

**DONEPEZİL YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE IN VITRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**PREPARATION AND IN VITRO EVALUATION OF
DONEPEZIL LOADED NANOPARTICULAR DRUG
DELIVERY SYSTEMS**

SEVDA ŞAHAN

PROF. DR. YILMAZ ÇAPAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2018

ÖZET

DONEPEZİL YÜKLÜ NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE IN VITRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Sevda ŞAHAN

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

Haziran 2018, 103 sayfa

Günümüzde dünya çapında yaklaşık 46 milyon demanslı bulunmaktadır. Hastalığın nedeni bilinmemektedir ve günümüzde dejeneratif prosesi durduracak ya da yavaşlatacak bir tedavi yöntemi yoktur.¹ Ancak kullanılan semptomatik tedavi yaklaşımları ile temel olarak hastanın yaşam kalitesini arttırmak, hastalığın bilişsel fonksiyonlarını iyileştirmek, duygusal ve mental değişiklikleri kontrol altında tutmak amaçlanmaktadır.² Donepezil, Alzheimer Hastalığı tedavisinde kullanılan reversibl bir kolinesteraz inhibitörüdür. Kolinerjik sistem öğrenme, hafıza ve Alzheimer Hastalığı'nda kolinerjik disfonksiyondan kaynaklanan şiddetli hafıza bozukluklarında önemli bir rol oynamaktadır.³ Geleneksel taşıma mekanizmalarındaki yetersizlik nedeniyle ilaç moleküllerinin kan beyin bariyerini geçebilmesi için kan beyin bariyerinin osmotik olarak açılması ya da ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gibi yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Kan beyin bariyerini atlatan girişimsel teknikler arasında ilaç taşıyıcı nanoboyutlu sistemlerin kullanımı ve intranasal yol bulunmaktadır.¹ Polimerik nanopartiküller nanometrik boyutlarıyla ilaçları in vitro ve in vivo bozunmadan korurlar, ilacı kontrollü bir şekilde salabilirler ve ilaç hedeflendirme olasılığı sunarlar.⁴

Bu alışmada, Donepezil etken maddesi yüklü PLGA nanopartikülleri çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Nanopartikül hazırlanması için birden fazla teknik denenmiş ve bu tekniklerin nanopartikülleri hazırlamadaki etkinlikleri gözlemlenmiştir. Donepezil etken maddesi yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamak için belirlenen optimum teknikte partikül boyutunu etkileyen parametreler incelenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu için HPLC, FTIR, partikül boyutu ölçümleri gerçekleştirilmiş, partikül hazırlama verimi, enkapsülasyon etkinliği ve yüklenme oranları hesaplanmıştır. Ayrıca Donepezil etken maddesinin HPLC metodu ile tayin edilebilmesi için analitik metot geliştirilmiş ve doğruluğu kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Donepezil, PLGA, Alzheimer Hastalığı, Nanopartikül, HPLC

ABSTRACT

PREPARATION AND IN VITRO EVALUATION OF DONEPEZIL LOADED NANOPARTICULAR DRUG DELIVERY SYSTEMS

Sevda ŞAHAN

**Degree of Master, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

June 2018, 103 pages

There are about 46 million dementia worldwide today. The cause of disease is unknown and there is currently no treatment to stop or slow the degenerative process.¹ However, there are some symptomatic treatment approaches to partially improve the cognitive functions of Alzheimer' s Disease, to control emotional and psychological changes, and to improve the quality of life of patients with clinical practice.² Donepezil is a reversible cholinesterase inhibitor used in the treatment of Alzheimer' s Disease. The cholinergic system plays an important role in learning, memory, and severe memory impairment due to cholinergic dysfunctions in Alzheimer' s Disease.³ New strategies are needed, such as osmotically opening the blood brain barrier or developing drug delivery systems, in order for drug molecule to bypass the blood brain barrier because of the inadequacy of traditional transport mechanisms. Interventional techniques that bypass blood brain barrier include the use of drug carrying nanoparticle systems and intranasal pathway.¹ Polymeric nanoparticles protect nanoparticles in vitro and in vivo degradation, release drugs in a controlled manner, and offer the possibility of drug targeting.⁴

In this study, PLGA nanoparticles loaded with Donepezil agent were prepared by solvent evaporation technique. Several techniques have been tried for preparation of nanoparticles and the activity of these techniques in preparing nanoparticles has been observed. Parameters affecting the particle size were investigated and reported in the optimal technique for preparing Donepezil active substance loaded PLGA nanoparticles. For the characterization of the prepared nanoparticles, HPLC, FTIR, particle size measurements were performed, particle preparation efficiency, encapsulation efficiency and loading rates were calculated. Furthermore, the analytical method has been developed and its validity proved to be able to determine the Donepezil drug substance by the HPLC method.

Keywords: Donepezil, PLGA, Alzheimer's Disease, Nanoparticle, HPLC

TEŐEKKÜR

Bana bu fırsatı verdiği için saygıdeğer danıőmanım, eski direktörüm Sn. Yılmaz ÇAPAN' a, ihtiyaç duyduğum her durumda bilgi birikimini ve teknik desteğini esirgemeyen Sn. Adem ŐAHİN' e, yardımları için Sn. Sedenay AKTAŐ' a, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve tüm imkanlarıyla yanımda olan aileme, sabrı, anlayıőı ve sevgisiyle elimi tutan eőim Semih ŞAHAN'a teőekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Alzheimer Hastalığı Genel Görünüm	1
1.2. Alzheimer Hastalığı'nda Genetik ve Diğer Risk Faktörleri	3
1.3. Alzheimer Hastalığı'nın Tedavisi	5
1.4. Alzheimer Hastalığı'nın Tedavisinde Kullanılan İlaçlar	6
1.5. Alzheimer Hastalığı'nda Donepezil'in Etkinliği	8
1.6. Donepezil Etken Maddesi.....	10
1.7.Kan Beyin Bariyeri.....	12
1.8. Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler	18
1.9. Nanopartikül Çeşitleri	19
1.9.1. Polimerik Nanopartiküller	19
1.9.1.1 Doğal Polimerler	19
1.9.1.2 Sentetik Polimerler	19
1.10 PLGA Polimerler	21
1.11. Nanokapsüller ve Nanoküreler	23
1.12. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	24
1.12.1. Tek Boyutlu Nanopartiküller	24
1.12.2. İki Boyutlu Nanopartiküller	24
1.12.3. Üç Boyutlu Nanopartiküller	24
1.13. İlaç Salım Mekanizmaları	24
1.14. Nanopartikül Hazırlanması	25
1.14.1. Polimerin Dağıtılması ile Nanopartikül Hazırlama Metotları.....	25
1.14.2.Monomerin Polimerleştirilmesi ile Nanopartikül Hazırlama Metotları	25
1.14.3. PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanmasında Kullanılan Farklı Metotlar	26

1.14.3.1 Çözücü Buharlaştırma Metodu	26
1.14.3.1.1. Suda Yağ Emülsiyonu (Tek Emülsiyon)	31
1.14.3.1.2. Çoklu Emülsiyon (w/o/w)	32
1.14.3.2.Nanoçöktürme (Çözücü Difüzyonu yada Çözücü Yer Değişirme) Metodu.....	33
1.14.3.3.Tuzaklama (Salting Out) Metodu	35
1.14.3.4.Emülsiyon Difüzyon Metodu	37
1.15.Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	39
1.15.1 Partikül Boyutu	39
1.15.2 Zeta Potansiyeli.....	40
1.15.3 Kromatografik Yöntemler.....	40
1.15.4 Spektrometrik Yöntemler	40
1.15.5 Nanopartiküllere Yüklenen Etken Madde Miktarı.....	41
2.MATERYAL VE METOT	42
2.1. Materyal ve Metot.....	42
2.1.1. Materyal.....	42
2.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	42
2.1.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	43
2.2. Metot	44
2.2.1. Donepezil'in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini	44
2.2.1.1. Donepezil'in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini için Kromatografik Koşulların Optimize Edilmesi.....	44
2.2.1.2. Donepezil için Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi	48
2.2.1.3. Analitik Metodun Valide Edilmesi	49
2.2.1.3.1. Özgüllük (Seçicilik) Parametresi	49
2.2.1.3.2. Kesinlik Parametresi.....	52
2.2.1.3.2.1. Tekrarlanabilirlik	52
2.2.1.3.2.2. Ara Kesinlik	52
2.2.1.3.2.3. Tekrar Üretilebilirlik.....	53
2.2.1.3.3. Doğrusallık	53
2.2.1.3.4. Doğruluk ve Geri Kazanım	55
2.2.1.3.5. Bulma Limiti (LOD) ve Saptama Limiti (LOQ).....	56

2.2.2. Nanopartikül Hazırlanması	56
2.2.3. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yüklenme Oranının Tespit Edilmesi.....	57
2.2.4. Nanopartiküllerin Hazırlanma Verimlerinin Belirlenmesi	58
2.2.5. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi	58
2.2.6. Nanopartiküllerin FTIR Analizlerinin Gerçekleştirilmesi	58
2.2.7. Stabilite Çalışmaları	59
2.2.8. In Vitro Salım Çalışması.....	59
3.SONUÇLAR	60
3.3.1.Donepezil'in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini.....	60
3.3.1.1.Donepezil için Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi	60
3.3.2. Analitik Metodun Valide Edilmesi	61
3.3.2.1. Özgüllük (Seçicilik) Parametresi.....	61
3.3.2.2. Kesinlik Parametresi.....	62
3.3.2.2.1. Tekrarlanabilirlik	62
3.3.2.2.2. Ara Kesinlik	63
3.3.2.3. Doğrusallık Parametresi	64
3.3.2.4. Doğruluk ve Geri Kazanım Parametresi	65
3.3.2.5. Bulma Limiti (LOD) ve Saptama Limiti (LOQ).....	65
3.3.3. Nanopartikül Hazırlanması, Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli	66
3.3.4. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yüklenme Oranının Tespit Edilmesi.....	74
3.3.5. Nanopartiküllerin Hazırlanma Verimlerinin Belirlenmesi	75
3.3.6. Fourier Transform Infra Red Spektroskopisi.....	76
3.3.7. Stabilite Çalışmaları	78
3.3.8. İn Vitro Salım Çalışması	78
4.YORUM.....	80
REFERANSLAR.....	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo-1: Çözücü buharlaştırma metodunun avantaj ve dezavantajları

Tablo-2: Nanoçöktürme metodunun avantaj ve dezavantajları

Tablo-3: Tuzaklama (Salting Out) metodunun avantaj ve dezavantajları

Tablo-4: Emülsiyon difüzyon metodunun avantaj ve dezavantajları

Tablo- 5: DNP miktar tayini için kullanılan 1 numaralı HPLC metodu

Tablo- 6: DNP miktar tayini için kullanılan 2 numaralı HPLC metodu

Tablo- 7: Tekrarlanabilirlik parametresinin sonuçları (n=6 numune için)

Tablo- 8: Ara Kesinlik parametresinin sonuçları (n=6 numune için)

Tablo- 9: Doğruluk ve Geri Kazanım parametresinin sonuçları (n=6 numune için)

Tablo- 10: 1. Yöntem A ve 1. Yöntem B için karşılaştırma tablosu (n=3 numune için)

Tablo- 11: 3. Yöntem A ve 3. Yöntem B için karşılaştırma tablosu (n=3 numune)

Tablo- 12: 3. yöntem ile hazırlanacak nanopartiküller için partikül boyutunu etkileyen parametrelerin belirlenmesi (n=3 numune)

Tablo- 13: 4. Yöntem ile üretilen nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri

Tablo- 14: Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve yüklenme oranı (n=6 numune)

Tablo- 15: Nanopartiküllerin hazırlanma veriminin ölçülmesi (n=3 numune)

Tablo- 16: Stabilite çalışmasının sonuçları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil- 1: Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar

Şekil- 2: Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan merkezi kolinerjik etkili ilaçlar

Şekil- 3: Donepezil HCl molekülü

Şekil- 4: Kan beyin bariyerindeki çeşitli geçiş mekanizmaları

Şekil- 5: PLGA'nin moleküler yapısı

Şekil- 6: Nanokapsül ve nanoküre arasındaki fark

Şekil- 7: PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan farklı metotlar

Şekil- 8: Çözücü buharlaştırma metodu ile farklı tipte etken maddelerin yüklenmesi için uygulanan emülsiyon tipleri

Şekil- 9: Boyutlarına göre çözücü buharlaştırma tekniğinde kullanılan emülsiyon tipleri

Şekil- 10: Çözücü buharlaştırma metodunun basamakları

Şekil- 11: Nanoçöktürme metodunun basamakları

Şekil- 12: Tuzaklama (Salting Out) metodunun basamakları

Şekil- 13: Emülsiyon difüzyon metodunun basamakları

Şekil- 14: DNP miktar tayini için kullanılan 1 numaralı HPLC metodundan elde edilen kromatogram

Şekil- 15: DNP miktar tayini için kullanılan 2 numaralı HPLC metodundan elde edilen kromatogram

Şekil- 16: Özgüllük parametresi kromatogram-DNP çözeltisi

Şekil- 17: Özgüllük parametresi kromatogram-PLGA çözeltisi

Şekil- 18: Özgüllük parametresi kromatogram-Mobil Faz A

Şekil- 19: Özgüllük parametresi kromatogram-Mobil Faz B

Şekil- 20: Özgüllük parametresi kromatogram-DNP Çözücüsü

Şekil- 21: Özgüllük parametresi kromatogram-PLGA Çözücüsü

Şekil- 22: Özgüllük parametresi kromatogram-pH 6,8 Tamponu

- Şekil- 23:** Özgüllük parametresi kromatogram-Boş NP
- Şekil- 24:** Özgüllük parametresi kromatogram-Etken Madde Yüklü NP
- Şekil- 25:** Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 1,0 µg/ml
- Şekil- 26:** Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 2,0 µg/ml
- Şekil- 27:** Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 3,0 µg/ml
- Şekil- 28:** Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 4,0 µg/ml
- Şekil- 29:** Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 5,0 µg/ml
- Şekil- 30:** Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 6,0 µg/ml
- Şekil- 31:** Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 7,0 µg/ml
- Şekil- 32:** Nanopartiküllerin hazırlanması
- Şekil- 33:** DNP için 7 farklı noktada çizilen kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemleri
- Şekil- 34:** DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin partikül boyut diagramı
- Şekil- 35:** DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel
- Şekil- 36:** Donepezil etken maddesine ait FTIR spektrumu
- Şekil- 37:** PLGA polimerine ait FTIR spektrumu
- Şekil- 38:** Donepezil etken maddesi yüklü PLGA nanopartiküllerine ait FTIR spektrumu
- Şekil- 39:** DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin in- vitro salım profili

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	yüzde
m ²	metrekare
Da	Dalton
Ω	Ohm
cm ²	santimetrekare
>	büyüktür
<	küçüktür
Å	angstrom
nm	nanometre
m	metre
ml	mililitre
mV	milivolt
μ	mikron
cm	santimetre
mm	milimetre
M	Molar
dk	dakika
°C	Celsius Derecesi
g	gram
L	litre
μm	mikrometre
μl	mikrolitre
M _w	Molecular weight/ Moleküler ağırlık
μm	mikrometre
μg	mikrogram
mg	miligram
rpm	round per second (saniyedeki dönüş sayısı)

mbar milibar

Kısaltmalar

AH	Alzheimer hastalığı
SSS	Santral sinir sistemi
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Apo E	Apolipoprotein E
APP	Amiloid Perkürsör Proteini
PS1	Presenilin- 1
PS2	Presenilin- 2
Aβ	Amiloid Beta
NFY	Nörofibril Yumak
ACh	Asetilkolin
CAT	Kolinasetiltransferaz
NMDA	N- metil- D- aspartat
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
KBB	Kan beyin bariyeri
NP	Nanopartikül
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
TJ	Tight Junction
SI	Uluslararası Birimler Sistemi
PLA	Polilaktik asit
PGA	Poliglikolik asit
PLGA	Poli(laktik- ko-glikolik) asit
PVA	Polivinil alkol
DCM	Diklorometan
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

UV	Ultraviyole
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FTIR	Fourier Transform Infra Red
USP	United States Pharmacopeia
DNP	Donepezil
TEA	Trietilamin
GAA	Glasiyel Asetik Asit
LOD	Limit of detection
SD	Varyasyon katsayısı
ORT	Ortalama
RSD	Relatif standart sapma
LOQ	Limit of quantification/miktar limiti
DMSO	Dimetil sülfoksit
MFA	Mobil faz A
MFB	Mobil faz B
PDI	Polidispersite İndeksi
EE	Enkapsülasyon etkinliği
DL	Yüklenme oranı
o/w	su içinde yağ
w/o	yağ içinde su
w/o/w	su içinde yağ içinde su

1.GİRİŞ

1.1. Alzheimer Hastalığı Genel Görünüm

Son yıllarda sağlık alanında yaşanan gelişmeler sayesinde ortalama insan ömründe artış olmuştur. Ortalama yaşam beklentisindeki artış 65 yaş ve üzeri kişi sayısının çoğalmasıyla sonuçlanmıştır. İleri yaşlardaki nüfusun popülasyonunda meydana gelen artış özellikle orta yaşın üstünde gözlemlenen demans gibi yada demansın öncülük ettiği birtakım hafıza problemlerinin görülme oranını yükseltmiştir.⁵

Demans kelimesi Latince kökenlidir. Kelime olarak aklın yitilmesi anlamına gelmektedir. Başlıca belirtisi kişinin mental ve sosyal bütünlüğünün günlük yaşamı etkileyecek derecede yıkılması olan bellek bozukluğu olarak tanımlanabilir. Bellek bozukluğunu takiben dil ve konuşma, görsel ve alansal beceriler, anlama, dikkat ve odaklanma, problem çözme gibi fonksiyonlar da bozulur. Akabinde davranış değişiklikleri, kişilikteki farklılaşmalar, psikiyatrik semptomlar da gözlemlenen belirtilere eklenebilir.⁶

Günümüzde dünya çapında yaklaşık 46 milyon demanslı bulunmaktadır.¹ Demansın en yaygın nedeni Alzheimer Hastalığı' dır (AH) . 20. yüzyılın başlarından beri AH hakkında araştırmalar yapılmaktadır. Hastalık ilk defa Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır (1906) .⁷ AH; SSS (Santral Sinir Sistemi) ' nin çeşitli kısımlarında sinaps ve nöron kayıplarından dolayı ortaya çıkan⁵, öncelikle yüksek entellektüel fonksiyonlarda ve buna bağlı olarak düşünme ve davranışlarda görülen, defektif özelliklerle karakterize, sinsi gelişen bir hastalıktır.⁸

Demans görülme sıklığının özellikle ilerleyen yaşlarda, her 5 yılda bir 2 katına çıktığı raporlanmıştır. ^{9,10} Tüm demanslı hastaların % 50-75'ini AH oluştururken ⁸ 65 yaş üzeri kişilerde % 3-11 oranlarında bir prevalansa sahip olmakla birlikte, 85

yaşın üzerindeki bireylerde % 20 ila 47 oranlarında görülmektedir.¹¹ Erken başlangıçlı AH türleri otozomal dominant geçişlidir. Bu türler tüm olguların yaklaşık olarak %3 ila 5'ini oluşturmaktadır.¹²

Tahminlere göre dünya genelinde yaklaşık olarak 15 milyon AH bulunmaktadır. Bu oran Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 4 milyon olmakla birlikte bu değer tahminlere göre Türkiye genelinde yaklaşık olarak 250000-500000 arasındadır. 2050 yılında ABD' deki AH sayısının yaklaşık beş milyon olacağı öngörülmektedir.⁵

65 yaş üzeri 1255 hasta ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Geriatri Ünitesi Polikliniği'nde gerçekleştirilen bir çalışma ile tüm hastaların % 4,8'inde Alzheimer dışı demans ve % 8,2'sinde ise AH kaynaklı demans olduğu tespit edilmiştir.⁵

'Türkiye Alzheimer Hastalığı Prevalansı Çalışması' adı altında gerçekleştirilen başka bir çalışmada 70 yaş üzerindeki kişiler arasındaki AH görülme oranının % 11 olduğu tespit edilmiştir.⁵

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre dünya üzerinde AH 600 milyar dolara mal olmaktadır ve 2050 yılına kadar özellikle yaşlı popülasyonda AH görülme oranının yaklaşık 3 kat artması beklenmektedir. Hastalığın nedeni bilinmemektedir ve günümüzde dejeneratif prosesi durduracak ya da yavaşlatacak bir tedavi yöntemi yoktur.¹

AH sinsi başlayan ve yavaş seyreden bir kliniğe sahiptir. AH kesin tanısı biyopsi yada ölüm sonrasında otopsi ile koyulabilmektedir. AH kliniğinin en belirgin özelliklerinden birisi radikal tedavisinin olmamasıdır. Ancak hastanın yaşam kalitesini arttırmayı amaçlayan bir takım semptomatik tedaviler mevcuttur.⁵ Ancak yine de AH' a karşı uygulanan koruyucu ve terapötik stratejilerin çoğu hala çok sınırlıdır ve daha etkili stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.¹³

AH kesin tanısı demanslı hastalar için biyopsi yada ölüm sonrası otopsi sonucunda AH patolojik bulgularının saptanması ile koyulabilmektedir. AH'na

özgü patolojik bulgular sinaps kaybı, nöron kaybı, nörofibriler yumaklar, nörotik plaklar, granülovakuolar dejenerasyon, Meynertin Bazal Nukleus'unda kolinerjik hücre kaybı, aterosklerotik değişikliklerdir.¹² Gelişmiş ülkelerde AH 4. önde gelen ölüm nedeni olmuştur.²

Alzheimer hastalarının ortalama yaşam süreleri tanı konulmasını takiben yaklaşık 5-20 yıl arasındadır (ortalama 8,1) . Bu süre içinde hastalar bütün bilişsel işlevlerini kaybeder, yatağa bağımlı ve çevrelerine cevap veremeyecek hale gelirler. ¹²

Patolojik olarak kesin Alzheimer tanısı, biyopsi veya otopside alınan doku incelemesi sonucunda koyulabilir. Klinik olarak koyulan AH tanısı kesin değil olası AH tanısıdır. Klinik AH tanısının doğruluk oranını hasta öyküsü, fiziki ve nörolojik muayene, laboratuvar incelemeleri, görüntüleme teknikleri, nöropsikolojik testler yaklaşık % 85-90'lara varan bir oranda yükseltmektedir. ¹²

1.2. Alzheimer Hastalığı'nda Genetik ve Diğer Risk Faktörleri

Beyindeki nöron olarak adlandırılan sinir hücrelerinin bozukluğu ve sonunda ölümü bireylerin hafızasını, fonksiyonel ve kognitif yeteneklerini sonunda da yürüme, çiğneme gibi yeteneklerini doğrudan etkiler. Beyindeki nöron ve sinapsların hasarına bağlı olarak AH'nın belirtileri kısa süreli hafıza kayıpları, isimleri hatırlayamama, cevap verme güçlüğü, kafa karışıklığı, davranışsal değişiklikler, fiziksel bozukluklar olarak görülebilir. Bu belirtilerin sebebi genetik ve genetik dışı faktörlerdir.¹

AH'nın gelişmesindeki kesin risk faktörleri; yaş, aile geçmişi ve kişinin apolipoprotein E (Apo E) ε4 aleline sahip olmasıdır.⁵

Majör genetik olmayan etkenler; ileri yaş, obezite, travma ve kardiyovasküler hastalıklardır.¹

AH'nda rol alan başlıca faktörlerden en önemlileri çevresel ve genetik faktörlerdir. AH'nda söz konusu olan otozomal dominant geçiş % 2-5 oranında 21. , 14. ve 1. kromozomlardaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır.⁸

Alzheimer hastalığının moleküler genetik temeli incelendiğinde 4 subtipine rastlanmıştır.⁸

AH1 Subtip: 21. kromozomda Amiloid Perkürsör Proteini (APP) gen mutasyonu

AH2 Subtip: 19. kromozomda Apo E ϵ 4 aleli

AH3 Subtip: 14. kromozomda Presenilin-1 (PS1) gen mutasyonu

AH4 Subtip: 1. kromozomda Presenilin-2 (PS2) gen mutasyonu

AH'nda amiloid beta ($A\beta$) peptid seviyelerinin arttığı bildirilmektedir. Bu artışın nedeni 21. kromozomdaki APP ve 1. kromozomdaki PS2 genlerinin mutasyonları olduğu bildirilmiştir.¹⁰

PS1 genindeki mutasyonlar sonucunda, APP hatalı bölünmektedir ve bu da toksik $A\beta$ üretimiyle sonuçlanmaktadır. Diğer yandan PS1 genindeki mutasyon sonucu Tau Proteinleri hiperfosforile olmaktadır ve bu durum da nörofibriler yumak oluşumuyla (NFY) sonuçlanmaktadır.¹⁰

19. kromozomda bulunan Apo E geni ise geç başlangıçlı AH'nın oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Apo E geninin ϵ 2 aleli AH riskini azalttığı, ϵ 4 alelinin ise AH riskini arttırdığı bildirilmiştir. Bu nedenle Apo E geninin ϵ 2 aleli koruyucu alel olarak bilinirken ϵ 4 aleli amiloid plak ve NFY oluşumuna neden olmaktadır.¹⁰

AH' nın temel mikroskopik değişiklikleri nöron kaybı, amiloid plaklar ve nörofibriler yumaklardır.¹⁰

Nörofibril yumaklar mikrotübül bağlantılı protein olan Tau'nun hiperfosforillenmiş şeklini içeren, hücre gövdelerinde ve dentritlerde biriken çift sarmal iplikçik yığınlarından oluşmaktadır. Hiperfosforile olan Tau Proteinini' nin mikrotübüllerle etkileşiminin azalacağı ve hücre işlevlerinde bozukluk meydana gelebileceği bildirilmiştir.¹⁰

Hücrel kompartımanlarda birikmiş nörotoksik A β mitokondriyal ve sinaptik hasara neden olmakta ve Tau Proteini' nin hiperfosforilasyonuna yol açmakta ve böylece hücrel fonksiyonlara zarar vermektedir. ¹⁰

Normalde fizyolojik koşullarda öğrenmeye yardımcı olan ve dikkati arttıran asetilkolin (ACh) seviyeleri AH esnasında değişiklikler göstermektedir. AH'da ACh sentezinde düşüş meydana gelmektedir. ACh sentezindeki düşüklük kolin geri alımında azalmaya, kolinasetiltransferaz (CAT) enziminin miktarının ve işlevinin düşmesine, kolinerjik nöronlarda ve aksonlarda hasar oluşmasına, korteks ve hipokampusa projekte olan kolinerjik nöronlarda meydana gelen kayıplara bağlı olduğu rapor edilmiştir. ¹⁰ Kolinerjik eksiklik AH'nın en temel patolojik özelliklerinden biridir. Bu eksiklik AH' nın primer semptomları olan bilinç ve hafıza ile kaybı ilişkilidir. ¹³

Özellikle immobilizasyon nedeniyle hastaların bakıma muhtaç hale gelmeleri, sanayileşmiş ülkelerde yaşam süresi ortalamalarının yükselmesiyle birlikte AH'nı üzerinde en çok çalışılan hastalıklardan biri yapmıştır. ⁸

AH'na karşı birtakım genetik olmayan koruyucu faktörler bilinmektedir. Erken dönemde menapozu girdikten sonra, östrojen alan kadınların AH açısından düşük risk taşımaktadır. İnflamasyon da AH patolojisi için önemli bir bileşendir. Non- steroid antiinflatuar bileşiklerin AH'nin gelişme riskini azalttığı düşünülmektedir. ⁶

AH için diğer olası risk faktörleri Down sendromu, düşük eğitim seviyesi, bilinç kaybı ile birlikte seyreden kafa travmaları, atriyal fibrilasyon, aterosklerotik karotid hastalığı, miyokard infarktüs öyküsü, cinsiyet ve fazla bilişsel aktivite gerektirmeyen işlerde çalışma, hipertansiyon, diabetes mellitus, depresyon, insüline bağımlı diyabet hastalığı bulunmaktadır. ^{10, 5}

1.3. Alzheimer Hastalığı'nın Tedavisi

Yaklaşık olarak yüz yıldır bilinen ve üzerinde çalışılmakta olan AH'nın radikal bir tedavisi henüz yoktur. Ancak klinik uygulamalarla duygusal ve zihinsel

değişiklikleri kontrol etmek, hastaların bilişsel fonksiyonlarını iyileştirmek gibi özetle Alzheimer hastalarının yaşam kalitelerini arttırması amaçlanan bir takım semptomatik tedaviler geliştirilmiş ve uygulanmaktadır.⁵

AH'nda temel olarak 3 tedavi yaklaşımı bulunmaktadır:⁵

1) Bilişsel semptomların tedavisinde farmakolojik yaklaşımlar:

Bilişsel semptomların tedavisinde farmakolojik amaçla kullanılan ilaçlar iki türlü etki edebilirler. Bunlardan biri beyinde azalmış olan kolinerjik nörotransmisyonun arttırılması, diğeri ise glutaminerjik nörotransmisyonun azaltılması/zayıflatılmasıdır. Kolinerjik etkili ilaçlar AH esnasında karşılaşılan bilişsel yıkımın tedavisinde kullanılan başlıca ajanlardır. Kolinerjik etkili ilaçlar; kolinesteraz inhibitörleri, nikotinic ve muskarinic agonistler ve asetilkolin salımını dolaylı etkileyen ajalardır.⁵ AH esnasında ortaya çıkan bilişsel yıkıma yönelik kullanılan ikinci ilaç grubu ise NDMA antagonistleridir. Memantin AH nedeniyle gelişen aşırı glutaminerjik etkinliğin azaltılması amaçlanarak geliştirilmiş, FDA onayı almış, nonkompetitif bir NDMA reseptör antagonistidir.⁵

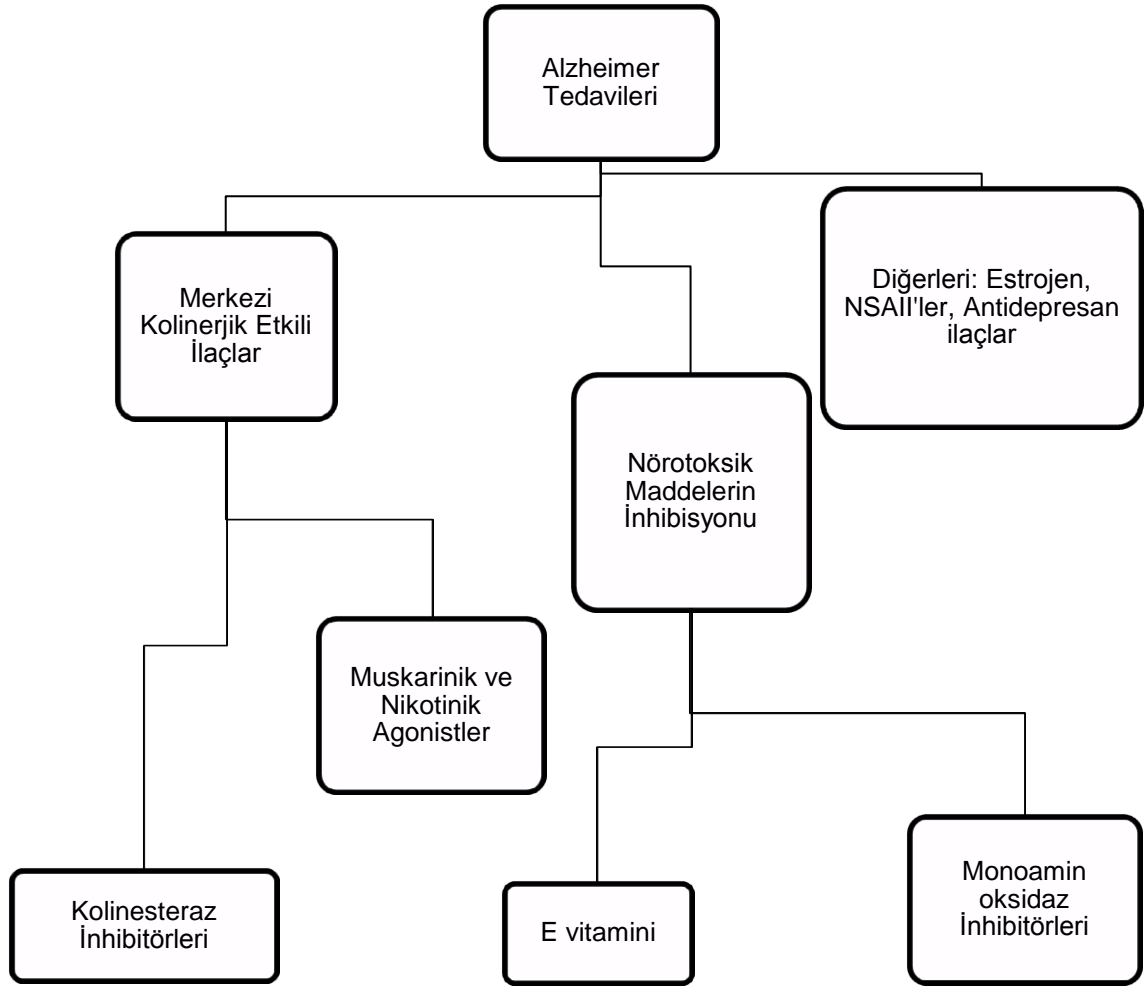
2) AH'nın ilerlemesini yavaşlatan farmakolojik yaklaşımlar.

