

KETOPROFEN LİZİN İÇEREN  
POLİ LAKTİK-KO-GLİKOLİK ASİT (PLGA)  
NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE  
İN-VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Akın ELMASKAYA

Eskişehir, 2019

**KETOPROFEN LİZİN İÇEREN  
POLİ LAKTİK KO GLİKOLİK ASİT (PLGA)  
NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE  
*İN-VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Akın ELMASKAYA**

**Yüksek Lisans Tezi**




**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ**

**ESKİŞEHİR  
Anadolu Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Temmuz 2019**

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1706S379no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Akın Elmaskaya'nın 'Ketoprofen Lizin İçeren Poli Laktik-Ko- Glikolik Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve *In-Vitro* Değerlendirilmesi' başlıklı tezi 01/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç.Dr. Evrim Yenilmez	
Üye :	Doç.Dr. Ebru Başaran	
Üye :	Dr. Öğr. Üyesi Umay Merve Güven	

  
Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü



**ÖZET**  
**KETOPROFEN LİZİN İÇEREN POLİ LAKTİK-KO- GLİKOLİK ASİT (PLGA)**  
**NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE *İN-VİTRO***  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Akın ELMASKAYA**

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı**

**Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,**

**Danışman: Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ**

Bu tez çalışmasının amacı, Poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) polimer bazlı nanopartiküller içerisine ağrı kesici ve antienflamatuar özellikleri bulunan ketoprofen lizin tuzunun yüklenmesi ve hazırlanan formülasyonların *in-vitro* karakterizasyon çalışmalarının yapılmasıdır.

Ketoprofen günümüzde ağrı, osteoartrit, romatoid artrit gibi yüksek enflamasyon durumlarında sıklıkla reçete edilen ağrı kesici ve enflamasyon giderici bir etkin maddedir. Ketoprofen lizin tuzu uzun yıllardır özellikle antienflamatuar etkinliğinden dolayı kullanılan ketoprofen etkin maddesinin bir tuzudur. Ancak ketoprofen etkin maddesinin var olan gastrointestinal yan etkileri ve çözünürlük problemleri kullanımını kısıtlamaktadır. Ketoprofen lizin tuzunun çözünürlük özelliği tuz olmasından kaynaklı olarak daha üstündür. Antienflamatuar ve ağrı kesici olarak polimerik bir nanopartikülle yapılan kaplama ilacın gastrointestinal yan etkilerini azaltıp, tedavi kısıtlılığını ortadan kaldıracığı düşünülmektedir. Bu özelliklerin Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı olan PLGA gibi güvenli ve uzun yıllardır polimerik taşıyıcı sistem olarak kullanılan bir polimerle gerçekleşmesi oldukça güvenilir ve kullanışlı bir sistem oluşturacağı düşünülmektedir. Ülkemiz de yalnızca iki adet ketoprofen lizin preparatı kullanımdadır. Bu preparatlar da kontrollü salım özelliğine sahip değildir. Bu tezle birlikte ketoprofen lizin yüklü Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA) bazlı polimerik nanopartiküller çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme ve püskürterek kurutma yöntemleriyle hazırlanmış ve etkili taşıyıcı aday olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, *in vivo* deneyler, elde edilen *in vitro* sonuçları desteklemek ve son kararı vermek için gereklidir.

**Anahtar Sözcükler: Ketoprofen Lizin Tuzu, Poli Laktik Ko Glikolik Asit, Nanopartikül**

**ABSTRACT**  
**PREPARATION OF KETOPROPHEN LYSINE LOADED**  
**POLY LACTIC CO GLYCOLIC ACID (PLGA)**  
**AND *IN-VITRO* EVALUATION**  
**Akm ELMASKAYA**  
**ANADOLU UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY**  
**Supervisor:**  
**Assoc.Prof.Dr. Evrim YENILMEZ**

The aim of this thesis study was to develop a new oral drug delivery system with ketoprofen lysine salt loaded with Poly Lactic Acid-co-Glycolic Acid (PLGA) nanoparticles which has analgesic and anti-inflammatory properties and to evaluate *in-vitro* release studies and characterisation of this system.

Ketoprofen is a pain relieving and antiinflammatory agent frequently prescribed in high inflammation conditions such as pain, osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Ketoprofen lysine salt is a salt of ketoprofen which has been used for many years because of its antiinflammatory activity. However the solubility of ketoprofen and gastrointestinal side effects are limiting of usage. Lysine salt of ketoprofen solubility is better than normal ketoprofen. Coating with a polymeric nanoparticle as an antiinflammatory and painkiller will reduce the gastrointestinal side effects of the drug and eliminate treatment limitation. This protection, especially by the US Food and Drug Administration (FDA) approved by PLGA as a polymer with a polymer used as polymeric carrier system for many years and will be a very reliable and useful drug.

