlikte kullanımı ile nanolif formülasyonları geliştirilmesi planlanmıştır. Bu nedenden dolayı PVA konsantrasyonu %10 olarak seçilerek sonraki çalışmalara devam edilmiştir.

Seçilen baz PVA formülasyonu (%10) dikkate alınarak mukoadezyon, mekanik özellikler ve salım özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla PVA ile farklı özellikte polimerler kombine edilerek nanolifler üretilmiştir. Çalışmalarda kullanılan polimerlerin tipine ve çözelti karakterizasyon özelliklerine bağlı olarak elektroçekim yöntemi ile üretim parametrelerinde

farklılıklar gözlenmiştir. Bu çalışmadan seçilen optimum formülasyonlara TDF ve FTC yüklenerek liflerde farklı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Zein, etkin maddelerin kontrollü salım sistemlerinin üretilmesi için kullanılmaktadır (Kayacı ve Uyar, 2012). Doku mühendisliği, gıda endüstrisi ve tıbbi uygulamalarda kullanılan bitki proteinlerinden biridir. Bizde çalışmamızda TDF ve FTC'nin mukoadezif ve kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesi amacıyla zein bazlı nanolif formülasyonlarını geliştirdik. Zein liflerinin vajinal uygulamada kullanımını mekanik özelliklerinin zayıf olması sınırlandırmaktadır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için zein ile kombine farklı mukoadezif polimerler kullanılarak nanolifler üretilmiştir. Doğal polimerlerle hazırlanmış zein nanolifleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Zein liflerinin mekanik ve mukoadezif özellikleri incelenmiştir. Zein bazlı liflerde kullanılan solvan sistemi ve polimerlin oranı ve tipine göre farklı üretim parametreleri ile nanolif üretimi gerçekleştirilmiştir. (Çizelge 3.19)

PLGA, biyouyumluluk ve biyoparçalanabilir bir polimer olduğundan çeşitli klinik ve biyomedikal uygulamalarda elektroçekim ile nanolifler oluşturmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. PLGA ile TDF ve FTC'nin salımının kontrol edilmesi amaçlanmıştır. PLGA bazlı karışım nanolif formülasyonlarında PEO ve PVP kullanılarak mukoadezif özellik artırılmaya çalışılmıştır. Yeterli sonuç alınamadığı için, PLGA kullanılarak tabakalı nanolif formülasyonlarının geliştirilmesine karar verilmiştir. Tabakalı PLGA nanoliflerin orta tabakasında yani PLGA tabakasında etkin maddeler bulunmaktadır ve kontrollü salım başarıyla sağlanmıştır. Bu grup nanoliflerin alt ve üst tabakasını %10'luk PVA oluşturmaktadır ve formülasyonların mukoadezif özelliklerini artırdığı tespit edilmiştir. Kontrol edilmesi amaçlanmıştır. Tabakalı yapıda nanolif formülasyonları başarılı şekilde üretilmiş ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

5.6. Nanolif Formülasyonlarının Yapısal Karakterizasyonu

5.6.1. DSC ile geçimlilik çalışmaları

İlaçların ve polimerlerin katı durumunu karakterize etmek, termal davranışlarını izlemek, geçimsizlik durumunu değerlendirmek için DSC çalışmaları yapılmıştır. Erime, kristalleşme ve kristal yapı oluşumu gibi termal davranışlar DSC ile incelenmiştir.

PVA ile geliştirilen önformülasyon çalışmaları kapsamında üretilen nanoliflerin DSC termogramları Şekil 4.39'de gösterilmiştir. Nanolif yapılarında PVA polimeri, 180°C ila 200°C arasında endotermik bir pik gözlenmiştir. DSC analizi, PVA'nın erime noktasına bağlı olarak 193,8 °C'de endotermik bir pik göstermiştir. PVA nanolifleri ile yapılan bir çalışmada elektroçekim ile üretilen PVA liflerinde erime sıcaklığının (190 °C) saf PVA'ya (179 °C) göre neredeyse hiç değişmediği gözlemlenmiştir (Kim, 2010). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde üretilen nanolif formülasyonlarında PVA'nın karakteristik piklerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.

TDF ve FTC ile hazırlanan nanolif formülasyonlarının DSC'leri incelendiğinde F4-TF formülasyonun DSC termogramında etkin maddelerin pikleri gözlenmemiştir (Şekil 4.40). Bu durum analiz edilen nanolif içerisinde TDF ve FTC miktarı çok az olduğundan veya etkin maddelerin formülasyon içerisinde amorf bir yapıya geçtiği de söylenebilmektedir. F4-TF ait termogramda PEO'ya ait pik gözlenirken PVA'nın karakteristik geniş ve yayvan piki çok küçük bir şekilde bulunmaktadır.

Nunes ve arkadaşları, lif bileşenlerinin uyumluluğunu anlamak ve ilaçların/lipozomların lif yapısı üzerindeki etkisini analiz etmek için TDF ve FTC yüklü lipozom ve nanoliflerin DSC termogramlarını incelemişlerdir (Nunes ve diğerleri, 2021). Termogramlarda, polimer füzyonundan kaynaklanan tek endotermal pikler gözlenmiştir. TDF ve FTC'nin eklenmesi ile PCL bazlı nanoliflerin kristallik özellikleri azalmıştır. PVA liflerindeki lipozomların termogramlarında etkin maddelerin veya lipitlerin tipik erime endotermleri gözlenmemiştir. Bu durumun, etkin maddelerin ve lipozomların polimerik dokuya iyi bir şekilde karışabilirliğini yani yapıya dahil edildiğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Tuğcu-Demiröz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada metronidazol yüklü nanolif formülasyonları geliştirilmiştir (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2020). Termogramlarında metronidazolün karakteristik erime derecesini 160 °C civarında keskin bir tek endotermik pik ile gözlenmiştir. Etkin madde içeren nanolifler 150 ile 200 derece arasında herhangi bir pik gözlenmemiştir. Etkin madde yüklü nanoliflerde metronidazolün karakteristik pikleri gözlenmemiştir. Bu durum metronidazolün nanoliflere yüklenmesi ile kristal yapısında meydana gelen değişikliklerden kaynakladığını belirtmişlerdir.

Benzer şekilde zein içeren nanolif formülasyonlarında etkin madde piklerinin DSC termogramonda kaybolduğu gözlenmiştir. Bu durum literatürlerde belirtilen şekilde kristal özelliklerindeki değişiklikten veya yapıya homojen bir şekilde dahil olmasından kaynaklanmaktadır. Zein ve PVP içeren ZK7-TF nanolif formülasyonunda (Şekil 4.41) PVP'nin karakteristik piki gözlenmiştir.

PLGA ve PEO karışımını içeren nanolif formülasyonlarında (M2-TF) etkin madde piklerinin DSC termogramonda kaybolduğu gözlenmiştir. Bu durum literatürlerde belirtilen şekilde kristal özelliklerindeki değişiklikten veya yapıya homojen bir şekilde dahil olmasından kaynaklanmaktadır. PEO polimerine ait pk nanolif formülasyonunda küçüldüğü gözlenmiştir (Şekil 4.42).

Tabakalı nanolif formülasyonlarının DSC termogramları incelendiğinde etkin madde piklerinin DSC termogramonda kaybolduğu gözlenmiştir. S1-TF nanolif formülasyonun PVA ve PLGA polimerlerine ait küçük pikler gözlenmiştir (Şekil 4.43).

Nanolif formülasyonlarında etkin maddelere ait pikler gözlenmemiştir. Bu durum lif içerisinde TDF ve FTC miktarının çok az olması veya etkin maddelerin kristal yapılarında meydana gelen değişiklikten kaynaklanabilmektedir. Polimerlerin erime noktası ise nanolif termogramlarında gözlenmesi elektroçekim tekniğinin bu polimerin kimyasal yapısında bir değişikliğe neden olmadığını belirtmektedir.

5.6.2. FTIR ile geçimlilik çalışmaları

FTIR analizlerinde polimerlerin karakteristik yapıları gözlenmiştir. Nanolif yapılarında ise sadece baskın olan polimerlerin karakteristik bantları gözlenmiştir. TDF ve FTC ile hazırlanan nanolif formülasyonlarının lif içerisindeki oranları çok düşük miktarlarda olduğu için TDF'nin veya FTC'nin karakteristik bantlarına rastlanılmamıştır.

PVA polimeri ve PVA nanolif formülasyonların spektrumu, PVA'daki moleküller arası hidrojen bağlarına atfedilen 3268 cm^{-1}'de geniş bir bant göstermiştir (Reguieg, Ricci, Bouyacoub, Belbachir ve Bertoldo, 2020) 2940 cm^{-1}'deki zirve, PVA polimerindeki simetrik olmayan CH_2 gerilmesiyle ilişkilidir ve spektrumdaki 1377 ve 1432 cm^{-1}'deki iki zirve, PVA'nın CH-OH ve CH_2 simetrik bükülme modu titreşimleridir (Koosha ve Mirzadeh,

2015). PVA'daki C—O ve C—C gerilmesinin iskelet hareketine atanan 1138 cm-1'deki zirve, PVA'nın kristallik derecesi ile ilişkilidir (Jipa ve diğerleri, 2012). FT-IR analizinde literatürle tutarlı olarak 3320, 2940, 1420 ve 840 cm^{-1} civarında spesifik PVA zirveleri gözlenmiştir.

Zein nanoliflerinin FTIR spektrumları Şekil 4.27'de gösterilmektedir. Zein nanolifleri, 1600–1700 cm−1'de amid I bölgesindeki ana bantları göstermiştir. Ali ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada zein nanoliflerinin FTIR analizleri incelendiğinde yüksek miktarda α-heliks yapısının varlığı, 1643 cm^{-1}'teki simetrik spektral tepe ile doğrulanmıştır, ancak β-tabakaları (1614 ve 1631 cm^{-1}) ve β-dönüşleri (1662 cm^{-1}) tespit edilmemiştir. Bunun nedeni muhtemelen elektroçekim işlemi sırasında solventin hızlı buharlaşması ve zincirlerin β-yapraklarını oluşturmak üzere moleküler yeniden düzenlenmesi için mevcut zamanın yetersiz olmasından kaynaklanmıştır (Ali ve diğerleri, 2014). Chen ve arkadaşları geliştirdikleri zein filmlerinin FTIR analizinde yaklaşık 3301-2874 cm^{-1}'deki önemli zirveleri, moleküller arası iç içe geçmiş hidroksil grubu ve tiyol gruplarının varlığını göstermişlerdir (Y. Chen, Ye ve Liu, 2014). 1700-1600'de esas olarak C=O gerilmesinden kaynaklanan iki titreşimsel gerilme bandı gözlemlenmiştir. Amid I'in zirvesi, NH bükülmesi ve CN gerilmesi ile elde edilmiştir. Benzer şekilde bizim formülasyonumuzda bantlara ait titreşim, gerinim ve bükülme noktaları elde edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan maddelere ait karakteristik pikler literatüre uyumlu olarak IR spektrumlarında gözlenmiştir. Etkin maddeye ait bazı piklerin görülmesi formülasyon yapısına TDF ve FTC'nin girdiğini göstermektedir. Etkin maddelere ait piklerin çoğunun görülmemesinin sebebi olarak formülasyonda bulunan maddelerin miktarlarının kullanılan polimerlere oranla çok az olmasıdır. Ayrıca bazı ortak pikler girişime sebep olmaktadır.

5.6.3. XRD ile yapısal karakterizasyon çalışmaları

Geliştirilen nanolif formülasyonlarından in-vivo çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen F4-TF, M2-TF ve S1-TF nanoliflerinin XRD difraktogramları incelenmiştir. TDF ve FTC'nin kristal yapıları nanolif formülasyonlarında gözlenmemiştir. PVA'nın karakteristik tepe noktaları, 2θ değerlerinde 20,09°, 22,88° ve 40,8° ile literatür ile uyumlu noktalar gözlenmiştir (Mohammadkhani, Mohammadkhani, Farhadyar ve Sadjadi, 2024). XRD sonuçları TDF ve FTC içeren nanoliflerinin üretimini doğrulamaktadır. Formülsyonların

XRD difraktogramı, yaklaşık 2 yüksek yoğunluklu tepe noktası birkaç tane düşük yoğunluklu pik gözlenmiştir. Formülasyonlardaki ilacın kristalliğinde önemli bir azalma gözlenmiştir. İlaca ilişkin piklerin sayısı ve pik yoğunlukları S1-TF, F4-TF ve M2-TF formülasyonunda daha da azalmıştır.

5.7. Nanolif Formülasyonlarının İn vitro Karakterizasyon

5.7.1. Nanolif formülasyonların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Nanolifler, lif boyutlarının mikronaltı olan formülasyonlar ifade etmektedir. Nanometre boyutlarında lif çapları liflerde spesifik yüzey alanında artış, yüksek porozite gibi özellikler sağlamaktadır. Hazırlanan vajinal nanoliflerin nanometre boyutlarında olması hedeflenmiştir. Nanoliflerin çapını üretime etki eden tüm parametreler etkilemektedir (Semnani, 2017). Çözelti akış hızı, çözelti konsantrasyonu, elektrik alanı, toplayıcı tipi, toplayıcı ile nozul arasındaki mesafe gibi elektroçekim parametreleri, nanoliflerin çapını etkilemektedir

Lif Çapı Ölçümleri

Nanoliflerin lif çaplarının belirlenebilmesi için SEM görüntülerinden rastgele 100 tane nanolifin çap ölçümü yapılmış ve buradan ortalama lif çapı hesaplanmıştır. Nanolif üretim sürecinde elektroçekim parametrelerinin uygun jet oluşması için formülasyonlara göre değiştirilmesi gerekmektedir. Toplayıcı ile nozül ucu mesafesi, voltaj ve akış hızı parametreleri formülasyon içeriklerine bağlı olarak değiştirilmiştir ancak ortam nemi ve sıcaklığı laboratuvar koşullarında ölçülmesi ve ayarlaması yapılamamıştır.

Elektroçekim işleminde polimer konsantrasyonu arttıkça genellikle nanolif çapı artsa da literatürde çözücü farkına bağlı olarak tam tersi sonuçlara da rastlanmaktadır. İletkenlik ile lif çapının ters bir ilişki gösterdiği, polimer çözeltilerinin daha yüksek iletkenliğinin, artan elektrostatik kuvvet ve jet uzaması nedeniyle daha ince çaplı lifler ürettiği belirtilmiştir. Düşük elektrik iletkenliğine sahip çözeltilerin elektroçekim ile üretiminde daha az gerilme nedeniyle daha büyük çaplarda lif oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Çizelge 4.17'de görüldüğü deneysel tasarımla geliştirilen nanolif formülasyonlarında polimer konsantrasyonunun artması ile nanolif çaplarında artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Deneysel tasarımla geliştirilen

PVA bazlı formülasyonların lif çapları incelendiğinde RUN5 formülasyonu hariç tüm formülasyonların lif çapının 1 μm'nin altında olduğu gözlenmiştir.

PVA ile hazırlanan mukoadezif nanolif formülasyonlarında bazı noktalarda boncuk oluşumu görülmüştür. Farklı polimer çözeltileri ile yapılan çalışmalarda konsantrasyondaki düşüşe bağlı olarak boncuk oluştuğuna dair birçok literatür bulunmaktadır. Bu durum polimer konsantrasyonu, viskozite veya lif üretimi sırasında uygulanan voltajdan kaynaklanmaktadır.

Zein nanolifler zayıf mekanik özellikler gösterdiği için PEO ve PVP gibi polimerler kullanarak hem mekanik özelliğinin hem de mukoadezif özelliklerinin artırılması amaçlanmıştır. Yao ve arkadaşları, etanol/su oranları 80:20 ve 90:10 (h/h) ve zein konsantrasyonları %20, %30 ve %40 (a/h) olan etanol sulu çözeltiler elektroçekim yöntemiyle üretilerek zein nanolifleri elde edilmiştir (Yao, Li ve Song, 2007). Zein konsantrasyonunun %30'un üzerine çıkarılmasıyla yaklaşık 1-6 mm çapında şerit benzeri nanolifler elde etmişlerdir ve lif morfolojisinin çözelti konsantrasyonundan etkilendiğini belirtmişlerdir. Hazırladıkları zein nanolifleri esnek ve parlak yapıda gözlenmiştir. Nanolif morfolojileri, solventin değişen bileşimine rağmen benzer bulunmuştur. Bizim çalışmamızda geliştirilen zein bazlı nanoliflerde kurdele benzeri yapılar elde edilmiştir. Bazı zein formülasyonlarında lif çapları 1μm'nin üzerinde hesaplanmıştır.

Krogstad ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, tenofovir eklenmesi lif çapı üzerinde ters etki ile sonuçlanmıştır. Tenofovirin PVA nanolifinde, artan instabiliteye bağlı olarak daha küçük lif çapları elde edilmiştir (Krogstad ve Woodrow, 2014) Bir başka çalışmada ise TDF içeren pH'ye duyarlı selüloz asetat ftalat (CAP) polimerinden oluşan lifler, boş liflere göre lif çapında bir değişiklik göstermemiştir (Huang ve diğerleri, 2012). Lif çapı, aktif maddelerin salım özelliklerinde kritik bir role sahiptir ve bazı araştırmalarda, azalan lif çapının aktif maddelerin salımını artırmaktadır (Tyo ve diğerleri, 2017).

Porozite sonuçlarının değerlendirilmesi

Nanometre boyutlarında lif çapları liflerde spesifik yüzey alanında artış, yüksek porozite gibi özellikler sağlamaktadır. Polimerik nanoliflerin porozite değerleri yaklaşık %50-60 arasındadır (Malik, Garg, Goyal ve Rath, 2015). Hazırladığımız nanoliflerin porozite

ölçümler %40-90 arasında kullanılan polimer tipine bağlı değişmektedir. İn-vivoda kullanılmak üzere seçilen F4-TF %49,33, M2-TF %45,88 ve S1-TF %47,26 porozite değerine sahiptir. Nanolif formülasyonlarının porozite değerleri vajinal uygulama için uygun porozite değerleri göstermiştir.

5.7.2. Nanolif formülasyonlarının etkin madde içeriğinin belirlenmesi

Elektroçekim işleminde, nanolif ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanırken etkin madde ve polimer uygun bir çözücü karışımı kullanılarak homojen bir karışım elde edilmektedir. Liflerin, etkin madde ve polimerin birlikte olduğu karışım içinden çekilmesi nedeniyle etkin madde yükleme etkinliği genellikle yüksek olmaktadır. Ancak bunun için elektroçekim sürecinin tıkanma olmadan ve kesintisiz bir şekilde yürümesi gerekmektedir. Bizim formülasyonlarımızda yükleme etkinlikleri kullanılan polimer türüne göre üretilen formülasyonlarda değişkenlik göstermektedir.

Nanoliflerde bulunan etkin madde miktarları hesaplanmış ve Çizelge 4.24'te gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre her iki maddenin liflere yükleme etkinlikleri literatür ile uyumlu olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonucun elde edilmesinde üretim sürecinin optimize edilmiş olması polimer çözeltilerinin homojen olmasından kaynaklanmaktadır.

5.7.3. Nanolif formülasyonlarının mekanik özelliklerinin incelenmesi

Mekanik özelliklerin değerlendirilmesi kapsamında formülasyonların gerilme direnci ve kopma uzaması değerlendirilmiştir. Nanoliflerin lif çapları, morfolojisi ve kullanılan polimer tipi nanoliflerin mekanik özelliklerini artırabildiğini gösterilmiştir. Çözücü sistemi, nanoliflerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Rianjanu, Kusumaatmaja, Suyono ve Triyana, 2018).

Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26'da görüldüğü üzere PVA ile yapılan önformülasyon çalışmaları ve deneysel tasarım gruplarında formülasyonlarda polimer konsantrasyonu arttıkça gerilme direnci ve kopma uzaması değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Deneysel tasarımla geliştirilen nanolif formülasyonlarının gerilme direnci ve kopma uzaması kullanılan çözücü sistemindeki farklılıklara bağlı olarak değişkenlik göstermiştir. DMF: Distile su ile üretilen nanolifler daha düşük mekanik özellikler göstermiştir.

PVA ile geliştirilen mukoadezif nanolif formülayonlarında farklı polimerlerin PVA ile hazırlanan formülasyonların mekanik özellikleri kullanılan polimer tipine bağlı değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.29).

PVA içeren formülasyonların gerilme direnci zein bazlı formülasyonlardan daha yüksek bulunmuştur. Zein ile üretilen nanolif formülasyonların mekanik özellikleri düşük bulunmuştur. Deng ve ark., zein ile jelatin kompozit nanolif formülasyonları geliştirimişlerdir (Deng ve diğerleri, 2018). Saf zein nanoliflerinin, mekanik özelliklerinin ölçmek için çok zayıf olduğu belirtilmiştir. Jelatin ve zein kompozit liflerinin mekanik özellikleri jelatin oranının artmasıyla arttığı bulunmuştur. Bunun nedeni muhtemelen karışım polimerlerinin kısmi zincirleri arasındaki etkileşimden veya fiziksel etkileşimlerden kaynaklanmaktadır.

Zein içeren formülasyonlar hariç geliştirilen tüm formülasyonların mekanik özellikleri vajinal uygulama için yeterli bulunmuştur. İn-vivoda kullanılmak üzere hazırlanan M2-TF, F4-TF ve S1-TF'nin gerilme dirençleri 2,3 ile 3,7 MPa arasında bulunmuştur. Kopma uzaması değerleri ise %26 ile %80 arasında değişmektedir. Tuğcu-Demiröz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada benzidamin yüklü nanolif formülasyonları geliştirmişlerdir. Bu nanoliflerin gerilme direncini 1,749 ve 2,406 MPa arasında; kopma uzamalarını ise %28-39 arasında bulmuşlardır.

5.7.4. Nanolif formülasyonlarının temas açılarının ölçülmesi

Mukoadezif ilaç taşıyıcı sistemlerinin ıslanabilirliği için hidrofilik yapıda olma önemli bir özelliktir. Nanolifler ne kadar hızlı ıslanırsa, mukoza ile temas süresi o kadar erken olur (Asmatulu ve diğerleri, 2013). Nanoliflerin ıslanabilirliği kimyasal yapılarına da bağlıdır. PVA ile yapılan önformülasyon çalışmalarında nanoliflerin temas açıları <90'den küçük bulunmuştur (Çizelge 4.35). Deneysel tasarım ile hazırlanan PVA formülasyonları, PVA bazlı mukoadezif nanoliflerin temas açıları sıfır bulunmuştur. Lif temas açıları ölçümü sırasında kısa sürede ıslanarak dağılmıştır. Bu sonuç liflerin ıslanabilirliğinin çok yüksek olduğu anlamına gelmektedir.

Zeinin formülasyonlarının mekanik özelliklerini artırmak için formülasyonlara eklenen PVP ve PEO gibi polimerler temas açısı ölçümleri 0° yani hidrofilik özelliktedir. Bu polimerlerle

birlikte karışım olarak hazırlanan zein içeren formülasyonların ise temas açısı 90°'den düşük bulunmuştur. Bu hazırlanan nanoliflerinin hidrofilik özellikte olduğunu göstermektedir. Ali ve arkadaşları yaptıkları zein nanolifleri ile ilgili çalışmada zein liflerinin temas açılarını başlangıç değerlerini 115° bulmuşlardır (Ali ve diğerleri, 2014). Ancak zein içeren nanoliflerin temas açısı bir saniye sonra neredeyse sıfıra düşmüştür. Temas açısındaki bu değişim zeinin sudaki zayıf morfolojik stabilitesinden kaynaklanmaktadır.

5.7.5. Nanoliflerin BET ile yüzey alanı analizi

Nanolifler yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip formülasyonlardır. Nanoliflerin yüksek yüzey alanı mukoza ile teması artırmaktadır. Nanolifler spesifik yüzey alanının fazla olmasından dolayı etkin maddelerin absorpsiyon, alıkonma ve mukoadezyonuna katkı sağlamaktadır. Nanoliflerin poröz yapıda olması artan yüzey alanı ile ıslanabilirliği ve difüzyonu etkilemektedir. Hazırladığımız formülasyonların en yüksek yüzey alanı F4-TF ile elde edilmiştir (Şekil 4.57). Suresh ve arkadaşları geliştirdikleri PVA nanoliflerinde spesifik yüzey alanı değerlerini 51,167 m^2/g olarak elde etmişlerdir (Suresh Babu, Saravanan, Muthuvel, George ve Narayanan, 2023).