3) AH'nın farmakolojik tedavisinde gelecekteki yaklaşımlar.

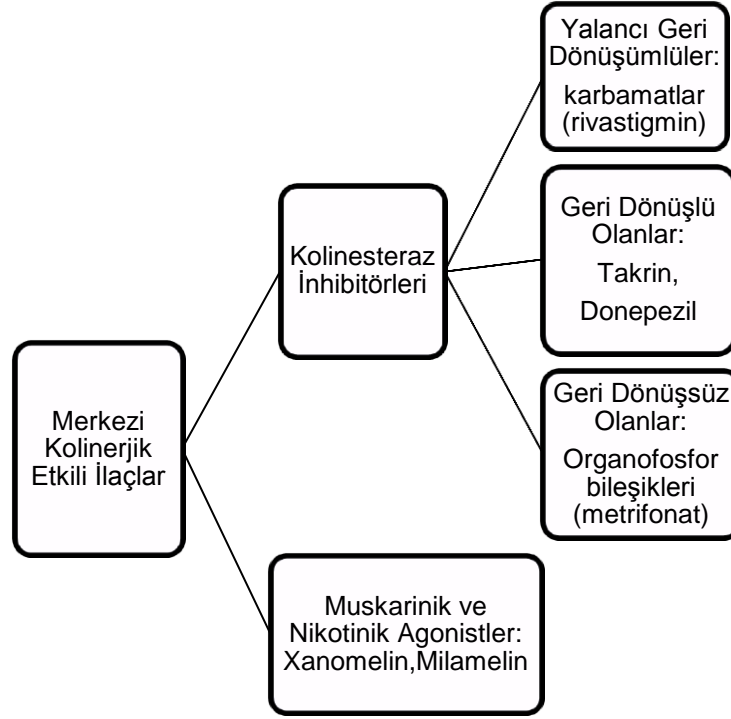
Kolinerjik olarak yerine koyma tedavisi AH tedavisinde etkin olan ilk semptomatik tedavi çeşitidir.¹²

1.4. Alzheimer Hastalığı'nın Tedavisinde Kullanılan İlaçlar

Alzheimer hastalığında kullanılan ilaçları üç temel gruba ayırabiliriz:¹⁴



Şekil- 1: Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar ¹⁴



Şekil- 2: Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan merkezi kolinergic etkili ilaçlar ¹⁴

1.5. Alzheimer Hastalığı'nda Donepezil' in Etkinliği

AH tedavisinde şimdiye kadar FDA tarafından onaylanmış dört adet kolinesteraz inhibitörü ve bir adet N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonisti vardır.

FDA onaylı dört kolinesteraz inhibitörü: takrin, donepezil, rivastigmin ve galantamindir.

FDA onaylı N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonisti ise memantindir.⁵

AH'nda uygulanan tedavi yaklaşımlarından başlıca beklentiler hastalığın nedeni olarak gelişmiş patolojik kaynağın tedavi edilmesi, hastalığın ilerleyişinin durdurularak kişinin eski normal yaşamına geri dönmesidir. Ancak günümüzde

kullanılan tedavi stratejileri ile AH'nın radikal olarak tedavi edilmesi olarak dahilinde değildir. Son yıllarda ortaya çıkan daha etkili maddelerle hastalığın semptomlarını iyileştirecek, ilerleyişini bir nebze yavaşlatacak, hastanın günlük aktivitelerini düzeltecek semptomatik tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. AH'nın tedavisi bilişsel fonksiyonların tedavisi ve psikolojik semptomların tedavisi olmak üzere iki başlıkta toplanabilir.¹

Bilişsel işlev bozukluğunun tedavisi için kullanılan etkin maddeler zayıflamış kolinerjik nörotransmisyonu güçlendirmek ve artmış olan glutaminerjik nörotransmisyonu zayıflatmak olmak üzere iki temel mekanizma ile etki göstermekte, bu amaçla en çok rivastigmin, donepezil ve memantin kullanılmaktadır.¹

Ayrıca Alzheimer hastalarında görülen davranış değişiklikleri ve psikiyatrik belirtileri kontrol altına almak için antidepresan, antipsikotik ve sedatif/ hipnotik ilaçlardan da yararlanılmaktadır.¹

Kolinesteraz inhibitörleri AH tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri kolinerjik sinapslarda ACh miktarını yükseltir ve bu vesileyle de kolinerjik nörotransmisyonu güçlendirerek tedavi sağlarlar. AH tedavisi amacıyla geliştirilmiş ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayını almış kolinesteraz inhibitörleri Donepezil, Takrin, Galantamin ve Rivastigmin' dir.¹⁰

Kolinesteraz inhibitörleri günümüzde en fazla denenmiş ve en çok kullanılan kolinerjik ilaçlardır. Enzimi dönüşümlü yada dönüşümsüz olarak inhibe edebilirler ve bu sayede asetilkolinin hidrolizini engellerler. Kolinesteraz inhibitörlerinin farmakolojik etkileri 4 ana başlık altında incelenebilir;

- 1) Nikotinik ve muskarinik etki ile santral kolinerjik sinapslardaki aşınımı iyileştirmek,
- 2) Nikotinik reseptör aktivasyonu ile toksik APP ürünü olan Aβ oluşmasını engellemek,

3) Toksik A β oluşumunu M1 reseptör aktivasyonu ile engellemek,

4) Muskarinik reseptörleri uyarma sonucunda büyüme faktörlerinin sentezini arttırmak.⁵

Kolinesteraz inhibitörleri ;

- Birinci kuşak kolinesteraz inhibitörleri; fizostigmin, takrin
- İkinci kuşak kolinesteraz inhibitörleri; rivastigmin, donepezil, metrifonat, galantamin, eptastigmin

olarak sayılabilir.⁵

Kolinesteraz inhibitörleri:

- Reversibl olanlar; takrin, donepezil, galantamin
- Psödoreversibl olanlar; fizostigmin, eptastigmin, rivastigmin
- Irreversibl olanlar; metrifonat

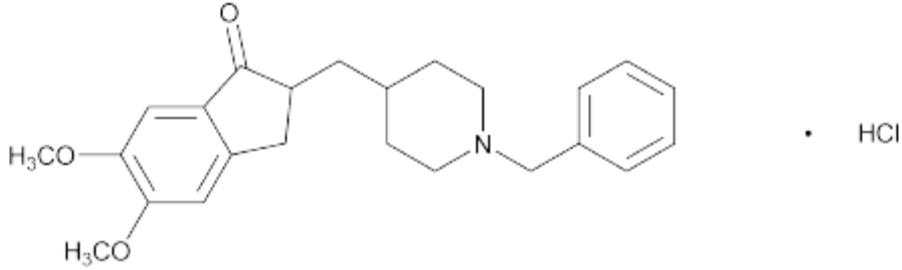
şeklinde de sınıflandırılabilir.⁵

Donepezil AH tedavisinde kullanılan reversible bir kolinesteraz inhibitörüdür. Kolinerjik sistem öğrenme, hafıza ve Alzheimer hastalığında kolinerjik disfonksiyondan kaynaklanan şiddetli hafıza bozukluklarında önemli bir rol oynamaktadır.³

1.6. Donepezil Etken Maddesi

Donepezil, ((RS)-2-[(1-benzil-4-piperidil) metil] -5,6-dimetoksi-2,3-dihidroinden-1-on) (Şekil- 1) FDA onayını alan (1996) ikinci kolinesteraz inhibitörü ve piperidin türevidir.^{5,3} Donepezil, yapısal olarak diğer bileşiklerden farklıdır ve halen AH tedavisi amaçlı olarak çalışılmaktadır. Donepezil halihazırda piyasada günlük oral tek kullanım oranında tablet ve kapsül formunda bulunmaktadır (5 mg/gün ya da 10 mg/gün) .^{3,13} Temel olarak hidroklorür tuzu olarak bulunur.¹⁵ Beyaz kristalin tozudur. Su, metanol, diklorometan, kloroform ve glasiyel asetik asitte çözünür,

etanolda ve n-bütanolde çok az çözünür, asetonitril ve asetonda çok az çözünür, pratikte etil asetat ve n-hekzanda çözünmez. ^{16,15,13} Empirik formülü $C_{24}H_{29}NO_3HCl$, moleküler ağırlığı 415,95 ve erime noktası 218- 220°C'dir. ^{16, 17}



Şekil- 3: Donepezil HCl¹⁷

Dönüşümlü, non-kovalent, piperidin yapısında, ikinci kuşak kolinesteraz inhibitörlerindedir. Donepezil nöronal asetilkolinesteraza seçicidir. Merkezi etkisi diğer kolinesteraz inhibitörlerinden daha fazladır. Karaciğer tarafından metabolize edilmektedir. Oral alımını takiben 3 saat sonunda plazmadaki en yüksek düzeyine ulaşmaktadır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı % 96'dır. Donepezil'in santral sinir sisteminin asetilkolinesterazlarına yüksek oranda seçiciliğinin olması bir üstünlüktür. Daha az yan etkisi vardır. Örneğin Takrin'in çok ciddi hepatotoksik yan etkileri olması nedeniyle ilaç kullanımı süresince karaciğer enzimlerinin monitorizasyonu gereklidir. Donepezil kullanımında bunun gibi bir durum söz konusu değildir. Donepezil kullanımında ilaç bağımlı etkiler orta ve hafif oranda gözlemlenmekle birlikte geçici olmaktadır. Donepezil kullanımı ile birlikte hastanın bilişsel bozukluklarında düzelme ile birlikte, davranışsal bozukluklarda da iyileşme gözlemlenir. Bunların yanında çok ender de olsa davranışsal sorunların artabildiği gözlemlenmiştir. Donepezil'in kullanım yararı diğer kolinesteraz inhibitörleri ile kıyaslanabilir düzeyde olmakla birlikte hem yan etkilerinin daha az olması hem de farmakokinetik açıdan uygun bulunması orta ve hafif seyreden AH tedavisi için ilk seçenek olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. ⁵

Donepezil'in eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 70 saat olmakla birlikte oral biyoyararlanımı neredeyse % 100'dür.¹²

Asetilkolin tarafından sentezlenen kolin asetil transferazın aktivitesi korteks ve hipokampüsteki etkinliğinin Alzheimer hastası beyinlerde belirgin şekilde düşmüş olduğu bilinmektedir. Kolinasetil transferaz tüketilmesi de bilişsel rahatsızlığı şiddetli bir şekilde doğrulamaktadır. Kolinesteraz inhibitörleri asetilkolinin hidrolizini önleyebilmektedir ve kolinerjik transmisyonu arttıracak olan sinaptik yarıktaki asetilkolin konsantrasyonu artırabilir.²

1900 hasta üzerinde plasebo kontrollü olarak dört farklı kolinesteraz inhibitörünün karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada Donepezil'in hastalar tarafından iyi tolere edildiği, organ toksisitesine neden olmadığı ve laboratuvar testleri sonucu herhangi bir anomali oluşturmadığı belirtilmiştir.⁵

Bir başka çalışmada Takrin ve Donepezil karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada 205 hasta kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda Donepezil'in etkinliğinin Takrin'den daha iyi olduğu bildirilmiştir.⁵

1.7. Kan Beyin Bariyeri

Kan Beyin Bariyeri (KBB) ; kan dolaşımı ve santral sinir sistemi (SSS) arasındaki dinamik, fiziksel ve biyolojik bir bariyerdir. KBB, beyni patojenlerden ve istenmeyen moleküllerden koruyan, seçiciliği yüksek ve etkili bir duvardır ancak aynı zamanda terapötik ve diagnostik ajanların beyne taşınması için aşılması gereken en büyük engellerden biridir.¹

KBB, AH tedavisindeki en önemli engellerden birini oluşturmaktadır. Bu bariyerin üstesinden gelmek için; ön-ilaç/ko-ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları, antibadiler gibi partikül taşıyıcı sistemler, lipozomlar ya da nanopartiküller (NP) gibi bir çok strateji geliştirilmiştir.³

Kan ve beyin arasında seçici- geçirgen bir yapı olduğu fikrini ilk defa Paul Ehrlich ortaya sürmüştür (1880) .⁷ Tripan mavisi intravenöz olarak hayvanlara uygulandığında beyin hariç diğer organların boyandığı görüldü. Broman, KBB'ni (1940) beyin kapiler endotel hücrelerinin sahip olduğu spesifik yapı ile açıklamıştır.¹⁸ Vücuttaki en büyük yüzey alanı oluşturan KBB (20 m²) , devamlı ve

neredeyse geçilmez bir hücrenel bariyer oluşturarak ksenobiyotiklerin ve endojen maddelerin geçişini düzenleyen ve sınırlayan sıkı kavşaklar ile karakterizedir.¹

MSS (Merkezi Sinir Sistemi) hastalıklarına karşı etkili ilaçlar geliştirebilmek için KBB' nin fonksiyonlarının tamamen anlaşılması gerekmektedir.¹⁸

Beyin tüm metabolik ihtiyacını kandan aldığı ve oluşan bütün metabolik atıklarını kana verdiği için kan beyin bariyeri geçirgen olmak zorundadır.⁷ KBB istenmeyen molekülleri aktif bir şekilde beyinden uzaklaştırma ve beyne girişlerini engelleme yeteneklerine sahiptir; gerekli besinlerin, uyarıcı moleküllerin ve immun hücrelerin beyin içerisine akışını düzenler.¹

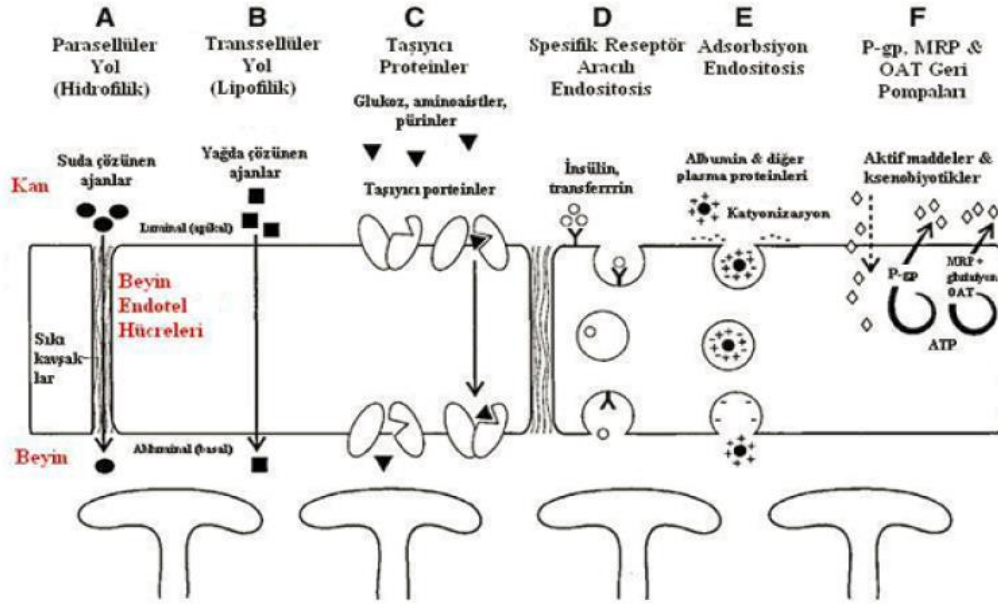
Beyin kapiler duvar kalınlığının diğer kapiller duvarlara göre yaklaşık %39 oranında daha incedir. Beyin kapiler duvarında pinositik vezikül sayısı yedi kez daha az olduğu gösterilmiştir. Duvar kalınlığındaki bu değişikliklerin, besinlerin beyin parankimine girişini belli sınırlar içinde tutacağı düşüncesi kabul edilmektedir.¹⁸

KBB' nin esas yapısını tight junction (sıkı kavşak) kompleksi (TJ) adı verilen sıkı bağlantıların oluşturduğu çok iyi bilinen bir gerçektir. Bu kompleks yapının ana bileşenleri TJ, okludin, klaudin, zonula okludinler ve kavşak yapışma molekülleri en çok çalışılan konulardır. KBB, TJ yapılarındaki kopmalar inme, AH, HIV ensefaliti, bakteriyel menenjit, multiple skleroz gibi bir çok MSS hastalığında kilit rol oynamaktadır.¹⁸

KBB, beyin hücrelerine madde geçişini hem fiziksel tight junction (TJ) : sıkı bağlantılar, hem de metabolik (enzim) bariyeri sayesinde çok sıkı kontrol edilir. Böylece terapötiklerin beyne yayılımı belli sınırlarda tutulur.¹⁸

KBB beyne homeostatik kendi kendini koruma mekanizması sağlarken aynı zamanda ilaç taşıma açısından aşılmaz bir engel oluşturarak nörolojik hastalıkların tanı ve tedavisini zorlaştırır.¹ Suda çözünen maddelerin kandan merkezi sinir sistemine geçmesini ve serebral parankime penetrasyonunu kısıtlayan en önemli engel kan beyin bariyeridir.⁷

KBB'ni oluşturan başlıca bileşenler: perisitler, kapiler damarların endotel hücreleri, astrositler, bazal membran, koroid pleksus, pia-araknoid zarlar.¹⁸



Şekil- 4: Kan beyin bariyerindeki çeşitli geçiş mekanizmaları¹⁹

Terapötik bileşenlerin beyne ulaşmak için pek çok membranı geçmesi gerekir. Ancak hemen hemen bütün yüksek molekül ağırlıklı ilaçlar (> 400- 600 Da) ve düşük molekül ağırlıklı ilaçların % 98'i KBB'ni geçemez. İlaçların yağda çözünürlük ve molekül ağırlığı gibi fizikokimyasal özellikleri KBB'ni ne kadar geçeceğini belirler.¹

Beyin kapilerini oluşturan endotel hücrelerdeki TJ- sıkı bağlantı bölgeleri KBB endotel hücreleri arasında yüksek bir elektrik direnci oluşmasına neden olmaktadır. Dokulardaki elektrik direnci normal dokularda 3- 33Ω/ cm² değerlerinde olmakla birlikte KBB'nde 1500-2000 Ω/cm² değerindedir. Bu durum hücrelerarası geçirgenliğin düşmesine neden olmaktadır. Bu bölgede moleküler ağırlığı 10000'in altında olan moleküllerin geçmesine izin verecek şekilde fenestresyon yada porlar bulunmamaktadır. Periferik kapilerden başlıca farklı özelliklerden biri de budur.¹⁸

Sadece fizyolojik pH'da iyonize olmayan, lipofilik ve düşük molekül ağırlıklı (<400 Da) ilaçlar KBB'ni difüzyon mekanizması ile geçerler.¹ KBB'nde intersellüler aralıklar 200 Å genişliğindedir ve dokularda çözünmüş olan maddelerin geçişine olanak sağlarlar.¹⁸

Geleneksel taşıma mekanizmalarındaki yetersizlik nedeniyle ilaç moleküllerinin KBB'ni geçebilmesi için KBB'nin osmotik olarak açılması ya da ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gibi yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.¹

Terapötik ya da diagnostik ajanların KBB'nden etkili ve başarılı bir şekilde geçmesi için etkin maddenin molekül ağırlığı, yapısal konformasyonu, molekül yükü, lipofilikliği, konsantrasyon gradyanı, formülasyonda kullanılan polimer, hücresel proteinlere afinitesi, dokunun patofizyolojik durumu ve etkin madde ya da dozaj formunun reseptörlere afinitesi gibi pek çok faktör göz önünde bulundurulmalıdır.¹

Moleküllerin KBB'ni aşabilmesi için çok farklı yöntemler denenmiştir. Bu çalışmalar; direkt intrakraniyal, intraserebral ya da intraventriküler infüzyon ya da depo formülasyonların intraventriküler implantasyonu gibi KBB'ni atlatan girişimsel teknikler, KBB permeabilitesinin osmotik açılma gibi yöntemlerle geçici olarak artırılması, ilaçların kimyasal modifikasyonu, ilaç moleküllerinin permeabilitesini artıracak in siliko teknikler, ilaç taşıyıcı nanoboyutlu sistemlerin kullanımı, KBB'ni geçemeyen bir molekülü KBB'ni geçebilen bir moleküle birleştirme yoluyla gerçekleştirilen Truva atı tekniği ve intranazal yol gibi KBB'ni atlayacak alternatif uygulama yollarının kullanımı olarak sıralanabilir.¹ Endotelial hücrelerin sitoplazmasının yoğunluğu tekdüzedir. Fenestra bulunmaz ve pinositik vezikül sayısı çok azdır.

KBB'ni geçmesi gereken bir madde kapiler endotelden, internal sitoplazmik alandan geçmelidir, daha sonra albüminal membranı aşarak perisitlere veya bazal laminaya gelmek ve bunları da aşmak zorundadır. Bu konuyla ilgili olarak kabul gören üç adet teori mevcuttur. Bu teoriler sırasıyla veziküler kanallar, birleşme bölünme ve transitozis teorileridir. Patolojik durumlardada bazal membranın sürekliliğinde bozulma meydana gelir. Vezikül sayısının artmasıyla birlikte, iyonlar ve proteinler beyne geçerler.¹⁸

Kapiller endotel hücrenin luminal yüzeyinden sitoplazmaya giren bazı ilaçlar ve nörotransmitterler burada farklı enzimlerle etkileşime girerek inaktif formlarına dönüşür ve böylece beyne besin geçişleri engellenir. Bundan dolayı serebral endotellerde enzimatik bir bariyer vardır. Bu enzimatik bariyer sayesinde besin ve ilaçlar metabolize edilirler. Kan ile taşınan maddeleri metabolize eden gama glutamil transpeptidaz, aromatik asit dekarboksilaz ve alkalen fosfataz gibi enzimler bulunmaktadır.¹⁸

Maddelerin KBB'nden geçişini ve beyne girişlerini etkileyen parametreler primer faktörler ve sekonder faktörler olmak üzere sınıflandırılabilirler.¹⁸

Maddelerin KBB'den geçişini ve beyne girişlerini etkileyen başlıca primer faktörler; maddenin moleküler ağırlığı, hücrenin enzimatik sabitliği, molekülün konformasyonel değişim kabiliyeti, hücresel sekresyon, hidrojen bağlama potansiyeli, akıma karşı afinite, taşıyıcılara karşı afinite ve mevcut patolojik durumların etkisidir.¹⁸

Maddelerin KBB'den geçişini ve beyne girişlerini etkileyen başlıca sekonder faktörler veya periferik faktörler ise sistemik enzimatik sabitlik, plazma protein bağlayıcıların afinitesi, serebral kan akımı ve mevcut patolojik durumların etkisidir.¹⁸

KBB'nde taşıma şekilleri; basit difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif taşıma, veziküler taşıma olarak sıralanabilir.¹⁸

İlaçların KBB'nden transport mekanizmaları aşağıdaki gibi tanımlanır;

- Paraselüler yol
- İlacın moleküler büyüklüğü ve lipofilikliğine dayalı ve konsantrasyon gradyanına bağlı olarak gerçekleşen pasif transport-transsellüler yol
- Aktif ve pasif prosesleri içeren glukoz, aminoasitler, nükleositler gibi maddelerin taşınmasında görülen taşıyıcı aracılı transport

- Ökaryotik hücrelerde makromoleküllerin seçici alımı için aktif transport prosesi olan, insülin ve albümin gibi endojen peptitlerin alımında görülen reseptör aracılı endositoz
- Pozitif yüklü nanomateryal ve beyin endotelindeki negatif yüklü bölgeler arasındaki elektrostatik etkileşmelerden kaynaklanan adsorptivite aracılı transport¹

KBB'nin aşılması için kullanılan yaklaşımlar arasında polimerik nanopartiküllerin kullanılması AH tedavisi için geliştirilen modern farmasötik yöntemlerin başında gelmektedir.³

KBB fizyolojik ortamlarda nöronların homeostazisini sağlamaktadır. KBB, yapısal ve metabolik bir bariyer görevi görmek suretiyle beyni kanda oluşabilen değişimlerden korumak, seçici taşıma, kan ve beyinde bulunan maddelerin metabolizma ve modifikasyonu ile nöronlar için optimum ortamı sağlamaktadır.¹⁸

KBB'ndeki spesifik değişiklikler TJ'ların açılması, pinositik aktivite artışı, membranın stabilitesinde azalma, hastalık veya toksinlerin neden olduğu besin taşınımındaki değişiklikler, por oluşumu ilacın biyoyararlanımını azaltabilir veya arttırabilir.¹⁸

Intranazal uygulamanın avantajları taşıma için büyük bir yüzey alanı içermesi, hedef ilaç seviyelerine hızlı ulaşım, kan beyin bariyerini atlaması, ilk geçiş metabolizmasından kaçınması, invazif değildir, hasta konforu ve uyumunu en yükseğe çıkartır. Ek olarak intranazal ilaç uygulaması merkezi sinir sistemi ilaçlarının beyne iletilmesini kolaylaştırmaktadır.¹³

Özetle, nanopartiküller normalde kan beyin bariyerini geçemeyen ilaçların beyne hedeflendirilmesinde büyük potansiyele sahip olduğu için önemlidir.³

1.8. Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler

Nanoteknoloji küçük olanın -çok küçük olanın, bilimidir. Maddenin çok küçük bir ölçekte kullanımı ve manipülasyonudur. Bu ölçülerde atomlar ve moleküller farklı çalışırlar ve geniş bir alanda ilginç kullanım olanakları sağlarlar.²⁰

Nanoteknoloji malzemelerin atomik, moleküler ve makromoleküler ölçekte yeni nanoboyutlu mazlemeler oluşturmak üzere dizayn, üretim ve uygulamasını temsil eder.²⁰

Nanomalzemeler tıp, elektronik ve farmasötik alanlarında geniş uygulamalara sahiptir.²¹

Son yıllarda, nanopartiküller kullanılarak geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin oluşturulması konusuna artan bir ilgi söz konusudur. Nanopartiküller geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler ile kıyaslandığında yüksek stabilite, yüksek spesifiklik, yüksek ilaç taşıma kapasitesi, kontrollü salım yeteneği, farklı rotalarda kullanım olasılığı ve hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların taşınabilmesi gibi belirgin avantajlara sahiptirler.²⁰

Terapötik uygulamalarda kullanılan nanomalzemeler biyouyumlu, biyobozunur, ucuz olmalı ve ilaç yüklenmesi açısından etkili olmak zorundadır.²¹

Polimerik nanopartiküllerin sentezinin geliştirilmesi gen, protein ve ilaç taşınımı alanında belki de en başarılı gelişimlerden biridir.²¹

Polimerik nanopartiküller enkapsülasyon ve ilaç ve gen taşınımında görece daha iyi oldukları için mikro partiküllerin yerini almışlardır.²¹

Nano ön eki antik Yunan'da cüce anlamında kullanılan, en geniş anlamıyla da çok küçük anlamına gelen bir kelimedir. Uluslararası Birimler Sistemi'nde (SI) 10^9 kez küçültmek anlamında kullanılır. Dolayısıyla, nanoboyutlu evren tipik olarak nanometre ile ölçülmektedir ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ' ye tekabül etmektedir) ve ölçüleri moleküler boyutun üstünü ve makroskopik boyutun altını (genellikle $>1 \text{ nm}$ ve $<100 \text{ nm}$) kapsar.²⁰

Tüm bunların yanında son derece küçük boyutları ve büyük yüzey alanları sayesinde polimerik nanopartiküller dozaj formlarının yeni fonksiyonlarını sağlamaktadır.²²

1.9. Nanopartikül Çeşitleri

Hazırlama prosesine bağlı olarak 2 tip nanopartikül vardır: Nanoküreler ve nanokapsüller. (Nanopartikül terimi her iki yapıyı da kapsamaktadır.)²⁰

Nanoküreler ilaçların yüzeye dağıldığı ya da adsorbe edildiği ya da partikül içine enkapsüle edildiği monolitik tipte yapıya sahiptirler.⁴

1.9.1. Polimerik Nanopartiküller

1.9.1.1. Doğal Polimerler

Nanopartikül hazırlanmasında en çok kullanılan doğal polimerler kitosan, jelatin, sodyum aljinat ve albumindir.²³

1.9.1.2. Sentetik Polimerler

Nanopartikül hazırlanmasında en çok kullanılan sentetik polimerler polilaktidler (PLA), poliglikolikler (PGA), poli(laktik ko-glikolikler) (PLGA), polianhidridler, poliortoesterler, polisiyanoakrilatlar, polikaprolaktonlar, poliglutamik asit, polimalik asit, poli (N-vinil piroolidon), poli (metil metakrilat), poli (vinil alkol), poli (akrilik asit), poliakrilamit, poli (etilen glikol), poli (metakrilik asit) 'dir.²³