Only two ketoprofen lysine preparations are available in our country. None of them has a controlled release.

In the scope of the thesis, it was concluded that ketoprofen lysine-loaded polymeric nanoparticles prepared by solvent evaporation, nanoprecipitation and spray drying methods and based on Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) are effective carriers. However, *in vivo* experiments are required to support the resulting *in vitro* results and to make the final decision.

**Keywords: Ketoprofen Lysine Salt, Poly Lactic Ko Glycolic Acid, Nanoparticles**

## TEŞEKKÜR

Bu tezin ortaya çıkmasında gereken tüm bilgi, birikimlerinden faydalandığım hayat görüşümde yeni ufuklar açan, bana yeni ve doğru yollar gösterip her zaman yardımcı olan çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ' e çok teşekkür ederim.

Bu süreçte ve öğrencilik hayatım boyunca bizlere yenilikçi ve aydın bakış açıları kazandırarak çağdaş bireyler olmamızı sağlayan çok değerli hocam Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a teşekkür ederim.

Tüm çalışmalarım esnasında bilgilerini ve yardımlarını sakınmayan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Umay Merve GÜVEN'e, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Alper ÖZTÜRK'e, Araş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen Araş.Gör. Kemal Can DEMİRKILINÇ, Uzm. Ecz. Nur İlge ÇINAR'a, Uzm. Ecz. Serdar ALAGÖZ'e, Uzm. Ecz. Sinan ÖZER'e, Yük. Müh. Mustafa BEKİROĞLU'na teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca her zaman yanımda olan çok değerli aileme annem, babam ve ablama çok teşekkür ederim.

Bu uzun ve zorlu süreçte bana destek olan biricik ruh ikizim, çalışma arkadaşım, hayat yoldaşım, kısacası tüm paydaşım sevgili eşim Büşra'ya teşekkür ederim.

Bizlere her zaman yardımcı olan sayın Ertan MUTLU, Emel ÖZEL ve Nudiye MERT'e teşekkür ederim

01/08/2019

### **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	2
2.1. Ketoprofen Lizin Tuzu.....	2
2.2. Enflamasyon.....	4
2.3. Ağrı .....	4
2.4. Polimerler, Nanopartiküller ve PLGA .....	5
2.4.1. PLGA'nın biyodegradasyonu .....	8
2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	12
2.5.1. Polimerik nanopartiküller (PNP) ve hazırlanmaları.....	13
2.5.1.1. Önceden hazırlanmış bir polimerin disperse edilmesiyle hazırlanan PNP'ler .....	14
2.5.1.1.1. Çözücü buharlaştırma.....	15
2.5.1.1.2. Tuzla Çöktürme .....	16
2.5.1.1.3. Nanoçöktürme .....	17
2.5.1.1.4. Diyaliz .....	19
2.5.1.1.5. Süperkritik sıvı teknolojisi.....	20
2.5.1.1.6. Püskürterek kurutma.....	22



2.5.1.2. Bir monomerin polimerizasyonu ile elde edilen PNP'ler .....	23
2.5.1.2.1. Emülsiyon polimerizasyonu .....	23
2.5.2. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu .....	24
2.5.2.1. Morfoloji .....	25
2.5.2.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) .....	25
2.5.2.1.2. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) .....	26
2.5.2.2. Partikül boyutu, dağılımı ve yapısal analizi .....	27
2.5.2.2.1. X-ışını difraktometresi (XRD) .....	28
2.5.2.2.2. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) .....	28
2.5.2.2.3. Nükleer manyetik rezonans (NMR) .....	28
2.5.2.3. Zeta potansiyel (ZP) .....	29
2.5.2.4. Etkin madde yüklenmesi ve salım .....	29
2.5.2.4.1. Farmakokinetik modelleme .....	31
2.6. Hücre Kültürü .....	32
3. GEREÇLER .....	33
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	33
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	33
4. YÖNTEMLER .....	35
4.1. Formülasyonlarda Etkin Madde Miktar Tayini için Gerekli Analitik Yöntemin Optimizasyonu ve Validasyon İşlemleri .....	35
4.1.1. Analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları .....	35
4.2. Formülasyonların Hazırlanması .....	36
4.2.1. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi .....	36
4.2.2. Nanoçöktürme yöntemi .....	37
4.2.3. Püskürterek kurutma yöntemi .....	38
4.3. Karakterizasyon Çalışmaları .....	39
4.3.1. Termal analiz .....	39