5.7.6. İn vitro permeabilite çalışmaları

Vajinada etkin maddelerin ilacı daha uzun süre salması, ilaç uygulama sıklığının azaltılması ve hasta uyumunun artırılması açısından önemlidir (Değim, Tuğcu-Demiröz, Tamer-İlbasmış ve Acartürk, 2008; Zong ve diğerleri, 2015).

Nanolif formülasyonlarından TDF ve FTC'nin diyaliz membrandan salımının incelenmesi amacıyla Franz difüzyon hücreleri ve 12000 daltondan küçük moleküllere geçirgen olan diyaliz membran kullanılmıştır.

Sekiz saat sonunda, F4-TF'den TDF %90,078±18,013 oranında, FTC ise %95,365±16,822 oranında salımı gerçekleşmiştir. Bu durum PVA ve PEO'nun hidrofilik özellikte olduğunu ve etkin maddenin kontrollü salımını sağlamadığını göstermektedir. Nematpour ve arkadaşları, vajinal uygulama için klotrimazol yüklü nanolif geliştirmişlerdir (Nematpour ve diğerleri, 2020). Klotrimazolün nanoliflerden salımını Franz difüzyon hücresinde incelenmiş ve <5dk daha kısa sürede %30'dan fazlasını salmıştır. Çalışmada klotrimazolün tamamının

salımı 2 saat sürmüştür. Literatürde benzer şekilde bizim çalışmamızda PVA bazlı nanoliflerden hızlı salım gözlenmiştir.

M2-TF nanolif formülasyonundan 8 saatin sonunda TDF %83,878±6,511 oranında, FTC ise %87,389±17,316 oranında salım gerçekleşmiştir. 24 saatin sonunda ise TDF %85,662±6,365 oranında, FTC ise %89,165±17,251 oranında salmıştır. Bu formülasyon ilk 8 saatte %80'nin üzerinde salım yapmıştır. PLGA hidrofobik bir polimer olmasına karşın PEO gibi hidrofilik bir polimer ile hazırlanması kontrollü salım sağlamamıştır. Vashisth ve arkadaşları, ferulik asit içeren PLGA-PEO nanolif formülasyonu hazırlamıştır ve in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Vashisth ve diğerleri, 2015). Salım çalışmalarında 24 saatte yaklaşık %53 oranında salım gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda M2-TF nanolifinden kontrollü salım elde edilememesinin nedeni etkin maddelerin yüksek çözünürlüğe sahip olmaları düşünülmektedir. Ancak bu formülasyon ex-vivo çalışmalarda kontrollü geçiş göstermiştir.

S1-TF nanolif formülasyonundan 8 saatin sonunda TDF %67,48±4,98 oranında, FTC ise %93,54±6,86 oranında salım gerçekleşmiştir. 24 saatin sonunda ise TDF %79,84±9,75 oranında, FTC ise %99,58±6,59 oranında salmıştır. Bu formülasyon ilk 8 saatte TDF için kontrollü salım sağlamıştır ancak FTC için sağlamamaktadır. Tabakalı bir formülasyon olan S1-TF'den etkin maddeler orta tabakadali PLGA katmanında bulunmaktadır. Alt ve üst PVA tabakaları etkin madde içermemektedir. Bu formülasyonunda yapılan ex-vivo permeabilite çalışmalarında kontrollü geçiş sağladığı gözlenmiştir.

Zein ile hazırlanan nanolif formülasyonlarında kontrollü salım sağlanmasına karşı mekanik özellikleri vajinal uygulama için yeterli olmadıkları için değerlendirmeye alınmamıştır.

İn vitro salım çalışmaları sonucunda hazırlanan formülasyonlar kullanılan polimer tipine ve polimer konsantrasyonuna bağlı olarak farklı salım özellikleri göstermiştir.

5.7.7. Nanolif formülasyonlarının in vitro çözünme hızı çalışmaları ve salım kinetiklerinin belirlenmesi

Seçilen optimum formülasyonlar in vivo uygulama için supozituvar/tampon şekline rulo yapılarak getirilmiştir. Bu formülasyonların salım çalışmaları USP sepet yöntemi kullanarak yapılmış ve Çizelge 4.41'de verilen sonuçlara kontrollü salım sağladığı görülmüştür.

Çözünme hızı çalışmalarında kullanılan etkin maddelerin çözünürlüğüne göre tasarlanması gerekmektedir. Çözünme hızı ortamındaki etkin maddelerin konsantrasyonunun doygunluğa ulaşması etkin maddenin çözünmesini etkilemektedir. İn-vivo çalışmalarda çözünen madde kana geçerek ortamdan uzaklaşmaktadır. Benzer şekilde insan vücudunu daha iyi taklit etmek amacıyla yapılan in vitro çalışmlarında ortamdaki etkin madde konsantrasyonu çözünme hızını etkilemeyecek şekilde sink koşullarına göre çalışılması gerekmektedir. Avrupa Farmakopesi deney ortamında çözünen etkin maddenin erişebileceği maksimum konsantrasyon, etkin maddenin o ortamdaki doygunluk çözünürlüğünün 1/3 ile 1/10'u arasında olması gerektiğini belirtmektedir (P. Liu ve diğerleri, 2013). Çalışmamızda sink koşulun sağlanabilmesi amacıyla TDF (13,4 mg/mL) ve FTC (112 mg/mL)'nin çözünürlükleri hesaplanmıştır. Çözünme hızı çalışmalarının hesaplanan çözünürlük doğrultusunda sink koşul sağladığı gösterilmiştir.

TDF ve FTC içeren nanolifler, 0.derece 1.derece, Higuchi(Q√t), Korsmeyer-Peppas, Hixon-Crowell ve Weibull salım kinetiklerine uyum açısından incelenmiştir. İlaç salım çalışmaları sonrasında kinetik modeller bulunmuştur. Kriter olarak seçilen değerler arasında; R^2adj 1'e yaklaştıkça, AIC azaldıkça ve MSC arttıkça matematiksel modelin salım profillerine uygunluğu artmaktadır (Tuğcu-Demiröz ve diğerleri, 2021;Turanlı, 2022). Nanolif formülasyonların hangi kinetik modele uyduğu belirlenirken regresyon analizlerinin determinasyon katsayıları ve regresyonun standart hatası göz gönünde bulundurulmuştur (Çizelge 4.42-4.43). DDsolver yazılımından elde edilen bu değerlere göre S1-TF, M2-TF ve F4-TF formülasyonları için en uygun matematiksel modelin Weibull modeli olduğu görülmüştür. Weibull kinetik modeli polimerik matrislerden salım profillerine yüksek uyumluluk göstermektedir. Bu formülasyonlar Korsmeyer-Peppas modeli için de yüksek uyum göstermiştir ancak Weibull modelleriyle daha uyumlu olduğu belirlenmiştir.

5.8. Nanolif Formülasyonlarında Yapılan Ex-vivo Çalışmalar

Bu çalışmalar hazırlanan formülasyonların uygulama bölgesi olan vajinaya uygulanması sırasında davranışını belirlemek için inek vajinal dokusu kullanarak gerçekleştirilmiştir.

5.8.1. Ex-vivo permeabilite çalışmaları

Ex vivo doku modelleri, hücre kültürü ve in vivo dokular arasında bir köprü görevi görür (Merbah ve diğerleri, 2011). Nanolif formülasyonlarında inek vajinasından Franz hücreleri kullanılarak TDF ve FTC'nin permeabilitesi değerlendirilmiştir.

TDF için 24 saatin sonunda en az geçiş yapan formülasyon S1-TF olmuştur. S1-TF nanolif formülasyonundan 8 saatin sonunda TDF %46,92±14,11 oranında, 24 saatin sonunda ise TDF %62,15±17,83 oranında geçiş sağlanmıştır. FTC için 24 saatin sonunda en az geçiş yapan formülasyon F4-TF olmuştur. F4-TF nanolif formülasyonundan 8 saatin sonunda FTC %46,68±8,98 oranında, 24 saatin sonunda ise FTC %55,63±6,63 oranında geçiş sağlanmıştır.

Ex vivo geçiş verilerinden akı hesabı yapılmış ve TDF için en yüksek akı değeri F4-TF formülasyonunda gözlenmiş ve değeri 23,883±8,587 $\mu g.cm^{-2}.h^{-1}$ olarak bulunmuştur. En yüksek permeabilite katsayısı TDF için M2-TF formülasyonunda 0,058±0,011 $cm.h^{-1}$ olarak bulunmuştur (Çizelge 4.45). Benzer şekilde FTC için en yüksek akı değeri S1-TF formülasyonunda gözlenmiş ve değeri 24,094±2,771 $\mu g.cm^{-2}.h^{-1}$ olarak bulunmuştur. FTC için en yüksek permeabilite katsayısı ise M2-TF formülasyonunda 0,092±0,016 $cm.h^{-1}$ olarak bulunmuştur.

5.8.2. Ex vivo alıkonma çalışmaları

Nanoliflerin alıkonma performansı, vajinanın fizikodinamik koşullarını taklit eden simüle edilmiş dinamik vajinal sistem kullanılarak incelenmiştir. Başlangıçta nanolifler, SVS'yi emdikten sonra vajinal mukoza üzerinde yumuşamış ve şişmiş bir yapıya dönüşerek vajinal mukozaya yapışmıştır. Nanolifler, vajinal mukoza üzerinde biyoadezif bir tabaka oluşturarak bölgede daha uzun süre yüksek ilaç düzeylerinin elde edilmesine yardımcı olacaktır. Tutunma özellikleri nanoliflerin yapısına daha mukoadezif özellikte ve daha geç aşınan nanoliflerin ilave edilmesi ile kontrol edilebilmektedir. Zong ve ark. yaptıkları çalışmada vajinadaki biyolojik koşulları taklit eden in vitro ilaç salımı testinde sisplatinin %28,4'ü nanolifler ile temas halindeki vajinal doku tarafından emildiği gözlenmiştir (Zong ve diğerleri, 2015). Dobaria ve ark., itrakonazol içeren vajinal film formülasyonu geliştirmişlerdir (N. B. Dobaria ve diğerleri, 2009). Film formülasyonunun tutunma

özelliklerinin formülasyondaki polimer ve plastifiyen oranının ayarlanması ile kontrol edilebileceğini göstermiştirler. Formülasyonların in vitro salım ve çözünme hızı sonuçları ile tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Tutunma çalışmaları sırasında nanolif formülasyonları zamanla aşınmıştır. Nanoliflerin vajinal mukozadan tamamen uzaklaşması için gereken süre, formülasyonun bileşimine göre değişiklik göstermiştir.

5.8.3. Ex-vivo mukoadezyon çalışmaları

Biyoadezyon, uygulama alanında yüksek ilaç seviyelerinin korunmasında çok önemli bir husustur ve formülasyonun dışarı atılmasını önler. Vajinal formülasyonlar, vajinada yeterli tutuşu sağlayacak şekilde yüksek viskoziteye ve mukoadezif özelliğe sahip olmalıdır (Fernandes ve diğerleri, 2023). Etkili ilaç konsantrasyonunu daha uzun süre koruyarak, etkin maddelerin başarılı bir şekilde etki etmesini sağlarlar.

İlaç taşıyıcı sistem ile mukozal membran arasındaki arayüzde etkileşim olan mukoadezyon, vajinal ilaçların başarılı bir şekilde uygulanması için gerekmektedir (Zong ve diğerleri, 2015). Karbopol, poli (etilen glikol), polikarbofil, ksantan zamkı, mikrokristalin selüloz, hidroksipropilmetilselüloz, polivinil alkol, hidroksietil selüloz ve kitosan gibi mukoadezif polimerler, ilaç verilişi için oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır ve vajinada uzun süreli kalış sağlayarak etkin maddelerin kontrollü salımını sağlamaktadır. Nanolifler, uygulama sonrasında nanosistemlerin daha iyi dağılımını ve tutulmasını sağlayarak mukozal seviyede farmakoniketiği iyileştirme potansiyeline sahip dozaj şekilleri olarak belirtilmiştir.

Vajinal uygulama için kullanılacak formülasyonların mukoadezyon ozellikleri vajinada kalış suresi acısından oldukca onemlidir. Bu nedenle formülasyonların mukoadezif özellikleri incelenmiştir. Vajinal doku ile nanolif formülasyonunun birbirinden ayrılması için daha fazla enerji harcanması gerekmektedir. Hazırlanan nanolifler, mukozal yüzeylerde belirli bir süre kalmak için iyi mukoadezif özelliklere sahip olmalıdır. Mukoadezyon özelliklerinin çalışması, elektroçekim nanoliflerinin vajinal mukozadaki adezyon özelliğini belirlememizde yardımcı olacaktır. Bugüne kadar olan mukoadezif çalışmalar, farklı araştırma grupları tarafından aynı materyaller üzerinde farklı olarak değerlendirilmiştir. PVA hidrofilik ve mukoadezif bir polimerdir. Bizim çalışmamızda inek vajinasında yapılan çalışmada artan PVA konsantrasyonu ile nanoliflerin mukoadezyon işi artmıştır. PVA önformülasyon çalışmalarında ve deneysel tasarım ile hazırlanan formülasyon mukoadezyon işi değerlendirilmiş ve vajinal uygulama için daha yüksek değerler elde edilmek amacıyla

mukoadezif polimerler ile F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları oluşturulmuştur. F4 formülasyonu PVA ve PEO içeren ve mukoadezyon değeri en yüksek olan formülasyondur. F4 formülasyonu için mukoadezyon işi değeri 0,225±0,011 mJ/cm^2 olarak bulunmuştur, TDF ve FTC yüklenmesi ile bu değer 0,104±0,034 mJ/cm^2 olarak hesaplanmıştır.

PLGA ile hazırlanan karışım nanolif formülasyonları arasından en yüksek mukoadezyon değerine sahip formülasyon M2-TF'dir ve mukoadezyon işi değeri 0,122±0, mJ/cm^2 olarak bulunmuştur. PLGA ile hazırlanan katlı nanolif formülasyonlarında çevresindeki PVA tabaka kalınlığının artması ile mukoadezyon değerlerinde artış gözlenmiştir. S1-TF formülasyonunun mukoadezyon değeri vajinal uygulama için yeterli bulunmuştur.

5.9. Stabilite Çalışmaları

Tez çalışmalarımızda hazırlanan nanolif formülasyonları 4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nem ortamlarında saklanmıştır. 1 ay boyunca nanoliflerde görünüş, temas açısı, etken madde miktar tayini kontrolleri yapılmıştır.

Nanolif formülasyonlarının stabilite çalışmasında 1 ay süre boyunca 4°C/ortam nemi, 25°C/%60 bağıl nem ve 40°C/%75 bağıl nem ortamlarındaki örneklerde görünüş ve temas açısında bir değişiklik yaşanmamıştır.

ICH klavuzuna göre etkin maddenin dozaj şekli içinde %95-%105 arasında olması beklenmektedir. Hazırlanan nanoliflerdeki TDF ve FTC miktarı %95-100 arasında olup uygun bulunmuştur.

5.10. İn-Vivo Deneyler

5.10.1. Analiz yöntemi

Çeşitli matrislerden ilaçların miktarının belirlenmesi için yöntem geliştirirken karşılaşılan zorluklardan biri, kalibrasyon standartlarının ve kalite kontrollerinin hazırlanması için büyük miktarlarda numune alınması gibi zorlukların bulunmasıdır. Bununla birlikte, analiz edilecek maddelerin, matris ortamında analiz yönteminin geliştirilmesi ve doğrulanması gerekmektedir. Güvenilir biyoanalitik veriler oluşturmak için numune toplama, işleme,

depolama, ekstraksiyon ve analiz süresi sırasında analitin stabilitesi sağlanmalıdır (D. Xiao ve diğerleri, 2020).

TDF ve FTC'nin kan, vajinal sıvı, semen ve serebrospinal sıvı gibi farklı doku örneklerinden analizi için LC/MS/MS yöntemi kullanılmıştır (Illamola ve diğerleri, 2016; Ocque, Hagler, Morse, Letendre ve Ma, 2018; Zheng ve diğerleri, 2014). Çalışmamızda, TDF ve FTC'nin kan plazmasında miktarının belirlenmesi için LC-MS/MS ile basit, duyarlı ve yüksek verimli bir yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen metot alternatif matrisler için de kullanılabilir bir yöntem olarak da değerlendirilebilir. Matris sistemlerden TDF ve FTC'nin analizinde hassasiyet belirleyici bir faktör olduğundan, kütle spektrometresi bu tür matrislerin analizi için uygun bir yöntemdir ve analiz için yüksek hassasiyet ve özgüllük sağlamaktadır. Analiz yöntemi, farmakokinetik çalışmalar için kan plazmasında TDF ve FTC'nin analizinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Örnek Hazırlama

Analiz yöntemlerinde numune hazırlama için genel olarak katı faz ekstraksiyonları kullanılmaktadır ancak bu yöntemler zaman alıcı ve pahalıdır(Wiriyakosol ve diğerleri, 2018) . Çalışmamızda TDF ve FTC'nin LC/MS/MS ile analizinde örnek hazırlama işlemi asetonitril kullanılarak basit bir protein çökmesi ile gerçekleştirilmiştir. Çökmenin ardından berrak süpernatan doğrudan LC/MS/MS'ye enjekte edilmiştir. Basit ve uygun maliyetli yöntem, plazma TDF ve FTC seviyesinin etkin bir şekilde izlenmesi için kullanışlıdır.

İnternal madde seçimi

Kromatografik analizlerde internal standartların kullanılmasının amacı, tüm yöntemin (numune hazırlama, kromatografi ve analiz dahil) rastgele ve sistematik hatalarını kapsamaktan, analizlerin rastgele ve sistematik hatalarını kapsamaya doğru bir yaklaşım bulunmaktadır (Wieling, 2002). Ancak mevcut LC-MS-MS'de internal standartlara duyulan ihtiyaç aynı zamanda kromatografik ayırma derecesine ve numune temizleme derecesine de bağlıdır. Bu, bir iç standardın seçilmesi de dahil olmak üzere yöntem geliştirme ihtiyacı gerekmektedir. İnternal standart seçiminde; (1) dahili standart olmaması, (2) yapısal olarak ilgili bir bileşik, (3) yapısal olarak benzer bir bileşik veya (4) kararlı bir izotop işaretli bileşikler tercih edilmektedir.

Delahunty ve arkadaşları, TFV analizinde adefovir ve FTC analizi için dideoksiüridin ve deoksi-florositidin internal standart olarak kullanmıştır (Delahunty, Bushman, Robbins ve Fletcher, 2009). Bununla birlikte, bu internal standartlar maddelerden farklı kromatografik ve kimyasal özelliklere sahip olduğundan bu durumun konsantrasyonlarının hesaplanmasında hatalara yol açabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında, maddelere kimyasal benzerlikleri olan izotop işaretli internal standartlar ile analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntem başarıyla kullanılmıştır.

İnternal standart ile analit arasındaki yapısal benzerlikler dikkate alınarak yapısal analoglar da kullanılabilmektedir (Stokvis, Rosing ve Beijnen, 2005). Yapısal olarak benzer internal standartların başarılı bir şekilde kullanımını açıklayan çeşitli analizler bulunmaktadır ve izotop işaretli internal standartların dezavantajlarını açıklayan çalışmalar da vardır. Çalışmalarımızda internal standart olarak ornidazol kullanılmıştır.

5.10.2. Farmakokinetik çalışmalar

İn vivo çalışmalar ticari ürün Truvada® ile hazırladığımız nanolif formülasyonları olmak üzere toplamda dört grupta yürütülmüştür. Tavşanlarda kan konsantrasyon-zaman profilleri ve vajinal dokuda etkin madde miktarları hesaplanmıştır. Truvada®, 300 mg TDF ve 200 mg FTC içeren ticari ürünüdür, tavşanlara oral gavaj yöntemi ile 30 mg TDF/20 mg FTC olacak şekilde uygulanmıştır. Geliştirilen nanolif formülasyonları supozituvar-tampon şekline rulo yapılarak aplikatör yardımıyla tavşanlara vajinal yolan uygulanmıştır. Nanolif formülasyonlarında oral uygulama ile aynı doz olacak şekilde seçilmiştir.

Doz seçimi farklı literatürler incelenerek belirlenmiştir. İnsan çalışmalarından elde edilen veriler, servikovajinal sıvı seviyeleri >1.000 ng/mL olduğunda %1 TFV jelinin koruyucu bir etki sağladığını göstermiştir. Donnell ve arkadaşları, oral tenofovir-emtrisitabin kombinasyonu alan çiftlerde TFV plazma seviyelerini araştırmıştır. HIV negatif bireylerin çoğunda, günlük ilaç dozajıyla tutarlı olarak >40 ng/ml TFV plazma konsantrasyonları gözlenmiştir; ancak HIV'e yakalanan bireylerde bu eşik TFV seviyesi gözlenmemiştir (Donnell ve diğerleri, 2014).

Veselinovic ve arkadaşları, farelerde mukozal tenofovir doku düzeylerini araştırmışlardır (Veselinovic ve diğerleri, 2014). Bu araştırmacılar, tenofovir tayini için plazma ve dokuyu

toplamadan önce 5 gün boyunca oral gavajla günlük 61,5 mg/kg oral TDF uygulamışlardır. TFV konsantrasyonları, son dozdan 2, 8, 24 saat sonra plazma ve mukozal doku bölümlerinde, yani vajinal, rektal ve bağırsak dokularında ölçülmüştür. Ayrıca 48. saatte plazma konsantrasyonları da belirlenmiştir. Bu farelerde oral TDF'nin yarı ömrü ortalama 9 saat olarak belirtilmiştir. Clark ve arkadaşları, HIV'ın önlenmesi için vajinal tablet formülasyonu geliştirmişlerdir (M. R. Clark ve diğerleri, 2014). Vajinal tabletler, mikrobisitlerin uygulanması için ucuz, fark edilmeyen bir dozaj formu olarak jellere alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu çalışmada, tenofovir (TFV, 10 mg), emtrisitabin (FTC, 10 mg) ve TFV ve FTC (her biri 10 mg) içeren in vitro ve in vivo koşullar altında hızla parçalanan vajinal tabletlerin farmakokinetik değerlendirmesini ve Faz III klinik çalışmaları olan TFV %1 jel ile doğrudan karşılaştırılmıştır. Tabletlerden TFV ve FTC'nin farmakokinetiği, intravajinal uygulanan tavşanlarda da değerlendirilmiştir. Tek bir doz TFV tabletinin ve TFV %1 jelinin doğrudan karşılaştırılmasında gruplar arasında TFV'nin vajinal farmakokinetiğinde hiçbir farklılık gözlenmemiştir; bununla birlikte, TFV'nin sistemik biyoyararlanımı jelden önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Tavşanlar, TFV, FTC veya TFV/FTC'nin kombinasyonlu tabletleri ile yedi gün boyunca birer kez uygulanması, TFV ve FTC'nin vajinal ve sistemik konsantrasyonları birlikte formüle edilmelerinden etkilenmemiştir. Ayrıca plazma farmakokinetik parametreleri, tek bir doz veya günde bir kez yedi günlük uygulamadan sonra benzer bulunmuştur. Uygulamadan 4 saat sonra vajinadaki TFV ve FTC doku konsantrasyonları 104-105 ng/g arasında değişmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak S1-TF nanoliflerinin uygulandığı in-vivo D grubunun vajinal dokusunda TDF ve FTC doku konsantrasyonları 188±31,7 ile 506±14,54 ng/g olarak bulunmuştur (Çizelge 4.65).

Everson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, tedavi gruplarındaki sıçanlara TDF (25,8 mg/kg/gün), FTC (17,4 mg/kg/gün) ve efavirenzi (51,6 mg/kg/gün) her gün her sıçana oral gavaj yoluyla uygulamışlardır (Everson ve diğerleri, 2018). Biz de çalışmamızda bu dozlara benzer olarak 2-3 kg ağırlığındaki tavşanlara 20 mg FTC/30 mg TDF olacak şekilde uyguladık. Uygulama gruplarının farmakokinetik parametreleri PKSolver ve excell yardımıyla trapez yöntemi kullanarak ile hesaplanmıştır.