PLA-poli laktik asit, PLGA-poli (D, laktik-ko-glikolik) asit ve PCL-polikaprolakton gibi FDA onaylı biyobozunur polimerler biyouyumlu ve biyobozunur olmaları nedeniyle ilaç taşınımında en sık kullanılan polimerik nanopartiküllerdir.^{24,25}

Sentetik polimerlerin doğal polimerler ile kıyaslandığında yüksek saflıkta olma ve tekrar üretilebilir olma gibi avantajları vardır.²⁵

Biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerden elde edilen nanopartiküler sistemlerin kontrollü ilaç taşınımı ve ilaç hedeflendirmesi konularında ilginç seçenekleri vardır.⁴

Polimerik nanopartiküller çapları 1-1000 nm aralığında değişen katı kolloid parçacıklardır.⁴ İlaç nanopartikül matrisine çözünmüş, tutunmuş, enkapsüle edilmiş ya da tutturulmuş olabilir.²³ Partikül boyutları ve kandaki uzun sirkülasyonlarından dolayı özellikle ilaç taşınması ve ilaç hedeflendirilmesi konularında araştırılmaktadırlar.⁴

1-100 nm boyutundaki nanomateryaller fizikokimyasal özellikleri ve fonksiyonelleştirmeye olanak sağlamaları sayesinde KBB'ni geçme ve bu sorunun çözümü için potansiyel bir biyomedikal araç oluşturur.¹

İlaçların polimerik nanotaşıyıcılar ile taşınmalarının ters reaksiyonların ve yan etkilerin önüne geçtiği düşünülmektedir.²⁶

Polimerik nanopartiküller nanometrik boyutlarıyla ilaçları in vitro ve in vivo bozunmadan korurlar, ilacı kontrollü bir şekilde salabilirler ve ilaç hedeflendirme olasılığı sunarlar.⁴

Polimerik nanopartiküller yüzeylere adsorbe edilmiş veya bağlanmış, katı veya çözelti halinde yüklenmiş ilaçları içeren kolloidal taşıyıcılardır. Bu ilaç taşıyıcı sistemler fizikokimyasal stabilite, biyouyumluluk, biyoparçalanabilirlik, düşük toksisite, düşük immunojenik cevap, uzatılmış ilaç salımı ve üretim kolaylığı gibi çeşitli avantajlar ortaya koymaktadır. Ancak etkili bir hücre tutulumu elde etmek için nanopartikül boyutu 100-200 nm'nin üzerinde olmamalıdır.¹ Bazı araştırmacılar katı kolloidal partiküllerin nanopartikül olarak adlandırılabilmesi için 10-1000 nm boyutlarında olmalarının yeterli olduğunu düşünmelerine rağmen, bazı araştırmacılar ise nanofaz ve nanoyapılar gibi terimleri kullanarak 100 nm'den küçük çapa sahip partikülleri kastetmektedirler.²⁶ Nanopartiküller, küçük boyutlarından dolayı hedef hücrede etkin ilaç birikimine izin verecek şekilde küçük kapilerlere bile penetre olabilirler ve hücre içine alınabilirler.³

İlaç taşınmasında nanopartiküllerin kullanılmasının avantajları şöyle sıralanabilir:⁴

- Taşınma boyunca ve belirlenen bölgede ilacın kontrollü ve geciktirilmiş salımının sağlanabilmesi, ilacın organlara dağılımının değiştirilebilmesi, ilacın terapötik etkinliğinin artırılması ve yan etkilerinin azaltılması.
- Toksisitenin ve ters ilaç reaksiyonlarının azaltılması.
- Daha iyi ilaç kullanımı.
- Bölgeye özgü hedeflendirme.
- Sistemin oral, nazal, parenteral, intra- oküler gibi farklı yollarla uygulanabilir olması.⁴

Tüm bu avantajlarının yanında nanopartiküllerin küçük boyutlarından ve geniş yüzey alanlarından kaynaklanan bir takım sınırlamalar mevcuttur: Partikül-partikül agregasyonu nanopartiküllerin sıvı ve kuru formda saklanma ve taşınmalarını zorlaştırmaktadır.⁴

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için koaservasyon, nanopresipitasyon, emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi, emülsiyon- çözücü difüzyon yöntemi, iyonotropik jelasyon, süperkritik sıvı teknolojisi ve monomer polimerizasyonu gibi farklı yöntemler tanımlanmıştır.¹

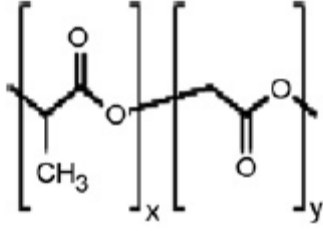
Polimerik hidrofilik nanopartiküller hedef spesifik hücrelerde, dokularda ve çekirdeklerde ilaç taşıyıcı olarak kullanım potansiyelinden dolayı dikkat çekmektedir.²⁶

1.10. PLGA Polimeri

Polimerik taşıyıcılar seçilirken göz önünde bulundurulması gereken karakteristik özellikler;²⁶

- polimer vücut ile uyumlu olmalıdır (toksik ya da antijenik olmamalıdır) , biyobozunur ve biyouyumlu olmalıdır.
- partiküller ilacı saklamalı ve korumalı ve aksiyon bölgesine gelmeden salmamalıdır.

- nanopartiküller vücut hücreleri ya da dokusuyla etkileşime girmemeli ve zarar vermemelidir.
- partiküller aksiyon bölgesini tanımalı ve aksiyon bölgesi ile etkileşime girebilmelidir.
- ilaç istenen terapötik etkiyi oluşturabilmek için süregelen bir şekilde salınmalıdır.
- ilaç salındıktan sonra partiküller bozunmalı veya vücuttan atılmalıdır.²⁶



Şekil- 5: PLGA'nin moleküler yapısı²⁷

Nanopartikül hazırlamakta kullanılan tüm malzemeler arasında PLGA biyobozunur, biyouyumlu ve çok yönlü bir bozunma kinetiğine sahip olduğu için kullanılır. Ek olarak, hem hidrofilik ilaçlar hem de lipofilik ilaçlar PLGA nanopartikülleri ile başarılı bir şekilde enkapsüle edilebilir.³

PLGA, klinik uygulamalar ve terapötik kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. PLGA, monomerik birimlerin (glikolik ya da laktik asit) polimerizasyon sırasında birbirlerine ester bağlarıyla başarılı bir şekilde bağlanmasıyla oluşan amorf lineer polyester ürünüdür. Bu polimer asidik ortama maruz kaldığında kontrollü bir şekilde erozyona ve bozunmaya uğrar. Ek olarak PLGA, boyut, boyut dağılımı, morfoloji, yüzey modifikasyonu ve zeta potansiyeli gibi fiziksel özellikleri kolaylıkla kontrol edilebilir olduğu için tek çözelti emülsiyon metodu ile yüksek verimle nanopartikül oluşturmak için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.²¹

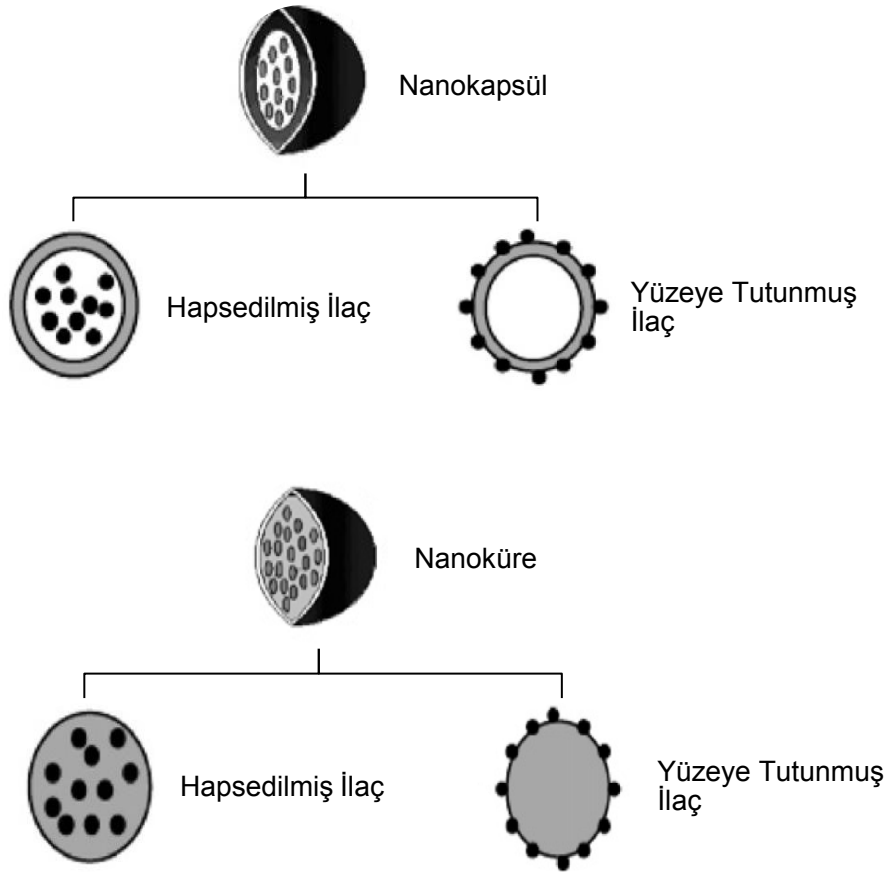
PLGA nanopartiküllerinin boyutu, partikül boyutu dağılımı diğer fiziksel karakteristiklerinin yanında nanopartikülü hazırlamak için kullanılan yöntemden ve

PLGA moleküler ağırlığı, aktif maddenin eklenmesi, yüzey aktif madde ve diğer katkı maddeleri gibi ilgili parametrelerden etkilenmektedir.²⁵

1.11. Nanokapsüller ve Nanoküreler

Nanopartikül, nanoküre ve nanokapsül isimlerini birlikte kapsayan bir terimdir.²⁰

Nanokapsüller ilacın ince bir polimer kavite tarafından sarıldığı sistemler olmakla birlikte, nanoküreler ilacın fiziksel ve homojen bir şekilde dağıldığı matrislerdir.²³



Şekil- 6: Nanokapsül ve nanoküre arasındaki fark²⁷

Nanoküreler, içinde ilacın homojen bir şekilde dağıldığı matris sistemler olmakla birlikte, nanokapsüller ise ilacın tek bir polimerik zarın etrafını sardığı sistemlerdir.²⁰

1.12. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküllerin sınıflandırılmasında kullanılan değişik yaklaşımlar mevcuttur. Nanopartiküller tek, iki ve üç boyutlu olmak üzere sınıflandırılabilirler.²⁰

1.12.1. Tek Boyutlu Nanopartiküller

İnce film ya da üretilmiş yüzeyler gibi tek boyutlu sistemler, on yıllardır elektronik, kimya ve mühendislik alanlarında kullanılmaktadır. Günümüzde güneş hücreleri ya da katalizör olarak geniş kullanım alanına sahiptir.²⁰

1.12.2. İki Boyutlu Nanopartiküller

Karbon nanotüpler iki boyutlu nanopartiküler sistemlerdir. Karbon atomlarının 1 nm çapında ve 100 nm uzunluğunda hegzagonal ağ diziliminde özel yapısıdır. Bu yapının mekanik gücü en iyi çelikten altı kat daha iyidir. Moleküler absorpsiyon ve üç boyutlu bir konfigürasyona olanak sağlaması sayesinde inanılmaz bir kapasitesi vardır. Ek olarak, kimyasal anlamda çok stabildirler.²⁰

1.12.3. Üç Boyutlu Nanopartiküller

Fullerenler (Karbon 60), dendrimerler ve kuantum noktalar olarak sınıflandırılabilirler.²⁰

1.13. İlaç Salım Mekanizmaları

Polimerik ilaç taşıyıcılar ilacı hedef dokuya aşağıda belirtilen üç genel fizikokimyasal mekanizmadan biri ile iletmektedir;²³

- 1) Polimerik nanopartiküllerin hidrasyon ile şişmesi sonucunda ilacın difüzyon ile salınımı
- 2) İlacın hapsedildiği iç çekirdekten kopma, bölünme ya da bozunma ile sonuçlanan bir enzimatik reaksiyon ile salınımı

3) İlacın polimerden ayrılması ve şişen nanopartiküllere de-adsorpsiyonu ve salınımı²³

1.14. Nanopartikül Hazırlanması

PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması için kullanılan metotlar 2 sınıfa ayrılabilir: Aşağıdan yukarı ve yukarıdan aşağı teknikler. Emülsiyon ya da mikroemülsiyon polimerizasyonu, arayüz polimerizasyonu, çöktürme polimerizasyonu gibi aşağıdan yukarı teknikler başlangıç noktası olarak bir monomeri temel alırlar. Çözücü buharlaştırma, emülsiyon difüzyon, çözücü yer değiştirme ve tuzaklama gibi yukarıdan aşağı metotlarda ise nanopartiküller mevcut polimerlerden sentezlenirler.²⁵

1.14.1. Polimerin Dağıtılması ile Nanopartikül Hazırlama Metotları

İlacı polimerde dağıtarak uygulanan nanopartikül hazırlama metotları biyobozunur nanopartikül hazırlamada çok yaygın olarak kullanılan metotlardır.²³

Bunlar;

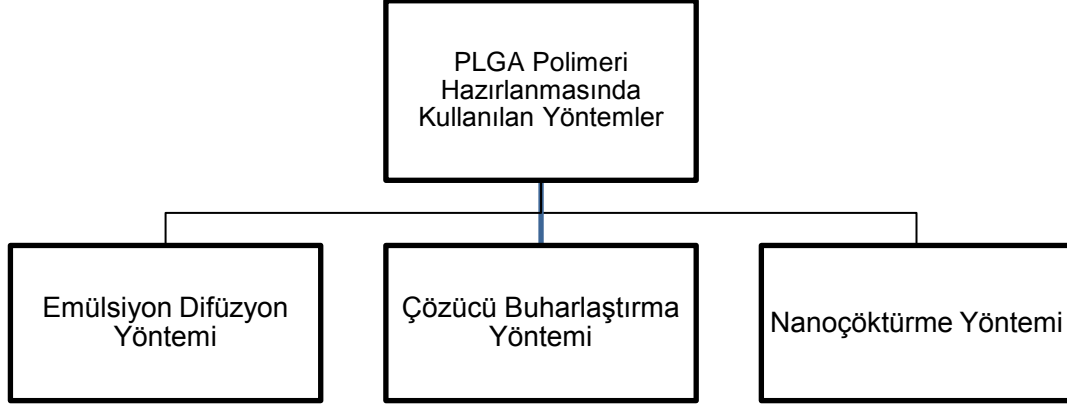
- Çözücü buharlaştırma,
- Nanoçöktürme,
- Emülsifikasyon/çözücü difüzyonu
- Tuzaklama
- Diyaliz
- Süperkritik sıvı teknolojisi²³

1.14.2. Monomerin Polimerleştirilmesi ile Nanopartikül Hazırlama Metotları

- Emülsiyon
- Miniemülsiyon
- Mikroemülsiyon
- Arayüz polimerizasyonu
- Kontrollü radikal polimerizasyonu²³

Nanopartikül hazırlamak için en uygun metodun seçimi polimerin ve yüklenecek ilacın fizikokimyasal karakterine bağlıdır.²⁰

1.14.3. PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanmasında Kullanılan Farklı Metotlar



Şekil- 7: PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan farklı metotlar²⁷

1.14.3.1 Çözücü Buharlaştırma Metodu

Çözücü buharlaştırma yöntemi polimerik nanopartikül üretilmesi amacıyla kullanılan en eski metottur.^{23,25}

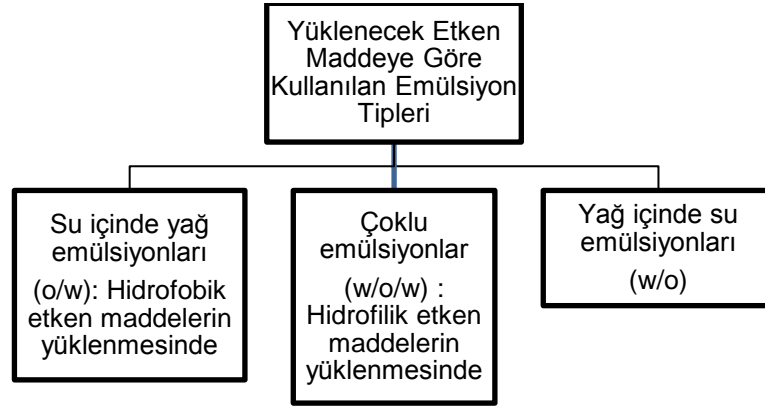
Nanopartikül hazırlamada kullanılan değişik yöntemler arasında en bilinen ve en sık kullanılanlardan biri çözücü buharlaştırma tekniğidir.^{28,20} Bu metot hem kolay olması, hem de bir çok lipofilik ilaç için etkili bir enkapsülasyon ile sonuçlanması nedeniyle çok tercih edilir.²⁸

Metodun temeli polimerin organik çözeltilisinin sulu bir fazda emülsifikasyonuna ve devamında organik fazın buharlaştırılmasına dayanmaktadır.²⁵

Çözücü buharlaştırma metodu 2 ana basamaktan oluşmaktadır.²⁰

1.basamakta; polimer uygun bir çözücüde (etil asetat, kloroform, metil klorür gibi) çözülür. Organik faz surfaktanın içinde çözülmüş olduğu sürekli fazın (sulu) üstüne eklenir.²⁵ Polimer çözeltilisi sulu fazın içinde emülsifiye edilir.²⁰ Emülsifikasyon işlemi emülsiyon damlacıklarının boyutlarının küçültülmesi için

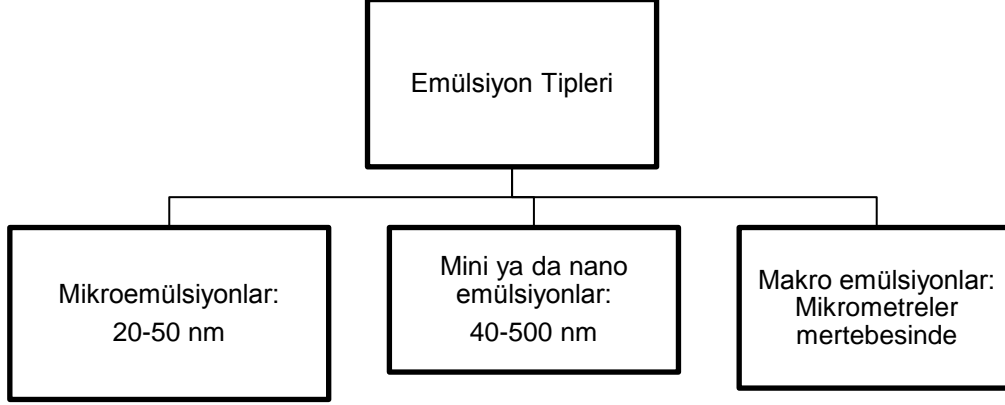
yüksek kesme gerilmesi altında yapılır (bu doğrudan nanopartiküllerin boyutlarına etki eden bir basamaktır) .²⁵ İkinci basamak; boyunca polimer nanoküreler halinde çöküp nanopartikülleri oluştururken, polimer çözücüsü buharlaştırılır.^{20, 25} Nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanır ve stabilizatör kalıntısının ve serbest ilaç moleküllerinin uzaklaştırılması için distile suyla yıkanır.²⁰ Normal emülsiyonlar su içinde yağ (o/w) , yağ içinde su (w/o) ve çoklu emülsiyonlar (w/o/w) farklı özelliklerdeki etken maddelerin tuzaklanmasını sağlamak için kullanılabilir. Su içinde yağ emülsiyonları (o/w) hidrofobik malzemelerin yüklenmesinde, çoklu emülsiyonlar ise (w/o/w) hidrofilik etken malzemelerin yüklenmesinde kullanılır.²⁵



Şekil- 8: Çözücü buharlaştırma metodu ile farklı tipte etken maddelerin yüklenmesi için uygulanan emülsiyon tipleri²⁵

Bu metodun anahtar basamağı emülsiyon oluşturma aşamasıdır. Çünkü bu aşamada oluşan emülsiyon damlacıklarının boyutları final ürünün partikül boyutunu doğrudan etkilemektedir. Emülsiyonlar mikroemülsiyonlar, makroemülsiyonlar ve miniemülsiyonlar olarak sınıflandırılabilir. Mikroemülsiyonlar transparan ve termodinamik olarak stabil emülsiyonlardır (daha küçük boyuttaki damlacıkların entropik etkilerinden dolayı) , emülsiyon damlacıklarının ortalama partikül boyutu 20-50 nm aralığında değişmektedir. Mini ya da nanoemülsiyonların damlacıklarının boyutları 40-500 nm aralığında değişmektedir. Stabil emülsiyonlar elde edebilmek için yüksek kesme gerilmesi ve yeterli miktarda surfaktan eklenmelidir. Nanoemülsiyonlar kinetik olarak stabildir. Makroemülsiyon

damlacıklarının partikül boyutları mikrometreler mertebesindedir. Makroemülsiyonlar hafif karıştırarak elde edilirler ve stabilite için surfaktan eklemek gerekir. Uzun süreler için stabil değildir ve agrege olma eğilimi gösterirler.²⁵

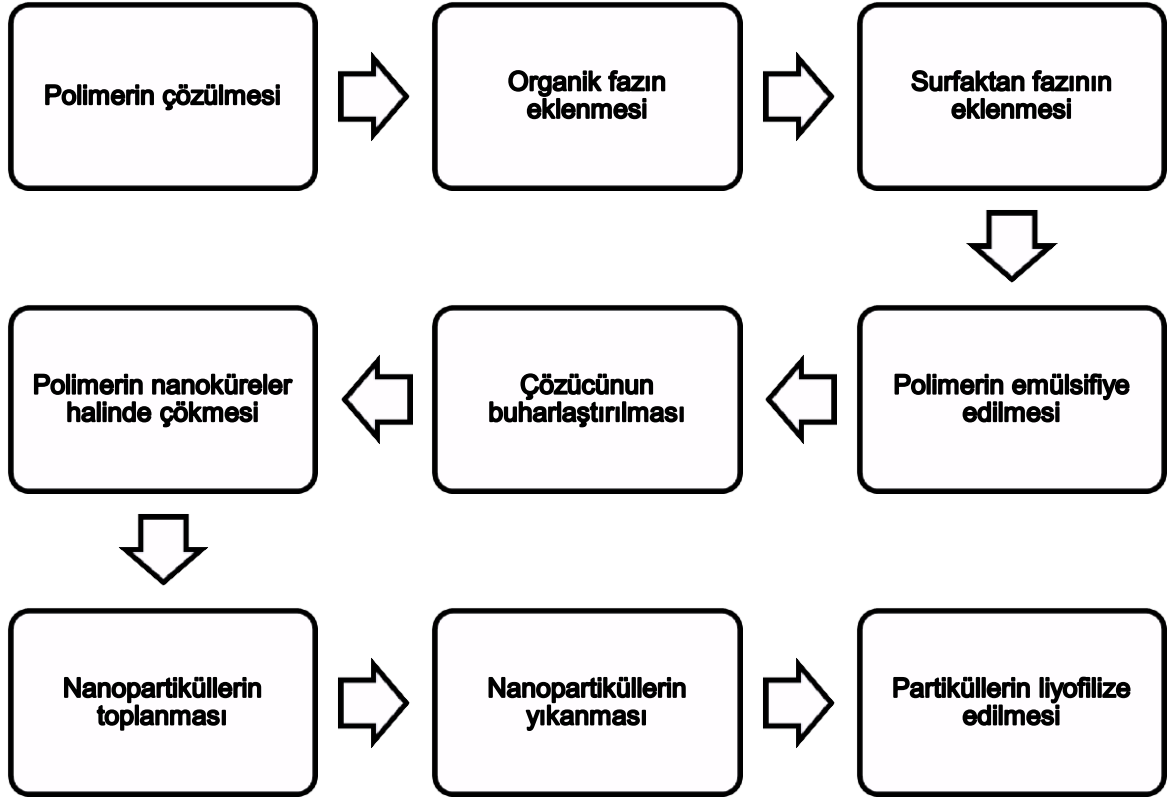


Şekil- 9: Boyutlarına göre çözücü buharlaştırma tekniğinde kullanılan emülsiyon tipleri²⁵

Landfester ve arkadaşlarının damlacık boyutuna sonikasyon etkisini görebilmek için gerçekleştirdikleri çalışmada ²⁹ stabil emülsiyon oluşturmak için dalgaboyu genliği % 20'den fazla ve 600-800 s sonikasyon olması gerektiğini göstermişlerdir. Sonikasyonun temel engeli oluşan emülsiyonda monodispersitenin olmamasıdır. Mason ve Bibette ^{30,31} sonikasyonun tersine laminar kesme hızı akışının monodispers damlacık ile sonuçlandığını göstermişlerdir.

Polimer çözeltileri uçucu solventlerde hazırlanır ve emülsiyonlar formüle edilir. Geçmişte çözücü olarak diklorometan ve kloroform sıkça kullanılırdı, günümüzde bu çözeltiler yerini toksikolojik profili daha iyi olduğu için etil asetata bırakmaktadır. Çözücü buharlaşırken emülsiyon da bir nanopartikül süspansiyonuna dönüşür. Geleneksel metotlarda emülsiyon oluşturmak için 2 ana strateji kullanılır: Tek-emülsiyon hazırlanması mesela, su içinde yağ (w/o) ya da çoklu emülsiyon mesela su içinde su içinde yağ (w/o)/w. Bu metotlar solvent buharlaşmasını takiben oda sıcaklığında ya da indirgenmiş basınç altında sürekli manyetik karıştırma, yüksek hızda homojenizasyon ya da ultrasonikasyon içerirler. Sonunda katılaştıran nanopartiküller ultrasantirifüjleme ve surfaktanlar gibi katkı malzemelerinin

uzaklaştırılması için distile su ile yıkama aşamasının akabinde toplanırlar ve liyofilize edilirler.²³



Şekil- 10: Çözücü buharlaştırma metodunun basamakları²⁷

Yapılan çalışmalarda çözücü buharlaştırma tekniği ile gerçekleştirilen nanopartikül üretimlerinde stabilize edici ajanın konsantrasyonu ve tipinin, homojenizatör hızının, dağıtıcı ajanın tipi ve miktarının, organik ve sulu fazın viskozitelerinin, sıcaklığın ve polimer konsantrasyonunun partikül büyüklüğünü etkilediği gösterilmiştir.^{32,20}

Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan stabilizasyon ajanının tipi ve oranı final ürünün partikül boyutu üzerinde çok etkilidir. PVA (poli vinilalkol) konsantrasyonu, nanopartiküllerin büyüklüğü ve zeta potansiyeli üzerine önemli ölçüde etkilidir.²⁴

Tuba Şengel Türk ve ark.²⁴ istenen özelliklere sahip nanopartiküllerin elde edilebilmesi için stabilizasyon ajanı seçiminin çok kritik bir parametre olduğunu göstermişlerdir.

Bhavna ve arkadaşları³ Donepezil yüklü PLGA nanopartiküllerini solvent emülsiyon difüzyon buharlaştırma tekniği ile hazırlamışlardır. Bunun için Donepezil ve PLGA 3-4 ml DCM ile çözülmüş, stabilize edici ajan olarak % 1 PVA içeren 10 ml sulu faz eklenmiş ve emülsiyon oluşturması için karıştırılmıştır.