4.3.2. X-Işını kırınımı.....	39
4.3.3. FT-IR analizi .....	39
4.3.4. Nükleer manyetik rezonans ( <sup>1</sup> H-NMR) .....	39
4.4. Sitotoksitenin Belirlenmesi .....	39
4.5. <i>İn-vitro</i> Salım Çalışmaları.....	40
4.6. Enkapsülasyon Etkinliği .....	40
<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>41</b>
5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları.....	41
5.1.1. Doğrusallık .....	41
5.1.2. Kesinlik .....	42
5.1.3. Doğruluk.....	43
5.1.4. Seçicilik .....	43
5.1.6. Duyarlılık.....	44
5.2. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları .....	45
5.2.1. Termal analiz.....	45
5.2.2. X-ışını kırınımı (XRD).....	46
5.2.3. Infrared (FT-IR) analizleri .....	47
5.2.4. Nükleer manyetik rezonans ( <sup>1</sup> H-NMR) analizi.....	50
5.2.5. Morfolojik analiz.....	52
5.2.6. Partikül boyutu, zeta analizi ve verim .....	53
5.2.7. <i>İn-vitro</i> salım çalışmaları.....	54
5.2.8. Salım kinetikleri.....	55
5.2.9. Hücre kültürü çalışmaları.....	55
<b>6.TARTIŞMA .....</b>	<b>57</b>
<b>7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>64</b>
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>65</b>
<b>EKLER</b>	

**EK-1**  
**ÖZGEÇMİŞ**

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Çizelge 4.1.</b> Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları.....	35
<b>Çizelge 4.2.</b> Çift emülsiyon çözücü uçurma yönteminde kullanılan formülasyonların içerikleri, E-1, E-2 ve plasebo .....	37
<b>Çizelge 4.3.</b> Çift emülsiyon çözücü uçurma yönteminde kullanılan formülasyonların içerikleri, E-1,E-2 ve plasebo.....	38
<b>Çizelge 4.4.</b> Püskürterek kurutma yönteminde kullanılan S-1, S-2 ve plasebo formülasyon içerikleri.....	38
<b>Çizelge 5.1.</b> Doğrusallık çalışması için hazırlanan serileri ve alan değerleri (n=10)...	41
<b>Çizelge 5.2.</b> 75 µg.mL <sup>-1</sup> derişim için kesinlik sonuçları.....	42
<b>Çizelge 5.3.</b> 125 µg.mL <sup>-1</sup> derişim için kesinlik sonuçları.....	42
<b>Çizelge 5.4.</b> 175 µg.mL <sup>-1</sup> derişim için kesinlik sonuçları.....	43
<b>Çizelge 5.5.</b> Doğruluk çalışması sonuçları.....	43
<b>Çizelge 5.6.</b> Formülasyonların partikül boyutu, dağılımı, zeta potansiyel ve yükleme oranları.....	53
<b>Çizelge 5.7.</b> <i>In-vitro</i> Salım kinetiği sonuçları.....	55

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> Ketoprofen Lizin Tuzunun Kimyasal Yapısı.....	3
<b>Şekil 2.2.</b> PLGA Kimyasal Yapısı.....	7
<b>Şekil 2.3.</b> PNP Eldesinin Gösterimi.....	14
<b>Şekil 2.4.</b> Su/yağ/su çift emülsiyonun hazırlanışı, a: yüksek gerilimli emülsiyon b: düşük gerilimli emülsiyon.....	15
<b>Şekil 2.5.</b> Süperkritik Akışkanlarla Polimerik Nanopartikül Eldesinin Sistemik Şeması).....	21
<b>Şekil 2.6.</b> Çözelti İçerisindeki Polimerin Süperkritik Sıvı ile Birlikte Hızla Genleştirilerek PNP üretimi.....	22
<b>Şekil 5.1.</b> KL'nin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi' ne ait standart eğri ve doğrusallık eşitliği (n=12).....	41
<b>Şekil 5.2.</b> KLT'ye ait YBSK piki.....	44
<b>Şekil 5.3.</b> Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait DSC termogramları, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: E- plasebo e: E-1 f: E-2.....	45
<b>Şekil 5.4.</b> Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait DSC termogramları, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: S-plasebo e: S-1 f: S-2.....	46
<b>Şekil 5.5.</b> Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait XRD analiz pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: E- plasebo e: E-1 f: E-2.....	46
<b>Şekil 5.6.</b> Püskürterek kurutma tekniği ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait XRD analiz pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: S-plasebo e:S-1 f: S-2.....	47
<b>Şekil 5.7.</b> Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait FT-IR analiz sonuçları, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: E- plasebo e: E-1 f: E-2.....	48