Çalışmamızda in vivo tavşanlara uygulanan formülasyonlar sonucu en yüksek $AUC_{0-\infty}$ değeri TDF için S1-TF nanoliflerinin kullanıldığı D grubunda bulunmuştur. En düşük $AUC_{0-\infty}$ değeri TDF için piyasa preparatı olan Truvada® uygulanan C grubunda elde

edilmiştir (Çizelge 4.63). S1-TF nanoliflerinin uygulandığı D grubundan elde edilen AUC değeri yaklaşık 8 kat daha fazladır. Diğer nanolif formülasyonlarına göre yaklaşık 2 kat daha iyi AUC değeri göstermiştir. Cmax değerleri TDF için en yüksek D grubunda sonrasında sırasıyla E, F ve C grubunda bulunmuştur. D grubunun Cmax değeri piyasa prepatına göre 8 kat yüksektir. FTC için en yüksek $AUC_{0-\infty}$ değeri piyasa preparatı olan Truvada®'da elde edilmiştir. Daha sonra ikinci en yüksek $AUC_{0-\infty}$ değeri FTC için S1-TF nanoliflerinin kullanıldığı D grubunda bulunmuştur. Her iki madde için de en düşük $AUC_{0-\infty}$ değerini veren grup F4-TF nanoliflerinin uygulandığı F grubu olmuştur. Cmax değerleri FTC için en yüksek C grubunda sonrasında sırasıyla E, D ve F grubunda bulunmuştur.

Nunes ve arkadaşları, TDF/FTC yüklü lifler ile vajinal uygulama ile topikal PrEP sağlamak için nanolif formülasyonları geliştirmiştir (Nunes ve diğerleri, 2021). Bu amaç için, her biri her iki etkin maddeyi içeren PCL lifleri veya lipozomlar ve hidrofilik PVA liflerinden oluşan kompozit iki tip nanolif formülasyonu geliştirilmiştir. Kompozit durumunda, lipozomları yalnızca liflerde TDF ve FTC'yi tutmak amacıyla değil, aynı zamanda mikrobisit olarak vajinada kalışı iyileştirmek için tercih edilmiştir. Çalışmada potansiyel olarak koruyucu vajinal ilaç seviyeleri liflerin tek doz farmakokinetiği ile farelerde TDF/FTC ile sürekli oral PrEP kullanımıyla karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. İntravajinal olarak uygulanan liflerin lokal ve sistemik farmakokinetik özellikleri oral TDF/FTC ile karşılaştırmak için TDF'nin (0,07 mg) ve FTC'nin (0,05 mg) vajinal dozları, farelerde vajinal HIV bulaşmasının önlenmesinde etkinlik gösteren önceki çalışmalara uygun olarak seçilmiştir. TDF/FTC, vücut ağırlığının kg'ı başına (yaklaşık 30 g ağırlığındaki hayvanlar) 61.5 mg TDF ve 41 mg FTC için oral sondayla uygulanmıştır; intravajinal olarak uygulanan dozların yaklaşık 25 katına karşılık gelmektedir. Liflerin farmakokinetiği tek bir dozdan sonra değerlendirilirken, sürekli oral PrEP'i simüle etmek ve kararlı durum ilaç seviyelerine ulaşmak için farelere beş günlük doz uygulanmıştır. TDF'nin hidrolizinden kaynaklanan TFV de dahil olmak üzere ilaç konsantrasyonları vajinal lavajda ve dokuda ve ayrıca kan plazmasında belirlenmiştir. Örnekleme süreleri 15 dakika, 1 saat, 4 saat ve 24 saat olarak yapılmıştır. Vajinal lavaj sonuçları, PVA liflerindeki lipozomlar için TDF, TFV ve FTC konsantrasyonlarının, özellikle daha erken zaman noktalarında, oral PrEP ile karşılaştırıldığında genel olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir; bu liflerin, tek bir uygulamayla hızlı bir şekilde koruyucu seviyeler sağlayabileceğini düşündürmektedir. PVA liflerindeki lipozomlar ile oral TDF/FTC arasındaki farklar, AUC 0,25-24 saat değerleri karşılaştırılarak daha iyi değerlendirilmiştir. TFV ve FTC seviyeleri sırasıyla kabaca 4 ve 29 kat daha yüksek

bulunmuştur. Oral uygulama için saptanabilir seviyelerin kaydedilmediği TDF için de farklılıklar anlamlı bulunmuştur. PCL lifleri ayrıca oral TDF/FTC'ye göre daha yüksek ilaç konsantrasyonlarının elde edilmesine olanak tanımıştır ancak farklılıklar daha az belirgin bulunmuştur.

PrEP için günlük oral antiretroviral ilaçların, çeşitli yüksek riskli gruplarda etkinliği kanıtlanmıştır, ancak günlük doz rejimine uyumsuzluk arttırmıştır. Bu amaçla PrEP için farklı uygulama yollarından hastaların tercihlerine göre farklı dozaj şekillerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Mandal ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, farelerde tenofovir alafenamid (TAF) ve FTC yüklü nanopartiküllerinin uzun etkili PrEP potensini çözeltilerine göre karşılaştırmalı olarak incelemiştir. TAF + FTC nanopartikülleri ve TAF + FTC çözeltisi (her ilaç 200 mg/kg'da) LC-MS/MS kullanılarak plazma ve doku farmakokinetik parametrelerini belirlemek için hu-CD34-NSG farelerine uygulanmıştır. Nanopartiküller, plazmaya kıyasla doku etkin maddelerin birikimini artırmıştır. HIV enfekte olan farelerde PrEP etkinliği için aynı doz uygulanmıştır. Hu-BLT farelerine, sc tedavilerinden 4, 7 ve 14. günlerde 5x105 TCID50 aşılamasında bulaşma sağlayan virüs vajinal olarak uygulanmıştır ve enfekte olan tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Tedaviden 21 gün sonra, TAF + FTC çözeltisi ile tedavi edilen ve kontrol grubu olan tedavi edilmeyen fareler enfekte olmuştur. Bununla birlikte, TAF + FTC nanopartikülleri, kontrol grubuna kıyasla HIV'den (sırasıyla 4 gün: %80, 7 ve 14 gün:% 60) önemli bir koruma sağlamıştır. Bu çalışma, uzun süreli PrEP etkinliği ile ilişkili olan TAF+FTC nanopartikülleri ile tedavi sağlamıştır. TAF/FTC vajinal düzeylerini göstermiştir ve böylece uzun etkili TAF+FTC nanopartiküllerinin potansiyel bir PrEP yöntemi olduğunu gösterilmiştir. Farklı ilaç taşıyıcı sistemler kullanıldığında sistemik dolaşıma ulaşan aktif bileşik miktarının yanı sıra lokal doku ilaç seviyelerinin önemi mikrobisit alanında son yıllarda artmıştır (José das Neves ve diğerleri, 2013). Genital mukozadaki ilaç düzeylerinin lokal koruma sağlayacak kadar yüksek olması gerekir; diğer yandan, olumsuz etkilerden ve potansiyel viral direnç sorunlarından kaçınmak için sistemik maruziyetin azaltılması avantajlı olabileceği belirtilmiştir.

Farmakokinetik çalışmamızın sonucunda cinsel bulaşın olabileceği vajinal bölgede geliştirdiğimiz nanolif formülasyonlarının kullanımı ile literatür ile uyumlu olarak yüksek ilaç seviyelerinin sağlandığı ve hastalığın önlenmesi için koruyucu seviyelere ulaşıldığı gösterilmiştir.

5.10.3. Biyokimyasal ve immunolojik çalışmalar

Karaciğer, endojen ve eksojen kaynaklı oluşan serbest radikalleri temizlemek için detoksifikasyon enzimlerinin toplandığı en önemli organdır. Enzim sistemlerini dengede tutmak için organizma, ilgili genleri indükleyici ve inhibe edici mekanizmalar geliştirir. Malondialdehit, çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif radikaller tarafından peroksidasyonunun ana oksidatif ürünüdür. Yapılan çalışmada TDF/FTC uygulamalarında D grubuna yapılan uygulamada nanolif uygulamasının karaciğer dokusunda lipit peroksidasyonun artışına neden olduğu ve karaciğer MDA düzeylerini arttırdığı gözlemlenmiştir. E grubu ve F grubunda karaciğer lipit peroksidasyonunu baskılayarak MDA düzeylerini azalttığı gözlemlenmektedir.

Glutatyon redoks döngüsü, antioksidanlara karşı hücresel savunma mekanizmalarının ana bileşenidir. Artan total GSH seviyeleri ve GSH ile ilişkili enzimler, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hasara karşı en önemli biyokimyasal koruyucu sistemlerdir. Yapılan çalışmada, D grubuna uygulanan formülasyonların artan lipit peroksidasyona karşı GSH'ın tükendiği gözlemlenmektedir. Diğer TDF/FTC içeren uygulama gruplarında ise antioksidan kapasitenin arttığı gözlemlenmektedir. Nitrik oksit, birçok önemli biyolojik fonksiyonda yer alan kısa ömürlü bir serbest radikaldir. Fizyolojik düzeylerde NO düzeyleri önemli işlevler göstermesine karşın, yüksek düzeyde NO üretimi nitrozatif strese neden olmaktadır. Çalışmamızda, D grubunda NO düzeylerinde diğer uygulamalara kıyasla artış gözlemlenmiştir. E ve F grubunda ise C grubuna göre NO düzeylerini azaltarak nitrozatif stresi baskıladığı düşünülmektedir.

Reaktif nitrojen ara maddeleri de dahil olmak üzere NO ve türevleri, enfekte konakçılarda patojen büyümesini kısıtlayan önemli efektör moleküller olarak tanımlanmıştır ve monositler ve makrofajlar, endotel hücreleri, hepatositler ve nötrofiller reaktif nitrojen ara maddelerini yapısal yollar, indüklenebilir yollar veya her ikisi yoluyla sentezleyebilmektedirler. NO aynı zamanda güçlü bir lokal haberci moleküldür, hücreden hücreye hızlı göç etme yeteneğine sahiptir. Makrofajlar tarafından üretilen, esas olarak interferon tarafından aktive edilen reaktif nitrojen ara maddelerinin bakteriyel, fungal, helmintik ve protozoan enfeksiyöz ajanlara karşı tip I immün tepkisinin önemli efektörleridir. NO'nun antiviral etkileri, murin çiçek virüsü, herpes simpleks virüsü, EpsteinBarr virüsü, coxsackievirüs ve influenza virüsü dahil olmak üzere çeşitli virüsler için

bilinmektedir (Torre, Pugliese ve Speranza, 2002) . Virüs enfeksiyonu, enfeksiyon alanındaki lokalize iNOS ekspresyonu ile doğrudan veya dolaylı olarak (interferon üretimi yoluyla) NO üretimine neden olmaktadır. NO'nun birçok patolojik etkisinin, oksijen radikalleri ile etkileşimi yoluyla peroksinitrit üreterek üretildiği düşünülmektedir. NO'nun antiviral etkileri, enfekte olmuş hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını gerektirmediğinden ve NO hücrelere kolayca geçebildiğinden, spesifik bir bağışıklık tepkisi gelişmeden önce viral enfeksiyonlara karşı yararlı bir erken savunma sağlamaktadır, dolayısıyla NO, basit bir antiviral ajandan ziyade bir konakçı yanıt modülatörü olabilmektedir.

Soccal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, HIV ile enfekte, tedavi edilmeyen hastalarda ve ARV tedavi alan HIV ile enfekte hastalarda NO seviyelerini incelemişlerdir (Soccal, De Carvalho, Bochi, Moresco ve Da Silva, 2016). Kontrol grubu ve HIV ile enfekte hastaların serum örneklerinde değerlendirildiğinde, HIV ile tedavi edilmeyen grubun hem kontrole hem de HIV ile tedavi edilen gruba göre önemli ölçüde daha yüksek NO düzeylerine sahip olduğu gösterilmiştir. Kontrol ve HIV ile tedavi edilen grup arasında NO düzeylerinde anlamlı bir fark olmamasına rağmen, HAART alan hastalar daha düşük NO düzeylerine doğru bir eğilim gözlenmiştir. HIV ile enfekte hastalar CD4/CD8 oranlarına göre sınıflandırıldığında en düşük CD4/CD8 grubunda, en yüksek grubundan önemli ölçüde daha yüksek NO seviyeleri gözlenmiştir.

Chippiani ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, yüksek düzeyde aktif antiretroviral tedavinin (HAART) tedavi edilen pediatrik hastalarda serum nitrit/nitrat konsantrasyonlarını azalttığını ve HAART'ın virolojik etkinliği azalan nitrit/nitrat konsantrasyonları ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (Chiappini, Galli, Azzari ve de Martino, 2003). Ayrıca çalışmada, nitrit/nitrat konsantrasyonları ile CD4+ T-lenfosit sayıları arasında hiçbir ilişki gözlenmemiştir ve nitrit/nitrat konsantrasyonları HIV-1 yüküyle ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmaya yanıt olarak Torre, NO'nun ikili etkisinin, özellikle primer enfeksiyonda, hastalığın ileri evresinde ve muhtemelen HAART'a yanıt vermeyen hastalarda görülen yüksek üretiminin NO'nun HIV'in aktif replikasyonuna yol açtığı, düşük NO üretimi ise özellikle hastalığın semptomsuz aşamasında veya HAART tedavisi sırasında HIV-1 replikasyonunun azalmasına veya inhibisyonuna neden olabileceği belirtmiştir (Torre, 2003). HAART, doğrudan HIV-1 replikasyonunun azalmasına ve dolaylı olarak dolaşımdaki proinflamatuar sitokin seviyelerini azalttığı ve NO'nun kendisi de HIV-1 replikasyonunun

daha da azalmasına yol açmaktadır. NO, T hücrelerinin proliferasyonunu ve antikor üretimini baskılayabilmekte ve dolayısıyla artan NO üretiminin, HIV-1 de dahil olmak üzere viral ajanlara karşı bağışıklık tepkisini aşağı doğru düzenleyebildiği rapor edilmiştir. HAART'ın dolaşımdaki NO konsantrasyonlarını azaltarak, kısmen NO'nun kendisi tarafından indüklenen immün baskılamayı azaltabilmektedir. Bu bulgular NO'nun bir proinflamatuar olduğunu göstermektedir. HIV-1 ile enfekte çocuklarda zararlı olabilecek ve HAART'ın NO'nun zararlı etkilerini azaltabilecektir.

Yalnızca NO'nun ve onu üreten hücrelerin rollerinin daha iyi tanımlanması ve HIV-1 enfeksiyonunda hücresel üretimini düzenleyen mekanizmaların tam olarak anlaşılması, organa özgü ve hücreye özgü NO donör maddeleri, izoform seçici NO inhibitörleri veya her ikisinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır (Torre ve diğerleri, 2002). NO gibi çok yönlü bir molekülün hedeflenmesinde, NO aşırı üretiminin zararlı etkilerini önlemek veya onun faydalı etkilerini tetiklerken kontrolden çıkmış viral replikasyonu durdurması mümkündür. HIV-1 enfeksiyonunda NO araştırmalarının gelecekteki zorlukları, aşırı üretimin seçici olarak nasıl önleneceğini veya NO kaynaklı bir antiviral tepkinin aktif olarak nasıl uyarılacağını öğrenmektir. NO'nun koruyucu ve toksik etkileri sıklıkla paralel olarak görülmektedir. Bu maddenin hücre içindeki ve hücreler arasındaki sinyal kapasitesi, NOS inhibitörlerinin ve NO donörlerinin etkisinin tahmin edilmesini son derece zorlaştırmakta ve bu da terapötik uygulamaları engellemektedir.

Böbrek dokusu MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, hem TDF ve FTC içeren karışım lif PVAPEO hem de TDF ve FTC içeren karışım lif PLGAPEO uygulamalarının MDA seviyesini düşürerek oksidatif stresi inhibe edebileceğini göstermektedir. TDF ve FTC içeren piyasa preparatı uygulamasının MDA düzeyini diğer gruplara kıyasla arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durumda gözlenen MDA seviyesindeki artışı, bu ajanların neden olduğu lipit peroksidasyonunun bir işareti haline getirmektedir. Böbrek, kendisini kimyasalların neden olduğu hasardan koruyan hücresel antioksidanlara sahiptir. Bu antioksidanlar genellikle ilaçların neden olduğu oksidatif böbrek hasarında tükenmektedir. Çalışmamızda GSH düzeyleri değerlendirildiğinde, TDF ve FTC içeren piyasa preparatı ve TDF ve FTC içeren katlı lif uygulamalarında gözlemlenen GSH seviyesindeki düşüş, lipit peroksidasyonunu ortadan kaldırmak için GSH'nin kullanılacağını veya tüketileceğini akla getirmektedir. TDF ve FTC içeren karışım lif PVAPEO ve TDF ve FTC içeren karışım lif PLGAPEO uygulamalarında GSH seviyelerindeki artışın böbrek dokusunda antioksidan kapasitesinin

artmasına yol açtığı söylenebilir. Nitrik oksit (NO) böbrek fonksiyonunu etkiler ve natriürezi ve diürezi teşvik ederek normal kan basıncının korunmasına yardımcı olur ve diyetle tuz alımındaki değişikliklere uyum sağlanmasına yardımcı olur. NO aynı zamanda O2'nin olumsuz etkilerini en aza indiren güçlü bir anti-oksidatif ajan olarak da görev yapar. Böbrek dokusunda, NO aktivitesinin azalması, süperoksit anyon radikalinin daha fazla deaktivasyonuna yol açarak renal arterlerde vasküler direncin artmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda böbrek dokusu NOX düzeyleri değerlendirildiğinde, TDF ve FTC içeren piyasa preparatı ve TDF ve FTC içeren katlı lif uygulamalarının NOx seviyelerini önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmektedir. TDF ve FTC içeren karışım lif PV-APEO ve TDF ve FTC içeren karışım lif PLGAPEO uygulamaları böbrek dokusunda NOx düzeylerini arttırarak koruyu etki göstermiştir.

Vajina dokusu MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, vajinal olarak uygulanan gruplar arasında yalnızca TDF ve FTC içeren katlı lif uygulamasında MDA seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. Vajina dokusu GSH düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlenmemiştir. Vajina dokusu NOx düzeylerinde ise TDF ve FTC içeren piyasa preparatı ve TDF ve FTC içeren katlı lif uygulaması NOx düzeylerinde artış gözlemlenmiştir. Diğer uygulamalar ile kontrol grubu arasında farklılık bulunmamaktadır.

HIV enfeksiyonunun terminal aşaması olan AIDS'in, bir bireyde viral replikasyon oranını daha da arttırabilen oksidatif strese neden olan aşırı ROS (oksidanlar olarak adlandırılan) üretimi ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (B. Sharma, 2014). Oksidatif türlerin varlığı hücresel sistemlere meydan okuyarak oluşan yanıtlar, yalnızca HIV'in değil, aynı zamanda diğer virüs türlerinin de çoğalması için uygun koşulları oluşturabilmektedir. Aslında hücre içi redoks ortamının, optimal hücre fonksiyonunu sürdürmek için oksidatif ortamdan daha fazla indirgeyici olması gerekir.GSH ve MDA, HIV olma durumu ilişkilendirildiğinde, HIV pozitif bireylerde, HIV negatif bireylerle karşılaştırıldığında daha düşük GSH konsantrasyonları ve daha yüksek MDA konsantrasyonları, daha yüksek oksidatif stresi gözlenmiştir (Watanabe, Barbosa Júnior, Jordão ve Navarro, 2016). Bu sonuçlar, HIV pozitif bireylerde GSH eksikliğinin yaygın olduğunu ve GSH-sentetik enzim seviyelerindeki azalmayla ilişkili olabileceğini ve MDA konsantrasyonlarının HIV enfeksiyonunda oksidatif stres için belirteç olarak kullanılabilmektedir.

Sundaram ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HIV'in doğal seyri ve hastalık ilerlemesi etnik ve ırksal gruplar arasında farklılık gösterebileceğinden, güney Hindistan'da HAART kullanan HIV ile enfekte kişiler arasında oksidatif stresin rolünün ve antioksidan profildeki değişiklikler incelenmiştir (Sundaram ve diğerleri, 2008). HAART kullanan HIV ile enfekte katılımcılar, HAART kullanmamış katılımcılar ve HIV negatif kontroller arasında antioksidan profilindeki değişiklikler değerlendirilmiştir. Bu çalışma, HAART'ın tedavide kullanılmasından sonra artmış oksidatif stresin ve bozulmuş glutatyon metabolizmasının meydana geldiğini göstermektedir. Bu etkilerin HIV ile enfekte hastalarda kalıcı tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) aktivasyonu ile ilişkili olduğu görülmektedir. HIV ile enfekte bireylerin antioksidan konsantrasyonlarında azalma, glutatyon metabolizmasında bozulma ve spontan ROS oluşumunun arttığı gösterilmiştir. Düşük glutatyon redüktaz düzeylerinin ve oksidatif stresin, HAART alan hastalarda inflamatuar sitokin aktivitelerini arttırmaktadır. HIV enfeksiyonunun oksidatif stres sürecini artırabildiğini, bunun da HAART kullanımıyla daha da arttığını gözlenmiştir.

Mandas ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, HAART ile tedavi edilen HIV-1 bireylerinde, tedavi görmeyen HIV-1 ile enfekte ve normal gruplarla karşılaştırıldığında serumdaki ROS düzeylerinin önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gözlemlenmiştir (Mandas ve diğerleri, 2009). Ayrıca HIV-1 ile enfekte ancak HAART ile tedavi edilen grupta plazmadaki toplam antioksidan seviyelerinde azalma gözlenmektedir. HAART'a sıkı sıkıya bağlı olan hastaların, aralıklı HAART uyumu olanlara göre daha yüksek oksidatif stres oluşturduğu da gözlemlenmiştir.

HIV-1 tedavisinde kullanılan ilaçların neden olduğu toksisite, hastaların farklı organlarına zarar veren ROS üretme potansiyelini içermektedir. AntiHIV-1 rejimleriyle tedavi gören deneklerde farklı oksidatif stres parametrelerinin düzeyleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. AntiHIV-1 bileşikleri tarafından indüklenen ROS'un olumsuz etkilerini çeşitli takviye edicilerin kullanımı ile azaltılabilmektedir (Simon, Moog ve Obert, 1994)

5.10.4. Histopatolojik değerlendirmeler

Vajinal dokuda yapılan histolojik çalışmalarda herhangi bir patolojik değişim gözlenmemiştir. Vajinal dokularda herhangi bir dejenarasyon gözlenmemiştir. E grubundaki örnekte bağ dokusunda inflamatuar hücre birikimi gözlenmiştir. Aggarwal ve ark., farelerde

indüklenen tümör dokusu üzerinde histopatoloji çalışması yapmıştırlar. Histopatoloji incelemesi için hayvanlardan alınan serviks kanseri dokusu, hayvandan çıkarıldıktan hemen sonra %10 nötr tampon formalinde fikse edilmiştir. Düz sisplatin ile tedavi edilen grubun ve nanoliflerle tedavi edilen grubun histopatoloji çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Histopatoloji çalışmalarından elde edilen sonuçlar, farelerde tümör hücrelerinin varlığını doğrulamaktadır. Normal sisplatin ilacı ile tedavi edilen hayvan grubundaki kanserli hücre sayısı, sisplatin yüklü nanolifler ile tedavi edilen gruba göre daha yüksek bulunmuştur. Hazırlanan formülasyonun antikanser potansiyelini gösteren saf sisplatin ile karşılaştırıldığında tedavi edilen grupta mavi renk bölgesinde önemli bir azalma görülmüştür. Ayrıca hem kontrol grubunda hem de tedavi edilen grupta, geliştirilen formülasyonun sisplatinin lokal uygulaması için güvenli olduğunu gösteren hiçbir histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir. Hazırlanan formülasyondaki sisplatin geleneksel uygulamaya göre daha yüksek etkililik göstermiştir (Aggarwal ve ark., 2017). Ball ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada MTT canlılık testi ve makaklardan alınmış polarize servikal eksplantların histolojik incelemesiyle, %10 (ağırlık/ağırlık) GML ile yüklenmiş 30:70 PLLA/PEO liflerinin ex vivo toksik olmadığını ve işlenmemiş kontrollere benzer epitelyal katman bütünlüğüne sahip olduğunu bulmuşlardır. Nonoksinol-9'un, HIV enfeksiyonu riskini arttırdığı düşünülen genital lezyonların sıklığını arttırdığı bulunmuştur. Narayanan ve ark., yaptıkları çalışmada DTG yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygulanmasından sonra karaciğer, böbrek, kalp, beyin, karaciğer ve uterus gibi organların histomorfolojik analizi yapılmıştır. Nanopartiküller ile tedavi edilen hayvan gruplarının sonuçları, saf DTG (oral ve IV uygulama yoluyla) uygulanan hayvanlarla ve ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Tüm bu organlarda ilaç/nanopartiküllerin önemli bir dağılımı olmasına rağmen, dokuların morfolojisi ve patolojisinde önemli bir fark bulunmamıştır bu da DTG'nin nanopartiküller olarak uygulanmasının organlar için toksik olmadığının kabul edilebileceğini göstermiştir. Literatürde nanoliflerin vajinal uygulanması ile herhangi patolojik bir durum gözlenmemiştir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da histolojik analizlerde iritasyon veya enflamasyon gözlenmemiştir.