100 nm çapından küçük, hidrofilik yüzeyli partiküllerin kanda daha uzun süre sirküle edildiği bulunmuştur. 100 nm çapından büyük partikül boyutları biyodağılımını kısıtlamakta, partiküllerin Kupffer hücreleri ya da diğer patolojik hücre popülasyonları tarafından yakalanmalarının artışına katkı sağlamaktadır.³

Tablo- 1: Çözücü buharlaştırma metodunun avantaj ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Çok yüksek toksisitede olmayan çözeltilerin kullanılması	Yüksek kesme hızı gereksiniminden dolayı yüksek enerji sarfiyatı
Katkı maddeleri ile partikül boyutunun küçültülebilmesi	
Hidrofilik (çoklu emülsiyon) ve hidrofobik etken maddeler için kullanılabilmesi	

Çözücü buharlaştırma ile uzaklaştırılır ancak uzaklaştırma için gereken zaman çok uzun değildir. Aktif bileşenin eklenmesi final nanopartikül boyutunu etkilemektedir.²⁵

1.14.3.1.1 Suda Yağ Emülsiyonu (Tek Emülsiyon)

Bu metot organik bir çözeltinin polimer ve etken madde içeren bir sulu fazda emülsiyonu temeline dayanır. Devam eden süreçte organik faz uçurulur. Sürfaktan olarak PVA, SDS, Pluronic F68 kullanılabilir. Emülsiyon damlacıklarının partikül boyutunun küçültülmesi için sonikasyon ya da mikrosivılaştırma teknikleri uygulanır. Buharlaştırma basamağı organik faz içinde bulunan organik çözücünün elimine edilmesi için gereklidir. Bu basamak sayesinde polimer nanometre boyutunda yarıçapı olan nanopartiküller halinde çöker. Bu yöntem için önemli olan parametreler: Polimerin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu, ko-polimer oranı ve uç gruplar, surfaktanın doğası, faz oranı, çözücü doğası, buharlaştırma hızı, ilaç yüklenmesi, katkılar, kesme hızı ve sterilizasyon olarak sayılabilir.²⁵

Polimer konsantrasyonu nanopartikül oluşumunda önemli bir parametredir. Julienne ve arkadaşları farklı oranlarda PLGA konsantrasyonu ile çalıştıklarında ortalama partikül boyutunun değiştiğini görmüşlerdir.³³

Polimer moleküler ağırlığı arttıkça oluşan nanokürelerin boyutları büyümektedir. Ancak aktif madde yüklenmesi bu etkiyi azaltmaktadır.²⁵

Farklı ko- polimer oranlarının ortalama partikül boyutuna çok büyük etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Ancak farklı uç gruplar partikül boyutuna etki etmektedir. Ester uç gruplarıyla hazırlanan numuneler için ortalama partikül boyutunun asit uç gruplu nanopartiküllere oranla çok daha büyük olduğu tespit edilmiştir.²⁵

Surfaktan tipi küçük ve stabil nanopartikül eldesinde çok kritik bir parametredir. Nanoküre oluşturmak için çok farklı surfaktanlar kullanılabilir.²⁵ PVA için farklı konsantrasyonların partikül boyutuna etkisi ölçülmüş olmakla birlikte konsantrasyon arttıkça partikül boyutunda azalma gözlemlenmiştir.³³

Nanokürelerin partikül boyutunu belirlemede organik faz-sulu faz oranı da önemli bir etkindir. Genellikle organik-sulu faz oranı küçüldükçe nanopartikül boyutu da küçülmektedir.²⁵

PLGA nanopartiküllerinin oluşturulmasında farklı çözücüler kullanılabilir. Çözücü seçiminde 2 temel kriter vardır: Birincisi PLGA seçilen çözücüde çözünmelidir, ikincisi ise çözücü sulu fazda tamamen karıştırılmaz olmalıdır.²⁵

Organik fazın vakum altında uzaklaştırılması daha küçük boyutta nanopartikül elde etmek açısından daha etkindir.²⁵

Çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlanan PLGA nanopartikülleri için yüklenen ilacın hidrofobik özelliği arttıkça nanopartikül boyutunun azalma eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir.²⁵ Mu ve Feng surfaktan olarak TPGS vitamin E kullandıkları çalışmada elde ettikleri ortalama partikül boyutu etken madde yüklemeyen elde ettikleri partikül boyutundan çok daha küçüktür.³⁴

Etken maddenin sudaki çözünürlüğü nanopartikül boyutunu ve ilaç yüklenme oranını etkileyen temel parametrelerden biridir.²⁵ Song ve arkadaşları PLGA nanopartiküllerine anti-proliferatif ajan yüklerken genel olarak çözelti pH değeri arttıkça elde edilen partikül boyutunun küçüldüğü ve yükleme etkinliğinin de arttığını göstermişlerdir.³⁵

Damlacık boyutlarını küçültmek için kuvvetli ajitasyon gerekmektedir. Bu nanopartikül boyutuna yüksek oranda etkisi olan bir parametredir.²⁵

1.14.3.1.2 Çoklu Emülsiyon (w/o/w)

Çoklu emülsiyon metodunun ilk basamağı yağ içinde su emülsiyonunun oluşumudur (w/o) . Burada sulu çözelti hidrofilik etken madde içerir ve organik faz PLGA ve uygun bir surfaktan içerir. Miniemülsiyon kuvvetli kesme (sonikasyon, mikrosivileştirme, yüksek hızlı homojenizasyon gibi) hızı altında oluşmaktadır. Sonra, damlacık boyutunu küçültmek için sonikasyon yada homojenizasyon ile su içinde-yağ içinde-su emülsiyonu oluşur. Bu ikinci homojenizasyon aşaması etken

maddenin dış sulu faza difüzyonunu minimize etmek için kontrol edilmelidir. Son basamak olan buharlaştırma organik çözücünün uzaklaştırılması için gerçekleştirilmektedir. Polimer ve aktif maddenin zarar görmesini önlemek ve son nanopartikül boyutunun küçültülmesinin desteklemek için buharlaştırma vakum altında yapılır. Önemli parametreler: polimer/surfaktan oranı, polimer konsantrasyonu, surfaktan yapısı, viskozite, solvent tipi, kesme hızı, buharlaşma, katkılar ve ilk faz/ ikinci faz oranıdır.²⁵

Polimerin moleküler ağırlığı ve ko- polimer oranı nanoküre boyutunu küçültmede etkili olan bir parametredir. PLGA/ko-polimer oranı ortalama partikül boyutunu etkilemektedir.²⁵

Hidrofilik ilaçların enkapsülasyonu yüksek moleküler ağırlıklı PLGA kullanılması ve yüksek moleküler ağırlıklı surfaktan kullanılması ile geliştirilebilir.^{25, 32}

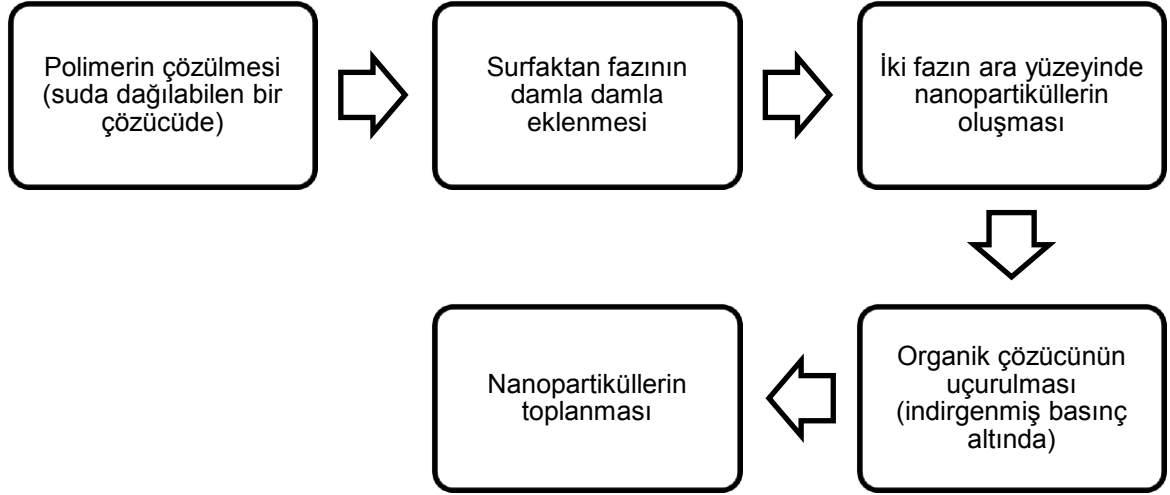
Çoklu emülsiyon metodunda damlacık boyutunu küçültmek için uygulanan en temel stratejilerden biri yüksek kesme hızının kullanılmasıdır.^{25,36}

1.14.3.2 Nanoçöktürme (Çözücü Difüzyonu yada Çözücü Yer Değiştirme) Metodu

Çözücü yer değiştirme metodu olarak da bilinir. Surfaktan varlığında ya da yokluğunda polimerin organik bir çözeltiden çöktürülmesi ve organik çözücünün sulu faza difüzyonu aşamalarını içeren bir tekniktir. Polimer genellikle PLA (Polikaltik asit) 'dir. Polimer nanokürelerin oluşmasında olanak sağlayacak şekilde orta polaritede, suda karışabilir bir çözeltide çözünür. Bu faz karışmakta olan ve stabilize edici ajan olarak surfaktan içeren sulu çözeltiliye enjekte edilir. Su ve organik faz arasındaki yüzeye temas eden polimerin bozunması koloidal süspansiyonun ani bir şekilde oluşmasına neden olur.²³

Bu metot genellikle hidrofobik ilaçların yüklenmesinde kullanılır. Polimer ve ilaç aseton, etanol ya da metanol gibi polar ve suda çözünen bir çözücüde çözünür. Hazırlanan çözelti surfaktan içeren sulu fazın üstüne damla damla eklenir. Nanopartiküller hızlı bir çözücü difüzyonuyla ani bir şekilde oluşur. Son aşamada

çözücü indirgenmiş basınç altında uzaklaştırılır. Bu yöntem için önem teşkil eden parametreler: polimer/surfaktan oranı, polimer konsantrasyonu, surfaktan tipi ve konsantrasyonu, çözücü tipi, viskozite, kaktılar, aktif madde ve faz enjeksiyonudur.²⁵



Şekil- 11: Nanoçöktürme metodunun basamakları²⁷

Bu metot kullanılarak hazırlanan nanopartiküller için polimer konsantrasyonundaki artış ile partikül boyutunda da artma oluşmaktadır. Polimerin molekül ağırlığı arttıkça partikül boyutu artmaktadır. Seçilen çözücüler ve kullanım oranları partikül boyutunu ve zeta potansiyelini etkilemektedir. Seçilen surfaktan tipi ve kullanım oranı partikül boyutunu etkilemektedir. Aktif bileşen yüklenmesinin bu metot ile hazırlanan nanopartiküllerin final boyutlarına önemli bir etkisi vardır. Örneğin, bu yöntem ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerine prokain HCl yüklenmesi partikül boyutunu arttırmaktadır.²⁵

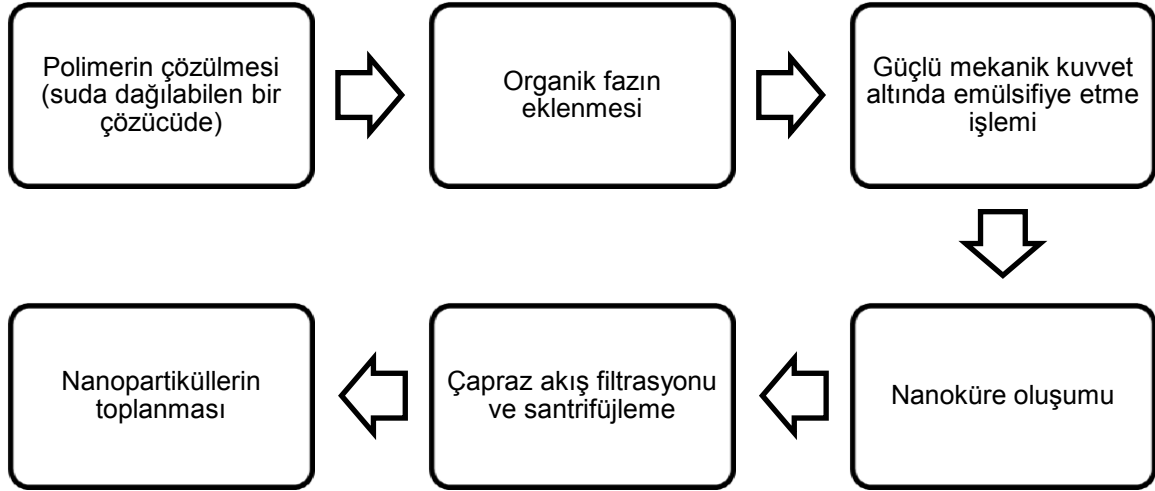
Tablo- 2: Nanoçöktürme metodunun avantaj ve dezavantajları²⁵

Avantajlar	Dezavantajlar
Çok yüksek toksik etkisi olmayan çözücülerin kullanılması	Çözücü buharlaştırma ile uzaklaştırıldığı için zaman alan bir metottur
Düşük enerji gereksinimi	Yüklenecek ilaçların polar çözücülerde iyi çözünebilir olması gerekmektedir
Katkı maddeleri kullanılarak partikül boyutunun düşürülebilmesi	İlaç yüklenme oranı hidrofilik ilaçlarda daha düşüktür
	Partikül boyutu çok polimer konsantrasyonundan fazla etkilenmektedir

1.14.3.3 Tuzaklama (Salting Out) Metodu

Bu teknikte polimer aseton ya da tetrahidrofuran gibi suda çözünebilir bir organik çözücüde çözülür. Organik faz güçlü mekanik kuvvet altında sulu fazda emülsifiye edilir. Sulu faz emülsifiye edici ajan ve yüksek konsantrasyonda organik fazda çözünmeyen tuz içerir. Tipik olarak kullanılan tuzlar polimer- tuz oranı 1:3 olacak şekilde ağırlıkça % 60 oranında magnezyum klorür hegzahidrat veya magnezyum asetat tetrahidrattır. Emülsiyon difüzyon metodunun tersine, tuzun varlığından kaynaklı çözücünün difüzyonu gibi bir durum söz konusu değildir. Saf suyun hafif karışan yağ su (o/w) emülsiyonuna hızlı bir şekilde eklenmesi iyonik gücü zayıflatır ve suda çözünebilir organik çözücünün göçüne imkan tanır bu durum da nanoküre oluşumunu uyarır. Son basamak çapraz- akış filtrasyonu ve santrifüjleme yöntemleri ile tuzaklama ajanının uzaklaştırılması için gerçekleştirilen saflaştırma adımlarıdır. En yaygın tuzaklama ajanları sodyum klorür, magnezyum asetat, magnezyum klorür gibi elektrolitler ya da sükröz gibi elektrolit olmayanlardır. Bu

metot için önemli olan parametreler: polimer konsantrasyonu ve moleküler kütle, karıştırma hızı ve süresi, surfaktan ve çözücünün doğası ve konsantrasyonu, kriyoprotektandır.²⁵



Şekil- 12: Tuzaklama (Salting Out) metodunun basamakları²⁵

Bu yöntem ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutları belli bir konsantrasyona kadar polimer oranından etkilenmemekle birlikte, belli bir konsantrasyonu geçtikten sonra polimer miktarının artmasıyla partikül boyutu da artmaktadır. PLGA'nin moleküler ağırlığı nanopartikül boyutunu etkilemektedir. Genellikle PLGA moleküler ağırlığı arttıkça nanopartikül boyutu artmaktadır. Bu yöntem ile hazırlanan nanopartiküllerin çözücü tipi de partikül boyutunu etkilemektedir. Çözücü olarak asetonun kullanıldığı sistemlerde tetrahidrofuran kullanılan sistemlere göre daha büyük partikül boyutları elde edilmiştir. Karıştırma hızı ve süresinin artması partikül boyutunu azaltmaktadır. Şekerlerden trehaloz, mannitol, glukoz, laktoz gibi üyeleri kriyoprotektan olarak kullanılmaktadır. Tüm kriyoprotektan partikül boyutunu az miktarda arttırmakla birlikte korumaktadır.²⁵

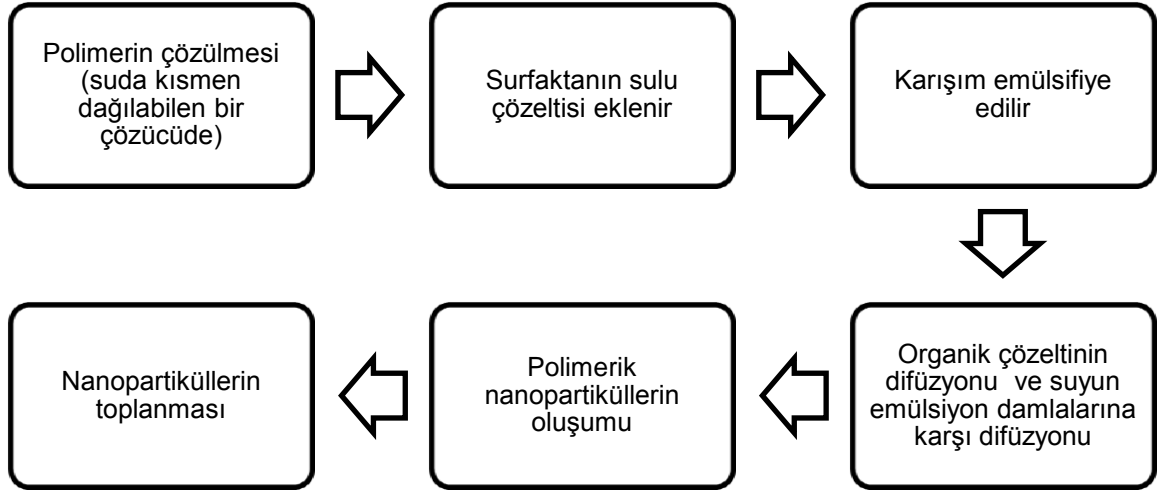
Tablo- 3: Tuzaklama (Salting Out) metodunun avantaj ve dezavantajları²⁵

Avantajlar	Dezavantajlar
Enerji gereksinimi düşüktür. Sadece normal karıştırma işlemi gerektirir.	Tuzaklama ajanının uzaklaştırılması için gerçekleştirilen saflaştırma basamağının olması
Az zaman gerektiren bir işlemdir.	

Tuzaklama ajanı suda çözünebilen bir madde olduğu için hidrofobik bileşenler için uygun bir yöntemdir. Kullanılan çözeltiler toksik değildir ancak patlayıcıdır. ²⁵

1.14.3.4 Emülsiyon Difüzyon Metodu

Bu metot ile polimer suda kısmen çözünen bir organik fazda (benzil alkol, propilen karbonat, etil asetat gibi) çözünür. Organik faz uygun bir surfaktanın (anyonik sodyum dodesil sulfat, non-iyonik PVA ya da katyonik di-dodesil dimetil amonyum bromit gibi) sulu çözeltisinde karıştırılarak emülsifiye edilir. Organik çözeltinin difüzyonu ve suyun emülsiyon damlalarına karşı difüzyonu polimer nanopartiküllerinin oluşmasına neden olur. ²⁵



Şekil- 13: Emülsiyon difüzyon metodunun basamakları ²⁷

Çözücü buharlaştırma senteziyle nanopartikül oluşumunu etkileyen önemli parametreler PLGA ko-polimer oranı, polimer konsantrasyonu, çözücü tipi, surfaktanın moleküler ağırlığı, viskozite, karıştırma hızı, sıcaklık ve eklenen suyun akışıdır. Laktik- glikolik oranının partikül boyutuna etkisi çok azdır. Polimer miktarının artması ortalama partikül boyutunu arttırmaktadır. Surfaktan tipine göre değişiyor olmakla birlikte surfaktan miktarının artmasının partikül boyutunu bir miktar azalttığı gözlemlenmiştir. Organik fazın sulu çözeltinin üzerine eklendiği durumlarda karıştırma ve çalkalama hızı partikül boyutunu etkilemektedir. Bu gibi durumlarda, karıştırma hızı ve çalkalama hızı arttıkça partikül boyutu belli bir noktaya kadar azalmaktadır ancak belli bir hızdan sonra azalma göstermemektedir. Çözücü difüzyonunu geliştirmek için eklenen suyun sıcaklığı arttıkça nanopartikül boyutu azalmaktadır. Liyofilizasyon aşamasında eklenen kriyoprotektan partikül boyutunu arttırmaktadır. ²⁵

Tablo- 4: Emülsiyon difüzyon metodunun avantaj ve dezavantajları²⁵

Avantajlar	Dezavantajlar
Düşük toksisiteli çözücülerle çalışılması	Nanopartikül oluşumu için yüksek miktarda suya ihtiyaç duyulması
Düşük enerji ihtiyacı (sadece karıştırmak yeterli)	Uzun süreler emülsiyonun çalkalanması
	Boyutların polimer derişiminden çok fazla etkilenmesi

Metot hidrofobik etken maddeler için uygundur. Hidrofilik etken maddeler bu metotla sulu faza göç etme eğiliminde olduklarından ilaç yüklenme etkinliği düşük olmaktadır.²⁵

1.15. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanopartiküller genelde partikül boyutu, morfoloji, yüzey yükü gibi özellikleri ile transmisyon elektron mikroskopu (TEM), taramalı elektron mikroskopu (SEM), atomik kuvvet mikroskopu (AFM) gibi mikroskopik teknikler ile karakterize edilirler.²⁰

1.15.1. Partikül boyutu

Partikül boyutu dağılımı ve morfoloji nanopartiküllerin karakterizasyonunda en önemli parametrelerdir. Partikül boyutunun ilaç salımını etkilediği bulunmuştur. Daha küçük partiküller daha büyük yüzey alanı sağlamaktadır. İlaçlar daha büyük partiküllere daha yavaş difüze olurlar. Ek olarak, çok küçük partiküller saklama koşullarında ve taşınma esnasında agregasyona ve dispersiyona meyillidirler. Yani küçük boyut ve maksimum stabilite arasında bir taviz vardır. Polimer bozunması

da partikül boyutunu etkileyebilir. Mesela, PLGA'nin bozunma hızının artan partikül boyutu ile birlikte arttığı tespit edilmiştir.²⁰

1.15.2. Zeta Potansiyeli

Nanopartiküllerin yüzey yükünün doğası ve yoğunluğu onların biyolojik ortamları ile etkileşimini ve biyoaktif bileşiklerle olan elektrostatik etkileşimini tanımladığı için çok önemlidir. Nanopartiküllerin koloidal stabilitesi zeta potansiyeli ile analiz edilir. Bu potansiyel yüzey yükünün dolaylı bir ölçüsüdür.²⁰

Zeta potansiyeli partiküllerin stabilitesini temsil eden ve saklama stabilitesi hakkında tahmin yürütmeye yarayan bir indekstir.^{3,20} Zeta potansiyeli partiküllerin yüklerinin bir ölçüsü olduğundan dolayı zeta potansiyelinin mutlak değeri ne kadar yüksekse yüzeydeki yük o kadar fazladır. Fiziksel olarak stabil bir nanosüspansiyon en az $\pm 30\text{mV}$ zeta potansiyeline sahip olmalıdır. Zeta potansiyelindeki yüksek negatif değerler partiküller arasındaki elektrostatik itmeyi belirttiğinden agregasyonu önler ve partikülleri stabilize eder.³

1.15.3. Kromatografik Yöntemler

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) sıvı kromatografisinin geliştirilmiş bir formudur. HPLC metotları bulk ilaç miktar tayini analizinde ilk kez 1980 yılında kullanıldı. HPLC metotlarının seçiciliği mükemmeldir ve kesinlikleri ulaşılabilir. Ancak analiz uygulanmadan önce kullanılan HPLC metodunun seçicilik, kesinlik ve doğruluk açısından uygun olduğunun kanıtlanması gerekir.

HPLC sistemlerinde en sık kullanılan detektörlerden biri UV (Ultraviyole) detektördür ve çok geniş bir dalga boyu aralığında çalışabilir.³⁷

1.15.4. Spektrometrik Yöntemler

Nanopartiküllerin spektrometrik analizleri için FTIR (Fourier Transform Infra Red) spektroskopisi seçilen polimer, ilaç ve nanopartiküllerin uyumluluğunun doğrulanması amacıyla kullanılır. İlaç, polimer ve ilaç yüklü nanopartiküller için fonksiyonel piklerin hiçbirinde majör bir kayma olmadığı doğrulanır.³⁸

1.15.5. Nanopartiküllere Yüklenen Etken Madde Miktarı

Nanopartiküllerin ilaç yüklenmesi genellikle polimer miktarına düşen ilaç oranı miktarıyla tanımlanır (sıklıkla mg polimer başına ilaç molü ya da mg ilaç miktarının mg polimer miktarına oranlanmasıyla) ; polimer içindeki yüzde oran olarak da verilebilir. Bunu analiz etmek için en sık kullanılan analitik yöntemler UV spektroskopisi ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi klasik analitik yöntemlerdir.²⁰ Literatürde Donepezil' in HPLC tayini ile ilgili bir çok metot vardır.

Keystone RP 25 cm x 4,6 mm, 5 µ analitik kolon ve metanol:0,02 M fosfat tamponu: trietilamin 60: 40: 0,5 (pH 7,5 ±0,1) oranında hareketli faz, akış hızı 1 ml/dk, kolon sıcaklığı 40°C ve UV dedeksiyonu 268 nm kullanılarak ayırım sağlanan analitik metotlar vardır. Bu metotta çözelti 0,45 µ'luk filtreden süzülür ve degaze edilir.¹⁶

İlaç ve bromocresol moru tampon çözeltisi içinde iyon çift kompleksi oluşturmaya dayanan, oluşan kompleksin kloroform ile ekstrakte edildiği ve 410 nm' de ölçülen metotlar vardır.¹⁵

RP C18 Kolon ile 268 nm dalga boyunda mobil faz olarak metanol, 0,02 M fosfat tamponu ve trietilaminin 50:50:0,5 oranında kullanıldığı metotlar mevcuttur.³⁹

Donepezil etken maddesinin USP (United States Pharmacopeia) metodunda ise tampon olarak sodyum 1- dekan sülfonatın sudaki 3,9 g/L konsantrasyonundaki çözeltisi kullanılır. Mobil faz olarak asetronitril ve tamponun sırasıyla 35:65 oranındaki karışımının pH 1,8'e sabitlenmiş hali kullanılır. Kromatografik koşullarda ise 271 nm dalgaboyunda ölçüm yapılır. Sabit faz olarak 4,6 mm x150 cm x5 µm boyutlarında L1 kolon kullanılmakla birlikte akış hızı 1,4 ml/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µl ve kolon sıcaklığı 35°C'dir.¹⁷

2.MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal ve Metot

2.1.1. Materyal

2.1.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Kimyasal Malzeme	Kaynak
Trietilamin	Sigma Aldrich, ABD
Asetik Asit	J.T.Baker
Metanol	Merck, Emsure, ABD
PLGA, Poli(D,L-laktid-co-glikolid) M_w 7,000-17,000	Sigma Aldrich, ABD
Diklorometan	Sigma Aldrich, ABD
Polivinil Alkol (PVA, MW 30000-70000)	S i g m a - A l d r i c h, ABD

2.1.1.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Firma
Saf su cihazı:Milli-Q	Millipore
Liyofilizatör	LABCONCO Freesone 4,5 plus
Sonik prop	Bandelin Sonopuls
Partikül Boyutu ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı	Malvern Instruments, Malvern Zetasizer, Nano-ZS, İngiltere
Santrifüj	Hettich Universal 320, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	Variomag Telesystem, ABD
Manyetik Karıştırıcı	IKA,RET Basic, Almanya
Hassas Terazî	Mettler Toledo, ABD
HPLC	Agilent 1200 series, ABD

2.2. Metot

2.2.1. Donepezil'in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini

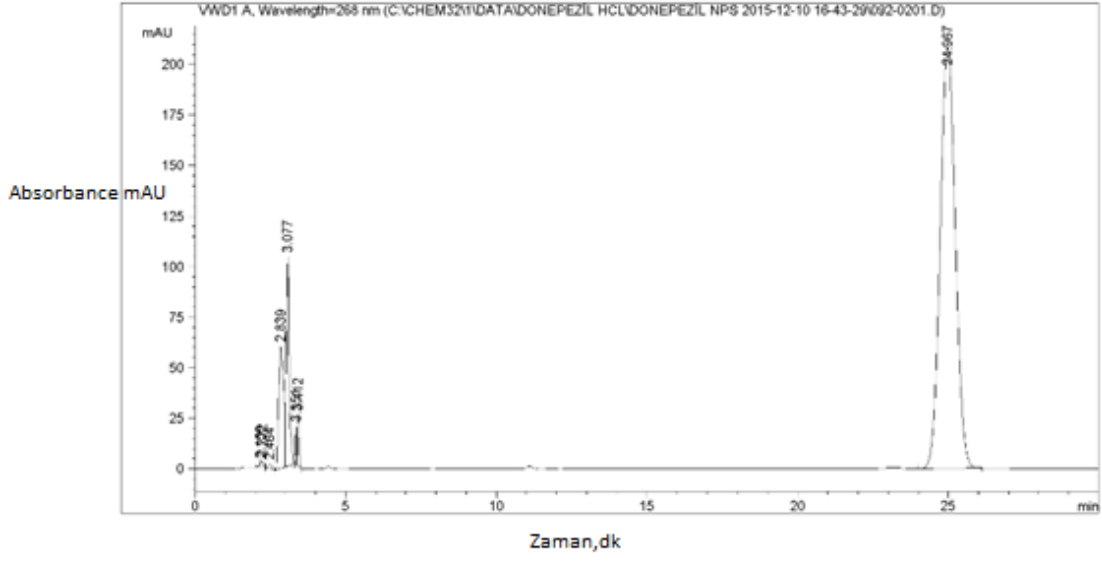
2.2.1.1. Donepezil'in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini için Kromatografik Koşulların Optimize Edilmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin içeriğindeki DNP miktarının UV-HPLC ile analizi için kullanılan analitik metot¹⁶ numaralı referansın içerdiği yöntemden yola çıkılarak geliştirilmiştir. Ancak tampon hazırlamak tuzu çözmek, pH ayarlaması yapmak, cihazı tıkamaması için tamponu süzmek gibi uzun süren ve zahmetli aşamalar gerektirdiği için mobil fazda tampon kullanılmaması seçilmiştir. Bu amaçla kullanılan ilk yöntemin ayrıntıları aşağıdaki gibidir:

Tablo- 5: DNP miktar tayini için kullanılan 1 numaralı HPLC metodu

Parametreler (1. Yöntem)	Koşullar
Enjeksiyon Hacmi	100 µl
Akış Hızı	1ml/ dk.
Enjeksiyon Süresi	30 dk.
Dalga Boyu	268 nm
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Mobil Faz A	1 ml suda 0,25 ml TEA (Trietilamin)
Mobil Faz B	Metanol
Mobil Faz Oranı	% 30:% 70 – Mobil Faz A: Mobil Faz B
Alıkonma Zamanı	~24 dk.
Kolon Tipi	ACE C18 250 cm x 4,6 mm x 5 µm

Bu yöntemin kullanılması ile elde edilen kromatogramlarda etken madde pikinin alıkonma zamanı yaklaşık 24 dk. olarak kaydedilmiştir. Alıkonma zamanı 24 dk. olan bir etken madde için enjeksiyon süresinin 30 dk. gibi bir zaman olacağı göz önünde bulundurulmalıdır.



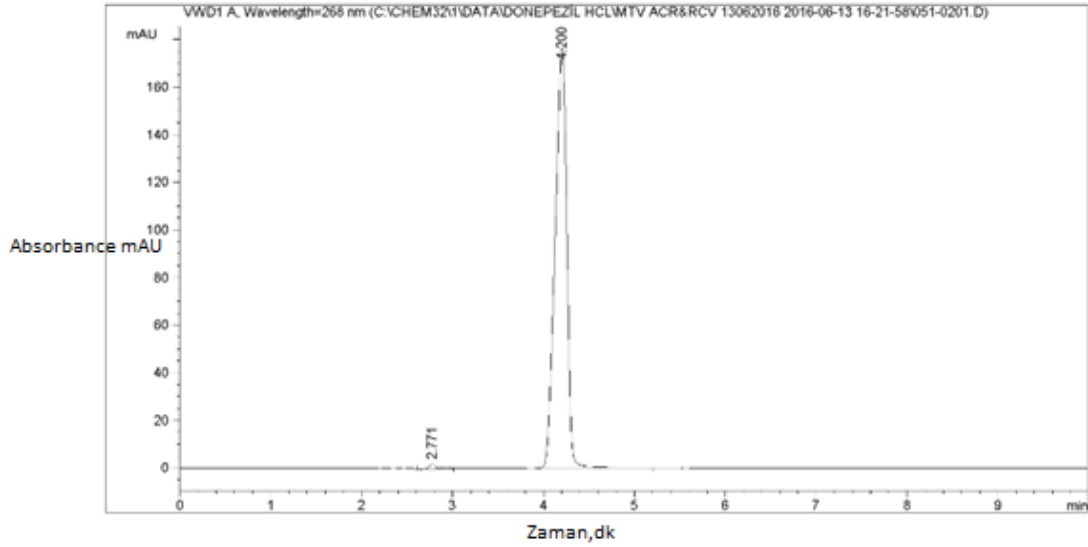
Şekil- 14: DNP miktar tayini için kullanılan 1 numaralı HPLC metodundan elde edilen kromatogram

Bu durumda harcanacak zaman, enerji kaybı ve mobil faz sarfiyatı göz önünde bulundurularak metotta revizyona gidilmiştir. Etken madde pikinin alıkonma zamanının kısaltılması için Mobil Faz A'ya 0,25 ml glasiyel asetik asit (GAA) eklenmiş ve TEA içeriği arttırılmıştır. Ek olarak, Mobil faz A-B oranı değiştirilmiştir. Kullanılan 2. metodun ayrıntıları aşağıdaki gibidir:

Tablo- 6: DNP miktar tayini için kullanılan 2 numaralı HPLC metodu

Parametreler (2. Yöntem)	Koşullar
Enjeksiyon Hacmi	50 µl
Akış Hızı	1ml/dk.
Enjeksiyon Süresi	10 dk.
Dalga Boyu	268 nm
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Mobil Faz A	1 L suda 0,25 ml GAA + 1ml TEA
Mobil Faz B	Metanol
Mobil Faz Oranı	% 50:% 50 – Mobil Faz A: Mobil Faz B
Alıkonma Zamanı	~4 dk.
Kolon Tipi	ACE C18 250 cm x 4,6 mm x 5 µm

Yapılan bu değişiklikler ile etken maddenin alıkonma zamanı 4 dk. gibi kısa bir süreye indirilmiştir. Bu sayede zaman ve enerji kaybı ile Mobil Faz sarfiyatından yüksek oranda azalma sağlanmıştır. Ayrıca enjeksiyon hacminin de yarıya indirilmesi ile etken madde pikinin teorik plaka sayısı artırılmış, kuyruklanma faktörü azaltılmıştır. Ek olarak, literatüre kısmen daha pratik bir analiz yöntemi kazandırılmıştır.