Mikrobisit nanosistemleri, uygulama platformları ve mukozal ortam arasındaki etkileşimlerin anlaşılması önemlidir ve şu ana kadar yapılan çalışmalarda her zaman geniş kapsamlı olarak değerlendirilmemiştir. Isıya duyarlı sistemler, vajinal filmler ve nanolifler araştırılmıştır ve uygulama sonrasında nanosistemlerin daha iyi dağılımını ve tutulmasını sağlama ve sonuçta mukozal seviyede farmakokinetiği iyileştirme potansiyeline sahiptir.

Aplikatör tasarımındaki diğer faktörler tutarlılık, doğru yere uygulama ve kabul edilebilirliktir (Friend, 2010) (konfor, kullanım kolaylığı, uygunluk, estetik çekicilik). Kaynakların zayıf olduğu ortamlarda kullanım, maliyet sorununu da gündeme getirir. Tek kullanımlık aplikatörler tercih edilse de daha yüksek fiyatlı bir ürün yaratacaktır. Muhtemelen tek kullanımlık plastik aplikatörlere en ucuz alternatif, kullanıcı tarafından doldurulan kâğıttan oluşan aplikatördür. Ayrıca plastik aplikatörlere göre nispeten ucuzdur ancak tek kullanımlık olması, uzun vadede tekrar kullanılabilen plastik aplikatörlere göre daha pahalı olmasını sağlar.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında vajinal uygulanmak üzere çeşitli mukoadezif polimerler kullanılarak kontrollü salım yapan nanolif ilaç taşıyıcı sistemler elektroçekim yöntemi ile başarı ile geliştirilmiştir.

Vajinal nanolif ilaç taşıyıcı sistemler ile ilgili sonuçlar aşağıdadır:

- PVA, PEO, PLGA, zein, PVP polimerleri kullanılarak vajinal yoldan uygulanmak üzere elektroçekim yöntemi ile nanolif formülasyonları başarıyla geliştirilmiştir.
- Çalışmalarımız sırasında belirlenen optimum formülasyonlar F4-TF (%10PVA-%50PEO), M2-TF (%10PLGA-%5PEO) ve S1-TF (Tabakalı formülasyon: orta tabaka: %10 PLGA, alt ve üst tabaka %10 PVA)'dir.
- Formülasyon bileşenleri arasında DSC çalışmaları ile geçimsizlik olmadığı gösterilmiştir.
- Formülasyonların FTIR spektrumlarında etkin maddelerin karakteristik pikleri görülmüş ve formülasyon bileşenleri ile herhangi bir geçimsizlik tespit edilmemiştir.
- Formülasyonların XRD difraktogramlarında etkin maddelerin karakteristik kristal özelliklerini gösteren pikler gözlenmemiştir.
- Optimum formülasyonların mekanik özelliklerinin vajinaya uygulanabilir olduğu tespit edilmiştir.
- Vajinal uygulamada kontrollü salım yapan formülasyon S1-TF tabakalı formülasyondur. Aynı zamanda mukoadezif özelliği iyi olduğu için in-vivo gruplara seçilmiştir.
- USP sepet yöntemi ile yapılan salım çalışmalarının sonucunda F4-TF, S1-TF ve M2-TF formülasyonları kontrollü salım özelliği göstermiştir. Mukoadezif özellikleri de vajinal uygulama için uygun olduğundan dolayı in-vivo gruplara seçilmiştir.
- Liflerden etkin maddelerin salımı kontrollü bir şekilde, Weibull salım kinetiğine uygun olarak gerçekleşmiştir.
- TDF ve FTC başarılı bir şekilde nanoliflere yüklenmiştir ve yükleme oranları %71-101 arasında bulunmuştur.
- Optimum nanolif formülasyonlarının lif çapları 263- 838 nm aralığındadır.
- Nanolif yapıları silindirik, pürüzsüz ve düzgün yapıda, lif çapı dağılımları dar bir aralıktadır.

- Liflerin temas temas açıları 90°'den küçüktür ve ıslanabilirlikleri iyidir.
- Optimum nanolif formülasyonlarının porozitesi yaklaşık %50 değerindedir. BET analizleri ile gerçekleştirilen spesifik yüzey alanı analizlerinde F4-TF formülasyonunda elde edilmiştir.
- Ex-vivo permeabilite çalışmalarında inek vajinal dokusu kullanılmış ve seçilen formülasyonların kontrollü geçiş yaptığı gözlenmiştir.
- Ex-vivo inek vajinal dokusu ile gerçekleştirilen mukoadezyon çalışmalarında en yüksek mukoadezyon işi değerini optimum formülasyonlar göstermiştir.
- Stabilite sonuçları optimum formülasyonların temas açısı, görünümü ve etkin madde miktar tayinleri uygun bulunmuştur.
- S1-TF, F4-TF ve M2-TF formülasyonları in vivo çalışmalar için optimum formülasyonlar olarak belirlenmiştir. Bu formülasyonlar mekanik özellikleri, mukoadezif özellikleri ve yapılan in vitro/ex vivo salım çalışmaları sonucunda vajinal uygulama için seçilmiştir.
- Optimum nanolif formülasyonları tavşanlara vajinal yoldan uyulanarak etkin maddelerin farmakokinetik değerlendirmeleri yapılmış ve HIV profilaksisi için yeterli kan ve doku düzeyi oluşturduğu gösterilmiştir.
- Nanoliflerin in-vivo vajinal uygulamasından sonra 24. saatte hayvanlar feda edildiğinde vajinal kanalda herhangi bir kalıntı ve tahrişe rastlanılmamıştır. Bu durum nanoliflerin supozituvar-tampon formunda uygulanmasının konvansiyonel vajinal dozaj formlarına göre sızıntı ve kalıntı bırakma özelliği açısından büyük bir avantaj sağladığını göstermektedir.
- Tavşanlarda biyokimyasal belirteçlerde olumlu sonuçlar elde edilmiştir.
- Histoloji anlizlerinde vajinal dokuda epitelyel doku bütünlüğü korunmuş herhangi bir patolojik durum gözlenmemiştir.

Bu bulgular ışığında elektroçekim yöntemi ile hazırlanan nanolif formülasyonlarının vajinal ilaç taşıyıcı sistem olarak etkili bir formülasyon olacağı sonucuna varılmıştır. İn-vivo farmakokinetik sonuçlar optimum formülasyonların HIV profilaksisinde etkili olabileceğini kanıtlamıştır. Vajinal yoldan HIV bulaşını önlemedeki etkinliklerinde mikrobisitlerin kullanıcı uyumu ve kabul edilebilirliği önem kazanmaktadır.

Vajinal nanolif ilaç taşıyıcı sistemler ile ilgili öneriler:

- Vajinal yoldan uygulanacak nanoliflerin uygun şekilde uygulanmasını sağlayacak uygun aplikatörlerin geliştirilmesi gerekmektedir.
- Vajinal ilaç taşıyıcı olarak liflerin biyouyumluluğu in vivo çalışmalar ile etkinliği değerlendirilmeden önce toksisite çalışmaları yapılmalıdır.
- Alıkonma çalışmalarında kullanılan platformda sıcaklık ayarlaması ile in-vivo ortamı daha iyi taklit edecek bir test koşulunun sağlanması gerekmektedir.
- Nanoliflerin salımının kontrollü şekilde sağlanması için tabakalı nanolif formülasyonlarına alternatif olarak çekirdek-kabuk yapısında nanolif üretimi gerçekleştirilebilir. Ayrıca, kombine madde kullanımlarında her maddenin özelliğine göre farklı tabakalara eklenmesi ile (janus nanolif gibi) kontrollü salım sağlayan sistemler geliştirilebilir.
- Vajinal nanoliflerin üretiminde laboratuvar koşullarından scale-up geçiş sürecinde cihaz veya üretim parametrelerindeki değişikliklerin sonuç üründeki etkilerinin optimizasyonu gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abass, H., Kamel, R. and Abdelbary, A. (2012). Metronidazole bioadhesive vaginal suppositories: formulation, in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(1), 344-353.

Abbaspour, M., Hoseini, H., Sobhani, Z., Emami, S. A., Bazzaz, B. S. F. and Javadi, B. (2022). Development and evaluation of vaginal suppository containing Althaea officinalis L. polysaccharide extract. *Brazilian Journal of pharmaceutical sciences*, 58, e20868.

Abd Ellah, N. H., Abdel-Aleem, J. A., Abdo, M. N., Abou-Ghadir, O. F., Zahran, K. M. and Hetta, H. F. (2019). Efficacy of ketoconazole gel-flakes in treatment of vaginal candidiasis: Formulation, in vitro and clinical evaluation. *International journal of pharmaceutics*, 567, 118472.

Abdelrazek, E., Abdelghany, A., Badr, S. and Abdelrahim, M. (2016). Evaluation of optical parameters and structural variations of UV irradiated (PEO/PVP)/Au polymer nanocomposites. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7(2), 1877-1890.

Abidin, I. Z., Murphy, E. J., Fehrenbach, G. W., Gately, N. and Major, I. (2024). Chitosan-(poly)acrylic acid polyelectrolyte complexes: Enhanced mucoadhesion and sustained drug release in vaginal tablets. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 7, 100480.

Abraham, P., Ramamoorthy, H. and Isaac, B. (2013). Depletion of the cellular antioxidant system contributes to tenofovir disoproxil fumarate-induced mitochondrial damage and increased oxido-nitrosative stress in the kidney. *Journal of biomedical science*, 20, 1-15.

Abu Owida, H., Al-Nabulsi, J. I., Alnaimat, F., Al Sharah, A., Al-Ayyad, M., Turab, N. M. and Abdullah, M. (2022). Advancement of nanofibrous mats and common useful drug delivery applications. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2022(1), 9073837.

Abutaleb, A., Lolla, D., Aljuhani, A., Shin, H., Rajala, J. and Chase, G. (2017). Effects of Surfactants on the Morphology and Properties of Electrospun Polyetherimide Fibers. *Fibers*, 5(3), 33.

Acarturk, F. (2009). Mucoadhesive vaginal drug delivery systems. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 3(3), 193-205.

Aggarwal, U., Goyal, A. K. and Rath, G. (2017). Development and characterization of the cisplatin loaded nanofibers for the treatment of cervical cancer. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 125-132.

Aghababaei, F., McClements, D. J., Martinez, M. M. and Hadidi, M. (2024). Electrospun plant protein-based nanofibers in food packaging. *Food Chemistry*, 432, 137236.

Aghayari, S. (2022). A novel method for measuring the porosity of the nanowebs. *Results in Materials,* 16, 100345.

Ahmadi Bonakdar, M. and Rodrigue, D. (2024). Electrospinning: Processes, structures, and materials. *Macromol,* 4(1), 58-103.

Akil, A., Parniak, M. A., Dezzutti, C. S., Moncla, B. J., Cost, M. R., Li, M. and Rohan, L. C. (2011). Development and characterization of a vaginal film containing dapivirine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), for prevention of HIV-1 sexual transmission. *Drug Delivery and Translational Research,* 1, 209-222.

Akyar, I. (2011). *Wide spectra of quality control*. BoD–Books on Demand.

Al-Majed, A. A., Bakheit, A. H., Al-Qahtani, B. M., Al-Kahtani, H. M. and Abdelhameed, A. S. (2020). Emtricitabine profiles of drug substances, excipients and related methodology. *Elsevier,* 45, 55-91.

Ali Ibrahim, E.-S., Ismail, S., Fetih, G., Shaaban, O., Hassanein, K. and Abdellah, N. H. (2012). Development and characterization of thermosensitive pluronic-based metronidazole in situ gelling formulations for vaginal application. *Acta pharmaceutica,* 62(1), 59-70.

Ali, S., Khatri, Z., Oh, K. W., Kim, I.-S. and Kim, S. H. (2014). Zein/cellulose acetate hybrid nanofibers: Electrospinning and characterization. *Macromolecular Research,* 22, 971-977.

Almousained, M. M., Alshehri, A. A., Aodah, A. H., Alhindi, Y. M., Alqahtani, S. H., Alfassam, H. A., Almomen, A. and Tawfik, E. A. (2024). Development of progesterone electrospun nanofibers to coat Arabin pessaries as a dual preventive and therapeutic approach for preterm labor. *Saudi Pharmaceutical Journal,* 32(2), 101929.

Alukda, D., Sturgis, T. and Youan, B. B. C. (2011). Formulation of tenofovir-loaded functionalized solid lipid nanoparticles intended for HIV prevention. *Journal of pharmaceutical sciences,* 100(8), 3345-3356.

Amariei, N., Manea, L., Bertea, A., Bertea, A. and Popa, A. (2017). *The influence of polymer solution on the properties of electrospun 3D nanostructures.* IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.

Amith, V., Sridhar, R., Angadi, G. and Hnnm, A. (2019). Comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers. *Journal of Nanoscience Nanoengineering and Applications,* 9(3), 1-6.

Angammana, C. J. and Jayaram, S. H. (2011). Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology. *IEEE Transactions on Industry Applications,* 47(3), 1109-1117.

Anusiya, G. and Jaiganesh, R. (2022). A review on fabrication methods of nanofibers and a special focus on application of cellulose nanofibers. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications,* 4, 100262.

Araujo, V. H. S., De Souza, M. P. C., Carvalho, G. C., Duarte, J. L. and Chorilli, M. (2021). Chitosan-based systems aimed at local application for vaginal infections. *Carbohydrate Polymers*, 261, 117919.

Ashenafi, D., Chintam, V., Van Veghel, D., Dragovic, S., Hoogmartens, J. and Adams, E. (2010). Development of a validated liquid chromatographic method for the determination of related substances and assay of tenofovir disoproxil fumarate. *Journal of Separation Science*, 33(12), 1708-1716.

Ashenafi, D., Ungerböck, M., Hoogmartens, J. and Adams, E. (2013). Liquid chromatographic analysis of various formulations containing emtricitabine. *Chromatographia*, 76(21-22), 1495-1503.

Asmatulu, R., Muppalla, H., Veisi, Z., Khan, W. S., Asaduzzaman, A. and Nuraje, N. (2013). Study of hydrophilic electrospun nanofiber membranes for filtration of micro and nanosize suspended particles. *Membranes*, 3(4), 375-388.

Asvadi, N. H., Dang, N. T., Davis-Poynter, N. and Coombes, A. G. (2013). Evaluation of microporous polycaprolactone matrices for controlled delivery of antiviral microbicides to the female genital tract. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24, 2719-2727.

Avlani, D., Shivakumar, H. N., Kumar, A., Prajila, A., Baraka, B. B. H. and Bhagya, V. (2024). Pre-exposure prophylactic mucoadhesive sodium alginate microsphere laden pessaries for intravaginal delivery of tenofovir disoproxil fumarate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 258, 128816.

Bachhav, Y. and Patravale, V. (2009). Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, in vitro and in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*, 365(1-2), 175-179.

Baganizi, D. R., Nyairo, E., Duncan, S. A., Singh, S. R. and Dennis, V. A. (2017). Interleukin-10 conjugation to carboxylated PVP-coated silver nanoparticles for improved stability and therapeutic efficacy. *Nanomaterials*, 7(7), 165.

Baggaley, R. F., Boily, M.-C., White, R. G. and Alary, M. (2006). Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. *Aids*, 20(6), 805-812.

Bancila, S., Ciobanu, C.-I., Murariu, M. and Drochioiu, G. (2016). Ultrasound-assisted zein extraction and determination in some patented maize flours. *Rev. Roum. Chim*, 61(10), 725-731.

Bang, L. M. and Scott, L. J. (2003). Emtricitabine: an antiretroviral agent for HIV infection. *Drugs*, 63, 2413-2424.

Barakat, N. A., Moustafa, H. M., Nassar, M., Abdelkareem, M. A., Mahmoud, M., Almajid, A. A. and Khalil, K. A. (2015). Distinct influence for carbon nano-morphology on the activity and optimum metal loading of Ni/C composite used for ethanol oxidation. *Electrochimica Acta*, 182, 143-155.

Bashir Khan, A. and Sharnagat Thakur, R. (2014). Formulation and evaluation of mucoadhesive microspheres of tenofovir disoproxil fumarate for intravaginal use. *Current drug delivery,* 11(1), 112-122.

Baum, M. M., Butkyavichene, I., Churchman, S. A., Lopez, G., Miller, C. S., Smith, T. J. and Moss, J. A. (2015). An intravaginal ring for the sustained delivery of tenofovir disoproxil fumarate. *International journal of pharmaceutics,* 495(1), 579-587.

Bektaş, D. (2019). *Tenofovir içeren lipit kaynakli kendiliğinden emülsifiye ilaç taşiyici nano sistemlerin geliştirilmesi ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi.* Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 45-48.

Berginc, K., Suljaković, S., Škalko-Basnet, N. and Kristl, A. (2014). Mucoadhesive liposomes as new formulation for vaginal delivery of curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 87(1), 40-46.

Beyazgul, B., Koruk, F. and Koruk, I. (2024). Development of a scale for Attitude toward sexually transmitted infections based on the health Belief model. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*.

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

Bhatt, T., Kumar, H., Jain, R. and Jain, V. (2023). Emerging applications of electrospun nanofibers using various fabrication techniques. *Ind. J. Pharm. Edu. Res,* 57(3), 658-668.

Bigucci, F., Abruzzo, A., Vitali, B., Saladini, B., Cerchiara, T., Gallucci, M. C. and Luppi, B. (2015). Vaginal inserts based on chitosan and carboxymethylcellulose complexes for local delivery of chlorhexidine: Preparation, characterization and antimicrobial activity. *International journal of pharmaceutics,* 478(2), 456-463.

Bilensoy, E., Abdur Rouf, M., Vural, I., Šen, M. and Atilla Hincal, A. (2006). Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β-cyclodextrin complex. *Aaps Pharmscitech,* 7, E54-E60.

Bilensoy, E., Çırpanlı, Y., Şen, M., Doğan, A. L. and Çalış, S. (2007). Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-Fu: cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry,* 57(1-4), 363-370.

Bilensoy, E., Moroy, P., Çırpanlı, Y., Bilensoy, T., Çalış, S. and Mollamahmutoglu, L. (2011). A double-blind placebo-controlled study of 5-fluorouracil:cyclodextrin complex loaded thermosensitive gel for the treatment of HPV induced condyloma. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry,* 69(3-4), 309-313.

Birer, M. (2021). *Vasküler doku iskelelerinin in vitro ve in vivo değerlendirilmesi*. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 32-47.

Birer, M., Kara, A. A., Yurdakok-Dikmen, B., Uyar, R., Aralan, G., Birer, Y. T., Filazi, A. and Acartürk, F. (2024). Electrospun hesperidin nanofibers induce a cytoprotective effect on sodium-fluoride induced oxidative stress in vitro. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 92, 105388.

Bittencourt, J. C., de Santana Gois, B. H., Rodrigues de Oliveira, V. J., da Silva Agostini, D. L. and de Almeida Olivati, C. (2019). Gas sensor for ammonia detection based on poly (vinyl alcohol) and polyaniline electrospun. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(13), 47288.

Blakney, A. K., Ball, C., Krogstad, E. A. and Woodrow, K. A. (2013). Electrospun fibers for vaginal anti-HIV drug delivery. *Antiviral Research*, 100, S9-S16.

Blum, J. S., Weller, C. E., Booth, C. J., Babar, I. A., Liang, X., Slack, F. J. and Saltzman, W. M. (2011). Prevention of K-Ras- and Pten-mediated intravaginal tumors by treatment with camptothecin-loaded PLGA nanoparticles. *Drug Delivery and Translational Research*, 1(5), 383-394.

Boddupalli, B. M., Mohammed, Z. N., Nath, R. A. and Banji, D. (2010). Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(4), 381-387.

Bonferoni, M. C., Sandri, G., Rossi, S., Ferrari, F., Gibin, S. and Caramella, C. (2008). Chitosan citrate as multifunctional polymer for vaginal delivery: evaluation of penetration enhancement and peptidase inhibition properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(2), 166-176.

Borman, P. and Elder, D. (2017). Q2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, 127-166.

Borumand, M., Mortazavi, S. A., Jafari Azar, Z. and Teymouri Rad, R. (2014). Development and in vitro evaluation of a novel contraceptive vaginal mucoadhesive propranolol hydrochloride film. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(6), 637-644.

Bourne, N., Zaneveld, L., Ward, J., Ireland, J. and Stanberry, L. (2003). Poly (sodium 4-styrene sulfonate): evaluation of a topical microbicide gel against herpes simplex virus type 2 and Chlamydia trachomatis infections in mice. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), 816-822.

Brache, V. and Faundes, A. (2010). Contraceptive vaginal rings: a review. *Contraception*, 82(5), 418-427.

Braga, P. C., Dal Sasso, M., Spallino, A., Sturla, C. and Culici, M. (2009). Vaginal gel adsorption and retention by human vaginal cells: Visual analysis by means of inorganic and organic markers. *International Journal of Pharmaceutics*, 373(1-2), 10-15.

Brako, F., Raimi-Abraham, B. T., Mahalingam, S., Craig, D. Q. M. and Edirisinghe, M. (2018). The development of progesterone-loaded nanofibers using pressurized gyration: A novel approach to vaginal delivery for the prevention of pre-term birth. *International Journal of Pharmaceutics*, 540(1-2), 31-39.

Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E. and Yazan, Y. (2016). Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 109, 174-183.

Calvo, N. L., Svetaz, L. A., Alvarez, V. A., Quiroga, A. D., Lamas, M. C. and Leonardi, D. (2019). Chitosan-hydroxypropyl methylcellulose tioconazole films: A promising alternative dosage form for the treatment of vaginal candidiasis. *International Journal of Pharmaceutics,* 556, 181-191.

Camerlo, A., Vebert-Nardin, C., Rossi, R. M. and Popa, A.-M. (2013). Fragrance encapsulation in polymeric matrices by emulsion electrospinning. *European Polymer Journal,* 49(12), 3806-3813.

Caramella, C. M., Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M. C. and Sandri, G. (2015). Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 92, 39-52.

Carter-Davis, J. and Seymour, E. (2024). Biomedical Approaches and Disparities in HIV Prevention. *The Nursing Clinics of North America,* 59(2), 289-296.

Carvalho, F. C., Bruschi, M. L., Evangelista, R. C. and Gremião, M. P. D. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences,* 46, 1-17.

Castillo-Henríquez, L., Vargas-Zúñiga, R., Pacheco-Molina, J. and Vega-Baudrit, J. (2020). Electrospun nanofibers: A nanotechnological approach for drug delivery and dissolution optimization in poorly water-soluble drugs. *ADMET and DMPK*.

Cautela, M. P., Moshe, H., Sosnik, A., Sarmento, B. and Das Neves, J. (2019). Composite films for vaginal delivery of tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 138, 3-10.

Cazorla-Luna, R., Ruiz-Caro, R., Veiga, M.-D., Malcolm, R. K. and Lamprou, D. A. (2021). Recent advances in electrospun nanofiber vaginal formulations for women's sexual and reproductive health. *International Journal of Pharmaceutics,* 607, 121040.

Cengiz, F., Dao, T. A. and Jirsak, O. (2010). Influence of solution properties on the roller electrospinning of poly (vinyl alcohol). *Polymer Engineering & Science,* 50(5), 936-943.

Cevher, E., Sensoy, D., Taha, M. A. and Araman, A. (2008). Effect of thiolated polymers to textural and mucoadhesive properties of vaginal gel formulations prepared with polycarbophil and chitosan. *Aaps Pharmscitech,* 9, 953-965.

Chakraborti, C. K., Sahoo, S. and Behera, P. K. (2015). Effect of different polymers on in vitro and ex vivo permeability of Ofloxacin from its mucoadhesive suspensions. *Saudi Pharmaceutical Journal,* 23(2), 195-201.

Chaowanachan, T., Krogstad, E., Ball, C. and Woodrow, K. A. (2013). Drug synergy of tenofovir and nanoparticle-based antiretrovirals for HIV prophylaxis. *PloS one,* 8(4), e61416.

Chapman, T. M., McGavin, J. K. and Noble, S. (2003). Tenofovir disoproxil fumarate. *Drugs,* 63, 1597-1608.

Chatterjee, A., Kumar, L., Bhowmik, B. B. and Gupta, A. (2011). Microparticulated anti-HIV vaginal gel: in vitro-in vivo drug release and vaginal irritation study. *Pharmaceutical Development and Technology,* 16(5), 466-473.

Chen, F. C.-K., Bergann, A., Kroße, J., Merholz, A. and David, M. (2008). Isosorbide mononitrate vaginal gel versus misoprostol vaginal gel versus Dilapan-S® for cervical ripening before first trimester curettage. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology,* 138(2), 176-179.