Şekil- 15: DNP miktar tayini için kullanılan 2 numaralı HPLC metodundan elde edilen kromatogram

Geliştirilen analitik metot seçicilik, doğrusallık, doğruluk ve geri kazanım ve kesinlik parametreleri açısından kontrol edilmiş ve uygun bulunmuştur.

2.2.1.2. Donepezil için Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi

DNP etken maddesinden uygun miktarda numune su ile çözülerek 1 mg/ ml konsantrasyonundaki DNP stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltisinden uygun oranlarda seyreltmeler yapılarak 7 farklı konsantrasyonda kalibrasyon numuneleri hazırlandı. (1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 3,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 6,0 µg/ml ve 7,0 µg/ml) . Hazırlanan her bir numune 2 defa enjekte edildi ve numunelerden elde edilen alanların ortalamaları alındı.

Hazırlanan her konsantrasyon değeri için elde edilen alanlar grafiğe geçirildi ve lineer regresyon analizi yapıldı. Lineer regresyon analizi grafiğinden elde edilen doğru denklemi gerçekleştirilen çalışmalarda DNP miktar tayinini belirlemek üzere kullanıldı.

2.2.1.3. Analitik Metod'un Valide Edilmesi

İlaç konsantrasyonunun ölçülmesi medikal ilaç geliştirmede önemli bir görüştür. Bu tarz veriler hem yeni aktif maddelerin uygulamalarını desteklemek hem de mevcut onaylı ürünlerin jenerik çalışmalarında gereklidir.⁴⁰ Analitik prosedür ilaç etken maddesinin ya da bitmiş ürünün belirlenen karakteristiğini test etmek için geliştirilir.⁴¹

Analitik metot validasyonu hem yeni metotlar için hem de literatürden temel alınan metotlar için uygulanmalıdır. Metot validasyonunun ana hedefi metodun güvenilirliğini kanıtlamaktır.⁴⁰

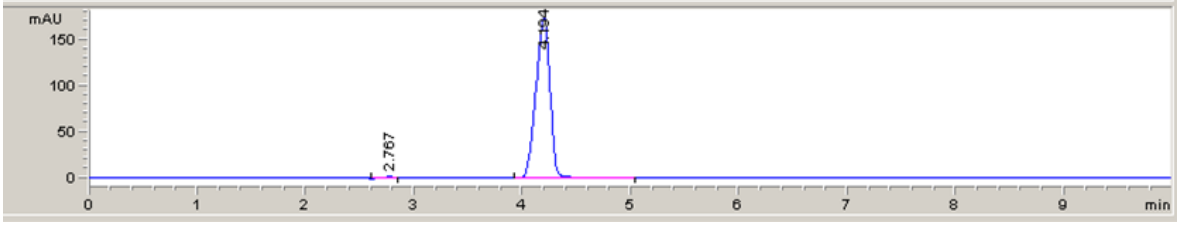
Metot geliştirirken kanıtlanması gereken parametreler seçicilik, doğrusallık ve aralık, bulma limiti, saptama limiti, doğruluk ve kesinliktir.⁴¹.

2.2.1.3.1. Özgüllük (Seçicilik) Parametresi

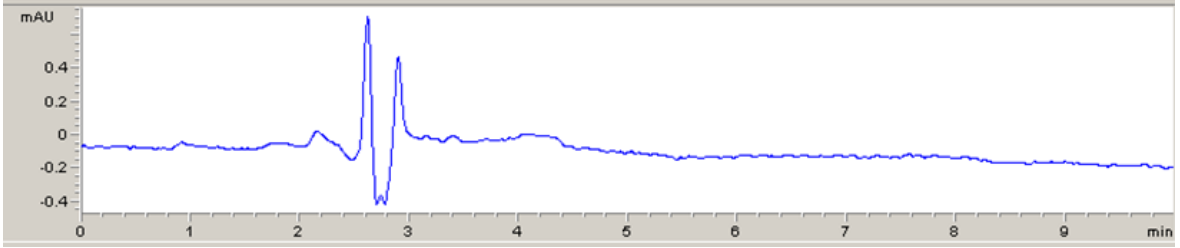
Analitik metot analitler ve matris içindeki endojen malzemeler ile numunedeki diğer örnekleri ayırabilmelidir. Normalde, etken madde piki ile çakışan bileşenler yoksa ya da cevap faktörü etken maddenin LOD (limit of detection) değerinin % 20'sinden küçükse metot seçici kabul edilir.⁴⁰

Seçicilik analitik metodun ortamda var olması beklenen diğer bileşenlerin varlığında analiti belirleme kabiliyetidir. Bu maddeler genellikle impüriteler, degradanlar ya da matrisin kendisinden gelen safsızlıklar olabilir.⁴²

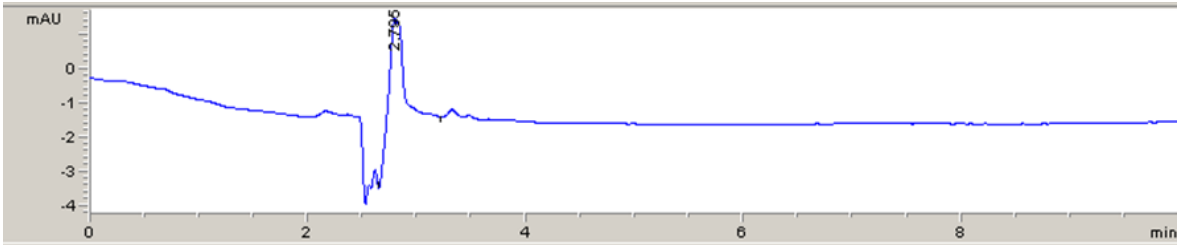
Kullanılan analitik metodun seçiciliğinin kanıtlanması için etken madde pikinin analize katılan diğer bileşenlerden gelen herhangi bir absorbans ile çakışmaması gerekmektedir. Bu nedenle, DNP çözeltisi, çözücü, PLGA çözeltisi, PLGA çözücüsü, mobil faz A, mobil faz B, pH 6,8 tamponu boş ve yüklenmiş NP çözeltisi numunelerinin her biri için analitik yöntem ile okumalar yapılmış ve etken madde ile aynı alıkonma zamanında absorbansları olup olmadığı kontrol edilmiştir. Kontrol sonucunda analitik yöntemin DNP etken maddesi için seçici olduğu kanıtlanmıştır.



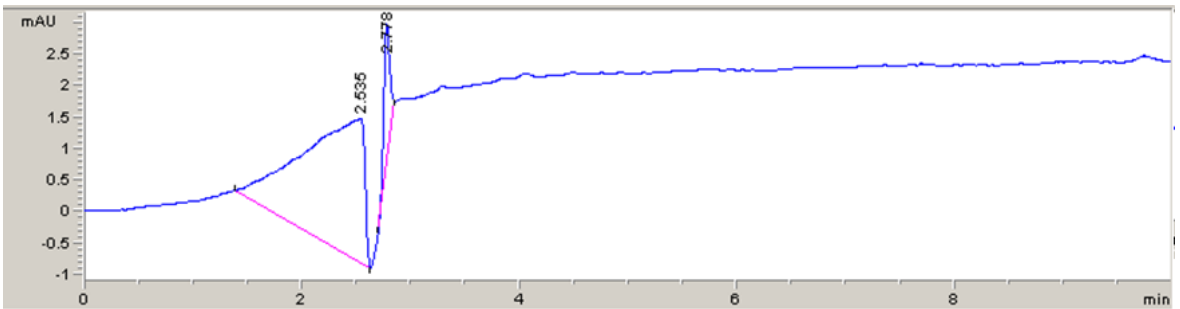
Şekil- 16: Özgüllük parametresi kromatogram-DNP çözeltisi



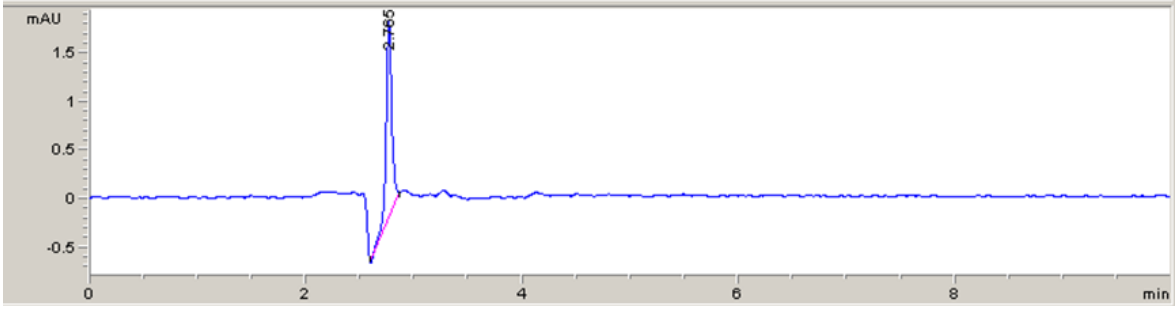
Şekil- 17: Özgüllük parametresi kromatogram-PLGA çözeltisi



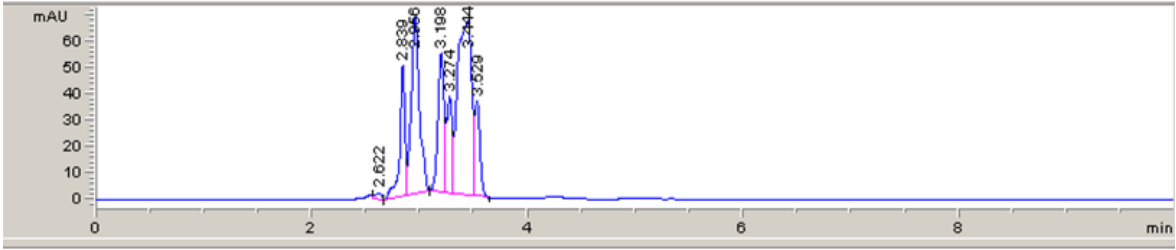
Şekil- 18: Özgüllük parametresi kromatogram-Mobil Faz A



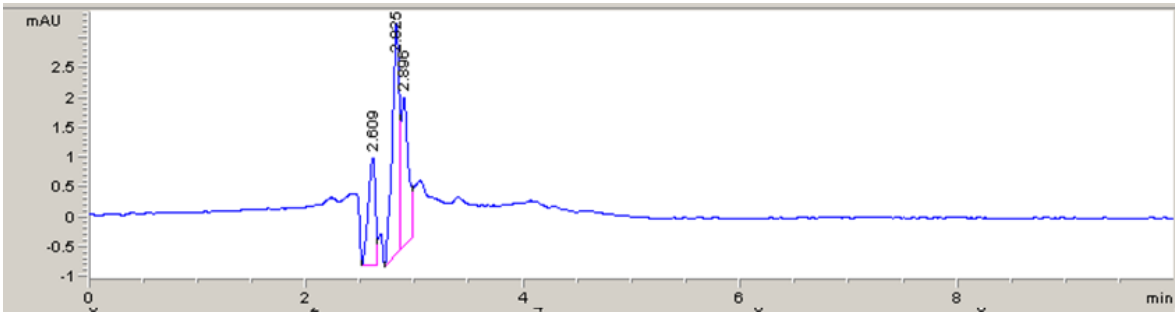
Şekil- 19: Özgüllük parametresi kromatogram-Mobil Faz B



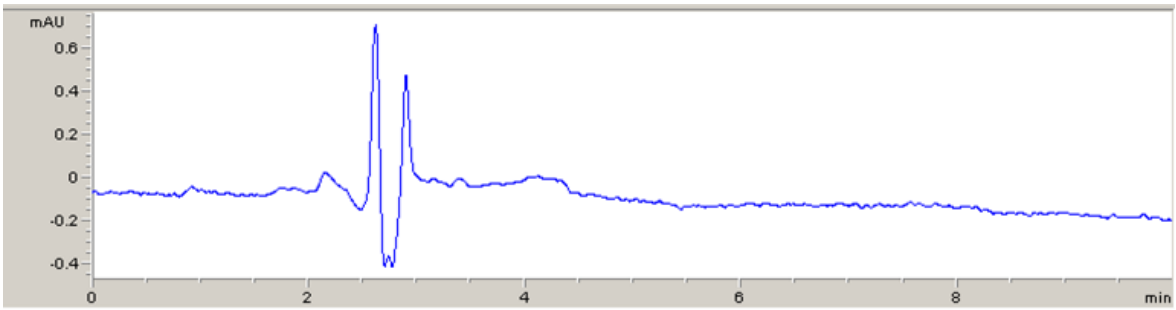
Şekil- 20: Özgüllük parametresi kromatogram-DNP Çözücüsü



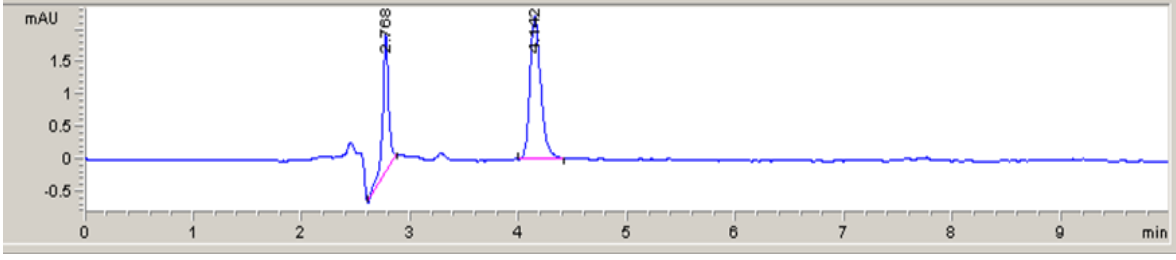
Şekil- 21: Özgüllük parametresi kromatogram-PLGA Çözücüsü



Şekil- 22: Özgüllük parametresi kromatogram-pH 6,8 Tamponu



Şekil- 23: Özgüllük parametresi kromatogram-Boş NP



Şekil- 24: Özgüllük parametresi kromatogram-Etken Madde Yüklü NP

2.2.1.3.2. Kesinlik Parametresi

Analitik metodun kesinliği analitin tekrar eden ölçümlerinin birbirlerine olan yakınlığını ifade eder. Kesinlik varyasyon katsayısı ile ifade edilir (SD) .⁴⁰ Bir analitik prosedürün kesinliği aynı homojen kaynağın aynı koşullar altında bir seri ölçümünün arasındaki yakınlığı ifade eder. Kesinlik 3 farklı düzeyde ifade edilebilir, bunlar: Tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar üretilebilirlik olarak sıralanabilir.⁴²

2.2.1.3.2.1 Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik parametresi aynı operasyonel koşullar altındaki kesinliği ifade eder.⁴² Tekrarlanabilirlik parametresinin doğruluğunun kanıtlanması için doğrusallık grafiği içindeki üç farklı konsantrasyonda hazırlanan 6'şar adet numune (4 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml) peş peşe analiz edilmiş ve numunelerden elde edilen alanlar kayıt edilmiştir. Elde edilen her bir alan için ortalama alan (ORT) , standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (RSD) değerleri hesaplanarak yöntemin tekraredilebilirliği kanıtlanmıştır.

2.2.1.3.2.2 Ara Kesinlik

Ara kesinlik parametresi laboratuvar içindeki varyasyonlar sonucu elde edilen kesinliği ifade eder; farklı gün, farklı analist, farklı ekipman gibi.⁴² Ara kesinlik parametresinin doğruluğunun kanıtlanması için doğrusallık grafiği içindeki üç farklı konsantrasyonda hazırlanan 6' şar adet numunenin (4 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml) peş peşe analizi 2 farklı günde gerçekleştirilmiş ve numunelerden elde edilen alanlar kayıt edilmiştir. Elde edilen her bir alan için ortalama alan (ORT) , standart sapma

(SD) ve relatif standart sapma (RSD) değerleri hesaplanarak yöntemin ara kesinliği kanıtlanmıştır.

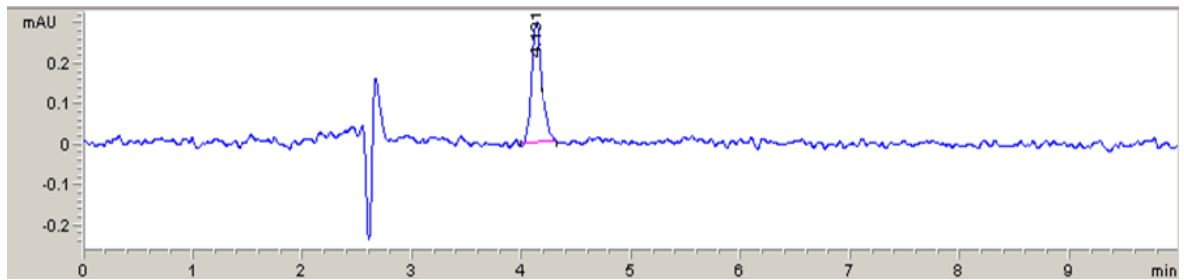
2.2.1.3.2.3 Tekrar retilbilirlik

Tekrar retilbilirlik parametresi laboratuvarlar arasındaki varyasyonlar sonucu elde edilen kesinliği ifade ettiği için bu parametre için herhangi bir işlem gerçekleştirilmemiştir.⁴²

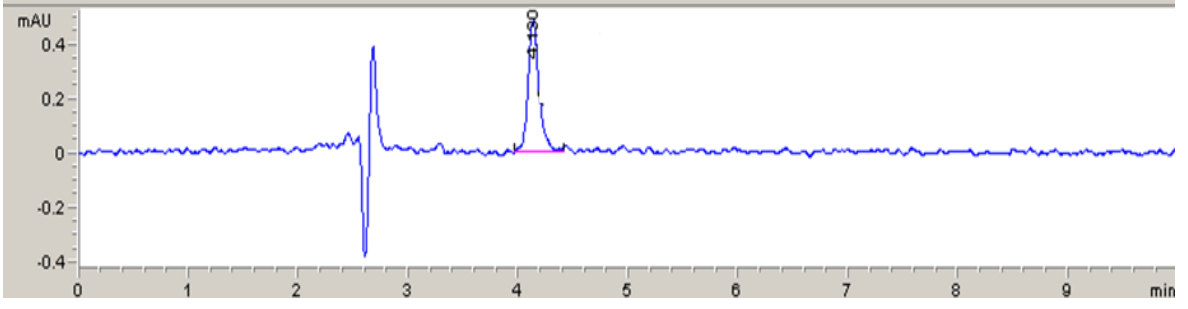
2.2.1.3.3. Doğrusallık

Cihazın analit konsantrasyonuna olan cevabı bilinmelidir ve belirli konsantrasyon aralıkları için hesaplanabilir olmalıdır. Kalibrasyon doğrusu standartları analit ile aynı matris ile hazırlanmalıdır. En az 6 kalibrasyon noktası kullanılmalıdır. Her kalibrasyon numunesi 2 defa analiz edilmelidir.⁴⁰

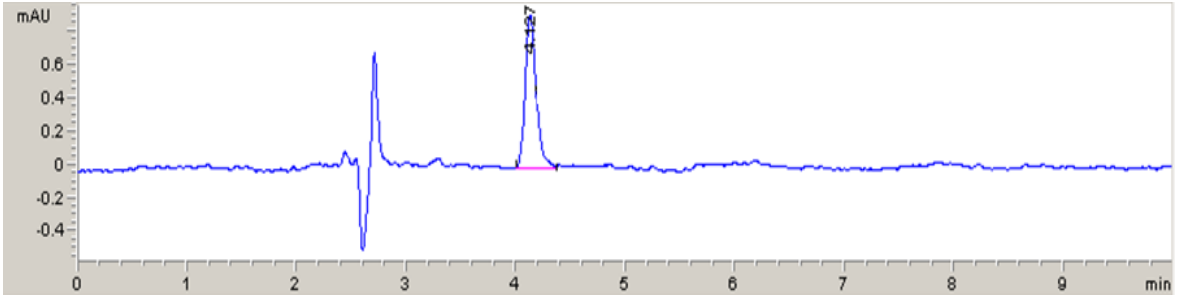
Yöntemin doğrusallık ve aralığını kanıtlamak için 20 µg/ml konsantrasyonundaki stok çözeltiden 7 farklı konsantrasyonda (1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 3,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 6,0 µg/ml ve 7,0 µg/ml) 2'şer adet numune hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler analiz edilmiş ve elde edilen absorbands değerlerinin ortalaması alınarak kayıt edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen alanlar konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiş ve lineer regresyon analizi yapılarak doğru denklemi elde edilmiştir.



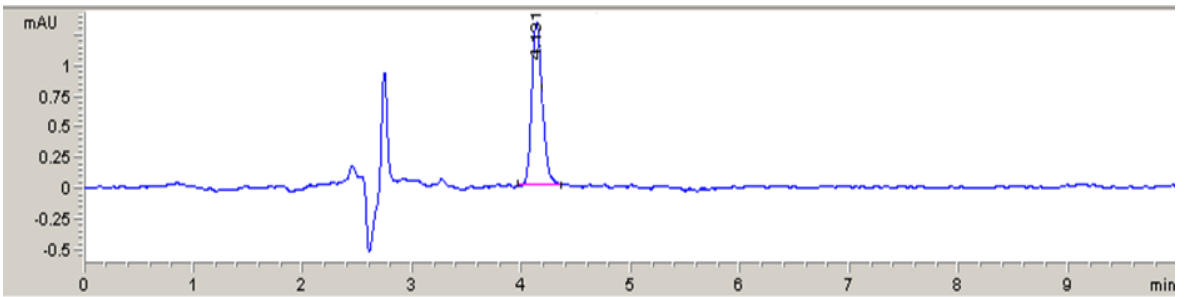
şekil- 25: Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 1,0 µg/ml



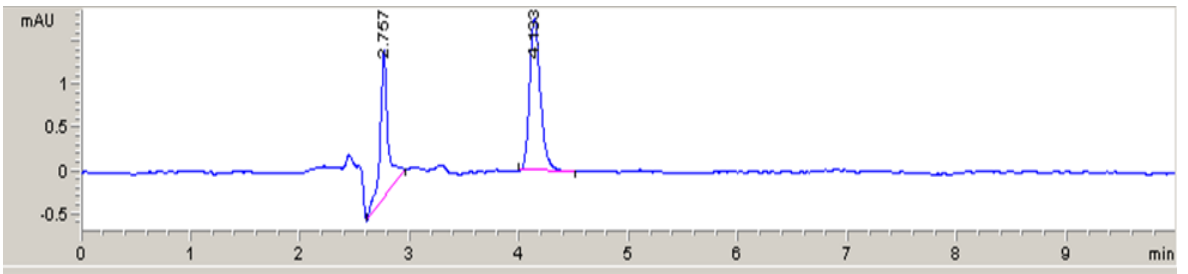
Şekil- 26: Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 2,0 µg/ml



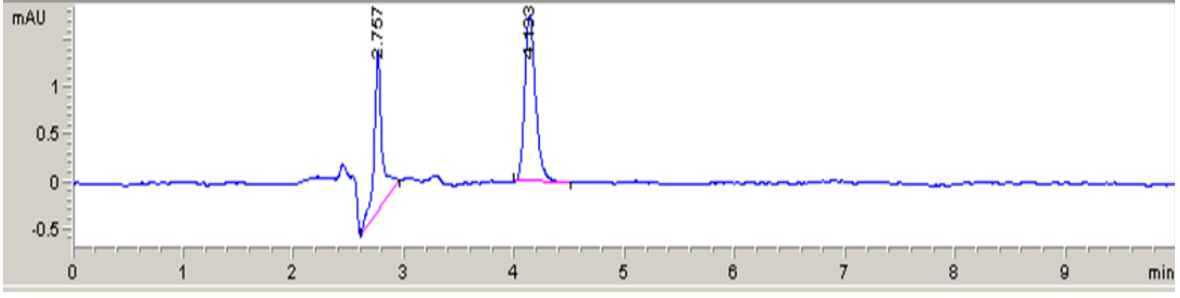
Şekil- 27: Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 3,0 µg/ml



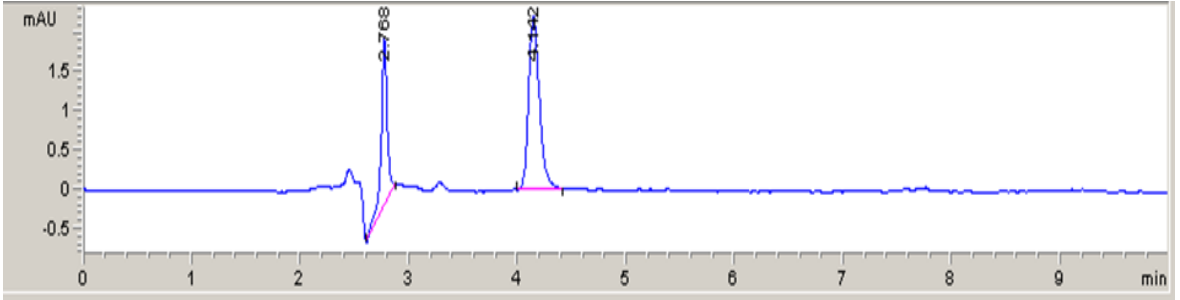
Şekil- 28: Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 4,0 µg/ml



Şekil- 29: Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 5,0 µg/ml



Şekil- 30: Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 6,0 µg/ml



Şekil- 31: Doğrusallık parametresi kromatogram- Konsantrasyon 7,0 µg/ml

2.2.1.3.4. Doğruluk ve Geri Kazanım

Bir analitik metodun doğruluğu metot için belirlenen değerler ile metottan elde edilen sonuç ile sembolik değerlerin birbirlerine olan yakınlığını ifade eder. Kalite kontrol örnekleri kalibrasyon grafiğine göre analiz edilirler ve elde edilen sonuçlar sembolik değerler ile karşılaştırılır. Kalite kontrol örneklerinden farklı olarak doğruluk numuneleri sembolik değerlerin yüzdesi olarak raporlanır.⁴⁰ Doğruluk bazen gerçeklik olarak da anılabilir.⁴²

Metodun doğruluğunu ve geri kazanımını tayin etmek için doğrusallık aralığındaki 3 farklı konsantrasyonda (2,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 6,0 µg/ml) 6'şar adet numune hazırlanmıştır.

Gerçekleştirilen hesaplamalar sonucunda metodun doğruluğu kanıtlanmıştır.

2.2.1.3.5. Bulma Limiti (LOD) ve Saptama Limiti (LOQ)

LOQ (limit of quantification) bir numune içindeki analitin güvenilir bir şekilde ve kabul edilebilir bir doğruluk ve kesinlik ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyondur.⁴⁰

LOD (limit of detection) bir numune içindeki analitin dedekte edilebilen ama kesin miktar olarak belirlenebilmesine gerek olmayan en küçük miktarının spesifik bir analitik prosedürüdür.⁴²

Düşük konsantrasyonda hazırlanan 6 farklı numune için elde edilen sonuçların standart sapmaları hesaplanmıştır.

LOD değerinin hesaplanabilmesi için standart sapma değeri doğrusallık parametresinden elde edilen doğru denkleminin eğimine oranlandı ve 3,3 ile çarpılarak elde edildi.

LOQ değerinin hesaplanabilmesi için standart sapma değeri doğrusallık parametresinden elde edilen doğru denkleminin eğimine oranlandı ve 10 ile çarpılarak elde edildi.

2.2.2. Nanopartikül Hazırlanması

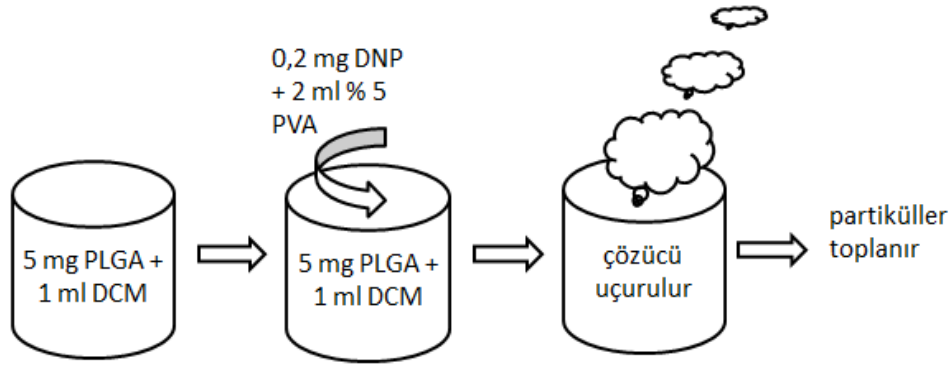
Nanopartiküllerin hazırlanması için birden fazla yöntem denenmiştir. Nanopartiküller Bhavna ve arkadaşları tarafından kullanılan³ çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. Özetle, 5 mg PLGA polimeri 1 ml DCM (diklorometan) ile çözünür. % 1 DNP etken maddesine eşdeğer DNP çözeltisi ve 3 ml % 0,5 PVA çözeltisi eklenmiştir. Ultrasonik prop ile 1,5 dk. sonikasyon uygulanan numuneler çözücünün uçması için açık hava basıncı altında ve oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcı yardımıyla, 1000 rpm hızda karıştırılır. Yaklaşık 4 saat sonra organik çözücünün tamamen uçmasının akabinde çözelti ultrasantirifüjlenir, distile su ile yıkanır ve liyofilize edilir.

Nanopartikül hazırlık aşamasında optimum koşulların elde edilmesi için partikül boyutunu etkileyen parametreler araştırılmıştır. Bunu görmek için numune hazırlık

aşamasındaki stabilizatör miktarı ve oranı, ilaç miktarı, polimer miktarı, sonikasyon süresi, santrifüj süresi gibi parametreler değiştirilerek partikül boyutuna etkileri gözlemlenmiştir.

Partikül boyutuna etkileyen parametrelerin tespitinin akabinde hazırlama metodu aşağıdaki şekliyle düzenlenmiştir.

5 mg PLGA polimeri 1 ml DCM ile çözünür. % 1 DNP (donepezil)'e eşdeğer DNP çözeltisi ve 2 ml % 0,5 PVA çözeltisi eklenmiştir. Ultrasonik prop ile sonikasyon uygulanan numuneler çözücünün uçması için karışmaya bırakılmıştır. Yaklaşık 2 saat sonra çözücü tamamen uçar ve çözelti ultrasantrifüjlenir, distile su ile yıkanır ve liyofilize edilir.



Şekil- 32: Nanopartiküllerin hazırlanması

2.2.3. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yükleme Oranının Tespit Edilmesi

Yükleme oranının tespit edilmesi için hazırlanan DNP yüklü nanopartiküllerden 1 mg numune tartılarak üzerine 1 ml DMSO (Dimetil sülfoksit) eklenmiştir. Bu çözelti ultrasonik banyoda oda sıcaklığında 5 dk. bekletilmiştir. Numunelerin üzerine 9 ml pH 6,8 tamponu eklendikten sonra numuneler 10 dk. manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Manyetik karıştırıcıdan alınan numuneler 13500 rpm hızda 30 dk. boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Santrifüj numunelerinden elde edilen

süpernatantlar valide edilen HPLC metodu ile analiz edilerek nanopartiküllere yüklenen madde miktarı hesaplanmıştır. Partiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi ve ilaç yüklenme oranlarının hesaplanması için aşağıdaki eşitlikler kullanılmıştır.

$$EE = \frac{\text{Toplam İlaç} - \text{Serbest İlaç}}{\text{Toplam İlaç}} \times 100^3$$

$$İY = \frac{\text{Toplam İlaç} - \text{Süpernatanttaki Serbest İlaç}}{\text{Toplam Partikül Miktarı}} \times 100^3$$

EE: Enkapsülasyon etkinliği

İY: İlaç yüklenme oranı

2.2.4. Nanopartiküllerin Hazırlanma Verimlerinin Belirlenmesi

Nanopartiküllerin formülasyon etkinliğinin belirlenmesi için formülasyon sonucu elde edilen toplam nanopartikül miktarının formülasyonda kullanılan polimer ve etken madde ağırlıklarının toplamına oranlanması ile belirlenmiştir.

2.2.5. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelinin belirlenmesi için hazırlanan DNP yüklü nanopartiküllerden 1 mg tartıldı. Oda sıcaklığında 10 ml suda 1 dk. boyunca vorteks yardımıyla dağıtıldı. Partiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli Malvern Instruments, Malvern Zetasizer, Nano-ZS cihazı kullanılarak ölçüldü ve ölçümler kayıt altına alındı.

2.2.6. Nanopartiküllerin FTIR Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

DNP, PLGA ve DNP yüklü PLGA nanopartikülleri için FTIR ölçümleri alındı ve spektrumlar kayıt edildi.

2.2.7. Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan nanopartiküller 1 ay boyunca 5°C sıcaklıkta bekletilmiş ve partikül boyutu, zeta potansiyeli, içeriğindeki ilaç miktarı gibi parametrelerindeki değişiklikler kontrol edilmiştir.³

2.2.8. In Vitro Salım Çalışması

5 mg DNP yüklü nanopartikül numunesi hassas terazide tartıldı. 1 ml pH 6,8 tamponunda dağıtıldı ve 10 ml çözünme ortamında bekletildi. Numuneler daha sonra önceden hazırlanmış diyaliz membranından (MWCO 12,000 g/mol) salım profillerinin gözlemlenmesi için 37°C sıcaklığa ayarlanan yatay karıştırıcıda 100 rpm hızında karıştırıldı. Belirli zaman aralıklarında numuneler alındı ve alınan numune kadar çözünme ortamı karıştırıcıya eklendi. Alınan numunelerin içeriğindeki etken madde miktarı valide edilmiş HPLC metodu ile ölçüldü. Elde edilen ilaç salım değerleri numunelerin alındığı zaman aralıklarına göre grafiğe geçirildi ve hazırlanan nanopartiküllerin in- vitro salım profilleri çizildi. Bu çalışma 6 adet numune ile gerçekleştirildi. Numunelerden örnekleme yapılma zamanları t: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5 3; 4; 5; 6;7 ;8 saat zaman aralıkları olarak belirlendi.

3. SONUÇLAR

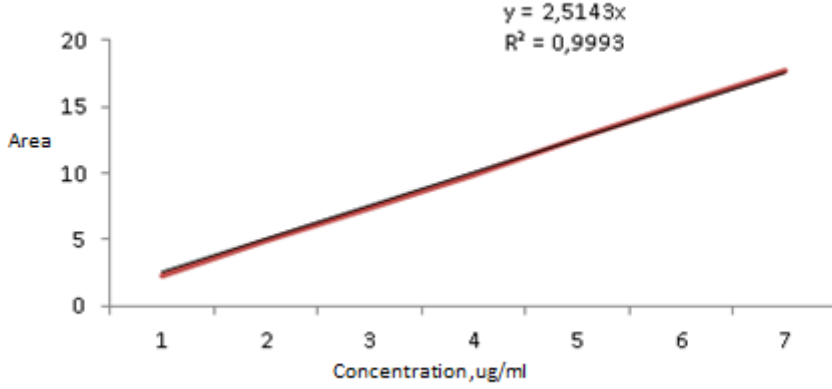
3.3.1 Donepezil'in HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini

Donepezil etken maddesinin HPLC yöntemi ile miktar tayini analizinin gerçekleştirilmesi için bölüm 2.2.1.1'de belirtilen 2 numaralı yöntem kullanılmıştır. 50 µl enjeksiyon hacmi ile 1 ml/ dk. akış hızında, 10 dk. enjeksiyon süresinde, 268 nm dalgaboyunda, 25°C kolon sıcaklığında, mobil faz A olarak 0,25 ml GAA ve 1 ml TEA' in 1 L suda çözülmüş hali, mobil faz B olarak metanol, mobil faz oranı ise % 50 MFA:% 50 MFB kullanılarak ayarlanmış olup kolon olarak ACE C18 250 cm x 4,6 mm x 5 µm kolon kullanılmıştır.

3.3.1.1. Donepezil için Kalibrasyon Doğrusunun Elde Edilmesi

Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı üzere DNP etken maddesi için kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi amacıyla hazırlanan 1 mg/ ml konsantrasyonundaki stok çözeltilisinden seyreltilerek hazırlanan 7 farklı konsantrasyondaki kalibrasyon numunesi valide edilmiş HPLC metodu ile analiz edilmiştir. Her bir numune 2'şer defa enjekte edilmiştir ve bu enjeksiyonlar sonucunda elde edilen alanların ortalaması alınmıştır. Kalibrasyon doğrusunun çizilmesi için seçilen 7 farklı konsantrasyon 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 3,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 6,0 µg/ml ve 7,0 µg/ml şeklindedir.

Analizler sonucunda belirlenmiş konsantrasyonlar için elde edilen alanlar grafiğe çizilmiştir ve lineer regresyon analizi yapılmıştır. Lineer regresyon analizi sonucunda elde edilen doğru denklemi gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil- 33: DNP için 7 farklı noktada çizilen kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi (n=7)

Grafikten elde edilen R^2 değeri belirlenen regresyonu sağladığı için kullanılan analitik metodun doğruluğu kanıtlanmıştır. Analitik metod belirlenen konsantrasyon aralıklarına doğrusal yanıt vermektedir.

3.3.2. Analitik Metodun Valide Edilmesi

DNP etken maddesinin tayini için kullanılan analitik yöntem Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı şekilde valide edilmiştir.

3.3.2.1 Özgüllük (Seçicilik) Parametresi

DNP etken maddesinin tayininde kullanılan analitik metodun seçiciliğinin kanıtlanması için hem etken madde yüklü nanopartikül çözeltisi, hem boş nanopartikül çözeltisi, numune hazırlama amaçlı kullanılan tüm çözücüler, PLGA çözeltisi, mobil faz A, mobil faz B, pH 6,8 tamponu, su ve DCM HPLC viallerine örneklenmiş ve kullanılan analitik metod ile okumaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen kromatogramlar içinde hiç birinde DNP etken

maddesinin alıkonma zamanında, DNP etken madde piki ile çakışacak herhangi bir absorbansa rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlardan kullanılan analitik metodun DNP etken maddesini ölçmek için seçici olduğu ve etken madde ölçümlerinde kullanılan diğer girdilerden hiçbirine ait girişim olmadığı kanıtlanmıştır.

3.3.2.2 Kesinlik Parametresi

3.3.2.2.1 Tekrarlanabilirlik

DNP etken maddesinin tayininde kullanılan analitik metodun kesinlik parametresinin kanıtlanması amacıyla doğrusallık grafiği içinden seçilen 3 farklı konsantrasyonda 6' şar adet numune hazırlanmıştır. Seçilen konsantrasyonlar 4 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml şeklinde dir. Belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler aynı gün içinde aynı sistemde peş peşe analiz edilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen alanlar kayıt edilmiştir. Her bir konsantrasyon için elde edilen alanların ortalaması (ORT), standart sapması (SD) ve relatif standart sapması (RSD) hesaplanarak yöntemin tekrarlanabilirliği kanıtlanmıştır. Tekrarlanabilirlik parametresinden elde edilen veriler Tablo 8'de verilmektedir. Aynı konsantrasyondaki farklı numunelerin ardışık okutulmalarından elde edilen sonuçlar arasındaki SD değerinin <2,0 olması metodun kesinliğini kanıtlamaktadır.^{16,172}

Tablo- 7: Tekrarlanabilirlik parametresinin sonuçları (n=6 numune için)

Teorik Hazırlanan Konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$	Elde Edilen Ortalama Konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$	Standart Sapma, SD	Relatif Standart Sapma, RSD
4 $\mu\text{g/ml}$	3,98	0,03	0,001
6 $\mu\text{g/ml}$	6,04	0,03	0,013
7 $\mu\text{g/ml}$	7,05	0,04	0,000

3.3.2.2.2. Ara Kesinlik

DNP etken maddesinin tayininde kullanılan analitik metodun kesinlik parametresinin kanıtlanması amacıyla doğrusallık grafiği içinden seçilen 3 farklı konsantrasyonda 6' şar adet numune hazırlanmıştır. Seçilen konsantrasyonlar 4 $\mu\text{g/ml}$, 6 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$ şeklindedir. Belirlenen konsantrasyonlarda 2 farklı günde hazırlanan numuneler 2 farklı gün içinde aynı koşullardaki sistemde analiz edilmiştir. Analizler sonucunda elde edilen alanlar kayıt edilmiştir. Her bir konsantrasyon için elde edilen alanların ortalaması (ORT), standart sapması (SD) ve relatif standart sapması (RSD) hesaplanarak yöntemin ara kesinliği kanıtlanmıştır. Ara kesinlik parametresinden elde edilen veriler Tablo 9'da verilmektedir.

Tablo- 8: Ara Kesinlik parametresinin sonuçları (n=6 numune için)

Günler	Teorik Hazırlanan Derişim $\mu\text{g/ml}$	Elde Edilen Ortalama Derişim $\mu\text{g/ml}$	Standart Sapma, SD	Relatif Standart Sapma, RSD
1. gün	4 $\mu\text{g/ml}$	3,98	0,03	0,001
	6 $\mu\text{g/ml}$	6,04	0,03	0,013
	7 $\mu\text{g/ml}$	7,05	0,04	0,000
2. gün	4 $\mu\text{g/ml}$	4,02	0,06	0,002
	6 $\mu\text{g/ml}$	6,01	0,06	0,024
	7 $\mu\text{g/ml}$	7,04	0,04	0,001

3.3.2.3 Doğrusallık Parametresi

DNP etken maddesinin HPLC ile miktar tayini yönteminin belirlenen aralıkta doğrusal sonuçlar verdiğini kanıtlamak için belirlenen 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan 2'şer adet numune HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Her bir konsantrasyon değeri için analiz edilen 2 farklı numuneden elde edilen alanların ortalamaları alınmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiştir. Lineer regresyon hesabı yapılarak doğruluk denklemi elde edilmiştir. Grafik ve denklem Şekil-8'de verilmektedir. Elde edilen R^2 değeri $> 0,99$ olduğu için analitik metodun doğrusallığı kanıtlanmıştır.

3.3.2.4 Doğruluk ve Geri Kazanım Parametresi

DNP etken maddesinin miktar tayini için geliştirilen HPLC metodunun doğruluk ve geri kazanım parametresinin kanıtlanması için seçilen 3 farklı konsantrasyonda 6'şar adet numune hazırlanmıştır. Seçilen konsantrasyonlar 2,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 6,0 µg/ml şeklindedir. Seçilen konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Analizler sonucunda hesaplanan konsantrasyonların teorik konsantrasyonlardan sapması hesaplanmıştır. Teorik konsantrasyonlar ve hazırlanan çözeltilerden elde edilen sonuçlar ile hesaplanan konsantrasyonların sapması Tablo-10'da verildiği gibidir. Elde edilen sonuçlar ışığında DNP etken maddesinin miktar tayini için geliştirilen HPLC metodunun doğruluğu ispatlanmıştır.

Tablo- 9: Doğruluk ve Geri Kazanım parametresinin sonuçları (n=6 numune)

Teorik Hazırlanan Derişim µg/ml	Elde Edilen Ortalama Derişim µg/ml	SD	RSD	% Doğruluk
2 µg/ml	1,98±0,03	0,029807	0,036883	99,00
5 µg/ml	5,00±0,02	0,020345	0,009961	100,00
6 µg/ml	6,06±0,02	0,018427	0,007455	101,00

3.3.2.5 Bulma Limiti (LOD) ve Saptama Limiti (LOQ)

DNP etken maddesinin miktar tayini analizi için geliştirilen HPLC metodunun validasyonu kapsamında LOD ve LOQ limitlerinin belirlenebilmesi için düşük konsantrasyonda hazırlanan 6 farklı numune HPLC sistemi ile analiz edilmiştir. Analiz ile elde edilen sonuçların standart sapması hesaplanmıştır.

LOD değerinin hesaplanabilmesi için elde edilen standart sapma değeri doğrusallık parametresinin kanıtlanması aşamasında çizilen lineerite grafiğine ait denklemin eğimine oranlanarak 3,3 ile çarpılmıştır. Bu çalışma sonucunda DNP etken maddesinin analizi için geliştirilen miktar tayini metodunun LOD değeri 0,09 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

LOQ değerinin hesaplanabilmesi için elde edilen standart sapma değeri doğrusallık parametresinin kanıtlanması aşamasında çizilen lineerite grafiğine ait denklemin eğimine oranlanarak 10 ile çarpılmıştır. Bu çalışma sonucunda DNP etken maddesinin analizi için geliştirilen miktar tayini metodunun LOQ değeri 0,28 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.3.3. Nanopartikül Hazırlanması, Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Nanopartiküllerin hazırlanması için birden fazla yöntem denenmiştir.

1. yöntem;

1. yöntem A; Bu yöntem Alaa ve arkadaşları tarafından geliştirilen PLGA-Poloksamer nanopartikül hazırlama metodunun⁴³ revize edilmesiyle geliştirilmiştir. 50 mg PLGA ve 50 mg Poloksamer 407 hassas terazide tartılmıştır. Tartılan numune üzerine 5 ml DCM ilave edilmiş ve vorteks yardımı ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti üzerine 2 mg DNP etken maddesine eşdeğer miktarda DNP çözeltisi eklenmiştir. Bu çözelti manyetik karıştırıcı ile karışmakta olan 25 ml etanol üzerine eklenmiştir. Çözelti, organik fazın uçurulması için 1 gece oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. 24 saatin sonunda numune 13500 rpm hızda 1 saat süreyle oda sıcaklığında ultrasentrifüjlenmiştir. Bu şekilde 3 adet numune hazırlanmıştır. Süpernatant alınmış ve partikül boyutu ölçülmüştür. Hazırlanan numunenin partikül boyutu ortalama 8350 ± 152 nm olarak ölçülmüştür. Bu yöntem ile hazırlanan partiküllerin boyutlarının nano boyutlardan ziyade mikro boyutlara daha yakın olduğu tespit edilmiştir.

1. yöntem B; 50 mg PLGA ve 50 mg Poloksamer 407 hassas terazide tartılmıştır. Tartılan numune üzerine 2 ml DCM ilave edilmiş ve vorteks yardımı ile

özlmtr. Hazırlanan özelti üzerine 2 mg DNP etken maddesine eşdeğer miktarda stok çözeltisi eklenmiştir. Bu özelti manyetik karıştırıcı ile karımakta olan 25 ml etanol üzerine eklenmiştir. Çözelti organik fazın uçurulması için evaporatörde 175 bar basınç altında 40°C sıcaklıkta, 100 rpm hızda karıtırılmıtır. Organik faz tamamen uçurulduktan sonra numuneler 13500 rpm hızda 1 saat süreyle oda sıcaklığında ultrasantrifjlenmitir. Aynı yöntem ile 3 adet numune hazırlanmıştır. Süpernatant alınmış ve partikül boyutu llmtir. Bu yöntem ile hazırlanan partiküllerin ortalama partikül boyutları 295 nm olarak llmtir. Polidispersite indeks değeri 0,249 olarak elde edilmiştir. Partikül boyutu dağılımı ise;

% 95,5; 323 ± 20 nm ve

% 4,5; 4733 ± 243 nm

olarak elde edilmiştir. DNP etken maddesi yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması için uygulanan metodun çözücü buharlaştırma basamağında yapılan değişikliğin partikül boyutunu ve partikül dağılımını etkilediği grlmtir. Organik faz olarak etanolün kullanıldığı ve homojenizasyon aşamasının vorteks ile gerçekleştirilerek üretilcek olan DNP yüklü PLGA nanopartikülleri için partikül boyutunu belirleyen kritik basamaklarda birinin çözücü buharlaştırma aşaması olduğu grlmtir.

Tablo- 10: 1. Yöntem A ve 1. Yöntem B için karşılaştırma tablosu (n=3 numune için)

Yöntem	Polimer Miktarı	Etken Madde Miktarı	Çözücü Buharlaştırma Basamağı	Ortalama Partikül Boyutu
1. yöntem-A	100 mg	2 mg	Sıcaklık: oda sıcaklığı	%100: 8350 ± 152 nm
			Karıştırma hızı: 1000 rpm	
			Karıştırma basıncı: açık hava basıncı	
			Uçurma Süresi: 24 saat	
1. yöntem-B	100 mg	2 mg	Sıcaklık: 40°C	% 95,5; 323 ± 20 nm % 4,5; 4733 ± 243 nm nm
			Karıştırma hızı: 100 rpm	
			Karıştırma basıncı: 175 bar	
			Uçurma Süresi: 4 saat	

2. yöntem;

2. yöntem A; 100 mg PLGA hassas terazide tartılmış ve 3 ml DCM ile çözülmüştür. 2 mg DNP etken maddesine eşdeğer stok çözeltisi vorteks ile homojenize edilmekte olan polimer çözeltisinin üzerine eklenmiştir. Çözeltiler 1 dk. boyunca vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Karıştırılan çözelti manyetik karıştırıcıda karışmakta olan 20 ml % 1 PVA çözeltisinin üzerine eklenmiştir. Karışım 5 dk boyunca 4000 rpm hızıyla ultraturaks ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım bir behere alınıp ağzı açık bir şekilde organik fazın uçması için 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Organik faz uçurulduktan sonra numuneler 13500 rpm hızında oda sıcaklığında 30 dk. santrifüjlendi. Distile su ile yıkandı. Aynı yöntem ile 3 adet numune hazırlanmıştır. Süpernatant alınmış ve partikül boyutları ölçülmüştür. Bu yöntem ile hazırlanan partiküller organik fazın uçurulması

aşamasında gözle görülür şekilde agrege olduğu için partikül boyutu ölçümleri yapılamamıştır.

2. yöntem DNP etken maddesi yüklü PLGA nanopartiküllerinin % 1 PVA ile hazırlanması için uygun bulunmamıştır.

2. yöntem B; 100 mg PLGA hassas terazide tartılmış ve 5 ml DCM ile çözülmüştür. 5 mg DNP etken maddesine eşdeğer DNP çözeltisi vorteks ile homojenize edilmekte olan polimer çözeltisinin üzerine eklenmiştir. Çözeltiler 1 dk. boyunca vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Karıştırılan çözelti manyetik karıştırıcıda karışmakta olan 20 ml % 1 PVA çözeltisinin üzerine eklenmiştir. Karışım 3 dk boyunca 8000 rpm hızıyla ultraturaks ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışım bir behere alınıp ağzı açık bir şekilde organik fazın uçması için 24 saat karışmaya bırakılmıştır. Organik faz uçurulduktan sonra numuneler 13500 rpm hızında oda sıcaklığında 30 dk. santrifüjlenmiştir. Akabinde distile su ile yıkanmıştır. Aynı yöntem ile 3 adet numune hazırlanmıştır. Süpernatant alınmış ve partikül boyutu ölçülmüştür. Numuneler organik fazın uçurulması aşamasında gözle görülür şekilde agrege oldukları için partikül boyutu ölçümleri kayıt altına alınmamıştır.

3. yöntem- A; Nanopartiküller Bhavna ve arkadaşları tarafından kullanılan³ çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi modifiye edilerek hazırlanmıştır. Özetle, 5 mg PLGA polimeri 1 ml DCM ile çözünür. % 2 DNP etken maddesine eşdeğer DNP çözeltisinden ve 2 ml % 0,5 PVA çözeltisi eklenmiştir. Ultrasonik prop ile 1,5 dk. sonike edilen numuneler çözücünün uçması evaporatörde 40°C sıcaklıkta, 850 mbar basınç altında karıştırıldı. Organik faz uçurulduktan sonra 13500 rpm hızda 30 dk boyunca ultrasantrifüjlenir, distile su ile yıkanır. Bu şekilde 3 adet numune hazırlanmıştır. Hazırlanan numunelerin ortalama partikül boyutu $209,8 \pm 1,25$ nm olarak ölçülmüştür. Numunelerin PDI değeri ise ortalama 0,112 olarak kayıt edilmiştir.

3. yöntem B; 3. Yöntem- A değiştirilerek uygulanmıştır. 5 mg PLGA polimeri 1 ml DCM ile çözünür. % 2 DNP etken maddesine eşdeğer stok çözeltisinden ve 2 ml % 0,5 PVA çözeltisinden eklenmiştir. Ultrasonik prop ile 1,5 dk sonike edilen numuneler çözücünün uçması için manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızda birkaç saat karıştırılmıştır. Organik faz uçurulduktan sonra 13500 rpm hızda 30 dk boyunca ultrasantirifüjlenir, distile su ile yıkanır. Bu şekilde 3 adet numune hazırlanmıştır. Hazırlanan numunelerin ortalama partikül boyutu $141,1 \pm 0,97$ nm olarak ölçülmüştür. Numunelerin PDI değeri ise ortalama 0,199 olarak kayıt edilmiştir.

Bu yöntem ile hazırlanan DNP yüklü PLGA nanopartikülleri için organik fazın uçurulması aşamasının partikül boyutuna ve PDI değerine etkisi ölçülmüştür. Organik fazın uçurulması için manyetik karıştırıcı kullanılmasının partikül boyutu değerlerine olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Tablo- 11: 3. Yöntem A ve 3. Yöntem B için karşılaştırma tablosu (n=3 numune)

Yöntem	Polimer Miktarı	Etken Madde Miktarı	Çözücü Buharlaştırma Basamağı	PDI	Ortalama Partikül Boyutu
3. yöntem-A	5 mg	0,1 mg	Sıcaklık: 40°C	0,112	%100: 209,8 ± 1,25 nm
			Karıştırma hızı: 100 rpm		
			Karıştırma basıncı: 175 bar		
			Uçurma Süresi: 4 saat		
3. yöntem-B	5 mg	0,1 mg	Sıcaklık: oda sıcaklığı	0,199	%100: 141,1 ± 0,97 nm
			Karıştırma hızı: 1000 rpm		
			Karıştırma basıncı: açık hava basıncı		
			Uçurma Süresi: 24 saat		

3. yöntem ile homojen ve kabul edilebilir büyüklükte partiküller elde edilmiştir. Bu nedenle 3. yöntem için partikül boyutunu etkileyen diğer parametrelerin tespit edilmesi amacıyla polimer miktarı, stabilizatör miktarı, sonikasyon süresi, santrifüj süresi, DNP miktarı gibi girdiler farklı oranlarda kullanılarak partikül boyutunda meydana gelen değişimler ölçülmüştür.

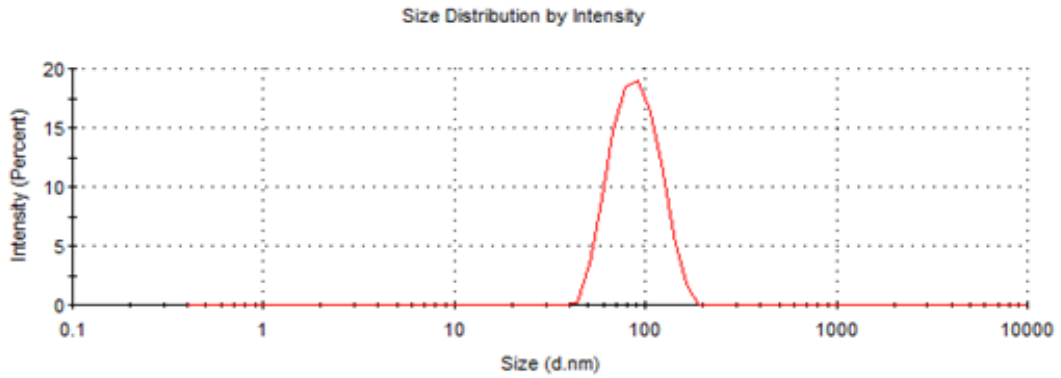
Tablo- 12: 3. yöntem ile hazırlanacak nanopartiküller için partikül boyutunu etkileyen parametrelerin belirlenmesi (n=3 numune)

Yöntem	Polimer Miktarı	Etken Madde Miktarı	Stabilizatör Miktarı	Sonikasyon Süresi	Santrifüj Süresi	Ortalama Partikül Boyutu
3.yöntemC	2,5 mg	0,1 mg	3 ml %0,5 PVA	1 dk.	30 dk.	135,3 ± 1,78 nm
3. yöntemD	10 mg	0,1 mg	3 ml %0,5 PVA	1 dk.	30 dk.	148,9 nm ± 0,91 nm
3. yöntemE	5 mg	0,1 mg	2 ml %0,5 PVA	1 dk.	30 dk.	123,7 ± 1,08 nm
3. yöntemF	5 mg	0,1 mg	4 ml %0,5 PVA	1 dk.	30 dk.	144,4 ± 1,74 nm
3. yöntemG	5 mg	0,1 mg	3 ml %0,5 PVA	0,5 dk.	30 dk.	145,2 ± 0,78 nm
3. yöntemH	5 mg	0,1 mg	3 ml %0,5 PVA	2 dk.	30 dk.	95,64 ± 1,27 nm
3. yöntem I	5 mg	0,1 mg	3 ml %0,5 PVA	1 dk.	20 dk.	142,3 64 ± 0,82 nm
3. yöntemJ	5 mg	0,1 mg	3 ml %0,5 PVA	1 dk.	40 dk.	141,4 ± 0,58 nm
3. yöntemK	5 mg	0,05 mg	3 ml %0,5 PVA	1 dk.	30 dk.	142,1 ± 1,55 nm
3. yöntemL	5 mg	0,2 mg	3 ml %0,5 PVA	1 dk.	30 dk.	121,7 ± 1,54 nm

DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin 3. Yöntem ile hazırlanması aşamasında partikül boyutunu etkileyen parametreler ölçülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda ultrasonikasyon süresi 2 dk olarak arttırılmıştır, DNP miktarı 0,2 mg olacak şekilde arttırılmış, PVA miktarı 2 ml olacak şekilde azaltılmıştır. Nanopartiküller hazırlanma yönteminde yapılan değişiklikler ile yeniden formüle edilmişlerdir. Seçilen bu yöntem 4. Yöntem olarak adlandırılmıştır.

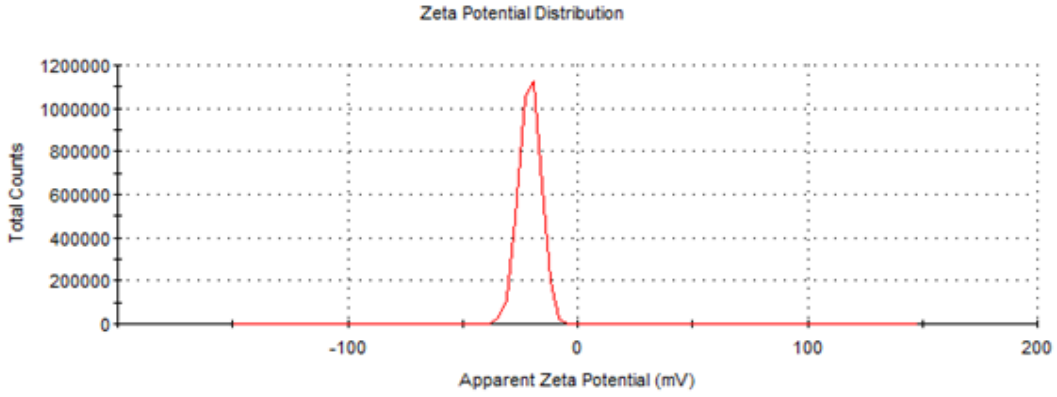
4. yöntem; 4. yöntem 3. yöntemin optimize edilmesi ile geliştirilmiştir. Bu yöntem ile 5 mg PLGA polimeri 1 ml DCM ile çözünür. 0,2 mg DNP'e eşdeğer DNP çözeltisi ve 2 ml % 0,5 PVA çözeltisi eklenmiştir. Ultrasonik prop ile 2 dk sonike edilen numuneler çözücünün uçması için manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm hızda birkaç saat karıştırılmıştır. Organik faz uçurulduktan sonra 13500 rpm hızda 30 dk. boyunca ultrasantirifüjlenir, distile su ile yıkanmıştır. Bu şekilde 3 adet numune hazırlanmıştır.

Optimum sonuçların alındığı yöntem olarak belirlenen 4. yöntem ile ortalama partikül boyutu 85,05 nm olarak elde edilmiştir. PDI değeri 0,065 olarak raporlanmıştır. Elde edilen partiküller 1-100 nm aralığındadır.



Şekil- 34: DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin partikül boyut diagramı

Partiküllerin zeta potansiyeli -20,8 mV olarak ölçülmüştür. Bu da partiküllerin stabilitesinin iyi olduğunu gösteren bir diğer etmendir.