Chen, S., Chen, W., Chen, Y., Mo, X. and Fan, C. (2021). Chondroitin sulfate modified 3D porous electrospun nanofiber scaffolds promote cartilage regeneration. *Materials Science and Engineering: C,* 118, 111312.

Chen, Y., Ye, R. and Liu, J. (2014). Effects of different concentrations of ethanol and isopropanol on physicochemical properties of zein-based films. *Industrial Crops and Products,* 53, 140-147.

Chiappini, E., Galli, L., Azzari, C. and de Martino, M. (2003). Nitric oxide in HIV-1 perinatally infected children treated with highly active antiretroviral therapy. *The Lancet Infectious Diseases,* 3(3), 128-129.

Chickering, D. and Mathiowitz, E. (1999). Definitions, mechanisms, and theories of bioadhesion. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences,* 98, 1-10.

Chindamo, G., Sapino, S., Peira, E., Chirio, D. and Gallarate, M. (2021). Recent advances in nanosystems and strategies for vaginal delivery of antimicrobials. *Nanomaterials,* 11(2), 311.

Cho, S. J., Jung, S. M., Kang, M., Shin, H. S. and Youk, J. H. (2015). Preparation of hydrophilic PCL nanofiber scaffolds via electrospinning of PCL/PVP-b-PCL block copolymers for enhanced cell biocompatibility. *Polymer,* 69, 95-102.

Choi, J.-S., Seo, K. and Yoo, J.-W. (2012). Recent advances in PLGA particulate systems for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation,* 42(3), 155-163.

Chore, S. and Dighade, S. (2020). A review on mucoadhesive vaginal drug delivery system.

Choudhari, V. P., Ingale, S., Gite, S. R., Tajane, D. D., Modak, V. G. and Ambekar, A. (2011). Spectrophotometric simultaneous determination of Tenofovir disoproxil fumarate and Emtricitabine in combined tablet dosage form by ratio derivative, first order derivative and absorbance corrected methods and its application to dissolution study. *Pharmaceutical Methods,* 2(1), 47-52.

Clark, J. T., Clark, M. R., Shelke, N. B., Johnson, T. J., Smith, E. M., Andreasen, A. K., Nebeker, J. S., Fabian, J., Friend, D. R. and Kiser, P. F. (2014). Engineering a Segmented Dual-Reservoir Polyurethane Intravaginal Ring for Simultaneous Prevention of HIV Transmission and Unwanted Pregnancy. *PloS One,* 9(3), e88509.

Clark, M. R., Peet, M. M., Davis, S., Doncel, G. F. and Friend, D. R. (2014). Evaluation of rapidly disintegrating vaginal tablets of tenofovir, emtricitabine and their combination for HIV-1 prevention. *Pharmaceutics,* 6(4), 616-631.

Coelho, S. C., Benaut, P., Laget, S., Estevinho, B. N. and Rocha, F. (2022). Optimization of electrospinning parameters for the production of zein microstructures for food and biomedical applications. *Micron,* 152, 103164.

Coimbra, P., Freitas, J. P., Gonçalves, T., Gil, M. H. and Figueiredo, M. (2019). Preparation of gentamicin sulfate eluting fiber mats by emulsion and by suspension electrospinning. *Materials Science and Engineering: C,* 94, 86-93.

Cunha-Reis, C., Machado, A., Barreiros, L., Araújo, F., Nunes, R., Seabra, V., Ferreira, D., Segundo, M. A., Sarmento, B. and Das Neves, J. (2016). Nanoparticles-in-film for the combined vaginal delivery of anti-HIV microbicide drugs. *Journal of controlled release,* 243, 43-53.

Dallal Bashi, Y. H., Murphy, D. J., McCoy, C. F., Boyd, P., Brown, L., Kihara, M., Martin, F., McMullen, N., Kleinbeck, K., Dangi, B., Spence, P., Hansraj, B., Devlin, B. and Malcolm, R. K. (2021). Silicone elastomer formulations for improved performance of a multipurpose vaginal ring releasing dapivirine and levonorgestrel. *International Journal of Pharmaceutics: X,* 3, 100091.

Darwesh, A. Y., Helmy, A. M., Abdelhakk, H. M., Giri, B. and Maniruzzaman, M. (2024). 3D-printed short nanofibers/hydrogel-based vaginal films as a novel system for the delivery of anti-HIV microbicide drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 105775.

das Neves, J., Araujo, F., Andrade, F., Michiels, J., Ariën, K. K., Vanham, G., Amiji, M., Bahia, M. F. and Sarmento, B. (2013). In vitro and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for vaginal and rectal delivery of the anti-HIV drug dapivirine. *Molecular Pharmaceutics,* 10(7), 2793-2807.

Das Neves, J. and Bahia, M. F. (2006). Gels as vaginal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics,* 318(1-2), 1-14.

Date, A. A., Shibata, A., Goede, M., Sanford, B., La Bruzzo, K., Belshan, M. and Destache, C. J. (2012). Development and evaluation of a thermosensitive vaginal gel containing raltegravir+efavirenz loaded nanoparticles for HIV prophylaxis. *Antiviral Research,* 96(3), 430-436.

de Araujo Pereira, R. R. and Bruschi, M. L. (2012). Vaginal mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 38(6), 643-652.

Deepak, A., Goyal, A. K. and Rath, G. (2018). Nanofiber in transmucosal drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 43, 379-387.

Değim, İ. T., Tuğcu-Demiröz, F., Tamer-İlbasmış, S. and Acartürk, F. (2008). Development of controlled release sildenafil formulations for vaginal administration. *Drug Delivery,* 15(4), 259-265.

Delahunty, T., Bushman, L., Robbins, B. and Fletcher, C. V. (2009). The simultaneous assay of tenofovir and emtricitabine in plasma using LC/MS/MS and isotopically labeled internal standards. *Journal of Chromatography B*, 877(20-21), 1907-1914.

Deng, L., Zhang, X., Li, Y., Que, F., Kang, X., Liu, Y., Feng, F. and Zhang, H. (2018). Characterization of gelatin/zein nanofibers by hybrid electrospinning. *Food Hydrocolloids*, 75, 72-80.

Destache, C. J., Mandal, S., Yuan, Z., Kang, G., Date, A. A., Lu, W., Shibata, A., Pham, R., Bruck, P. and Rezich, M. (2016). Topical tenofovir disoproxil fumarate nanoparticles prevent HIV-1 vaginal transmission in a humanized mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3633-3639.

Devlin, B., Nuttall, J., Wilder, S., Woodsong, C. and Rosenberg, Z. (2013). Development of dapivirine vaginal ring for HIV prevention. *Antiviral Research*, 100, S3-S8.

Dhand, C., Dwivedi, N., Sriram, H., Bairagi, S., Rana, D., Lakshminarayanan, R., Ramalingam, M. and Ramakrishna, S. (2017). Nanofiber composites in drug delivery nanofiber composites for biomedical applications. *Elsevier*, 2, 199-223.

Dik, Z. (2020). *Tenofovir disoproksil fumarat içeren nanolif ve jel formülasyonlarinin vajinal ilaç taşiyici sistem olarak değerlendirilmesi.* Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 55-59.

Ding, W., Wei, S., Zhu, J., Chen, X., Rutman, D. and Guo, Z. (2010). Manipulated electrospun PVA nanofibers with inexpensive salts. *Macromolecular Materials and Engineering*, 295(10), 958-965.

Ding, Y., Hou, H., Zhao, Y., Zhu, Z. and Fong, H. (2016). Electrospun polyimide nanofibers and their applications. *Progress in Polymer Science*, 61, 67-103.

Dobaria, N., Mashru, R. and Vadia, N. (2007). Vaginal drug delivery systems: a review of current status. *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 3-13.

Dobaria, N. B., Badhan, A. C. and Mashru, R. C. (2009). A novel itraconazole bioadhesive film for vaginal delivery: design, optimization, and physicodynamic characterization. *Aaps Pharmscitech*, 10(3), 951-959.

Doğan, M. and Sezer, A. D. (2020). Synthesis of crosslinked PVA/Chitosan hydrogels loaded EGF and evaluation in vitro characterization. *Cumhuriyet Medical Journal*, 42(1), 86-93.

Dongmo, E. G., Nsagha, D. S., Zofou, D., Njunda, A. L. and Joseph, A. (2020). Residual risk of HIV transmission through blood transfusion in five blood banks in Cameroon. *The Journal of Medical Research*, 6(4), 158-165.

Donnell, D., Baeten, J. M., Bumpus, N. N., Brantley, J., Bangsberg, D. R., Haberer, J. E., Mujugira, A., Mugo, N., Ndase, P. and Hendrix, C. (2014). HIV protective efficacy and correlates of tenofovir blood concentrations in a clinical trial of PrEP for HIV prevention. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 66(3), 340-348.

Duan, H., Chen, H., Qi, C., Lv, F., Wang, J., Liu, Y., Liu, Z. and Liu, Y. (2024). A novel electrospun nanofiber system with PEGylated paclitaxel nanocrystals enhancing the transmucus permeability and in situ retention for an efficient cervicovaginal cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics,* 650, 123660.

Edikresnha, D., Sriyanti, I. and Munir, M. (2017). *Synthesis of Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Green tea extract composite nanostructures using electrohydrodynamic spraying technique.* IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.

El-Hammadi, M. M. and Arias, J. L. (2021). Nanomedicine for vaginal drug delivery theory and applications of nonparenteral nanomedicines. *Elsevier*, 23, 235-257.

El-Sayed, H., Vineis, C., Varesano, A., Mowafi, S., Andrea Carletto, R., Tonetti, C. and Abou Taleb, M. (2019). A critique on multi-jet electrospinning: State of the art and future outlook. *Nanotechnology Reviews,* 8(1), 236-245.

Enggi, C. K., Isa, H. T., Sulistiawati, S., Ardika, K. A. R., Wijaya, S., Asri, R. M., Mardikasari, S. A., Donnelly, R. F. and Permana, A. D. (2021). Development of thermosensitive and mucoadhesive gels of cabotegravir for enhanced permeation and retention profiles in vaginal tissue: A proof of concept study. *International Journal of Pharmaceutics,* 609, 121182.

Erbetta, C. D. A. C., Alves, R. J., Magalh, J., de Souza Freitas, R. F. and de Sousa, R. G. (2012). Synthesis and characterization of poly (D, L-lactide-co-glycolide) copolymer.

Eren Boncu, T., Ozdemir, N. and Uskudar Guclu, A. (2020). Electrospinning of linezolid loaded PLGA nanofibers: effect of solvents on its spinnability, drug delivery, mechanical properties, and antibacterial activities. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(1), 109-121.

Esentürk, İ., Balkan, T., Özhan, G., Döşler, S., Güngör, S., Erdal, M. S. and Sarac, A. S. (2020). Voriconazole incorporated nanofiber formulations for topical application: preparation, characterization and antifungal activity studies against Candida species. *Pharmaceutical Development and Technology*, 25(4), 440-453.

Esteban-Cantos, A., Montejano, R., Pinto-Martínez, A., Rodríguez-Centeno, J., Pulido, F. and Arribas, J. R. (2024). Non-suppressible viraemia during HIV-1 therapy: a challenge for clinicians. *The Lancet HIV*.

Everson, F., Genis, A., Ogundipe, T., De Boever, P., Goswami, N., Lochner, A., Blackhurst, D. and Strijdom, H. (2018). Treatment with a fixed dose combination antiretroviral therapy drug containing tenofovir, emtricitabine and efavirenz is associated with cardioprotection in high calorie diet-induced obese rats. *PloS One,* 13(12), e0208537.

Fadil, F., Affandi, N. D. N., Misnon, M. I., Bonnia, N. N., Harun, A. M. and Alam, M. K. (2021). Review on electrospun nanofiber-applied products. *Polymers,* 13(13), 2087.

Falsafi, S. R., Topuz, F., Esfandiari, Z., Can Karaca, A., Jafari, S. M. and Rostamabadi, H. (2023). Recent trends in the application of protein electrospun fibers for loading food bioactive compounds. *Food Chemistry: X*, 20, 100922.

Fathima, A., Hari, B. V. and Devi, D. R. (2014). Development of microparticulate sustained release dosage form of emtricitabine: An anti-HIV drug. *Asian Journal of Chemistry,* 26(9), 2604.

Felgueiras, H. P. and Amorim, M. T. P. (2017). Functionalization of electrospun polymeric wound dressings with antimicrobial peptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 156, 133-148.

Feng, X., Li, J., Zhang, X., Liu, T., Ding, J. and Chen, X. (2019). Electrospun polymer micro/nanofibers as pharmaceutical repositories for healthcare. *Journal of Controlled Release,* 302, 19-41.

Fernandes, T., Patel, V., Aranha, C., Velhal, S., Momin, M., Mulkutkar, M. and Sawarkar, S. (2023). pH-triggered polymeric nanoparticles in gel for preventing vaginal transmission of HIV and unintended pregnancy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 191, 219-234.

Fernando, H. V., Chan, L. L., Dang, N., Santhanes, D., Banneheke, H., Nalliah, S. and Coombes, A. G. A. (2019). Controlled delivery of the antiprotozoal agent (tinidazole) from intravaginal polymer matrices for treatment of the sexually transmitted infection, trichomoniasis. *Pharmaceutical Development and Technology,* 24(3), 348-356.

Flynn, P. M. and Abrams, E. J. (2019). Growing up with perinatal HIV. *Aids,* 33(4), 597-603.

Fogolari, O., Leimann, F. V., Ineu, R. P., Rudy, M., Ludwig, A. F., Salles, F. M., De Arruda Amorim, J. P., Franci, C. R., Sagae, S. C., Sayer, C., De Araújo, P. H. H. and Gonçalves, O. H. (2023). Progesterone-loaded solid lipid nanoparticles for use in the regulation of the estrous cycle in female rats. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 88, 104954.

Fong, H., Chun, I. and Reneker, D. H. (1999). Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer,* 40(16), 4585-4592.

Fonseca, J. d. C., Tenorio Clavijo, J. C., Alvarez, N., Ellena, J. and Ayala, A. P. (2018). Novel solid solution of the antiretroviral drugs lamivudine and emtricitabine. *Crystal Growth & Design,* 18(6), 3441-3448.

Forato, L. A., Bicudo, T. D. C. and Colnago, L. A. (2003). Conformation of α zeins in solid state by Fourier transform IR. *Biopolymers,* 72(6), 421-426.

Fox, J. and Fidler, S. (2010). Sexual transmission of HIV-1. *Antiviral Research,* 85(1), 276-285.

Frampton, J. E. and Perry, C. M. (2005). Emtricitabine: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs,* 65, 1427-1448.

Frey Tirri, B. (2011). Antimicrobial topical agents used in the vagina. *Topical Applications and the Mucosa*, *40*, 36-47.

Friend, D. R. (2010). Pharmaceutical development of microbicide drug products. *Pharmaceutical Development and Technology,* 15(6), 562-581.

Fu, J., Yu, X. and Jin, Y. (2018). 3D printing of vaginal rings with personalized shapes for controlled release of progesterone. *International Journal of Pharmaceutics*, 539(1-2), 75-82.

Galvin, S. R. and Cohen, M. S. (2004). The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature Reviews Microbiology,* 2(1), 33-42.

Gao, Z. (2009). In Vitro Dissolution Testing with Flow-Through Method: A Technical Note. *Aaps Pharmscitech*, 10(4), 1401-1405.

García-Moreno, P. J., Stephansen, K., van der Kruijs, J., Guadix, A., Guadix, E. M., Chronakis, I. S. and Jacobsen, C. (2016). Encapsulation of fish oil in nanofibers by emulsion electrospinning: Physical characterization and oxidative stability. *Journal of Food Engineering*, 183, 39-49.

Garg, S., Vermani, K., Garg, A., Anderson, R. A., Rencher, W. B. and Zaneveld, L. J. D. (2005). Development and characterization of bioadhesive vaginal films of sodium polystyrene sulfonate (PSS), a novel contraceptive antimicrobial agent. *Pharmaceutical Research*, 22(4), 584-595.

Gaspar, L. M. d. A. C., Dórea, A. C. S., Droppa-Almeida, D., de Mélo Silva, I. S., Montoro, F. E., Alves, L. L., Macedo, M. L. H. and Padilha, F. F. (2018). Development and characterization of PLGA nanoparticles containing antibiotics. *Journal of Nanoparticle Research*, 20(11), 289.

Gavini, E., Sanna, V., Juliano, C., Bonferoni, M. C. and Giunchedi, P. (2002). Mucoadhesive vaginal tablets as veterinary delivery system for the controlled release of an antimicrobial drug, acriflavine. *Aaps Pharmscitech*, 3, 32-38.

Ghorbani-Choghamarani, A. and Taherinia, Z. (2020). Eco-friendly synthesis of 3-aminoimidazo [1, 2-a] pyridines via a one-pot three-component reaction in PEG catalyzed by peptide nanofibers: as hydrogen-bonding organocatalyst. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 17, 59-65.

Ghosal, K., Chandra, A., G, P., S, S., Roy, S., Agatemor, C., Thomas, S. and Provaznik, I. (2018). Electrospinning over Solvent Casting: Tuning of Mechanical Properties of Membranes. *Scientific Reports*, 8(1).

Ghosn, J., Taiwo, B., Seedat, S., Autran, B. and Katlama, C. (2018). HIV. *The Lancet*, 392(10148), 685-697.

Gill, P., Moghadam, T. T. and Ranjbar, B. (2010). Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 21(4), 167.

Gillespie, S. L., Paul, M. E., Chinen, J. and Shearer, W. T. (2013). Hiv infection and acquired immunodeficiency syndrome clinical immunology. *Elsevier,* 32, 465-479.

Gomes, E. C. d. L., Mussel, W. N., Resende, J. M., Fialho, S. L., Barbosa, J., Carignani, E., Geppi, M. and Yoshida, M. I. (2015). Characterization of tenofovir disoproxil fumarate and its behavior under heating. *Crystal Growth & Design*, 15(4), 1915-1922.

Gorji, M., Jeddi, A. A. and Gharehaghaji, A. (2012). Fabrication and characterization of polyurethane electrospun nanofiber membranes for protective clothing applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 125(5), 4135-4141.

Grim, S. A. and Romanelli, F. (2003). Tenofovir disoproxil fumarate. *Annals of Pharmacotherapy*, 37(6), 849-859.

Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *Q2 (R1)*, 1(20), 05.

Gupta, U. and Jain, N. K. (2010). Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(4-5), 478-490.

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

Halder, J., Kanti Rajwar, T., Pradhan, D., Rai, V. K., Dubey, D., Kar, B., Ghosh, G. and Rath, G. (2023). Glycyrrhizin loaded hyaluronic acid nanofiber-based artificial saliva for the management of oral mucositis: Preparation, optimization and in-vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 87, 104777.

Hamarapurkar, P. D. and Parate, A. N. (2013). HPLC method for the determination of emtricitabine and related degradation substances. *Journal of Chromatographic Science*, 51(5), 419-424.

Hauck, T. S., Giri, S., Gao, Y. and Chan, W. C. W. (2010). Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(4-5), 438-448.

Hausberger, A. G. and De Luca, P. P. (1995). Characterization of biodegradable poly (D, L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(6), 747-760.

He, M., Xue, J., Geng, H., Gu, H., Chen, D., Shi, R. and Zhang, L. (2015). Fibrous guided tissue regeneration membrane loaded with anti-inflammatory agent prepared by coaxial electrospinning for the purpose of controlled release. *Applied Surface Science*, 335, 121-129.

Hernández, S. N. H. and Chauhan, G. (2022). Nanofibers for cancer sensing and diagnostics. *Materials Today: Proceedings*, 48, 66-70.

Holan, V., Chudickova, M., Trosan, P., Svobodova, E., Krulova, M., Kubinova, S., Sykova, E., Sirc, J., Michalek, J. and Juklickova, M. (2011). Cyclosporine A-loaded and stem cell-seeded electrospun nanofibers for cell-based therapy and local immunosuppression. *Journal of Controlled Release*, 156(3), 406-412.

Hosseini, S., Radnia, N., Vafaei, S., Pirdehghan, A. and Mehrabadi, N. (2023). The effect of conjugated estrogens vaginal cream and a combined vaginal cream of vitamins D and E in the treatment of genitourinary syndrome. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 12(3), 507.

Hsin, Y. K., Thangarajoo, T., Choudhury, H., Pandey, M., Meng, L. W. and Gorain, B. (2023). Stimuli-Responsive in situ Spray Gel of Miconazole Nitrate for Vaginal Candidiasis. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 112(2), 562-572.

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

Huang, C., Soenen, S. J., Van Gulck, E., Vanham, G., Rejman, J., Van Calenbergh, S., Vervaet, C., Coenye, T., Verstraelen, H., Temmerman, M., Demeester, J. and De Smedt, S. C. (2012). Electrospun cellulose acetate phthalate fibers for semen induced anti-HIV vaginal drug delivery. *Biomaterials,* 33(3), 962-969.

Hussain, A. and Ahsan, F. (2005). The vagina as a route for systemic drug delivery. *Journal of Controlled Release,* 103(2), 301-313.

Ibrahim, H. M. and Klingner, A. (2020). A review on electrospun polymeric nanofibers: Production parameters and potential applications. *Polymer Testing,* 90, 106647.

Illamola, S., Valade, E., Hirt, D., Dulioust, E., Zheng, Y., Wolf, J. and Tréluyer, J. (2016). Development and validation of a LC–MS/MS method for the quantification of tenofovir and emtricitabine in seminal plasma. *Journal of Chromatography B,* 1033, 234-241.

Inan, T. (2017). Thermoplastic-based nanoblends: Preparation and characterizations Recent developments in polymer macro, micro and nano blends. *Elsevier,* 33, 17-56.

Jaworek, A. (2007). Micro-and nanoparticle production by electrospraying. *Powder Technology,* 176(1), 18-35.

Jayakumar, R., Prabaharan, M., Nair, S. and Tamura, H. (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances,* 28(1), 142-150.

Jie, H., Liu, L., Shuangying, G., Xingqi, W., Rongfeng, H., Yong, Z., Chunling, T., Mengqiu, X. and Xiaoqin, C. (2019). A Novel Phytantriol-Based In Situ Liquid Crystal Gel for Vaginal Delivery. *Aaps Pharmscitech,* 20(5).

Jipa, I. M., Stoica, A., Stroescu, M., Dobre, L.-M., Dobre, T., Jinga, S. and Tardei, C. (2012). Potassium sorbate release from poly (vinyl alcohol)-bacterial cellulose films. *Chemical Papers,* 66, 138-143.

Johal, H. S., Garg, T., Rath, G. and Goyal, A. K. (2016). Advanced topical drug delivery system for the management of vaginal candidiasis. *Drug Delivery,* 23(2), 550-563.

Jøraholmen, M. W., Basnet, P., Acharya, G. and Škalko-Basnet, N. (2017). PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 113, 132-139.

Jose, M. V., Thomas, V., Xu, Y., Bellis, S., Nyairo, E. and Dean, D. (2010). Aligned bioactive multi-component nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Macromolecular Bioscience,* 10(4), 433-444.

Kabbara, W. K. and Ramadan, W. H. (2015). Emtricitabine/rilpivirine/tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HIV-1 infection in adults. *Journal of Infection and Public Health,* 8(5), 409-417.

Kadir, M. F. Z., Aspanut, Z., Majid, S. R. and Arof, A. K. (2011). FTIR studies of plasticized poly(vinyl alcohol)–chitosan blend doped with NH4NO3 polymer electrolyte membrane. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* 78(3), 1068-1074.

Kaewnopparat, S. and Kaewnopparat, N. (2009). Formulation and evaluation of vaginal suppositories containing Lactobacillus. *World Academy of Science, Engineering and Technology,* 55, 25-28.

Kalantari, K., Afifi, A. M., Jahangirian, H. and Webster, T. J. (2019). Biomedical applications of chitosan electrospun nanofibers as a green polymer–Review. *Carbohydrate Polymers,* 207, 588-600.

Kale, V. V. and Ubgade, A. (2013). Vaginal mucosa–A promising site for drug therapy. *British Journal of Pharmaceutical Research,* 3(4), 983-1000.

Kawamura, M., Naito, T., Ueno, M., Akagi, T., Hiraishi, K., Takai, I., Makino, M., Serizawa, T., Sugimura, K. and Akashi, M. (2002). Induction of mucosal IgA following intravaginal administration of inactivated HIV-1-capturing nanospheres in mice. *Journal of Medical Virology,* 66(3), 291-298.

Kearney, B. P., Flaherty, J. F. and Shah, J. (2004). Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics,* 43, 595-612.