Şekil- 35: DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel

Tablo- 13: 4. Yöntem ile üretilen nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri (n=6 numune)

Partikül Boyutu	Partikül Boyutu,nm	PDI	Zeta Potansiyeli,mV
NP-1	85,05	0,065	-20,8
NP-2	84,73	0,057	-20,9
NP-3	85,11	0,081	-20,5
NP-4	86,01	0,089	-21,9
NP-5	85,21	0,055	-19,7
NP-6	84,21	0,045	-20,9
Ortalama	85,05	0,065	-20,8
Standart Sapma	0,59	0,017	0,71

3.3.4. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği ve İlaç Yüklenme Oranının Tespit Edilmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin yüklenme oranlarının tespit edilmesi için bölüm 2.2.3'te anlatılan metot kullanılmıştır. Bu metot ile enkapsülasyon etkinliği ve yüklenme oranının 6 farklı numunede tayin edilmesiyle elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda verildiği gibidir.

Tablo- 14: Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği ve yüklenme oranı (n=6 numune)

Numune	% EE	% İY
Numune-1	79,5 ± 0,87	17,5 ± 0,71
Numune-2	80,5 ± 0,87	18,5 ± 0,71
Numune-3	79 ± 0,87	16,5 ± 0,71
Numune-4	79,75 ± 0,87	18 ± 0,71
Numune-5	80,9 ± 0,87	17,5 ± 0,71
Numune-6	81,25 ± 0,87	17 ± 0,71
ORTALAMA	80,15	17,5
STANDART SAPMA	0,87	0,71

3.3.5. Nanopartiküllerin Hazırlanma Verimlerinin Belirlenmesi

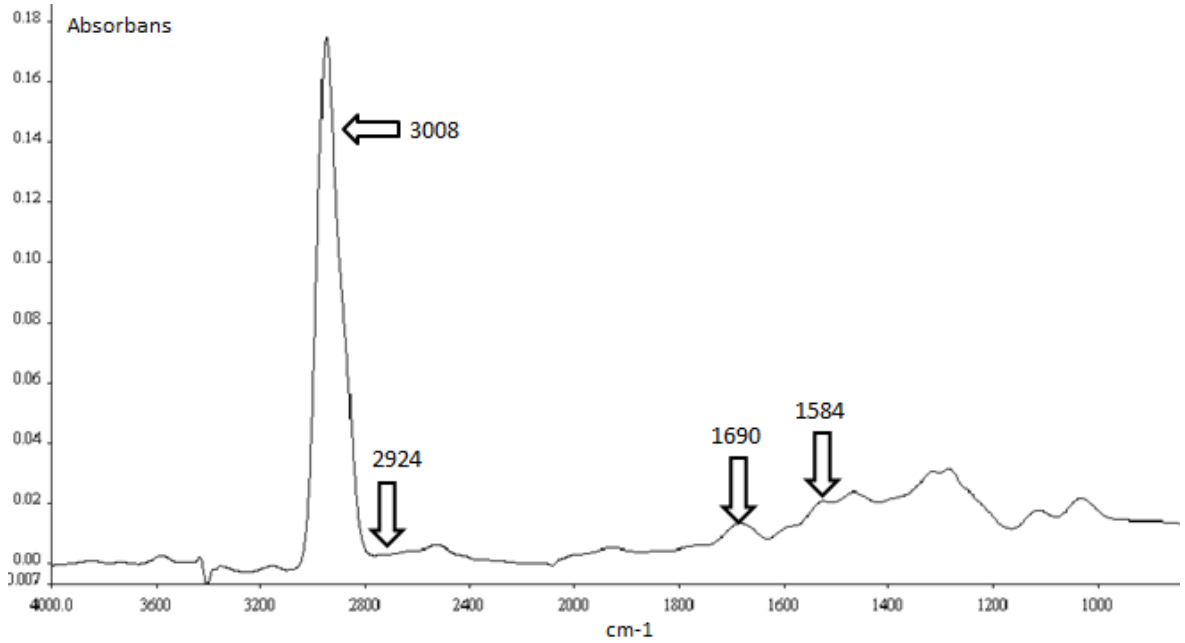
Hazırlanan DNP etken maddesi yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanma verimlerinin belirlenmesi için elde edilen nanopartikül miktarının ağırlığının nanopartiküller hazırlanırken alınan polimer miktarının ve nanopartiküllere eklenen PLGA miktarının toplam ağırlıklarına oranlanmıştır. DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması aşamasında elde edilen partikül hazırlama verimleri 3 adet numune için Tablo-14'te verilmektedir.

Tablo- 15: Nanopartiküllerin hazırlanma veriminin ölçülmesi (n=3 numune)

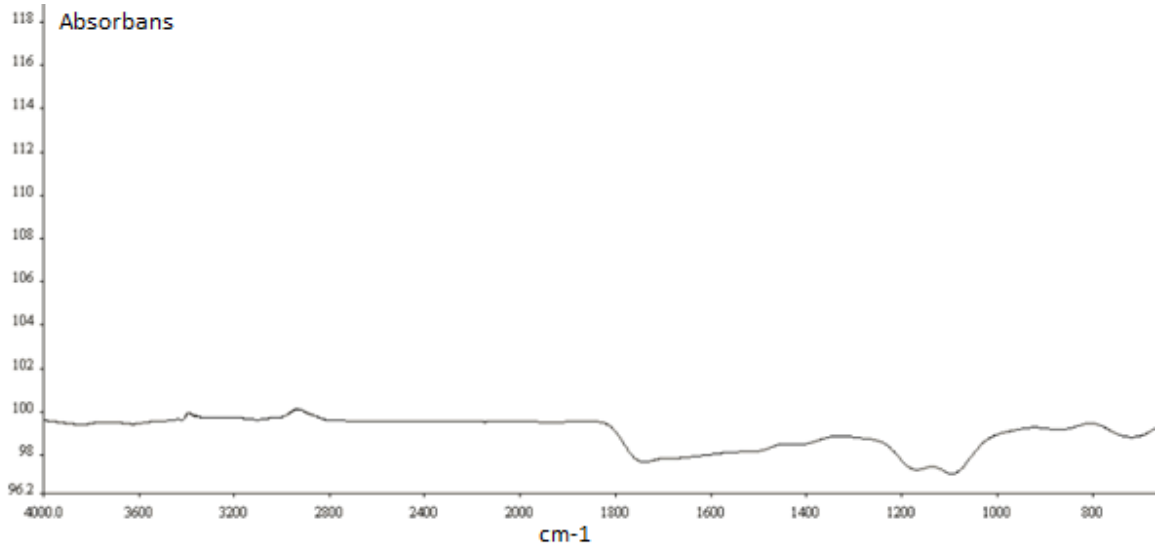
	PLGA + DNP	NP Ağırlığı, mg	% Verim
NP-1	5 mg + 0,2 mg	3,89	74,80769
NP-2	5 mg + 0,2 mg	4,01	77,11538
NP-3	5 mg + 0,2 mg	3,99	76,73077

3.3.6. Fourier Transform Infra Red Spektroskopisi (FTIR)

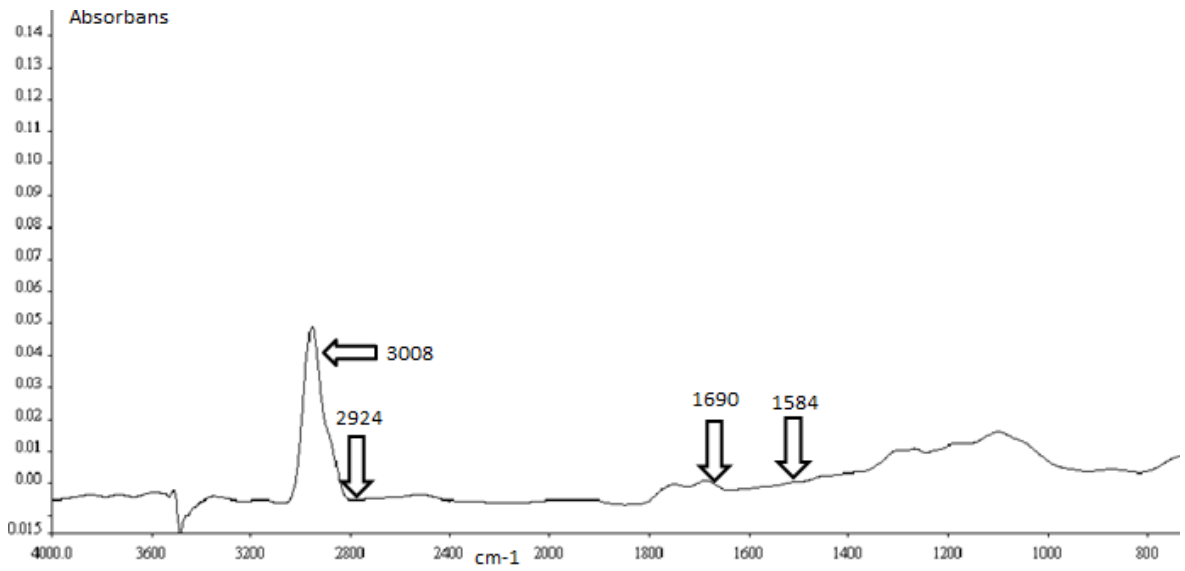
Donepezil hammaddesinin, nanopartikül üretiminde kullanılan PLGA polimerinin ve donepezil yüklü PLGA nanopartiküllerinin FTIR spektrumları çekilmiştir.³



Şekil- 36: Donepezil etken maddesine ait FTIR spektrumu



Şekil- 37: PLGA polimerine ait FTIR spektrumu



Şekil- 38: Donepezil etken maddesi yüklü PLGA nanopartiküllerine ait FTIR spektrumu

Donepezil' in FTIR spektrumu ilaç yapısının karakteristik piklerini göstermektedir. 3008 cm^{-1} aromatik CH grup gerilmesini göstermektedir, 2924 cm^{-1} alifatik CH_2 grup gerilmesini göstermektedir. 1690 cm^{-1} ve 1589 cm^{-1} sırasıyla C=O karbonil grup gerilmesini ve C=C gerilmesini göstermektedir.³

3.3.7. Stabilité Çalışmaları

Sentezlenen nanopartiküller 1 ay boyunca 5°C sıcaklıkta bekletilmiş ve partikül boyutu, zeta potansiyeli, içeriğindeki ilaç miktarı gibi parametrelerindeki değışiklikler kontrol edilmiştir. Kontrol sonucunda partiküllerin tipik değerlerinde belirgin bir değışim olmadığı gözlemlenmiştir.

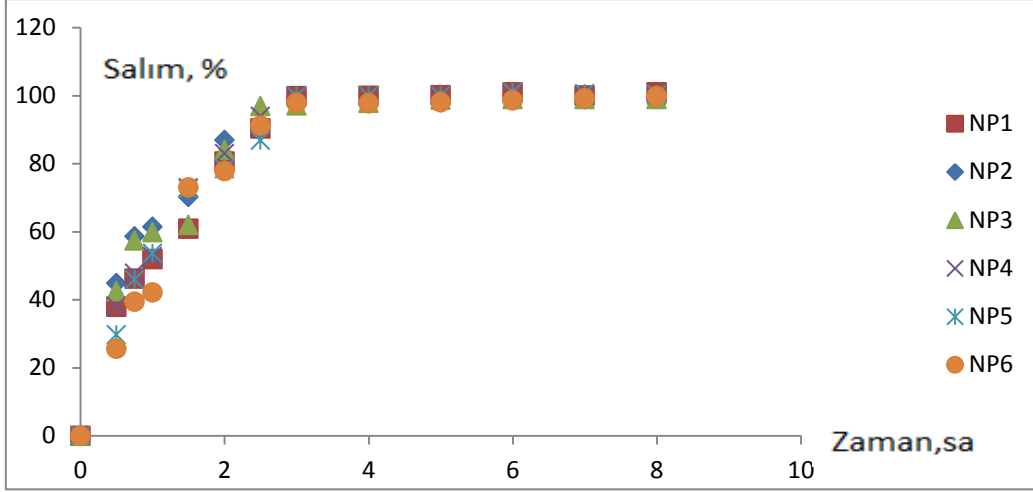
Tablo- 16: Stabilité çalışmasının sonuçları

Nanopartikül	Partikül Boyutu, nm	Zeta Potansiyeli,mV	EE, %
NP-1,T0	85,09	-20,5	80,12
NP-2,T0	85,51	-20,1	79,78
NP-3,T0	85,67	-21,0	80,47
NP-1,T1	85,17	-20,3	80,1
NP-2,T1	85,62	-19,7	79,77
NP-3,T1	85,65	-20,6	80,4

T0: Başlangıç anındaki değerler, T1: 1. Ay sonundaki değerler

3.3.8. In Vitro Salım Çalışması

Hazırlanan DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro salım profillerinin gözlemlenebilmesi için numuneler pH 6,8 tamponunda, 37°C sıcaklıkta ve 100 rpm hızında dağıtıldı. Daha önceden hazırlanmış olan diyaliz membran içinden salım miktarları belirlenen zaman aralıkları için kontrol edildi. Her örnekleme akabinde salım sistemine alınan numune kadar çözünme ortamı enjekte edilmiştir. Belirlenmiş olan örnekleme zamanları t: 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5 3; 4; 5; 6;7 ;8 saat zaman aralıkları olarak seçilmiştir.



Şekil- 39: DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin in- vitro salım profili (n=6 numune)

Gerçekleştirilen salım çalışmalarının sonucunda partiküllerin ortalama 3 saatte % 100 salıma ulaştıkları hesaplanmıştır.

4. YORUM

Son yıllarda sağlık sektöründe yaşanan olumlu gelişmeler sayesinde ortalama yaşam süresinde artış olmuştur. Ortalama yaşam beklentisinde oluşan artış ile 65 yaş ve üzeri nüfus popülasyonunda artış meydana gelmiştir. Orta yaş üstü nüfusun artması ise başta demans gibi hafıza problemlerinden kaynaklanan ve yaşla artış gösteren hastalıkların görülme sıklığını etkilemektedir.⁵ Günümüzde dünya çapında yaklaşık 46 milyon demanslı bulunmaktadır. Hastalığın nedeni bilinmemektedir ve günümüzde dejeneratif prosesi durduracak ya da yavaşlatacak bir tedavi yöntemi yoktur.¹ AH'nın neden olduğu bilişsel fonksiyonları iyileştirmek, mental ve duygusal değişiklikleri kontrol altına almak ve sonuçta hastanın hayat kalitesini yükseltmek amaçlanarak uygulanan bir takım semptomatik tedaviler mevcuttur.⁵ Ancak yine de AH'na karşı uygulanan koruyucu ve terapötik stratejilerin çoğu hala çok sınırlıdır ve daha etkili stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.¹³ Gelişmiş ülkelerde AH 4. önde gelen ölüm nedeni olmuştur.² Kolinergik eksiklik AH'nın en temel patolojik özelliklerinden biridir. Bu eksiklik AH'nın primer semptomları olan bilinç ve hafıza kaybı ile ilişkilidir.¹³ Donepezil AH tedavisinde kullanılan reversible bir kolinesteraz inhibitörüdür.

Kolinergik sistem öğrenme, hafıza ve Alzheimer hastalığında kolinergik disfonksiyondan kaynaklanan şiddetli hafıza bozukluklarında önemli bir rol oynamaktadır.³ Donepezil, FDA tarafından onay alan (1996) ikinci kolinesteraz inhibitörü ve piperidin türevidir.^{5,3}

Kan Beyin Bariyeri (KBB) ; kan dolaşımı ve santral sinir sistemi (SSS) arasındaki dinamik, fiziksel ve biyolojik bir bariyerdir.¹ KBB, AH tedavisindeki en önemli engellerden birini oluşturmaktadır. Bu bariyerin üstesinden gelmek için; ön-ilaç/ko-ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları, antibadiler gibi partikül taşıyıcı sistemler, lipozomlar ya da nanopartiküller (NP) gibi bir çok strateji geliştirilmiştir.³ KBB beyne homeostatik kendi kendini koruma mekanizması sağlarken aynı zamanda

ilaç taşıma açısından aşılmaz bir engel oluşturarak nörolojik hastalıkların tanı ve tedavisini zorlaştırır.¹

Geleneksel taşıma mekanizmalarındaki yetersizlik nedeniyle ilaç moleküllerinin KBB'ni geçebilmesi için KBB'nin osmotik olarak açılması ya da ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gibi yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.¹ KBB'ni atlatan girişimsel teknikler arasında ilaç taşıyıcı nanoboyutlu sistemlerin kullanımı ve intranazal yol bulunmaktadır.¹

Nanoteknoloji maddenin çok küçük bir ölçekte kullanımı ve manipülasyonudur. Bu ölçülerde atomlar ve moleküller farklı çalışırlar ve geniş bir alanda ilginç kullanım olanakları sağlarlar.²⁰ Nanopartiküller geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler ile kıyaslandığında yüksek stabilite, yüksek spesifiklik, yüksek ilaç taşıma kapasitesi, kontrollü salım yeteneği, farklı rotalarda kullanım olasılığı ve hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçların taşınabilmesi gibi belirgin avantajlara sahiptirler.²⁰ Polimerik nanopartiküllerin sentezinin geliştirilmesi gen, protein ve ilaç taşınımı alanında belki de en başarılı gelişimlerden biridir.²¹ 1-100 nm boyutundaki nanomateryaller fizikokimyasal özellikleri ve fonksiyonelleştirmeye olanak sağlamaları sayesinde KBB'ni geçme ve bu sorunun çözümü için potansiyel bir biyomedikal araç oluşturur.¹ Polimerik nanopartiküller nanometrik boyutlarıyla ilaçları in vitro ve in vivo bozunmadan korurlar, ilacı kontrollü bir şekilde salabilirler ve ilaç hedeflendirme olasılığı sunarlar.⁴ Kan beyin bariyerini atlatan girişimsel teknikler arasında ilaç taşıyıcı nanoboyutlu sistemlerin kullanımının yanı sıra intranazal yol da bulunmaktadır.

Bu çalışmada, partiküller içindeki etken maddenin tayini için literatürdeki farklı sistemler ile hazırlanan farklı HPLC yöntemleri incelenmiştir. Kullanılan analitik yöntem literatürde mevcut olan bir metottan¹⁶ yola çıkılarak geliştirilmiştir. Literatür metodu için gerçekleştirilen mobil faz içeriği ve mobil faz oranı üzerinde yapılan değişiklikler sonucunda literatüre DNP etken maddesinin tayininde kullanılmak üzere uygulanabilecek kısmen daha pratik bir metot kazandırılmıştır. Bu amaçla Bölüm 2.2.1.1'de belirtilmekte olan 2 numaralı yöntem kullanılmıştır. Analitik metot için uygulanan metodun koşullarına ait ayrıntılar Tablo-6'da verilmektedir. 50 µl

enjeksiyon hacmi, 1 ml/dk. akış hızı, 268 nm dalga boyu, 25°C kolon sıcaklığı, mobil faz a olarak 1L suda 0,25 ml GAA ve 1 ml TEA, mobil faz b olarak metanol, mobil faz oranı % 50- % 50 ve kolon tipi ACE C18 250 cm x 4,6 mm x 5 µm'dir. Bu koşullar uygulanarak kurulan HPLC sisteminden elde edilen kromatogram Şekil-15'te verildiği gibidir. Etken madde piki için alıkonma zamanı 4,195 dk., kuyruklanma faktörü < 1,0 ve teorik plaka sayısı 3857'dir. Elde edilen değerler ICH Guideline ile uyumludur.

Analitik metot için kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi aşamasında Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı gibi 1 mg/ml derişiminde hazırlanan stok çözeltisi seyreltilerek 7 farklı konsantrasyonda (1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 3,0 µg/ml, 4,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 6,0 µg/ml ve 7,0 µg/ml) kalibrasyon numuneleri hazırlanmıştır. Hazırlanan numuneler 2'şer defa analiz edilmiş ve elde edilen alanların ortalama değerleri alınarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil-33'te verilmektedir. Kalibrasyon doğrusundan elde edilen doğru denklemi için eğim 2,5143 ve R² değeri 0,9993 olarak raporlanmıştır. R² değeri >0,99 olması analitik bir metodun doğrusallığını kanıtlamakla birlikte, bu değer 1'e olan yakınlığı sistemin doğrusallığını ifade etmektedir. Bu nedenle raporlanmış olan 0,9993 değeri sistemin doğrusallığını kanıtlamak için yeterli ve uygun bulunmuştur.

Kullanılan analitik metodun özgüllüğünün kanıtlanması için Bölüm 2.2.1.3.1'de anlatıldığı gibi etken madde pikinin analize katılan diğer bileşenlerden gelen herhangi bir absorbans ile çakışmaması gerekmektedir. Eğer herhangi bir çakışma söz konusu ise bile cevap faktörü etken maddenin LOD (limit of detection) değerinin % 20'sinden küçükse metot seçici kabul edilir.⁴⁰ Bu nedenle, DNP çözeltisi, çözücü, PLGA çözeltisi, PLGA çözücüsü, mobil faz A, mobil faz B, pH 6,8 tamponu, boş ve yüklenmiş NP çözeltisi numunelerinin her biri için analitik yöntem ile okumalar yapılmış (Şekil-16, Şekil-17, Şekil-18, Şekil-19, Şekil-20, Şekil-21, Şekil-22, Şekil-23, Şekil-24) ve etken madde ile aynı alıkonma zamanında absorbansları olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda elde edilen kromatogramlar içinde hiç birinde DNP etken maddesinin alıkonma zamanında, DNP etken madde piki ile çakışacak herhangi bir absorbansa rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlardan kullanılan analitik metodun DNP etken

maddesini ölçmek için seçici olduğu ve etken madde ölçümlerinde kullanılan diğer girdilerden hiçbirine ait girişim olmadığı kanıtlanmıştır.

Tekrarlanabilirlik parametresi Bölüm 2.2.1.3.2.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Analitik metodun tekrarlanabilirliğinin kanıtlanması için doğrusallık grafiği içindeki üç farklı konsantrasyonda hazırlanan 6' şar adet numune (4 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml) peş peşe analiz edilmiş ve numunelerden elde edilen alanlar kayıt altına alınmıştır. Aynı konsantrasyondaki farklı numunelerin ardışık okutulmalarından elde edilen sonuçlar arasındaki SD değerlerinin sırasıyla 0,03, 0,03, ve 0,04 olarak elde edilmesi ve RSD değerlerinin sırasıyla 0,001, 0,013 ve 0,000 olması¹⁷² metodun kesinliğini kanıtlamaktadır. Çünkü standart sapma değerleri <2,0'dır.

Analitik metodun ara kesinliğinin kanıtlanması Bölüm 2.2.1.3.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Ara kesinlik parametresinin kanıtlanması için farklı gün aynı koşullar için hazırlanan aynı konsantrasyonlardaki numunelerin ardışık ölçümünden elde edilen RSD değerlerinin 4 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml konsantrasyonları için sırasıyla 0,002, 0,024 ve 0,001 olması ve elde edilen standart sapma değerlerinin 1. gün için 0,03, 0,03, 0,04 ve 2. gün için 0,06, 0,06 ve 0,04 olarak raporlanması metodun ara kesinliğini¹⁷² kanıtlamaktadır. Çünkü standart sapma değerleri <2,0'dır.

Metodun doğruluk ve geri kazanımı parametresini kanıtlamak için gerçekleştirilen çalışmalar Bölüm 2.2.1.3.4'te anlatıldığı gibidir. Seçilen 3 farklı konsantrasyonda (2,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 6,0 µg/ml) hazırlanan numuneler HPLC sisteminde analiz edilmiştir. Analizler sonucunda hesaplanan konsantrasyonların teorik konsantrasyonlardan sapması hesaplanmıştır. Teorik konsantrasyonlardan sapmalar Tablo-9'da verildiği gibi 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 6 µg/ml konsantrasyonları için sırasıyla ±0,03, ±0,02 ve ±0,02 ve % doğruluk değerleri ise %99,00, %100,00 ve %101,00 olarak raporlanmıştır.

LOD değerinin hesaplanabilmesi için elde edilen standart sapma değeri doğrusallık parametresinin kanıtlanması aşamasında çizilen lineerite grafiğine ait denklemin eğimine oranlanarak 3,3 ile çarpılmıştır. Bu çalışma sonucunda DNP

etken maddesinin analizi için geliştirilen miktar tayini metodunun LOD değeri 0,09 µg/ml olarak hesaplanmıştır. LOQ değerinin hesaplanabilmesi için elde edilen standart sapma değeri doğrusallık parametresinin kanıtlanması aşamasında çizilen lineerite grafiğine ait denklemin eğimine oranlanarak 10 ile çarpılmıştır. Bu çalışma sonucunda DNP etken maddesinin analizi için geliştirilen miktar tayini metodunun LOQ değeri 0,28 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen analitik metot özgüllük, doğrusallık, doğruluk ve geri kazanım ve kesinlik parametreleri açısından kontrol edilmiştir. Yapılan kontroller sonucunda geliştirilen analitik metodun DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin etken madde miktar tayini analizi için kullanılmasının uygun olduğu kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada, DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması için birden fazla yöntem denenmiştir. Nanopartikül hazırlanması için kullanılan 1. Yöntem-A Alaa ve ark. tarafından geliştirilen PLGA- Poloksamer nanopartikül hazırlama metodunun⁴³ revize edilmesiyle geliştirilmiştir. Bu yöntemle NP hazırlığının ayrıntısı Bölüm 3.3.3'te verildiği gibidir. Hazırlanan nanopartiküllerin n=3 numune için ortalama partikül boyutu 8350 ± 152 nm olarak elde edilmiştir. Nanoçöktürme metodu ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutuna en fazla etkileyen parametreler arasında polimer konsantrasyonu, kullanılan polimerin molekül ağırlığı ve laktik-glikolik oranı, seçilen çözücüler ve kullanım oranları, seçilen surfaktan tipi, etken madde yüklenmesi olarak raporlanmıştır.²⁵ Bu çalışmada nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan NP'lerin partikül boyutuna çözelti uzaklaştırma basamağının etkisinin görülmesi için Bölüm 3.3.3'te kullanılan partikül hazırlama yöntemi olan 1. Yöntem A'nın çözücü buharlaştırma basamağı açık hava basıncı altında ve oda kuşullarında iken düşük basınç altında ve yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilmesi için değişiklikler yapılmış ve kullanılan bu yöntem 1. Yöntem B olarak adlandırılmıştır. Çözücü buharlaştırma basamağında yapılan bu değişiklik sonucu elde edilen NP'lerin partikül boyutunun n=3 numune için % 95,5 oranında 323 ± 20 nm ve % 4,5 oranında 4733 ± 243 nm olduğu raporlanmıştır. Bu çalışmadan nanoçöktürme metodu ile üretilen NP'lerin partikül boyutuna etki eden parametreler arasında çözücü buharlaştırma basamağının da önemli bir parametre olabileceği, özellikle bu aşamadaki sıcaklık ve basınç farklarının elde

edilen NP boyutuna etki edebileceği düşünülmektedir. Bunun bir nedeninin farklı sıcaklıklarda çözelti içindeki partiküllerin kinetik enerjisinden kaynaklanan hareketlerinden dolayı daha yüksek sıcaklıklarda daha hareketli oldukları için partikül-partikül etkileşmesi ile birlikte partiküller arası agregasyonu azaltabileceği düşünülmektedir.

Nanoçöktürme yönteminin iyileştirilmesine rağmen elde edilen partiküllerin boyutları istenilen <100 nm aralığında olmadığı için 2. yöntem denenmiştir. Partikül boyutunun <100 nm olması istenmektedir çünkü Desai ve ark.¹⁷³ Cacu-2 hücreleriyle yaptıkları çalışmada 100 nm boyutundaki NP'lerin hücre içine alımlarının 1 µm boyutundaki partiküllere kıyasla 2,5 kat daha fazla olduğunu ve 10 µm boyutundaki partiküllere kıyasla ise 6 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanı sıra özellikle 100 nm civarındaki nanoboyutlu sistemlerin hücre içine alınmalarında mikropartiküler sistemlere nazaran 15-250 kat daha avantajlı olduğu gösterilmiştir.¹⁷⁴

2. yöntemden elde edilen partiküller çözücü buharlaştırma basamağında gözle görülür şekilde agregate oldukları için partikül boyutu tayin edilmemiştir. Bunun çözelti içindeki polimer konsantrasyonunun yüksek olmasından dolayı partiküller arası agregasyonu tetiklediği için gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Uygulanan 3. yöntemde ise elde edilen partikül boyutları $209,8 \pm 1,25$ nm olarak raporlanmıştır. Çözücü buharlaştırma aşamasında yapılan değişikliğin çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan partiküllere de etki edip etmediğinin gözlemlenmesi için çözücü buharlaştırma basamağı değiştirilmiştir. Yapılan değişikliğin partikül boyutunu düşürdüğü ($141,1 \pm 0,97$ nm) gözlemlenmiştir. Çözücü buharlaştırma metodu ile sentezlenen NP'lerin partikül boyutunun çözücü buharlaştırma aşamasında sıcaklığın düşürülmesi, basıncın yükseltilmesi ve karıştırma hızının artırılması ile düşmesi bu aşamaya kadar hazırlanmış emülsiyonun ortam koşullarında stabil olmasından dolayı yükselen sıcaklık ve alçalan basıncın partiküller arası elektrostatik itme kuvvetlerinin aşılmasına neden olabileceği için partikül boyutunu arttırdığı düşünülmüştür.

3. yöntem B için nanopartikül boyutuna etki eden parametreler araştırılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda polimer miktarının artmasının nanopartikül boyutunu arttırdığı ($148,9 \pm 0,91$ nm) , polimer miktarının azaltılmasının ise partikül boyutunu düşürdüğü ($135,3 \pm 1,78$ nm) gözlemlenmiştir. Polimer miktarı arttıkça iç faz viskozitesi artmaktadır, artan iç faz viskozitesi ise partiküller arası kayma geriliminin düşmesine neden olduğundan dolayı partikül boyutu artmaktadır.^{175,177,178}

PVA miktarının azaltılması partikül boyutunun düşmesine neden olmuştur ($123,7 \pm 1,08$ nm) . PVA miktarının artması ise partikül boyutunda ufak da olsa artmaya neden olmuştur ($144,4 \pm 1,74$ nm) . PVA derişiminin artmasıyla emülsiyonun yüzey geriliminde azalma meydana geleceği için partikül boyutunun düşmesi beklenir ancak, artan PVA konsantrasyonu ile partikül boyutunun az da olsa artması ve azalan PVA konsantrasyonu ile partikül boyutunun azalması başlangıçta eklenen PVA miktarının emülsiyon viskozitesini arttırdığı için partikül boyutunda artışa neden olmuştur.^{175,176}

Sonikasyon süresinin azalması partikül boyutunu arttırmıştır ($145,2 \pm 0,78$ nm) . Sonikasyon süresinin artması ise partikül boyutunu azaltmıştır ($95,64 \pm 1,27$ nm) . Ultrasonikasyon emülsiyon damlacıklarının küçülmesine neden olmaktadır ve bu nedenle oluşan partiküllerin partikül boyutunun küçülmesine yardımcı olmuştur.^{29,179}

Santrifüj süresinin değişmesinin partikül boyutuna belirgin bir etkisi gözlemlenmemiştir.