Khan, A. B., Mahamana, R. and Pal, E. (2014). Review on mucoadhesive drug delivery system: novel approaches in modern era. *RGUHS J Pharm Sci,* 4(4), 128-141.

Kharazmi, A., Faraji, N., Hussin, R. M., Saion, E., Yunus, W. M. M. and Behzad, K. (2015). Structural, optical, opto-thermal and thermal properties of ZnS–PVA nanofluids synthesized through a radiolytic approach. *Beilstein Journal of Nanotechnology,* 6(1), 529-536.

Kılıç, A., Yıldırım, B., İçoğlu, H. İ., Türkoğlu, M. and Topalbekiroğlu, M. (2024). Production of continuous nanofiber bundles by multi parallel electrodes in needleless electrospinning. *Materials Today Communications,* 39, 109025.

Kim, G.-M. (2010). Fabrication of bio-nanocomposite nanofibers mimicking the mineralized hard tissues via electrospinning process. *Nanofibers,* 69-88.

Kiser, P. F., Mahalingam, A., Fabian, J., Smith, E., Damian, F. R., Peters, J. J., Katz, D. F., Elgendy, H., Clark, M. R. and Friend, D. R. (2012). Design of tenofovir–UC781 combination microbicide vaginal gels. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 101(5), 1852-1864.

Koçak, E., Yıldız, A. and Acartürk, F. (2021). Three dimensional bioprinting technology: Applications in pharmaceutical and biomedical area. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 197, 111396.

Kong, Y. and Hay, J. N. (2002). The measurement of the crystallinity of polymers by DSC. *Polymer,* 43(14), 3873-3878.

Koosha, M. and Mirzadeh, H. (2015). Electrospinning, mechanical properties, and cell behavior study of chitosan/PVA nanofibers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* 103(9), 3081-3093.

Koski, A., Yim, K. and Shivkumar, S. (2004). Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters,* 58(3-4), 493-497.

Krause, M., Wheeler, T. L., Snyder, T. E. and Richter, H. E. (2009). Local effects of vaginally administered estrogen therapy: a review. *Urogynecology,* 15(3), 105-114.

Krogstad, E. A., Ramanathan, R., Nhan, C., Kraft, J. C., Blakney, A. K., Cao, S., Ho, R. J. Y. and Woodrow, K. A. (2017). Nanoparticle-releasing nanofiber composites for enhanced in vivo vaginal retention. *Biomaterials,* 144, 1-16.

Krogstad, E. A. and Woodrow, K. A. (2014). Manufacturing scale-up of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers containing tenofovir for vaginal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics,* 475(1-2), 282-291.

Krovi, S. A., Johnson, L. M., Luecke, E., Achilles, S. L. and van der Straten, A. (2021). Advances in long-acting injectables, implants, and vaginal rings for contraception and HIV prevention. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 176, 113849.

Krychman, M. L. (2011). Vaginal estrogens for the treatment of dyspareunia. *The Journal of Sexual Medicine,* 8(3), 666-674.

Kuang, G., Lin, X., Li, J., Sun, W., Zhang, Q. and Zhao, Y. (2024). Electrospun nanofibers-derived functional scaffolds for cancer therapy. *Chemical Engineering Journal,* 489, 151253.

Kumar, M., Sharma, A., Mahmood, S., Thakur, A., Mirza, M. A. and Bhatia, A. (2024). Franz diffusion cell and its implication in skin permeation studies. *Journal of Dispersion Science and Technology,* 45(5), 943-956.

Kumbar, S., James, R., Nukavarapu, S. and Laurencin, C. (2008). Electrospun nanofiber scaffolds: engineering soft tissues. *Biomedical Materials,* 3(3), 034002.

Kuo-Haller, P., Cu, Y., Blum, J., Appleton, J. A. and Saltzman, W. M. (2010). Vaccine delivery by polymeric vehicles in the mouse reproductive tract induces sustained local and systemic immunity. *Molecular Pharmaceutics,* 7(5), 1585-1595.

Kusumawati, D., Istiqomah, K., Husnia, I. and Fathurin, N. (2021). *Synthesis of nanofiber polyvinyl alcohol (PVA) with electrospinning method.* Journal of Physics: Conference Series.

Landau, G., Kodali, V. K., Malhotra, J. D. and Kaufman, R. J. (2013). Detection of oxidative damage in response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Elsevier,* 526, 231-250.

Langwald, S. V., Ehrmann, A. and Sabantina, L. (2023). Measuring Physical Properties of Electrospun Nanofiber Mats for Different Biomedical Applications. *Membranes*, 13(5), 488.

Lavanya, M., Jeyakumar, S., Veerappa, V. G., Pushpadhas, H. A., Ramesha, K. P., Kumaresan, A., Manimaran, A. and Eljeeva Emerald, F. M. (2024). Fabrication and characterization of progesterone loaded pullulan nanofibers for controlled release. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 91, 105193.

Layek, B. and Das, S. (2021). Chitosan-based nanomaterials in drug delivery applications biopolymer-based nanomaterials. *Elsevier*, 232, 185-219.

Lee, A. S. D. and Cody, S. L. (2020). The Stigma of Sexually Transmitted Infections. *Nursing Clinics of North America*, 55(3), 295-305.

Lee, E. H., Smith, D. T., Fanwick, P. E. and Byrn, S. R. (2010). Characterization and anisotropic lattice expansion/contraction of polymorphs of tenofovir disoproxil fumarate. *Crystal Growth & Design*, 10(5), 2314-2322.

Leung, V. and Ko, F. (2011). Biomedical applications of nanofibers. *Polymers for Advanced Technologies*, 22(3), 350-365.

Leyva-Gómez, G., Piñón-Segundo, E., Mendoza-Muñoz, N., Zambrano-Zaragoza, M. L., Mendoza-Elvira, S. and Quintanar-Guerrero, D. (2018). Approaches in polymeric nanoparticles for vaginal drug delivery: a review of the state of the art. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1549.

Li, R., Cheng, Z., Yu, X., Wang, S., Han, Z. and Kang, L. (2019). Preparation of antibacterial PCL/PVP-AgNP Janus nanofibers by uniaxial electrospinning. *Materials Letters*, 254, 206-209.

Li, Z. and Wang, C. (2013). *Effects of working parameters on electrospinning*. Springer Berlin Heidelberg, 15-28.

Lian, S., Lamprou, D. and Zhao, M. (2023). Electrospinning technologies for the delivery of biopharmaceuticals: Current status and future trends. *International Journal of Pharmaceutics*, 123641.

Liotta, D. C. and Painter, G. R. (2016). Discovery and development of the anti-human immunodeficiency virus drug, emtricitabine (Emtriva, FTC). *Accounts of Chemical Research*, 49(10), 2091-2098.

Liu, G., Gu, Z., Hong, Y., Cheng, L. and Li, C. (2017). Electrospun starch nanofibers: Recent advances, challenges, and strategies for potential pharmaceutical applications. *Journal of Controlled Release*, 252, 95-107.

Liu, P., De Wulf, O., Laru, J., Heikkilä, T., van Veen, B., Kiesvaara, J., Hirvonen, J., Peltonen, L. and Laaksonen, T. (2013). Dissolution studies of poorly soluble drug nanosuspensions in non-sink conditions. *Aaps Pharmscitech*, 14, 748-756.

Liu, Y., Hao, M., Chen, Z., Liu, L., Liu, Y., Yang, W. and Ramakrishna, S. (2020). A review on recent advances in application of electrospun nanofiber materials as biosensors. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 13, 174-189.

Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. L. and Wang, Q. (2011). Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α-tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 145-152.

Lv, F., Wang, J., Chen, H., Sui, L., Feng, L., Liu, Z., Liu, Y., Wei, G. and Lu, W. (2021). Enhanced mucosal penetration and efficient inhibition efficacy against cervical cancer of PEGylated docetaxel nanocrystals by TAT modification. *Journal of Controlled Release*, 336, 572-582.

Ma, C., Zhou, Y., Kang, J., Zhang, Y., Ma, Y., Wang, Y., Tian, W., Xu, T., Liang, S. and Fan, G. (2021). Vaginal pessary treatment in women with symptomatic pelvic organ prolapse: a long-term prospective study. *Menopause*, 28(5), 538-545.

Machado, R. M., Palmeira-De-Oliveira, A., Martinez-De-Oliveira, J. and Palmeira-De-Oliveira, R. (2013). Vaginal films for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(7), 2069-2081.

Madanchi, H., Shoushtari, M., Kashani, H. H. and Sardari, S. (2020). Antimicrobial peptides of the vaginal innate immunity and their role in the fight against sexually transmitted diseases. *New Microbes and New Infections*, 34, 100627.

Majoko, F., Zwizwai, M., Nyström, L. and Lindmark, G. (2002). Vaginal misoprostol for induction of labour: a more effective agent than prostaglandin F2 alpha gel and prostaglandin E2 pessary. *The Central African journal of Medicine*, 48(11-12), 123-128.

Makuku, R., Seyedmirzaei, H., Tantuoyir, M. M., Rodríguez-Román, E., Albahash, A., Mohamed, K., Moyo, E., Ahmed, A. O., Razi, S. and Rezaei, N. (2022). Exploring the application of immunotherapy against HIV infection in the setting of malignancy: A detailed review article. *International Immunopharmacology*, 105, 108580.

Malcolm, R. K., Boyd, P. J., McCoy, C. F. and Murphy, D. J. (2016). Microbicide vaginal rings: Technological challenges and clinical development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 103, 33-56.

Malcolm, R. K., Edwards, K.-L., Kiser, P., Romano, J. and Smith, T. J. (2010). Advances in microbicide vaginal rings. *Antiviral Research*, 88, S30-S39.

Malik, R., Garg, T., Goyal, A. K. and Rath, G. (2015). Polymeric nanofibers: targeted gastro-retentive drug delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 23(2), 109-124.

Mandal, S., Belshan, M., Holec, A., Zhou, Y. and Destache, C. J. (2017). An enhanced emtricitabine-loaded long-acting nanoformulation for prevention or treatment of HIV infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(1), 10.1128/aac. 01475-01416.

Mandal, S., Prathipati, P. K., Kang, G., Zhou, Y., Yuan, Z., Fan, W., Li, Q. and Destache, C. J. (2017). Tenofovir alafenamide and elvitegravir loaded nanoparticles for long-acting prevention of HIV-1 vaginal transmission. *Aids*, 31(4), 469-476.

Mandas, A., Iorio, E. L., Congiu, M. G., Balestrieri, C., Mereu, A., Cau, D., Dessì, S. and Curreli, N. (2009). Oxidative imbalance in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009.

Mane, P. P., Ambekar, R. S. and Kandasubramanian, B. (2020). Electrospun nanofiber-based cancer sensors: A review. *International Journal of Pharmaceutics,* 583, 119364.

Mansur, H. S., Sadahira, C. M., Souza, A. N. and Mansur, A. A. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering: C,* 28(4), 539-548.

Marfatia, Y. S., Jose, S. K., Baxi, R. R. and Shah, R. J. (2017). Pre-and post-sexual exposure prophylaxis of HIV: An update. *Indian journal of sexually transmitted diseases and AIDS,* 38(1), 1-9.

Marques, M. R., Loebenberg, R. and Almukainzi, M. (2011). Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol,* 18(3), 15-28.

Martínez-Pérez, B., Quintanar-Guerrero, D., Tapia-Tapia, M., Cisneros-Tamayo, R., Zambrano-Zaragoza, M. L., Alcalá-Alcalá, S., Mendoza-Muñoz, N. and Piñón-Segundo, E. (2018). Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 115, 185-195.

Masho, S. W., Wang, C.-L. and Nixon, D. E. (2007). Review of tenofovir-emtricitabine. *Therapeutics and Clinical Risk Management,* 3(6), 1097-1104.

Matulevicius, J., Kliucininkas, L., Prasauskas, T., Buivydiene, D. and Martuzevicius, D. (2016). The comparative study of aerosol filtration by electrospun polyamide, polyvinyl acetate, polyacrylonitrile and cellulose acetate nanofiber media. *Journal of Aerosol Science,* 92, 27-37.

McGowan, J. P. (2000). Prevention of perinatal HIV transmission during pregnancy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy,* 46(5), 657-668.

McMillan, J. (2016). Principles of analytical validation proteomic profiling and analytical chemistry. *Elsevier,* 125, 239-251.

Mesquita, L., Galante, J., Nunes, R., Sarmento, B. and das Neves, J. (2019). Pharmaceutical vehicles for vaginal and rectal administration of anti-HIV microbicide nanosystems. *Pharmaceutics,* 11(3), 145.

Minooei, F., Gilbert, N. M., Zhang, L., Sarah Necamp, M., Mahmoud, M. Y., Kyser, A. J., Tyo, K. M., Watson, W. H., Patwardhan, R., Lewis, W. G., Frieboes, H. B., Lewis, A. L. and Steinbach-Rankins, J. M. (2023). Rapid-dissolving electrospun nanofibers for intra-vaginal antibiotic or probiotic delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* 190, 81-93.

Mir, M., Ahmed, N. and Rehman, A. U. (2017). Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 159, 217-231.

Mireles, L. K., Wu, M.-R., Saadeh, N., Yahia, L. H. and Sacher, E. (2020). Physicochemical characterization of polyvinyl pyrrolidone: A tale of two polyvinyl pyrrolidones. *ACS Omega*, 5(47), 30461-30467.

Mirza, M. A., Panda, A. K., Asif, S., Verma, D., Talegaonkar, S., Manzoor, N., Khan, A., Ahmed, F. J., Dudeja, M. and Iqbal, Z. (2016). A vaginal drug delivery model. *Drug Delivery*, 23(8), 3123-3134.

Mishra, R., Joshi, P. and Mehta, T. (2016). Formulation, development and characterization of mucoadhesive film for treatment of vaginal candidiasis. *International journal of Pharmaceutical Investigation*, 6(1), 47.

Mishra, R. K., Chaubey, N., Patel, J., Mishra, S. and Singh, R. (2020). A review of analytical techniques for determination of anti-HIV drugs. *Int J App Pharm*, 12(6), 41-50.

Mngadi, K. T., Maarschalk, S., Grobler, A. C., Mansoor, L. E., Frohlich, J. A., Madlala, B., Ngcobo, N., Abdool Karim, S. S. and Abdool Karim, Q. (2014). Disclosure of microbicide gel use to sexual partners: influence on adherence in the CAPRISA 004 trial. *AIDS and Behavior*, 18, 849-854.

Mohammadkhani, A., Mohammadkhani, F., Farhadyar, N. and Sadjadi, M. S. (2024). Novel nanocomposite zinc phosphate/polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose: Synthesis, characterization and investigation of antibacterial and anticorrosive properties. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 9, 100591.

Mohite, B., Patel, R., Kayande, N. and Thenge, R. (2021). Vaginal mucoadhesive drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(51A), 123-133.

Montuschi, P. (2013). Measurement of biomarkers of oxidative stress and airway inflammation in exhaled breath condensate: methodology and potential applications in patients with COPD and healthy smokers. *Volatile Biomarkers*, 19, 360-381.

Mulik, B. B., Dhumal, S. T., Harale, R. R., Kharat, K. R. and Sathe, B. R. (2018). Electrochemical Studies of Anti-HIV Drug Emtricitabine: Oxidative Determination and Improved Antimicrobial Activity. *ChemElectroChem*, 5(24), 3926-3931.

Mumper, R. J., Bell, M. A., Worthen, D. R., Cone, R. A., Lewis, G. R., Paull, J. R. A. and Moench, T. R. (2009). Formulating a Sulfonated Antiviral Dendrimer in a Vaginal Microbicidal Gel Having Dual Mechanisms of Action. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(5), 515-524.

Murphy, D. J., Desjardins, D., Boyd, P., Dereuddre-Bosquet, N., Stimmer, L., Caldwell, A., Le Grand, R., Kelly, C., Van Roey, J. and Malcolm, R. K. (2018). Impact of ring size and drug loading on the pharmacokinetics of a combination dapivirine-darunavir vaginal ring in cynomolgus macaques. *International Journal of Pharmaceutics*, 550(1-2), 300-308.

Mustapha, A. D., Oyedepo, F. M., Akin-Ajani, O. D. and Odeku, O. A. (2023). Design and evaluation of antifungal vaginal suppository using coconut oil as base for vulvovaginal candidiasis. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 80.

N'Guessan Gnaman, K. C., Bouttier, S., Yeo, A., Aka Any-Grah, A. A. S., Geiger, S., Huang, N., Nicolas, V., Villebrun, S., Faye-Kette, H., Ponchel, G., Koffi, A. A. and Agnely, F. (2020). Characterization and in vitro evaluation of a vaginal gel containing Lactobacillus crispatus for the prevention of gonorrhea. *International Journal of Pharmaceutics,* 588, 119733.

Nayak, R., Halder, J., Rajwar, T. K., Pradhan, D., Rai, V. K., Dubey, D., Kar, B., Ghosh, G. and Rath, G. (2024). Metronidazole loaded chitosan–phytic acid polyelectrolyte complex nanoparticles as mucoadhesive vaginal delivery system for bacterial vaginosis. *International Journal of Biological Macromolecules,* 255, 128212.

Nazari, K., Mehta, P., Arshad, M. S., Ahmed, S., Andriotis, E. G., Singh, N., Qutachi, O., Chang, M.-W., Fatouros, D. G. and Ahmad, Z. (2019). Quality by Design Micro-Engineering Optimisation of NSAID-Loaded Electrospun Fibrous Patches. *Pharmaceutics,* 12(1), 2.

Nel, A. M., Mitchnick, L. B., Risha, P., Muungo, L. T. M. and Norick, P. M. (2011). Acceptability of vaginal film, soft-gel capsule, and tablet as potential microbicide delivery methods among African women. *Journal of Women's Health,* 20(8), 1207-1214.

Nematpour, N., Moradipour, P., Zangeneh, M. M., Arkan, E., Abdoli, M. and Behbood, L. (2020). The application of nanomaterial science in the formulation a novel antibiotic: Assessment of the antifungal properties of mucoadhesive clotrimazole loaded nanofiber versus vaginal films. *Materials Science and Engineering: C,* 110, 110635.

Nezarati, R. M., Eifert, M. B. and Cosgriff-Hernandez, E. (2013). Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods,* 19(10), 810-819.

Nguyen, J. D. and Duong, H. (2019). Anatomy, abdomen and pelvis, female external genitalia.

Nikazar, S. and Bahrololoumi, S. (2023). 3D-printing: a novel tool for personalized drug delivery advanced and modern approaches for drug delivery. Elsevier, 32, 621-647.

Niu, G., Jin, Z., Zhang, C., He, D., Gao, X., Zou, C., Zhang, W., Ding, J., Das, B. C. and Severinov, K. (2020). An effective vaginal gel to deliver CRISPR/Cas9 system encapsulated in poly (β-amino ester) nanoparticles for vaginal gene therapy. *EBioMedicine,* 58, 214-225.

Norton, P. and Brubaker, L. (2006). Urinary incontinence in women. *The Lancet,* 367(9504), 57-67.

Notario-Pérez, F., Cazorla-Luna, R., Martín-Illana, A., Ruiz-Caro, R., Tamayo, A., Rubio, J. and Veiga, M.-D. (2018). Optimization of tenofovir release from mucoadhesive vaginal tablets by polymer combination to prevent sexual transmission of HIV. *Carbohydrate Polymers,* 179, 305-316.

Notario-Pérez, F., Galante, J., Martín-Illana, A., Cazorla-Luna, R., Sarmento, B., Ruiz-Caro, R., Das Neves, J. and Veiga, M.-D. (2021). Development of pH-sensitive vaginal films based on methacrylate copolymers for topical HIV-1 pre-exposure prophylaxis. *Acta Biomaterialia,* 121, 316-327.

Notario-Pérez, F., Martín-Illana, A., Cazorla-Luna, R., Ruiz-Caro, R., Bedoya, L.-M., Peña, J. and Veiga, M.-D. (2019). Development of mucoadhesive vaginal films based on HPMC and zein as novel formulations to prevent sexual transmission of HIV. *International Journal of Pharmaceutics,* 570, 118643.

Nuhu, F., Gordon, A., Sturmey, R., Seymour, A.-M. and Bhandari, S. (2020). Measurement of Glutathione as a Tool for Oxidative Stress Studies by High Performance Liquid Chromatography. *Molecules,* 25(18), 4196.

Nunes, R., Bogas, S., Faria, M. J., Gonçalves, H., Lúcio, M., Viseu, T., Sarmento, B. and Das Neves, J. (2021). Electrospun fibers for vaginal administration of tenofovir disoproxil fumarate and emtricitabine in the context of topical pre-exposure prophylaxis. *Journal of Controlled Release,* 334, 453-462.

Occhino, J. A., Trabuco, E. C., Heisler, C. A., Klingele, C. J. and Gebhart, J. B. (2011). Changes in vaginal anatomy and sexual function after vaginal surgery. *International Urogynecology Journal,* 22, 799-804.

Ocque, A. J., Hagler, C. E., Morse, G. D., Letendre, S. L. and Ma, Q. (2018). Development and validation of an LC–MS/MS assay for tenofovir and tenofovir alafenamide in human plasma and cerebrospinal fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 156, 163-169.

Okutan, N., Terzi, P. and Altay, F. (2014). Affecting parameters on electrospinning process and characterization of electrospun gelatin nanofibers. *Food Hydrocolloids,* 39, 19-26.

Omar, R. F. and Bergeron, M. G. (2011). The future of microbicides. *International Journal of Infectious Diseases,* 15(10), e656-e660.

Omer, S. and Zelkó, R. (2021). A systematic review of drug-loaded electrospun nanofiber-based ophthalmic inserts. *Pharmaceutics,* 13(10), 1637.

Organization, W. H. (2018). *Updated recommendations on first-line and second-line antiretroviral regimens and post-exposure prophylaxis and recommendations on early infant diagnosis of HIV: interim guidelines: supplement to the 2016 consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection* (No. WHO/CDS/HIV/18.51). World Health Organization.

Osmałek, T., Froelich, A., Jadach, B., Tatarek, A., Gadziński, P., Falana, A., Gralińska, K., Ekert, M., Puri, V. and Wrotyńska-Barczyńska, J. (2021). Recent advances in polymer-based vaginal drug delivery systems. *Pharmaceutics,* 13(6), 884.

Pair, L. S. and Somerall, W. E. (2024). Sexually Transmitted Infections Update. *Advances in Family Practice Nursing,* 6(1), 117-135.

Palmeira-De-Oliveira, R., Palmeira-De-Oliveira, A. and Martinez-De-Oliveira, J. (2015). New strategies for local treatment of vaginal infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 92, 105-122.

Palmisano, L. and Vella, S. (2011). A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Annali dell'Istituto superiore di sanitÃ,* 47, 44-48.

Pandey, P., Pal, R., Singh, S. and Gupta, H. (2023). The Current Status In Mucosal Drug Delivery System (Mdds) And Future Prospectus In Delivery: A Systematic Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences & Medicine (IJPSM)*, *8*(10), 76-106.

Parikh, U. M., Dobard, C., Sharma, S., Cong, M.-e., Jia, H., Martin, A., Pau, C.-P., Hanson, D. L., Guenthner, P. and Smith, J. (2009). Complete protection from repeated vaginal simian-human immunodeficiency virus exposures in macaques by a topical gel containing tenofovir alone or with emtricitabine. *Journal of Virology*, 83(20), 10358-10365.

Park, D., Park, S. and Kim, D.-W. (2021). Electrospun-cellulose derived free-standing carbon nanofibers as lightweight, ultrathin, and stackable interlayers for lithium-sulfur batteries. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126596.

Park, J.-C., Ito, T., Kim, K.-O., Kim, K.-W., Kim, B.-S., Khil, M.-S., Kim, H.-Y. and Kim, I.-S. (2010). Electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers: effects of degree of hydrolysis and enhanced water stability. *Polymer Journal*, 42(3), 273-276.

Partheniadis, I., Nikolakakis, I., Laidmäe, I. and Heinämäki, J. (2020). A mini-review: Needleless electrospinning of nanofibers for pharmaceutical and biomedical applications. *Processes*, 8(6), 673.

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E. and Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333(1), 19-39.

Patel, H. J., Patel, J. S., Desai, B. and Patel, K. D. (2010). Permeability studies of anti hypertensive drug amlodipine besilate for transdermal delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(1), 31-34.

Patel, P. and Patel, P. (2015). Formulation and evaluation of clindamycin HCL in situ gel for vaginal application. *International journal of Pharmaceutical Investigation*, 5(1), 50.

Patil, M. U., Rajput, A. P., Belgamwar, V. S. and Chalikwar, S. S. (2022). Development and characterization of amphotericin B nanoemulsion-loaded mucoadhesive gel for treatment of vulvovaginal candidiasis. *Heliyon*, 8(11), e11489.

Patil, S., Kadam, C. and Pokharkar, V. (2017). QbD based approach for optimization of Tenofovir disoproxil fumarate loaded liquid crystal precursor with improved permeability. *Journal of Advanced Research*, 8(6), 607-616.

Patki, M., Vartak, R., Jablonski, J., Mediouni, S., Gandhi, T., Fu, Y., Cetindag, E., Dave, R., Valente, S. T. and Patel, K. (2020). Efavirenz nanomicelles loaded vaginal film (EZ film) for preexposure prophylaxis (PrEP) of HIV. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 194, 111174.

Pereira, L. E., Clark, M. R., Friend, D. R., Garber, D. A., McNicholl, J. M., Hendry, R. M., Doncel, G. F. and Smith, J. M. (2014). Pharmacokinetic and safety analyses of tenofovir and tenofovir-emtricitabine vaginal tablets in pigtailed macaques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 58(5), 2665-2674.

Perioli, L., Ambrogi, V., Pagano, C., Massetti, E. and Rossi, C. (2011). New solid mucoadhesive systems for benzydamine vaginal administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* 84(2), 413-420.

Permana, A. D., Utomo, E., Pratama, M. R., Amir, M. N., Anjani, Q. K., Mardikasari, S. A., Sumarheni, S., Himawan, A., Arjuna, A., Usmanengsi, U. and Donnelly, R. F. (2021). Bioadhesive-Thermosensitive In Situ Vaginal Gel of the Gel Flake-Solid Dispersion of Itraconazole for Enhanced Antifungal Activity in the Treatment of Vaginal Candidiasis. *ACS Applied Materials & Interfaces,* 13(15), 18128-18141.

Popović-Djordjević, J., Quispe, C., Giordo, R., Kostić, A., Katanić Stanković, J. S., Tsouh Fokou, P. V., Carbone, K., Martorell, M., Kumar, M., Pintus, G., Sharifi-Rad, J., Docea, A. O. and Calina, D. (2022). Natural products and synthetic analogues against HIV: A perspective to develop new potential anti-HIV drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry,* 233, 114217.

Pozharani, L. B., Baloglu, E., Suer, K., Guler, E., Burgaz, E. V. and Kunter, I. (2023). Development and optimization of in-situ gels for vaginal delivery of metronidazole and curcumin via box-behnken design: In vitro characterization and anti-trichomonas activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 86, 104739.

Prakapenka, A. V., Bimonte-Nelson, H. A. and Sirianni, R. W. (2017). Engineering poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) micro- and nano-carriers for Controlled Delivery of 17β-Estradiol. *Annals of Biomedical Engineering,* 45(7), 1697-1709.

Pratistadevi, K. and Ramdial, E. C. (2013). *Pathology of the Vulva and Vagina*. (W. G. M. Laurence Brown Editör). Verlag London: Springer, 175-210.

Pucić, I. and Jurkin, T. (2012). FTIR assessment of poly (ethylene oxide) irradiated in solid state, melt and aqeuous solution. *Radiation Physics and Chemistry,* 81(9), 1426-1429.

Quinn, P. S. and Benzonelli, A. (2018). XRD and materials analysis. *The Encyclopedia of Archaeological Sciences*, 2, 1796-1800.

Rahma, A., Munir, M. M., Prasetyo, A., Suendo, V. and Rachmawati, H. (2016). Intermolecular interactions and the release pattern of electrospun curcumin-polyvinyl (pyrrolidone) fiber. *Biological and Pharmaceutical Bulletin,* 39(2), 163-173.

Raja, P. B., Munusamy, K. R., Perumal, V. and Ibrahim, M. N. M. (2022). Characterization of nanomaterial used in nanobioremediation nano-bioremediation: fundamentals and applications. *Elsevier,* 4, 57-83.

Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W.-E., Yong, T., Ma, Z. and Ramaseshan, R. (2006). Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today,* 9(3), 40-50.

Ramaswamy, D. (2018). *Transactional terrains: partnerships, bargains and the Postwar redefinition of the public realm, New York City 1965-1980.* Massachusetts: Massachusetts Institute of Technology, 114-118.

Ramsey, P. S., Ogburn Jr, P. L., Harris, D. Y., Heise, R. H. and Ramin, K. D. (2002). Effect of vaginal pH on efficacy of the dinoprostone gel for cervical ripening/labor induction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* 187(4), 843-846.

Rasouli, R., Barhoum, A., Bechelany, M. and Dufresne, A. (2019). Nanofibers for biomedical and healthcare applications. *Macromolecular Bioscience,* 19(2), 1800256.

Reddy, B. R. Y., Reddy, M. T. and Reddy, B. S. C. (2015). Simultaneous Estimation of Emtricitabine and Tenofovir Disoproxil Fumarate in Tablet Dosage Form by Reverse Phase High-performance Liquid Chromatography. SOJ Chromatograph Sci 1 (1): 6. *Simultaneous Estimation of Emtricitabine and Tenofovir Disoproxil Fumarate in Tablet Dosage Form by Reverse Phase High-performance Liquid Chromatography*.

Reddy, M. R., Subrahmanyam, A., Reddy, M. M., Kumar, J. S., Kamalaker, V. and Reddy, M. J. (2016). X-RD, SEM, FT-IR, DSC studies of polymer blend films of PMMA and PEO. *Materials Today: Proceedings,* 3(10), 3713-3718.

Reddy, V. S., Tian, Y., Zhang, C., Ye, Z., Roy, K., Chinnappan, A., Ramakrishna, S., Liu, W. and Ghosh, R. (2021). A review on electrospun nanofibers based advanced applications: From health care to energy devices. *Polymers,* 13(21), 3746.

Refate, A., Mohamed, Y., Mohamed, M., Sobhy, M., Samhy, K., Khaled, O., Eidaroos, K., Batikh, H., El-Kashif, E., El-Khatib, S. and Mehanny, S. (2023). Influence of electrospinning parameters on biopolymers nanofibers, with emphasis on cellulose & chitosan. *Heliyon,* 9(6), e17051.

Registration, D. P., Van Der Ende, M. E., Regez, R. M., Schreij, G., Van Der Meer, J. T. and Danner, S. A. (2002). Post-exposure prophylaxis. *International Journal of STD & AIDS,* 13(1), 30-34.

Reguieg, F., Ricci, L., Bouyacoub, N., Belbachir, M. and Bertoldo, M. (2020). Thermal characterization by DSC and TGA analyses of PVA hydrogels with organic and sodium MMT. *Polymer Bulletin,* 77(2), 929-948.

Ren, C., Li, X., Mao, L., Xiong, J., Gao, C., Shen, H., Wang, L., Zhu, D., Ding, W. and Wang, H. (2019). An effective and biocompatible polyethylenimine based vaginal suppository for gene delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,* 20, 101994.

Repka, M. A., Gerding, T. G., Repka, S. L. and McGinity, J. W. (1999). Influence of plasticizers and drugs on the physical-mechanical properties of hydroxypropylcellulose films prepared by hot melt extrusion. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 25(5), 625-633.

Rianjanu, A., Kusumaatmaja, A., Suyono, E. A. and Triyana, K. (2018). Solvent vapor treatment improves mechanical strength of electrospun polyvinyl alcohol nanofibers. *Heliyon,* 4(4), e00592.

Riaz, U. and Ashraf, S. M. (2014). *Characterization of polymer blends with ftir spectroscopy.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 625-678.

Richman, D. D. (2001). Antiretroviral activity of emtricitabine, a potent nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antiviral Therapy,* 6(2), 83-88.

Ries, A. J. (1997). Treatment of vaginal infections: candidiasis, bacterial vaginosis, and trichomoniasis. *Journal of the American Pharmaceutical Association (1996),* 37(5), 563-569.

Rodrigues, F., Maia, M. J., Das Neves, J., Sarmento, B., Amaral, M. H. and P.P. Oliveira, M. B. (2015). Vaginal suppositories containingLactobacillus acidophilus: development and characterization. *Drug development and Industrial Pharmacy,* 41(9), 1518-1525.

Roy, M., Hazra, A., Merkatz, R., Plagianos, M., Alami, M., Gaur, L. N., Aruldas, K., Sussman, H., Variano, B. and Sitruk-Ware, R. (2020). Progesterone vaginal ring as a new contraceptive option for lactating mothers: Evidence from a multicenter non-randomized comparative clinical trial in India. *Contraception,* 102(3), 159-167.

Roy, S. and Prabhakar, B. (2010). Bioadhesive polymeric platforms for transmucosal drug delivery systems – a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research,* 9(1), 25-32.

Rüzgar Özemre, G., Kara, A. A., Pezik, E., Tort, S., Vural, İ. and Acartürk, F. (2023). Preparation of nanodelivery systems for oral administration of low molecular weight heparin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 79, 104068.

Sabbagh, F., Muhamad, I. I., Niazmand, R., Dikshit, P. K. and Kim, B. S. (2022). Recent progress in polymeric non-invasive insulin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules,* 203, 222-243.

Salah, S., Awad, G. E. A. and Makhlouf, A. I. A. (2018). Improved vaginal retention and enhanced antifungal activity of miconazole microsponges gel: Formulation development and in vivo therapeutic efficacy in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 114, 255-266.

Salam, A., Khan, M. Q., Hassan, T., Hassan, N., Nazir, A., Hussain, T., Azeem, M. and Kim, I. S. (2020). In-vitro assessment of appropriate hydrophilic scaffolds by co-electrospinning of poly(1,4 cyclohexane isosorbide terephthalate)/polyvinyl alcohol. *Scientific Reports,* 10(1).

Sanchaniya, J. V., Lasenko, I., Kanukuntala, S. P., Smogor, H., Viluma-Gudmona, A., Krasnikovs, A., Tipans, I. and Gobins, V. (2023). Mechanical and Thermal Characterization of Annealed Oriented PAN Nanofibers. *Polymers,* 15(15), 3287.

Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., Castán, H. and Morales, M. E. (2018). A novel double-layer mucoadhesive tablet containing probiotic strain for vaginal administration: Design, development and technological evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 63-70.

Santen, R. (2015). Vaginal administration of estradiol: effects of dose, preparation and timing on plasma estradiol levels. *Climacteric*, 18(2), 121-134.

Saravolatz, L. D. and Saag, M. S. (2006). Emtricitabine, a new antiretroviral agent with activity against HIV and hepatitis B virus. *Clinical Infectious Diseases*, 42(1), 126-131.

Satapathy, B. S., Biswal, B., Pattnaik, S., Parida, R. and Sahoo, R. N. (2023). A mucoadhesive nanolipo gel containing Aegle marmelos gum to enhance transdermal effectiveness of linezolid for vaginal infection: In vitro evaluation, in vitro-ex vivo correlation, pharmacokinetic studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 648, 123542.

Satora, M., Grunwald, A., Zaremba, B., Frankowska, K., Żak, K., Tarkowski, R. and Kułak, K. (2023). Treatment of vulvovaginal candidiasis—an overview of guidelines and the latest treatment methods. *Journal of Clinical Medicine*, 12(16), 5376.

Schinazi, R. F., Patel, D. and Ehteshami, M. (2022). The best backbone for HIV prevention, treatment, and elimination: Emtricitabine+ tenofovir. *Antiviral Therapy*, 27(2), 13596535211067599.

Schmitt, J. and Flemming, H.-C. (1998). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(1), 1-11.

Scholar, E. (2009). Emtricitabine. *Elsevier*, 4, 1-5.

Semnani, D. (2017). Geometrical characterization of electrospun nanofibers electrospun nanofibers. Elsevier, 4, 151-180.

Shahabadi, N., Hadidi, S. and Feizi, F. (2015). Study on the interaction of antiviral drug 'Tenofovir'with human serum albumin by spectral and molecular modeling methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 138, 169-175.

Shaikh, R., Singh, T. R. R., Garland, M. J., Woolfson, A. D. and Donnelly, R. F. (2011). Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 89-100.

Shapiro, R. L., Bockley, K. M., Hsueh, H. T., Appell, M. B., Carter, D. M., Ortiz, J., Brayton, C. and Ensign, L. M. (2024). Hypotonic, gel-forming delivery system for vaginal drug administration. *Journal of controlled release*, 371, 101-110.

Sharma, A., Gupta, A., Rath, G., Goyal, A., Mathur, R. and Dhakate, S. (2013). Electrospun composite nanofiber-based transmucosal patch for anti-diabetic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(27), 3410-3418.

Sharma, B. (2014). Oxidative stress in HIV patients receiving antiretroviral therapy. *Current HIV Research,* 12(1), 13-21.

Sharma, R., Garg, T., Goyal, A. K. and Rath, G. (2016). Development, optimization and evaluation of polymeric electrospun nanofiber: A tool for local delivery of fluconazole for management of vaginal candidiasis. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology,* 44(2), 524-531.

Shattock, R. J. and Moore, J. P. (2003). Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology,* 1(1), 25-34.

Sill, T. J. and Von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials,* 29(13), 1989-2006.

Silva, J. A., De Gregorio, P. R., Rivero, G., Abraham, G. A. and Nader-Macías, M. E. F. (2021). Immobilization of vaginal Lactobacillus in polymeric nanofibers for its incorporation in vaginal probiotic products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 156, 105563.

Silva, J. P. A., Figueirêdo, C. B. M., De Medeiros Vieira, A. C. Q., De Lyra, M. A. M., Rolim, L. A., Rolim-Neto, P. J., De La Roca Soares, M. F., Albuquerque, M. M. and Soares-Sobrinho, J. L. (2017). Thermal characterization and kinetic study of the antiretroviral tenofovir disoproxil fumarate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry,* 130(3), 1643-1651.

Simon, G., Moog, C. and Obert, G. (1994). Effects of glutathione precursors on human immunodeficiency virus replication. *Chemico-Biological Interactions,* 91(2-3), 217-224.

Singh, G., Kaur, T., Kaur, R., Kaur, A. (2014). Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci,* 1(2), 30-42.

Singh, R., Kesharwani, P., Mehra, N. K., Singh, S., Banerjee, S. and Jain, N. (2015). Development and characterization of folate anchored Saquinavir entrapped PLGA nanoparticles for anti-tumor activity. *Drug Development and Industrial Pharmacy,* 41(11), 1888-1901.

Širc, J., Hobzová, R., Kostina, N., Munzarová, M., Juklíčková, M., Lhotka, M., Kubinová, Š., Zajícová, A. and Michálek, J. (2012). Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *Journal of Nanomaterials,* 2012, 1-14.

Soccal, R. M., De Carvalho, J. A. M., Bochi, G. V., Moresco, R. N. and Da Silva, J. E. P. (2016). Nitric oxide levels in HIV-infected, untreated patients and HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 79, 302-307.

Soni, A. (2013). Simultaneous estimation of tenofovir and emtricitabine in human plasma using HPLC after protein precipitation extraction. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques,* 04(03).

Sosnik, A. and Amiji, M. (2010). Nanotechnology solutions for infectious diseases in developing nations. Preface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(4-5), 375-377.

Stokvis, E., Rosing, H. and Beijnen, J. H. (2005). Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(3), 401-407.

Su, W., Guo, K., Tong, Z., Chang, G. and Song, C. (2000). R*esearch on the filtration performance of two kinds of ptfe modified filter media*. *De la facultad de ingenieria Учредители:* Venezuela: Universidad Central de Venezuela., 236-241.

Subi, M. T. M., Nandhakumar, S. and Vasanthi, H. R. (2024). Vaginal drug delivery system: A promising route of drug administration for local and systemic diseases. *Drug Discovery Today*, 104012.

Sudhamani, S., Prasad, M. and Sankar, K. U. (2003). DSC and FTIR studies on gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blend films. *Food Hydrocolloids*, 17(3), 245-250.

Sued, O., Figueroa, M. I. and Cahn, P. (2016). Clinical challenges in HIV/AIDS: Hints for advancing prevention and patient management strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 103, 5-19.

Sultan, B., Benn, P. and Waters, L. (2014). Current perspectives in HIV post-exposure prophylaxis. *HIV/AIDS-Research and Palliative Care*, 147-158.

Sun, Q., Liu, Z., Zhu, P., Liu, J. and Shang, S. (2023). The effects of electrospinning structure on the ion conductivity of PEO-based polymer solid-state electrolytes. *Energies*, 16(15), 5819.

Sun, S.-B., Liu, P., Shao, F.-M. and Miao, Q.-L. (2015). Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), 19670.

Sundaram, M., Saghayam, S., Priya, B., Venkatesh, K. K., Balakrishnan, P., Shankar, E. M., Murugavel, K. G., Solomon, S. and Kumarasamy, N. (2008). Changes in antioxidant profile among HIV-infected individuals on generic highly active antiretroviral therapy in southern India. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(6), e61-e66.

Suresh Babu, J., Saravanan, A., Muthuvel, B., George, R. and Narayanan, J. (2023). Synthesis and characterization of natural biomaterial composite nanofibers for ocular drug delivery systems. *OpenNano*, 10, 100122.

Szymańska, E., Wojasiński, M., Dąbrowska, J., Krzyżowska, M., Nowicka, M., Ciach, T. and Winnicka, K. (2022). Chitosan-poly(ethylene oxide) nanofibrous mat as a vaginal platform for tenofovir disoproxyl fumarate – The effect of vaginal pH on drug carrier performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 856-867.

Tan, E. P. S. and Lim, C. T. (2006). Mechanical characterization of nanofibers – A review. *Composites Science and Technology*, 66(9), 1102-1111.

Tangri, P. and Madhav, N. (2011). Oral mucoadhesive drug delivery systems: a review. *JBI*, 4, 2229, 7499.

Tao, F., Cheng, Y., Shi, X., Zheng, H., Du, Y., Xiang, W. and Deng, H. (2020). Applications of chitin and chitosan nanofibers in bone regenerative engineering. *Carbohydrate Polymers,* 230, 115658.

Tas, C., Özkan, Y., Savaser, A. and Baykara, T. (2003). In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives. *Il Farmaco,* 58(8), 605-611.

Tawfik, E. A., Alshamsan, A., Abul Kalam, M., Raish, M., Alkholief, M., Stapleton, P., Harvey, K., Craig, D. Q. M. and Barker, S. A. (2021). In vitro and in vivo biological assessment of dual drug-loaded coaxial nanofibers for the treatment of corneal abrasion. *International Journal of Pharmaceutics,* 604, 120732.

Teixeira, M. A., Amorim, M. T. P. and Felgueiras, H. P. (2019). Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers,* 12(1), 7.

Teworte, S., Aleandri, S., Weber, J. R., Carone, M. and Luciani, P. (2023). Mucoadhesive 3D printed vaginal ovules to treat endometriosis and fibrotic uterine diseases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 188, 106501.

Thakkar, S. and Misra, M. (2017). Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 107, 148-167.

Thakur, D., Fatima, T., Sharma, P., Hasan, M. R., Malhotra, N., Khanuja, M., Shukla, S. K. and Narang, J. (2023a). High-performance biosensing systems for diagnostics of sexually transmitted disease–A strategic review. *Process Biochemistry,* 126, 223-237.

Thakur, D., Fatima, T., Sharma, P., Hasan, M. R., Malhotra, N., Khanuja, M., Shukla, S. K. and Narang, J. (2023b). High-performance biosensing systems for diagnostics of sexually transmitted disease – A strategic review. *Process Biochemistry,* 126, 223-237.

Thenmozhi, S., Dharmaraj, N., Kadirvelu, K. and Kim, H. Y. (2017). Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. *Materials Science and Engineering: B,* 217, 36-48.

Tho, I. and Škalko-Basnet, N. (2024). Cell-based in vitro models for vaginal permeability studies concepts and models for drug permeability studies. *Elsevier,* 42, 169-186.

Tiboni, M., Campana, R., Frangipani, E. and Casettari, L. (2021). 3D printed clotrimazole intravaginal ring for the treatment of recurrent vaginal candidiasis. *International Journal of Pharmaceutics,* 596, 120290.

Tiboni, M., Cespi, M., Casettari, L., Palmieri, G. F., Perinelli, D. R. and Bonacucina, G. (2023). Hydrogel containing mPEG-PLGA nanoparticles for the vaginal delivery of saquinavir mesylate against HIV infection. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 191, 106599.

Tiţa, B., Fuliaş, A., Bandur, G., Marian, E. and Tiţa, D. (2011). Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,* 56(2), 221-227.

Tiwari, S. K. and Venkatraman, S. S. (2012). Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core–shell fibers. *Materials Science and Engineering: C,* 32(5), 1037-1042.

Sato, T., Iguchi, T. and Mohapatra, S. (2018). Vagina: Cell biology. In *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 360-367). Elsevier.

Topuz, F., Satilmis, B. and Uyar, T. (2019). Electrospinning of uniform nanofibers of Polymers of Intrinsic Microporosity (PIM-1): The influence of solution conductivity and relative humidity. *Polymer,* 178, 121610.

Torre, D. (2003). Nitric oxide in HIV-1 perinatally infected children treated with highly active antiretroviral therapy–Authors' reply. *The Lancet Infectious Diseases,* 3(3), 129-130.

Torre, D., Pugliese, A. and Speranza, F. (2002). Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? *The Lancet Infectious Diseases,* 2(5), 273-280.

Tort, S. (2016). *Elektro-çekim yöntemiyle hazırlanan nanolif yara örtülerinin İn vitro/in vivo değerlendirilmesi.* Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 111-115.

Tort, S. and Acartürk, F. (2016). Preparation and characterization of electrospun nanofibers containing glutamine. *Carbohydrate Polymers,* 152, 802-814.

Tort, S., Acartürk, F. and Beşikci, A. (2017). Evaluation of three-layered doxycycline-collagen loaded nanofiber wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics,* 529(1-2), 642-653.

Tort, S., Demiröz, F. T., Cevher, Ş. C., Sarıbaş, S., Özoğul, C. and Acartürk, F. (2020). The effect of a new wound dressing on wound healing: Biochemical and histopathological evaluation. *Burns,* 46(1), 143-155.

Tsevat, D. G., Wiesenfeld, H. C., Parks, C. and Peipert, J. F. (2017). Sexually transmitted diseases and infertility. *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* 216(1), 1-9.

Tuğcu-demiröz, F. (2017). Development of in situ poloxamer-chitosan hydrogels for vaginal drug delivery of benzydamine hydrochloride: Textural, mucoadhesive and in vitro release properties. *Marmara Pharmaceutical Journal,* 21(4), 762-770.

Tuğcu-Demiröz, F. Acartürk, F. and Erdoğan, D. (2013). Development of long-acting bioadhesive vaginal gels of oxybutynin: Formulation, in vitro and in vivo evaluations. *International Journal of Pharmaceutics,* 457(1), 25-39.

Tuğcu-Demiröz, F., Saar, S., Kara, A. A., Yıldız, A., Tunçel, E. and Acartürk, F. (2021). Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded nanofiber hybrid system for vaginal controlled release of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 161, 105801.

Tuğcu-Demiröz, F., Saar, S., Tort, S. and Acartürk, F. (2020). Electrospun metronidazole-loaded nanofibers for vaginal drug delivery. *Drug development and industrial Pharmacy,* 46(6), 1015-1025.

Tunpanich, P., Limpongsa, E., Pongjanyakul, T., Sripanidkulchai, B. and Jaipakdee, N. (2019). Mucoadhesive sustained-release tablets for vaginal delivery of Curcuma comosa extracts: Preparation and characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 51, 559-568.

Turanlı, Y. (2022). *Kolona özgü nanolif ilaç taşıyıcı sistemler üzerine çalışmalar.* Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 42-48.

Turanlı, Y., Tort, S. and Acartürk, F. (2019). Development and characterization of methylprednisolone loaded delayed release nanofibers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 49, 58-65.

Tümer, A. and Ünal, S. (2001). HIV/AIDS epidemiyolojisi ve korunma. *Sosyal Politika Çalışmaları Dergisi,* 4(4), 15-19.

Tyo, K. M., Vuong, H. R., Malik, D. A., Sims, L. B., Alatassi, H., Duan, J., Watson, W. H. and Steinbach-Rankins, J. M. (2017). Multipurpose tenofovir disoproxil fumarate electrospun fibers for the prevention of HIV-1 and HSV-2 infections in vitro. *International Journal of Pharmaceutics,* 531(1), 118-133.

Uyar, T. and Besenbacher, F. (2008). Electrospinning of uniform polystyrene fibers: The effect of solvent conductivity. *Polymer,* 49(24), 5336-5343.