Etken madde miktarının azalması partikül boyutunu belirgin ölçüde değiştirmemiş ($142,1 \pm 1,55$ nm) ancak etken madde miktarının artması partikül boyutunu küçülmüştür ($121,7 \pm 1,54$ nm) . Bu durumun etken madde yüklenmesi ile birlikte partiküllerin yüzey yükünün değişmiş olabileceğinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmanın sonucunda ultrasonikasyon süresi 2 dk olarak arttırılmıştır. DNP miktarı 0,2 mg olacak şekilde arttırılmış, PVA miktarı 2 ml olacak şekilde

azaltılmıştır (4. yöntem) . Bu yöntem ile hazırlanan partiküllerin ortalama partikül boyutu $85,05 \pm 0,59$ nm ve PDI değeri $0,065 \pm 0,017$ olarak raporlanmıştır. Partiküllerin zeta potansiyeli $-20,8 \pm 0,71$ mV olarak ölçülmüştür. Sonuçlar Bhavna ve ark.³ çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri 6 farklı numune için sırasıyla $79,5 \pm 0,87$, $80,5 \pm 0,87$, $79 \pm 0,87$, $79,75 \pm 0,87$, $80,9 \pm 0,87$, $81,25 \pm 0,87$ olarak elde edilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin yüklenme oranları 6 farklı numune için sırasıyla $17,5 \pm 0,71$, $18,5 \pm 0,71$, $16,5 \pm 0,71$, $18 \pm 0,71$, $17,5 \pm 0,71$, $17 \pm 0,71$ olarak elde edilmiştir. Partiküllerin hazırlanma verimleri 3 farklı numune için sırasıyla 74,80769, 77,11538, 76,73077 olarak elde edilmiştir.

Hazırlanan partiküllerin, DNP etken maddesinin ve PLGA polimerinin FTIR spektrumları çekilmiştir. Elde edilen spektrumlardan Donepezil'in FTIR spektrumundaki spesifik girişimlerin (Şekil-36) DNP yüklü NP'lerin FTIR spektrumunda da mevcut olduğu (Şekil-38) gözlemlenmiş olup, bunun nanopartiküllere ilaç yüklenmiş olmasının başka bir kanıtı olduğu gibi PLGA polimeri ile ters bir etkileşime girmediğinden spesifik girişimlerini kaybetmediği sonucuna ulaşılabilmektedir.³

Hazırlanan nanopartiküller 1 ay boyunca 5°C sıcaklıkta bekletilmiş ve partikül boyutu, zeta potansiyeli, içeriğindeki ilaç miktarı gibi parametrelerindeki değişiklikler kontrol edilmiştir. Kontrol sonucunda partiküllerin tipik değerlerinde T0 ile T1 zamanları arasında belirgin bir değişim olmadığı gözlemlenmiştir.

Gerçekleştirilen in vitro salım çalışmalarının sonucunda partiküllerin ortalama 3 saatte % 100 salıma ulaştıkları hesaplanmıştır. Bu şekilde gözlemlenen hızlı salımın patlama etkisinden (burst effect) kaynaklandığı düşünülmektedir. Partikül boyutları nispeten küçük olduğu için nanopartiküller ilaç etken maddesinin tutunabilmesi için geniş bir yüzey alanı sağlamakta, bu nedenle etken maddeler partiküller içine hapsedilmekten çok yüzeye tutundukları için bu etkiyi göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

Bu alışma sonucunda kullanılan yöntem ile hazırlanan DNP yüklü PLGA nanopartiküllerinin partikül boyutuna etkileyen parametreler belirlenmiştir. Bu parametreler içinde en belirgin olanının sonikasyon süresi ve solvent uçurma yolu olduğu belirlenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu, enkapsülasyon etkinliği, yüklenme oranları ve in vitro salım çalışmalarından elde edilen sonuçlar işığında partiküllerin in vivo çalışmalarda denenmelerinin uygun olabileceği tespit edilmiştir. Kısa dönem stabilite değerlerinin uygunluğu partiküllerin daha zorlayıcı koşullarda stabilite çalışmalarının yapılmasının faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Bu alışma sonucunda hazırlanan nanopartiküllerin intranazal yol ile KBB'ni aşma olasılığı daha yüksek olduğundan hazırlanacak partikül solüsyonlarının intranazal uygulanması ile doğrudan beyne iletilmesi olasılığı değerlendirilebilir. Bu şekilde kan beyin bariyeri aşılacak ve ilacın biyoyaralanımında artışın sağlanabileceği öngörülmektedir.

REFERANSLAR

- [1] Nadir Dereli, Özge Gün, Canan Hasçıçek, Alzheimer Hastalığı tedavisinde nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı, Derleme, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji A.D. ,2016
- [2] Pengcheng Zhang, Lingli Chen, Wangwen Gu, In vitro and in vivo evaluation of donepezil- sustained release microparticles for the treatment of Alzheimer's disease, ScienceDirect, Biomaterials 28 (2007) 1882-1888,
- [3] Bhavna,Shadab Md, Mushir Ali, Preparation, characterization, in vivo biodistribution and pharmacokinetic studies of donepezil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting, Drug Dev Ind Pharm, Early Online:1-10, 2013,
- [4] Natarajan Jawahar, Meyyanathan SN, Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review;International journal of health & allied sciences, Vol.1, Issue 4, Oct-Dec 2012,
- [5] Bihter Erdoğan, Alzheimer Hastalığı ve Tedavisinde Kullanılan İlaçlar, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Bitirme Ödevi, Haziran 2014,
- [6] Prof. Dr. Engin Eker, Alzheimer Hastalığı, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Türkiye'de sık karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar, Sempozyum Dizisi No:62, Mart 2008, S:85-110,
- [7] Nebi Yılmaz, Kan Beyin Bariyerinin Fizyopatolojisi, Van Tıp Dergisi:13 (19): 25-27,2006,
- [8] Uz. Dr. Cem Sezer, Prof. Dr. Leyla Memiş, Alzheimer Hastalığı Histopatolojisi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Demans Dergisi, 2001;1: 42-49,

- [9] Dr. Pervin K. İşeri, Dr. Hüsnü Efendi, Alzheimer Hastalığında Donepezil ve Rivastigmin'in Etkinliği ve Güvenirliği, Turkish Journal of Geriatrics, Geriatri 6(4): 119-123,2003,
- [10] Ümide Demir Özkay, Yusuf Öztürk, Özgür Devrim Can, Yaşlanan dünyanın hastalığı : Alzheimer hastalığı, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji A.D.,Derleme, 2010,
- [11] Dr. Esen Saka Topçuoğlu, Dr. Kaynak Selekler, Alzheimer Hastalığı, Turkish Journal of Geriatrics, Geriatri 1 (2):63- 67, 1998,
- [12] Kaynak selekler, Alois Alzheimer ve Alzheimer Hastalığı, Turkish Journal of Geriatrics, Özel sayı 3/ 2010 (9-14),
- [13] Bhavna, Shadab Md, Mushir Ali, Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: in vitro and in vivo safety evaluation, Internal Journal of Biological Macromolecules, 67 (2014) 418-425,
- [14] Nevzat Yüksel, Alzheimer Hastalığının İlaçla Tedavisi, Klinik Psikiyatri, 2000;3;137-141 ,
- [15] A. Shurwaikar, S. Devi, Rajagopal.P.L., Kiron S.S. & Sreejith.K.R., Development and Validation of Analytical Method for Determination of Donepezil HCl in Pure and Dosage Forms, Asian Journal of Pharm. and Clinical Research, Vol 7, Suppl 1, 2014,
- [16] T.Senthil Kumar, P.Solairaj, A. Thangathirupathi, Analytical Method Development and Validation of Donepezil Hydrochloride Tablets by RP-HPLC, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 3, Issue 3, 2011,
- [17] USP Official Monograph, Donepezil, Revision Bulletin,Official May 1,2011,
- [18] Sefa Gültürk, Gonca İmir, Ersin Tuncer, Kan Beyin Bariyeri, Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal) 2007; 29(2) :147-154,

- [19] Ceyda Tuba Şengel-Türk, Canan Haşçıçek, Nurşin Gönül, Beyne İlaç Hedeflendirilmesinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler, Journal of Neurological Sciences [Turkish] 24:(3)# 12;254-263, 2007,
- [20] Sovan Lal Pal, Uptal Jana, P.K. Manna, Nanoparticle: An Overview of preparation and characterization, Journal of Applied Pharmaceutical Science 01 (06); 2011; 228-234,
- [21] Archana Raichur, Yoshikata Nakajima, Hollow polymeric (PLGA) nano capsules synthesized using solvent emulsion evaporation method for enhanced drug encapsulation and release efficiency, Materials Research Express, 1 (2014) 045407,
- [22] Hideki Murakami, Masao Kobayashi, Hirofumi Takeuchi, Preparation of PLGA Nanoparticles by Modified Spontaneous Emulsification Solvent Diffusion Method, Internal Journal of Pharmaceuticals, 187 (1999)143-152,
- [23] Nagavarma B.V.N, Different Techniques for Preparation of Polymeric Nanoparticles- A Review, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, Vol 5, Suppl 3,2012,
- [24] C.Tuba Şengül Türk,Z.Sezgin Bayındır,U. Badıllı,Preparation of polymeric nanoparticles using different stabilizing agents, Ankara Ecz. Fak. Derg 38 (4) 257-268,2009,
- [25] Carlos E, Astete &Cristina M. Sabliov, Synthesis and Characterisation of PLGA Nanoparticles, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,Vol 17,No 3, pp 247-289 (2006),
- [26] P.K. Ghosh, Hydrophilic Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers, Indian Journal of Biochemistry Biophysics,Vol. 37, October 2000, pp 273-282,
- [27] Avnesh Kumari, Sadesh Kumar Yadav,Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems, Colloids and Surfaces , Biointerfaces 75 (2010)1-18,

- [28] Stephanie Desgouilles, The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study, *Langmuir* 2003, 19, 9504-9510 ,
- [29] K. Landfester, J. Eisenblatter and R. Rothe, *JCT Res.* **1**, 65 (2004).,
- [30] T. Mason and J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3481 (1996),
- [31] T. Mason and J. Bibette, *Langmuir* **13**, 4600 (1997),
- [32] C. Song, V. Labhasetwar, H.Murphy, X. Qu,W. Humphrey, R. Shebuski and R. Levy, *J. Control Rel.* **43**, 197 (1997),
- [33] M. Julienne,M. Alonso, J. Gomez Amoza and J. Benoit, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **18**, 1063 (1992),
- [34] L. Mu and S. Feng, *J. Control. Rel.* **86**, 33 (2003),
- [35] P. Pietzonka, E. Walter, S. Duda-Johner, P. Langguth and H. Merkle, *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**, 39 (2002),
- [36] K. Dillen, J. Vandervoort, G. Van der Mooter, L. Verheyden and A. Ludwig, *Int. J. Pharm.* **275**, 171 (2004),
- [37] Masoom Raza, Siddiqui, Zeid A. Alonthman,Nafisur Rahman, Analytical Techniques in Pharmaceutical Analysis-A Review, *Arabian Journal of Chemistry*, Accepted Manuscript, (2013),
- [38] N. Jawahar,T. Eagappanath,Nagasamy Venkatesh, Jubie.S,Samanta M.K, Preparation and Characterisation of PLGA- Nanoparticles Containing an Anti-Hypertensive Agent, *International Journal of Pharmatech Research*, Vol.1,NO.2,PP390-393,April-June 2009,
- [39] Horacio Pappa , A new HPLC Method to Determine Donepezil Hydrochloride in Tablets, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27 (2002) 177-182

[40] European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation, 21 July 2011,

[41] Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, CDER, CBER, July 2015, Pharmaceutical Quality

[42] ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, June 1995, CPMP, ICH, 381, 95,

[43] Alaa H. Salama,¹ Azza A. Mahmoud,^{1,2} and Rabab Kamel^{1,3}, A Novel Method for Preparing Surface-Modified Fluocinolone Acetonide, Loaded PLGA Nanoparticles for Ocular Use: In Vitro and In Vivo Evaluations, American Association of Pharmaceutical Scientists, 20 November 2015

[44] Uz. Dr. Ümmühan Altın, Uz. Dr. Lütfü Hanoğlu, Alzheimer Hastalığında Donepezil Hidroklorür Etkinliğinin Kantitatif EEG ile Değerlendirilmesi, DEMANS DİZİSİ, 1999

[45] Jaber Emami, Aida Pourmashhadi, Hojat Sadeghi, Jaleh Varshosa & Hamed Hamishehkar, Formulation and Optimization of Celecoxib-Loaded PLGA Nanoparticles by the Taguchi Design and Their in Vitro Cytotoxicity for Lung Cancer Therapy, *Pharmaceutical Development and Technology*, 2015; 20(7): 791-800

[46] J. Anderson and M. Shive, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **28**, 5 (1997).

[47] K. Westesen, H. Bunjes, G. Hammer and B. Siekmann, *J. Pharm. Sci. Technol.* **55**, 240 (2001).

[48] I. Brigger, C. Dubernet and P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 631 (2002).

[49] M. Chorny, I. Fishbein, H. Danenberg and G. Golomb, *J. Control. Rel.* **83**, 389 (2002).

[50] G. Barrat, G. Courraze, C. Couvreur, E. Fattal, R. Gref, D. Labarre, P. Legrand, G. Ponchel and C. Vauthier, in: *Polymeric Micro- and Nanoparticles as drug Carriers. In Polymeric Biomaterials*, S. Dumitriu (Ed.), 2nd edn, p. 753. Marcel Dekker, New York, NY (2000).

- [51] E. Nakache, N. Poulain, F. Candau, A. Orecchioni and J. Irache, in: *Handbook of Nanostructured Materials and Nanotechnology*, H. S. Nalwa (Ed.), p. 577. Academic Press, San Diego, CA (2000).
- [52] M. Hans and A. Lowman, *Curr. Opin. Solid State Matter Sci.* 6, 319 (2002).
- [53] G. S. Rao, M. S. Kumar, N. Mathivanan and M. B. Rao, *Pharmazie* 59, 5 (2003).
- [54] E. Allemann, R. Gurny and E. Doelker, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 39, 173 (1993).
- [55] S. Rani, R. Hiremath and A. Hota, *Indian J. Pharm. Sci.* 61, 69 (1998).
- [56] D. Quintanar-Guerrero, E. Allemann, H. Fessi and E. Doelker, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24, 1113 (1998).
- [57] S. Moghimi, A. Hunter and J. Murray, *Pharmacol. Rev.* 53, 283 (2001).
- [58] J. Panyam and V. Labhasetwar, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 329 (2003).
- [59] K. Avgoustakis, *Curr. Drug Deliv.* 1, 321 (2004).
- [60] I. Bala, S. Haribaran and R. Kumar, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 21, 387 (2004).
- [61] F. Alexis, *Polym. Int.* 54, 36 (2005).
- [62] Y. Konan, R. Cerny, J. Favet, M. Berton, R. Gurny and E. Allemann, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 115 (2003).
- [63] S. Kwon, J. Lee, S. Choi, Y. Jang and J. Kim, *Colloids Surf. A* 182, 123 (2001).
- [64] S. Lee, J. Jeong, S. Shin, J. Kim, Y. Chang, K. Lee and J. Kim, *Colloids Surf. A* 255, 19 (2005).
- [65] S. Choi, H. Kwon, W. Kim and J. Kim, *Colloids Surf. A* 201, 283 (2001).
- [66] M. R. Kumar, U. Bakowsky and C. Lehr, *Biomaterials* 25, 1771 (2004).
- [67] M. R. Kumar, S. Mohapatra, X. Kong, P. Jena, U. Bakowsky and C. Lehr, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 990 (2004).
- [68] P. Ahlin, N. Jerenec and J. Kristl, *Sci. Pharm.* 69, S167 (2001).
- [69] P. Ahlin, J. Kristl, A. Kristl and F. Vrecer, *Int. J. Pharm.* 239, 113 (2002).

- [70] Y. Konan, R. Gurny and E. Allemann, Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 233, 239 (2002).
- [71] M. Zweers, G. Engbers, D. Grijpma and J. Feijen, *J. Control. Rel.* 100, 347 (2004).
- [72] J. Eley, V. Pujari and J. McLane, *Drug Deliv.* 11, 255 (2004).
- [73] M. Prakobvaitayakit and U. Nimmannit, *AAPS PharmSciTech* 4(4), 1-9 (2003).
- [74] T. Govender, S. Stolnik, M. Garnett, L. Illum and S. Davis, *J. Control. Rel.* 57, 171 (1999).
- [75] N. Csaba, P. Caamano, A. Sanchez, F. Dominguez and M. Alonso, *Biomacromolecules* 6, 271 (2005).
- [76] T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou and Y. Kawashima, *J. Control. Rel.* 25, 89 (1993).
- [77] T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou and Y. Kawashima, *J. Pharm. Sci.* 83, 727 (1993).
- [78] T. Ameller, V. Marsaud, P. Legrand, R. Gref and J. Renoir, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 361 (2004). 34. T. Ameller, V. Marsaud, P. Legrand, R. Gref, G. Barrat and J. Renoir, *Pharm. Res.* 20, 1063 (2003).
- [79] Z. Panagi, A. Beletsi, G. Evangelatos, E. Livaniou, D. Ithakissios and K. Avgoustakis, *Int. J. Pharm.* 221, 143 (2001).
- [80] C. Oster, M. Wittmar, F. Unger, L. Barbu-Tudoran, A. Schaper and T. Kissel, *Pharm. Res.* 21, 927 (2004).
- [81] V. Saxena, M. Sadoqi and J. Shao, *Int. J. Pharm.* 278, 293 (2004).
- [82] N. Csaba, L. Gonzalez, A. Sanchez and J. Alonso, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 15, 1137 (2004).
- [83] F. De Jaeghere, E. Doelker and R. Gurny, in: *Encyclopedia of Control Drug Delivery*, E. Mathiowitz (Ed.), p. 641. Wiley, New York, NY (1999).
- [84] R. Alex and R. Bodmeier, *J. Microencapsul.* 7, 347 (1990).
- [85] W. Obeidat and J. Price, *J. Microencapsul.* 20, 57 (2003).
- [86] F. Mohammed and M. Hassan, *S.T.P. Pharm. Sci.* 13, 319 (2003).

- [87] S. Takada, Y. Yamagata, M. Misaki, K. Taira and T. Kurokawa, *J. Control. Rel.* 88, 229 (2003).
- [88] S. Park and S. Kim, *J. Colloid Interf. Sci.* 271, 336 (2004).
- [89] K. Holmberg, B. Jonsson, B. Kronberg and B. Lindman, in: *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*, 2nd edn, p. 451. Wiley, Chichester (2003).
- [90] M. Lopez-Quintela, *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* 8, 137 (2003).
- [91] B. Paul and S. Moulik, *Curr. Sci.* 80, 990 (2001).
- [92] K. Landfester, *Top. Curr. Chem.* 227, 75 (2003).
- [93] K. Bouchemal, S. Briancon, E. Perrier and H. Fessi, *Int. J. Pharm.* 280, 241 (2004).
- [94] K. Landfester, *Surfact. Sci. Ser.* 115, 225 (2003).
- [95] K. Landfester, J. Eisenblatter and R. Rothe, *JCT Res.* 1, 65 (2004).
- [96] J. Bibette, F. Leal-Calderon, V. Schmitt and P. Poulin, in: *Emulsion Science*, p. 79. Springer, Berlin (2002).
- [97] T. Mason and J. Bibette, *Phys. Rev. Lett.* 77, 3481 (1996).
- [98] T. Mason and J. Bibette, *Langmuir* 13, 4600 (1997).
- [99] V. Schmitt, F. Leal-Calderon and J. Bibette, *Top. Curr. Chem.* 227, 195 (2003).
- [100] X. Zhao and J. Goveas, *Langmuir* 17, 3788 (2001).
- [101] M. Julienne, M. Alonso, J. Gomez Amoza and J. Benoit, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 18, 1063 (1992).
- [102] J. Panyam, D. Williams, A. Dash, D. Leslie-Pelecky and V. Labhasetwar, *J. Pharm. Sci.* 93, 1804 (2004).
- [103] L. Mu and S. Feng, *J. Control. Rel.* 86, 33 (2003).
- [104] P. Pietzonka, E. Walter, S. Duda-Johner, P. Langguth and H. Merkle, *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 39 (2002).
- [105] C. Song, V. Labhasetwar, H. Murphy, X. Qu, W. Humphrey, R. Shebuski and R. Levy, *J. Control. Rel.* 43, 197 (1997).

- [106] T. Chung, Y. Huang and Y. Liu, *Int. J. Pharm.* 212, 161 (2001).
- [107] T. Chung, Y. Huang, Y. Tsai and Y. Liu, *J. Microencapsul.* 9, 463 (2002).
- [108] M. Ficheux, L. Bonakdar, F. Leal-Calderon and J. Bibette, *Langmuir* 14, 2702 (1998).
- [109] K. Pays, J. Giermanska-Kahn, B. Pouligny, J. Bibette and F. Leal-Calderon, *Langmuir* 17, 7758 (2001).
- [110] K. Pays, J. Giermanska-Kahn, B. Pouligny, J. Bibette and F. Leal-Calderon, *J. Control. Rel.* 79, 193 (2002).
- [111] A. Domb and L. Bergelson, in: *Microencapsulation: Methods and Industrial applications*, S. Benita (Ed.), p. 411. Marcel Dekker, New York, NY (1996).
- [112] S. Prabha and V. Labhasetwar, *Pharm. Res.* 21, 354 (2004).
- [113] J. Aukunuru, S. Ayalasomayajula and U. Kompella, *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 1199 (2003).
- [114] K. Dillen, W. Weyenberg, J. Vandervoort and A. Ludwig, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 539 (2004).
- [115] J. Vandervoort, K. Yoncheva and A. Ludwig, *Chem. Pharm. Bull.* 52, 1273 (2004).
- [116] P. Yan, Z. Huiying, X. Hui, W. Gang, H. Jinsong and Z. Junming, *J. Chin. Pharm. Sci.* 11, 38 (2002).
- [117] J. Vandervoort and A. Ludwig, *Int. J. Pharm.* 238, 77 (2002).
- [118] S. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha and V. Labhasetwar, *J. Control. Rel.* 82, 105 (2002).
- [119] K. Dillen, J. Vandervoort, G. Van der Mooter, L. Verheyden and A. Ludwig, *Int. J. Pharm.* 275, 171 (2004).
- [120] T. Nakashima, M. Shimizu and M. Kukizaki, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 45, 47 (2000).
- [121] N. Christov, D. Ganchev, N. Vassilena, N. Denkov, K. Danov and P. Kralchevsky, *Colloids Surf. A* 209, 83 (2002).
- [122] S. Joscelyne and G. Tragardh, *J. Membr. Sci.* 169, 107 (2000).
- [123] N. Yamazaki, H. Yuyama, M. Nagai, G. Ma and S. Omi, *J. Dispers. Sci. Technol.* 23, 279 (2002).

- [124] S. Pamujula, R. Graves, T. Freeman, V. Srinivasen, L. Bostanian, V. Kishore and T. Mandal, *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 1119 (2004).
- [125] B. Kim, D. Kim, S. Cho and S. Yuk, *J. Microencapsul.* 21, 697 (2004).
- [126] M. Cegnar, A. Premzl, V. Zavasnik-Bergant, J. Kristl and J. Kos, *Exp. Cell Res.* 301, 223 (2004).
- [127] M. Cegnar, J. Kos and J. Kristl, *Eur. J. Pharm. Sci.* 22, 357 (2004).
- [128] H. Jeon, Y. Jeong, M. Jang, Y. Park and J. Nah, *Int. J. Pharm.* 207, 99 (2000).
- [129] Y. Jeong, C. Cho, S. Kim, S. Ko, S. Kim, Y. Shim and J. Nah, *J. Appl. Polym. Sci.* 80, 2228 (2001).
- [130] Y. Jeong, Y. Shim, K. Song, Y. Park, H. Ryu and J. Nah, *Bull. Kor. Chem. Soc.* 23, 1579 (2002).
- [131] Y. Jeong, Y. Shim, C. Choi, M. Jang, G. Shin and J. Nah, *J. Appl. Polym. Sci.* 89, 1116 (2003).
- [132] J. Jeong and T. Park, *J. Control. Rel.* 82, 159 (2002).
- [133] J. Jeong, Y. Byun and T. Park, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 14, 1 (2003).
- [134] H. Kim, S. Choi, H. Park and Y. Jang, *Polym. Mater. Sci. Eng.* 84, 972 (2001).
- [135] A. Hawley, L. Illum and S. Davis, *Pharm. Res.* 14, 657 (1997).
- [136] S. Stolnik, S. Dunn, M. Garnett, M. Davies, A. Coombes, D. Taylor, M. Irving, S. Purkiss, T. Tadros, S. Davis and L. Illum, *Pharm. Res.* 11, 1800 (1994).
- [137] Y. Kawashima, H. Yamamoto, H. Takeuchi, T. Hino and T. Niwa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 41 (1998).
- [138] H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi and Y. Kawashima, *Adv. Powder Technol.* 11, 311 (2000).
- [139] M. Ricci, G. Basta, R. Calafiore, G. Luca, C. Nastruzzi, S. Giovagnoli and C. Rossi, *Acta Technol. Legis Med.* 13, 73 (2002).
- [140] M. Cascone, Z. Zhu, F. Borselli and L. Lazzeri, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 13, 29 (2002).
- [141] X. Jiang, C. Zhou and K. Tang, *J. Centr. South Univ. Technol.* 10, 202 (2003).

- [142] G. Dawson and G. Halbert, *Pharm. Res.* 17, 1420 (2000).
- [143] P. Pietzonka, B. Rothen-Rutishauser, P. Langguth, H. Wunderli-Allenspach, E. Walter and H. Merkle, *Pharm. Res.* 19, 595 (2002).
- [144] M. Diwan, P. Elamanchili, H. Lane, A. Gainer and J. Samuel, *J. Drug Target.* 11, 495 (2003).
- [145] S. Feng, L. Mu, K. Win and G. Huang, *Curr. Med. Chem.* 11, 413 (2004).
- [146] M. Bivas-Benita, S. Romeijn, H. Junginger and G. Borchard, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 1 (2004).
- [147] K. Win and S. Feng, *Biomaterials* 26, 2713 (2005).
- [148] P. Elamanchili, M. Diwan, M. Cao and J. Samuel, *Vaccine* 22, 2406 (2004).
- [149] M. Blanco and M. Alonso, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 43, 287 (1997).
- [150] Y. Jiao, N. Ubrich, M. Marchand-Arvier, C. Vigneron, M. Hoffman and P. Maincent, *Drug Deliv.* 8, 135 (2001).
- [151] I. Gutierrez, R. Hernandez, M. Igartua, A. Gascon and J. Pedraz, *Vaccine* 21, 67 (2002).
- [152] J. Panyam, W. Zhou, S. Prabha, S. Sahoo and V. Labhasetwar, *FASEB J.* 16, 1217 (2002).
- [153] A. Sanchez, M. Tobio, L. Gonzalez, A. Fabra and M. Alonso, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18, 221 (2003).
- [154] J. Eyles, V. Bramwell, J. Singh, E. Williamson and H. Alpar, *J. Control. Rel.* 86, 25 (2003).
- [155] I. Scholl, A. Weissenboeck, E. Forster-Waldl, E. Untersmayr, F. Walter, M. Willheim, G. Boltz- Nitulescu, O. Scheiner, F. Gabor and E. Jensen-Jarolim, *Clin. Exp. Allergy* 34, 315 (2004).
- [156] A. Weissenboeck, E. Bogner, M. Wirth and F. Gabor, *Pharm. Res.* 21, 1917 (2004).
- [157] S. Prabha and V. Labhasetwar, *Mol. Pharm.* 1, 211 (2004).
- [158] E. Horisawa, T. Hirota, S. Kawazoe, J. Yamada, H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima, *Pharm. Res.* 19, 403 (2002).

- [159] T. Riley, T. Govender, S. Stolnik, C. Xiong, M. Garnett, L. Illum and S. Davis, *Colloids Surf. B* 16, 147 (1999).
- [160] J. Panyam, S. Sahoo, S. Prabha, T. Bargar and V. Labhasetwar, *Int. J. Pharm.* 262, 1 (2003).
- [161] D. Quintanar-Guerrero, E. Allemann, E. Doelker and H. Fessi, *Colloid Polym. Sci.* 275, 640 (1997).
- [162] B. Jeong, C. Windisch, M. Park, Y. Sohn, A. Gutowska and K. Char, *J. Phys. Chem. B* 107, 10032 (2003).
- [163] L. Dailey, E. Kleemann, M. Wittmar, T. Gessler, T. Schmehl, C. Roberts, W. Seeger and T. Kissel, *Pharm. Res.* 20, 2011 (2003).
- [164] Y. Konan, M. Berton, R. Gurny and E. Allemann, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18, 241 (2003).
- [165] J. Panyam and V. Labhasetwar, *Pharm. Res.* 20, 212 (2003).
- [166] Y. Nam, J. Park, S. Han and I. Chang, *Biotechnol. Lett.* 24, 2093 (2002).
- [167] R. Gref, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk and R. Muller, *Colloids Surf. B* 18, 301 (2000).
- [168] D. Birnbaum and L. Brannon-Peppas, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* 14, 87 (2003).
- [169] Y. Nam, H. Kang, J. Park, T. Park, S. Han and I. Chang, *Biomaterials* 24, 2053 (2003).
- [170] D. Chognot, J. Six, M. Leonard, F. Bonneaux, C. Vigneron and E. Dellacherie, *J. Colloid. Interf. Sci.* 268, 441 (2003).
- [171] S. Desgouilles, C. Vauthier, D. Bazile, J. Vacus and J. Grossiord, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 9504 (2003).
- [172] Shabir, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A*, 2003. 987(1-2): p. 57-66.

[173] Desai, M.P., et al., The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res*, 1997. 14(11): p. 1568-73

[174] Xie H, Smith JW. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *Journal of Nanobiotechnology*, 2010, 8: 1-7.

[175] Song, X., et al., (2008). "Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency", *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 69(2): 445-453.

[176] Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, (2005). "PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution", *International journal of pharmaceutics*, 290(1): 137-144.

[177] Halayqa, M. and U. Domańska, (2014). "PLGA Biodegradable Nanoparticles Containing Perphenazine or Chlorpromazine Hydrochloride: Effect of Formulation and Release", *International journal of molecular sciences*, 15(12): 23909-23923.

[178] Murakami, H., et al., (1999). "Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method", *International journal of pharmaceutics*, 187(2): 143-152.

[179] Solans C, I.P., Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ, (2005). "Nano-emulsions", *Curr Opin Colloid Interface Science*, 10: 102-110.