Valamla, B., Thakor, P., Phuse, R., Dalvi, M., Kharat, P., Kumar, A., Panwar, D., Singh, S. B., Giorgia, P. and Mehra, N. K. (2022). Engineering drug delivery systems to overcome the vaginal mucosal barrier: Current understanding and research agenda of mucoadhesive formulations of vaginal delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 70, 103162.

Valenta, C. (2005). The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 57(11), 1692-1712.

Valenta, C., Kast, C. E., Harich, I. and Bernkop-Schnürch, A. (2001). Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. *Journal of Controlled Release,* 77(3), 323-332.

Valipouri, A. (2017). Production scale up of nanofibers: a review. *Journal of Textiles and Polymers,* 5(1), 8-16.

Valizadeh, A. and Mussa Farkhani, S. (2014). Electrospinning and electrospun nanofibres. *IET Nanobiotechnology,* 8(2), 83-92.

Valore, E. V., Park, C. H., Igreti, S. L. and Ganz, T. (2002). Antimicrobial components of vaginal fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* 187(3), 561-568.

Van Damme, L., Ramjee, G., Alary, M., Vuylsteke, B., Chandeying, V., Rees, H., Sirivongrangson, P., Tshibaka, L. M., Ettiègne-Traoré, V., Uaheowitchai, C., Karim, S. S. A., Mâsse, B., Perriëns, J. and Laga, M. (2002). Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *The Lancet,* 360(9338), 971-977.

VanBenschoten, H. M. and Woodrow, K. A. (2021). Vaginal delivery of vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 178, 113956.

Vanić, Ž., Jøraholmen, M. W. and Škalko-Basnet, N. (2021). Nanomedicines for the topical treatment of vulvovaginal infections: Addressing the challenges of antimicrobial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 178, 113855.

Vanić, Ž. and Škalko-Basnet, N. (2013). Nanopharmaceuticals for improved topical vaginal therapy: can they deliver? *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 50(1), 29-41.

Varan, C., Şen, M., Sandler, N., Aktaş, Y. and Bilensoy, E. (2019). Mechanical characterization and ex vivo evaluation of anticancer and antiviral drug printed bioadhesive film for the treatment of cervical cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* 130, 114-123.

Vartak, R., Jablonski, J., Deore, B., Mediouni, S., Sanhueza, C. A., Valente, S. T. and Patel, K. (2022). Bictegravir nanomicelles and anionic pullulan loaded vaginal film: Dual mechanistic pre-exposure prophylaxis (PrEP) for HIV. *International Journal of Biological Macromolecules,* 221, 416-425.

Vashisth, P., Sharma, M., Nikhil, K., Singh, H., Panwar, R., Pruthi, P. A. and Pruthi, V. (2015). Antiproliferative activity of ferulic acid-encapsulated electrospun PLGA/PEO nanofibers against MCF-7 human breast carcinoma cells. *3 Biotech,* 5(3), 303-315.

Vass, P., Szabó, E., Domokos, A., Hirsch, E., Galata, D., Farkas, B., Démuth, B., Andersen, S. K., Vigh, T. and Verreck, G. (2020). Scale-up of electrospinning technology: Applications in the pharmaceutical industry. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology,* 12(4), e1611.

Vellayappan, M., Venugopal, J., Ramakrishna, S., Ray, S., Ismail, A., Mandal, M., Manikandan, A., Seal, S. and aganathan, S. (2016). Electrospinning applications from diagnosis to treatment of diabetes. *RSC Advances,* 6(87), 83638-83655.

Vermani, K. and Garg, S. (2000). The scope and potential of vaginal drug delivery. *Pharmaceutical science & technology today,* 3(10), 359-364.

Veselinovic, M., Yang, K.-H., Lecureux, J., Sykes, C., Remling-Mulder, L., Kashuba, A. D. M. and Akkina, R. (2014). HIV pre-exposure prophylaxis: Mucosal tissue drug distribution of RT inhibitor Tenofovir and entry inhibitor Maraviroc in a humanized mouse model. *Virology,* 464-465, 253-263.

Vidal, F., Domingo, J. C., Guallar, J., Saumoy, M., Cordobilla, B., Sánchez de la Rosa, R., Giralt, M., Alvarez, M. L., López-Dupla, M. and Torres, F. (2006). In vitro cytotoxicity and mitochondrial toxicity of tenofovir alone and in combination with other antiretrovirals in human renal proximal tubule cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 50(11), 3824-3832.

Vidyadhari, A., Singh, A. K., Ralli, T., Parvez, S. and Kohli, K. (2023). Drug-loaded electrospun nanofiber for Vulvovaginal candidiasis: A systematic literature review. *Clinical Epidemiology and Global Health,* 24, 101420.

Wang, M., Li, D., Li, J., Li, S., Chen, Z., Yu, D.-G., Liu, Z. and Guo, J. Z. (2020). Electrospun Janus zein–PVP nanofibers provide a two-stage controlled release of poorly water-soluble drugs. *Materials & Design,* 196, 109075.

Wang, X.-J., You, J. Z. and Yu, F. (2015). Study on the thermal decomposition of emtricitabine. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis,* 115, 344-352.

Wang, X., Gao, C., Shu, G., Wang, Y. and Liu, X. (2015). The enzyme electrocatalytic immunosensor based on functional composite nanofibers for sensitive detection of tumor suppressor protein p53. *Journal of Electroanalytical Chemistry,* 756, 101-107.

Wang, X., Liu, S., Guan, Y., Ding, J., Ma, C. and Xie, Z. (2021). Vaginal drug delivery approaches for localized management of cervical cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 174, 114-126.

Watanabe, L. M., Barbosa Júnior, F., Jordão, A. A. and Navarro, A. M. (2016). Influence of HIV infection and the use of antiretroviral therapy on selenium and selenomethionine concentrations and antioxidant protection. *Nutrition,* 32(11-12), 1238-1242.

Wen, L., Tseng, J.-Y. and Wang, P.-H. (2006). Vaginal Expulsion of a Submucosal Myoma During Treatment with Long-Acting Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology,* 45(2), 173-175.

Wieling, J. (2002). LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia,* 55(S1), S107-S113.

Wihlfahrt, K., Günther, V., Mendling, W., Westermann, A., Willer, D., Gitas, G., Ruchay, Z., Maass, N., Allahqoli, L. and Alkatout, I. (2023). Sexually transmitted diseases—an update and overview of current research. *Diagnostics,* 13(9), 1656.

Wilkins, N. J., Rasberry, C., Liddon, N., Szucs, L. E., Johns, M., Leonard, S., Goss, S. J. and Oglesby, H. (2022). Addressing HIV/sexually transmitted diseases and pregnancy prevention through schools: an approach for strengthening education, health services, and school environments that promote adolescent sexual health and well-being. *Journal of Adolescent Health,* 70(4), 540-549.

Wiriyakosol, N., Puangpetch, A., Manosuthi, W., Tomongkon, S., Sukasem, C. and Pinthong, D. (2018). A LC/MS/MS method for determination of tenofovir in human plasma and its application to toxicity monitoring. *Journal of Chromatography B,* 1085, 89-95.

Woodsong, C. and Holt, J. D. (2015). Acceptability and preferences for vaginal dosage forms intended for prevention of HIV or HIV and pregnancy. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 92, 146-154.

Woolfson, A. D., Elliott, G. R. E., Gilligan, C. A. and Passmore, C. M. (1999). Design of an intravaginal ring for the controlled delivery of 17β-estradiol as its 3-acetate ester. *Journal of Controlled Release,* 61(3), 319-328.

Workowski, K. A. (2021). Sexually transmitted infections treatment guidelines, 2021. *MMWR. Recommendations and Reports,* 70.

Wright, M. E., Parrag, I. C., Yang, M. and Santerre, J. P. (2017). Electrospun polyurethane nanofiber scaffolds with ciprofloxacin oligomer versus free ciprofloxacin: Effect on drug release and cell attachment. *Journal of Controlled Release,* 250, 107-115.

Wu, T.-J., Chiu, H.-Y., Yu, J., Cautela, M. P., Sarmento, B., das Neves, J., Catala, C., Pazos-Perez, N., Guerrini, L. and Alvarez-Puebla, R. A. (2018). Nanotechnologies for early diagnosis, in situ disease monitoring, and prevention nanotechnologies in preventive and regenerative medicine. *Elsevier*, 41, 1-92.

Xiao, D., Ling, K. H. J., Tarnowski, T., Majeed, S. R., German, P., Kearney, B. P., Zhao, Y., Chen, Y.-S. and Ma, L. (2020). An LC-MS/MS method for determination of tenofovir (TFV) in human plasma following tenofovir alafenamide (TAF) administration: development, validation, cross-validation, and use of formic acid as plasma TFV stabilizer. *Analytical Biochemistry*, 593, 113611.

Xiao, T., Cai, Y. and Chen, B. (2021). HIV-1 entry and membrane fusion inhibitors. *Viruses*, 13(5), 735.

Xie, L., Li, Y., Liu, Y., Chai, Z., Ding, Y., Shi, L. and Wang, J. (2023). Vaginal Drug Delivery Systems to Control Microbe-Associated Infections. *ACS Applied Bio Materials,* 6(9), 3504-3515.

Yagi, K. (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, 2, 101-106.

Yan, E., Jiang, J., Yang, X., Fan, L., Wang, Y., An, Q., Zhang, Z., Lu, B., Wang, D. and Zhang, D. (2020). pH-sensitive core-shell electrospun nanofibers based on polyvinyl alcohol/polycaprolactone as a potential drug delivery system for the chemotherapy against cervical cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology,* 55, 101455.

Yang, J., Wang, K., Yu, D.-G., Yang, Y., Bligh, S. W. A. and Williams, G. R. (2020). Electrospun Janus nanofibers loaded with a drug and inorganic nanoparticles as an effective antibacterial wound dressing. *Materials Science and Engineering: C,* 111, 110805.

Yang, Z., Wu, X., Wang, H., Zhou, J., Lin, X. and Yang, P. (2024). Vagina, a promising route for drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105397.

Yao, C., Li, X. and Song, T. (2007). Electrospinning and crosslinking of zein nanofiber mats. *Journal of Applied Polymer Science,* 103(1), 380-385.

Yıldız, A., Kara, A. A. and Acartürk, F. (2020). Peptide-protein based nanofibers in pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules,* 148, 1084-1097.

Yilmaz, O. E. and Erdem, R. (2020). Evaluating hydrogen detection performance of an electrospun CuZnFe2O4 nanofiber sensor. *International Journal of Hydrogen Energy,* 45(50), 26402-26412.

Yoo, J.-W., Acharya, G. and Lee, C. H. (2009). In vivo evaluation of vaginal films for mucosal delivery of nitric oxide. *Biomaterials,* 30(23-24), 3978-3985.

Yoo, J.-W., Dharmala, K. and Lee, C. H. (2006). The physicodynamic properties of mucoadhesive polymeric films developed as female controlled drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics,* 309(1-2), 139-145.

Young, I. C., Srinivasan, P., Shrivastava, R., Janusziewicz, R., Thorson, A., Cottrell, M. L., Sellers, R. S., Sykes, C., Schauer, A., Little, D., Kelley, K., Kashuba, A. D. M., Katz, D., Pyles, R. B., García-Lerma, J. G., Vincent, K. L., Smith, J. and Benhabbour, S. R. (2023). Next generation 3D-printed intravaginal ring for prevention of HIV and unintended pregnancy. *Biomaterials,* 301, 122260.

Yu, T., Malcolm, K., Woolfson, D., Jones, D. S. and Andrews, G. P. (2011). Vaginal gel drug delivery systems: understanding rheological characteristics and performance. *Expert Opinion on Drug Delivery,* 8(10), 1309-1322.

Zaneveld, L. J., Waller, D. P., Anderson, R. A., Chany, C., Rencher, W. F., Feathergill, K., Diao, X.-H., Doncel, G. F., Herold, B. and Cooper, M. (2002). Efficacy and safety of a new vaginal contraceptive antimicrobial formulation containing high molecular weight poly (sodium 4-styrenesulfonate). *Biology of Reproduction,* 66(4), 886-894.

Zare, M. and Ramakrishna, S. (2020, December). Current progress of electrospun nanocarriers for drug delivery applications. In *Proceedings* (Vol. 4, p. 8790).

Zeiger, B. B., da Silva Carramão, S., Del Roy, C. A., da Silva, T. T., Hwang, S. M. and Auge, A. P. F. (2022). Vaginal pessary in advanced pelvic organ prolapse: impact on quality of life. *International Urogynecology Journal,* 33(7), 2013-2020.

Zhan, F., Yan, X., Li, J., Sheng, F. and Li, B. (2021). Encapsulation of tangeretin in PVA/PAA crosslinking electrospun fibers by emulsion-electrospinning: Morphology characterization, slow-release, and antioxidant activity assessment. *Food Chemistry,* 337, 127763.

Zhang, W., Parniak, M. A., Sarafianos, S. G., Cost, M. R. and Rohan, L. C. (2014). Development of a vaginal delivery film containing EFdA, a novel anti-HIV nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics,* 461(1-2), 203-213.

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. and Xie, S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal,* 12(3), 263-271.

Zhang, Y., Zhang, X., Li, P., Wu, W., Lin, J., Wang, J., Qu, L. and Zhang, H. (2020). Porous nanofiber composite membrane with 3D interpenetrating networks towards ultrafast and isotropic proton conduction. *Journal of Materials Chemistry A,* 8(10), 5128-5137.

Zhao, X., Boyd, P., Bashi, Y. D., Murphy, D. J., McCoy, C. F., Coulter, S., Laverty, G. and Malcolm, R. K. (2023). Two into one does go: Formulation development of a multipurpose combination vaginal ring releasing dapivirine and metronidazole for prevention of HIV infection and treatment of bacterial vaginosis. *International Journal of Pharmaceutics,* 648, 123572.

Zheng, J.-H., Guida, L. A., Rower, C., Castillo-Mancilla, J., Meditz, A., Klein, B., Kerr, B. J., Langness, J., Bushman, L. and Kiser, J. (2014). Quantitation of tenofovir and emtricitabine in dried blood spots (DBS) with LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 144-151.

Zidan, H. M., Abdelrazek, E. M., Abdelghany, A. M. and Tarabiah, A. E. (2019). Characterization and some physical studies of PVA/PVP filled with MWCNTs. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(1), 904-913.

Zong, S., Wang, X., Yang, Y., Wu, W., Li, H., Ma, Y., Lin, W., Sun, T., Huang, Y., Xie, Z., Yue, Y., Liu, S. and Jing, X. (2015). The use of cisplatin-loaded mucoadhesive nanofibers for local chemotherapy of cervical cancers in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 127-135.

Zupancic, S., Sinha-Ray, S., Sinha-Ray, S., Kristl, J. and Yarin, A. L. (2016). Controlled release of ciprofloxacin from core–shell nanofibers with monolithic or blended core. *Molecular Pharmaceutics*, 13(4), 1393-1404.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 26.08.2020-E.89044

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. FATMA NUR TUĞCU DEMİRÖZ
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 05.11.2019 tarih ve E.138571 sayılı yazımız ile onay alan, araştırmacı grubu Fatma Nur TUĞCU DEMİRÖZ, Şule COŞKUN CEVHER, Hakkı TAŞTAN ve Füsun ACARTÜRK'ten oluşan G.Ü.ET-19.063 kod numaralı ***"Kombine Antiretroviral İlaç İçeren Vajinal Formülasyonların Geliştirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi"*** başlıklı araştırmanız ile ilgili Kurulumuza vermiş olduğunuz 21.07.2020 ve 24.07.2020 tarihli dilekçeleriniz Kurulumuzun 24.07.2020 tarih ve 05 sayılı toplantısında incelenmiştir.

Araştırma önerinizde ilk başvurunuzda belirtilen çalışmanız ile ilgili kullanılacak olan efavirenz ve elvitegravir etkin maddelerinin temin edilememesi nedeniyle, çalışmanızı tenofovir disproksil fumarat ve emtrisitabin ile devam edilmesi ve araştırmacı grubuna Sinem SAAR'ın da dahil edilmesi ile ilgili taleplerinizin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek: 1 Liste

Bu

EK 1. (devam) Etik Kurul Onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 24/07/2020	TOPLANTI SAYISI : 05
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı	: Saar, Sinem
Uyruğu	: T.C.
Doğum tarihi ve yeri	
Medeni hali	
Telefon	
e-mail	

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Ana Bilim Dalı	
Lisans	Marmara Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi	
Lise	Sema Yazar Anadolu Lisesi	

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2018-Halen	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

İnceçayır, T., Olğaç, S., Yıldız, A., Saar, S. & Kodan, E. (2019). pH-Dependent dissolution behavior of a weakly basic BCS class II drug, clopidogrel. *Latin American Journal of Pharmacy 38*(10): 1921-8.

Saar, S., & Demiröz, Tuğcu-Demiröz F. (2023). Evaluation of Mechanical and Mucoadhesive Properties of Polyvinyl Alcohol Nanofibers As Vaginal Drug Delivery System. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(2), 219-230.

Tort, S., Akça, E. K., Olğaç, S., Saar, S., Yıldız, A., Ünal, İ.S., Özdal., Z.D. & Tuğcu-Demiröz, F. (2021). Development and evaluation of sustained release tablet formulations of venlafaxine hydrochloride. *Sağlık Bilimlerinde Değer, 12*(1): 28-35.

Tuğcu-Demiröz, F., Saar, S., Kara, A. A., Yıldız, A., Tunçel, E., & Acartürk, F. (2021). Development and characterization of chitosan nanoparticles loaded nanofiber hybrid system for vaginal controlled release of benzydamine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 161*, 105801.

Tuğcu-Demiröz, F., Saar, S., Tort, S., & Acartürk, F. (2020). Electrospun metronidazole-loaded nanofibers for vaginal drug delivery. *Drug Development and İndustrial Pharmacy, 46*(6), 1015-1025.

Poster Bildirileri

Dik, Z., Saar S., Tuğcu-Demiröz F. (2021). *Preparation and characterization of tenofovir disoproxil fumarate loaded nanofiber for vaginal delivery.* 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Turkey.

Dik, Z., Saar, S., Tuğcu-Demiröz, F. (2019). Preparation and characterization of tenofovir loaded mucoadhesive gels for vaginal delivery. *8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences,* 65.

Gürol, G., Saar, S., Tuğcu-Demiröz F. (2021). *Development and characterization of voriconazole loaded organogel formulations for vaginal delivery.* 3rd International Gazi Pharma Symposium Series, Ankara, Turkey.

Gürol, G., Saar, S., Tuğcu-Demiröz F. (2021). *Preparation and characterization of vaginal delivery of voriconazole loaded mucoadhesive organogels.* 12th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology Vienna, Austria.

Keskin, G., Akca, G., Saar, S., Tuğcu-Demiröz, F. (2022). *Antifungal activity of voriconazole loaded organogel formulations against candida albicans.* Fıgon DMD & Eufeps Annual Meeting, Leiden, Hollanda.

Keskin, G., Saar, S., Tuğcu-Demiröz F. (2022). *Vaginal mucoadhesion and permeability studies of voriconazole loaded organogel formulations.* 20th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), Ankara, Turkey.

Olgac S, Yildiz A, Saar S, Kodan E, Incecayir T. (2018). pH-Dependent Dissolution Behavior Of a Weakly Basic BCS Class II Drug, Clopidogrel. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 26-29 June 2018, Ankara, Turkey. (Poster Presentation).

Saar S., Tuğcu-Demiröz F. (2021). *Evaluation of polyvinyl alcohol nanofibers as vaginal drug delivery system.* 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Ankara, Turkey.

Saar S., Yıldız A., Ünal İS., Özdal ZD., Olgaç S., Kodan, E., Duran C., Tort S., Tuğcu Demiröz F. (2018). *Development and evaluation of extended release tablet formulations of venlafaxine hydrochloride.* 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 26-29 June 2018, Ankara, Turkey. (Poster Presentation).

Saar, S., Tuğcu-Demiröz F. (2021). *Development and optimization of electrospun PVA nanofibers for vaginal drug delivery using design of experiment method.* 3rd International Gazi Pharma Symposium Series, Ankara, Turkey.

Saar, S., Tuğcu-Demiröz F. (2022). *Evaluation of mechanical and morphological properties of zein-based nanofibers for vaginal drug delivery.* 20th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), Ankara, Turkey.

Saar, S., Yıldız A., Unal, Is., Ozdal, Z. D., Olgac, S., Kodan, E., Duran, C., Tort S., Tugcu-Demiroz, F. (2018). Development and evaluation of extended release tablet formulations of venlafaxine hydrochloride. *12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences,* 314.

Saar, S., Yıldız, A., Yıldırım, E., Uyar, R., Turgut, Y., Yurdakok-Dikmen, B., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. (2022). *In-vitro, ex-vivo and cytotoxicity evaluation of hydrocortisone loaded nanofiber for colon targeting.* Fıgon DMD & Eufeps Annual Meeting, Leiden, Hollanda.

Tuğcu Demiröz, F., Ongun, M., Saar, S., Tırnaksız F. (2019). *Evaluation and characterization of metronidazole loaded emulgel formulation for vaginal delivery.* 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 14-16 October 2019, İzmir, Turkey. (Poster Presentation).

Tuğcu Demiröz, F., Saar, S., Tort, S., Kara, A., Acartürk F. (2018). *Evaluation of ıntravaginal delivery of polyvinylpyrrolidone-metronidazole nanofibers for the treatment of bacterial vaginosis.* 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 26-29 June 2018, Ankara, Turkey. (Poster Presentation).

Tuğcu Demiröz, F., Tort, S., Yıldız, A., Saar, S., Acartürk F. (2018). *Vaginal permeability studies of metronidazole loaded PVP nanofibers.* 19th International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), 17-19 September 2018, Antalya, Turkey. (Poster Presentation).

Tuğcu-Demiröz, F., Saar, S., Tort, S., Kara, A. A., Acartürk, F. (2018). *Evaluation of ıntravaginal delivery of polyvinylpyrrolidone-metronidazole nanofibers for the treatment of bacterial vaginosis.* 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 313.

Yıldırım E., Yıldız A., Saar S., Tuğcu Demiröz F. N., Acartürk F. (2021). The evaluation of the potential eudragit based delayed release nanofibers for colon targeting. *13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences*,

Yıldız A, Saar S, Yıldırım E, Uyar R, Turgut-Birer Y, Yurdakok-Dikmen B, Tuğcu-Demiröz F, Acartürk F. (2022). *Evaluation of the effect of nanofiber formulations on the expression of IBD marker TNF-α by cell culture studies.* 16th Nanoscience & Nanotechnology Conference, Ankara, Türkiye.

Sözlü Bildirileri

Saar, S., Yıldız, A., Yıldırım, E., Uyar, R., Turgut, Y., Yurdakok-Dikmen, B., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk. F. (2022). In-vitro, Ex-vivo and Cytotoxicity Evaluation of Hydrocortisone Loaded Nanofiber for Colon Targeting FIGON DMD & EUFEPS Annual Meeting 2022, 1-3 Haziran 2022, Leiden, Hollanda. (Oral Presentation).

Yıldız, A., Turanlı, Y., Birer, M., Saar, S., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. (2021). *Fabrication and characterizatıon of methylprednisolone-loaded colon-specfic 3D-printed drug delivery systems.* 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Ankara, Turkey, 8-10 September 2021. (Oral Presentation).

Saar, S., Yıldız, A., Tort, S., Tuğcu-Demiröz, F., Acartürk, F. (2020). A Different Approach To Nanofiber Drug Delivery Systems: Nanofiber Based Tablet Formulations. *International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry* (BioTechBioChem 2020), 17-19 December 2020, Ankara, Turkey. (Oral Presentation).

Tuğcu Demiröz, F., Yıldız, A., Kara, AA., Tunçel E., Saar, S., Acartürk F. (2019). Development Of Benzydamine Loaded Nanofiber Formulations For Vaginal Controlled Drug Release. *8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences*, 14-16 October 2019, İzmir, Turkey. (Oral Presentation).

Dik, Z. Saar, S., Tuğcu-Demiröz F. (2023). *Preparation and Characterization of Tenofovir Disoproxil Fumarate Loaded Nanofiber for Vagınal Drug Delıvery*. 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 22-25 Haziran 2023, Ankara, Türkiye. (Oral Presentation).

Saar, S., Tuğcu-Demiröz F., Acartük, F. (2024) Preparation and Characterization of Tenofovir Disoproxil Fumarate And Emtricitabine Loaded Zein Based Nanofiber Formulations for Vagınal Drug Delıvery. *14th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS)*, 25-28 Haziran 2024, Ankara, Türkiye. (Oral Presentation).

Hobiler

Kitap okumak, Kültürel geziler yapmak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR…