<b>Şekil 5.8.</b> Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait FT-IR analiz sonuçları, a:KL b:PLGA c:Fiziksel Karışım d: S- plasebo e: S-1 f: S-2 .....	49
<b>Şekil 5.9.</b> Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle hazırlanmış formülasyonlar, saf etkin madde ve PLGA'ya ait <sup>1</sup> H-NMR pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel karışım d: E- plasebo e: E-1 f: E-2.....	50
<b>Şekil 5.10.</b> Püskürterek kurutma yöntemiyle hazırlanmış formülasyonlar, saf etkin madde ve PLGA'ya ait <sup>1</sup> H-NMR pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel karışım d: S- plasebo e: S-1 f: S-2.....	51
<b>Şekil 5.11.</b> Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan partiküller, saf etkin madde ve PLGA'ya ait SEM morfolojik analizinin görüntüleri, a: KL b: PLGA c: E-plasebo d: E-1 e: E- 2.....	52
<b>Şekil 5.12.</b> Püskürterek Kurutma yöntemi ile hazırlanan patiküller, saf etkin madde ve PLGA'ya ait SEM morfolojik analizinin görüntüleri, a: KL b: PLGA c: S- plasebo d: S-1 e: S-2.....	53
<b>Şekil 5.13.</b> Tüm formülasyonlar ve saf etkin maddeye ait ilk 1 saatlik salım profili.....	54
<b>Şekil 5.14.</b> Tüm formülasyonlar ve etkin maddeye ait salım profili.....	54
<b>Şekil 5.15.</b> Etkin madde ve Plasebo formülasyonların 24 ve 48 saatlik doza bağlı sitotoksisite değerleri.....	56
<b>Şekil 5.16.</b> S1, S2 ve E1, E2 Formülasyonlarına ait 24 ve 48 saatlik doza bağlı sitotoksisite değerleri .....	56

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>%EE</b>	: Enkapsülasyon/ yükleme etkililiği
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	: Proton nükleer manyetik rezonans
<b>AFM</b>	: Atomik kuvvet mikroskobu
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	: Dötero kloroform
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DLS</b>	: Dinamik ışık saçılımı
<b>DLVO</b>	: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek teorisi
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DSC</b>	: Diferansiyel taramalı kalorimetre
<b>EMA</b>	: Avrupa ilaç ajansı
<b>FBS</b>	: Fetal bovine serum
<b>FDA</b>	: Amerikan gıda ve ilaç dairesi
<b>FT-IR</b>	: Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi
<b>GA</b>	: Glikolik asit
<b>IASP</b>	: Uluslararası ağrı araştırma derneği
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Hücre yaşayabilirliğinde %50
<b>IR</b>	: İnfrared (Kızılötesi)
<b>KLT</b>	: Ketoprofen Lizin tuzu
<b>LA</b>	: Laktik asit
<b>LOD:</b>	: Saptama sınırı
<b>LOQ:</b>	: Miktar tayini sınırı
<b>MTT</b>	: Metil tetra tiyazol (boya)
<b>NMR</b>	: Nükleer manyetik rezonans
<b>NP</b>	: Nanopartikül
<b>NSAİ</b>	: Non-steroidal anti enflamatuar
<b>NSAİİ</b>	: Non-steroidal anti enflamatuar ilaç
<b>Θ</b>	: Teta
<b>PB</b>	: Parçacık Boyutu
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu salin çözeltisi
<b>PDI</b>	: Poli dispersite indisi
<b>pH</b>	: Hidrojen miktarı (Power of Hydrogen)

<b>PLA</b>	: Poli laktik asit
<b>PLGA</b>	: Poli laktik-ko-glikolik asit
<b>PNP</b>	: Polimerik Nanopartikül
<b>PVA</b>	: Poli vinil alkol
<b>RPMI</b>	: Roswell park memorial institute besiyeri
<b>rpm</b>	: Dakikadaki tur sayısı
<b>SEM</b>	: Taramalı elektron mikroskobu
<b>SH</b>	: Standart hata
<b>SS</b>	: Standart sapma
<b>TEM</b>	: Geçirimli elektron mikroskobu
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>XRD</b>	: X-ışını kırınımı
<b>YBSK</b>	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
<b>ZP</b>	: Zeta potansiyel



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde ilaç etkin maddelerinin istenen miktarda ve sıklıkta hedef organ veya bölgeye ulaşması gelişen teknoloji ve insan beklentilerinin doğal bir sonucu olarak popüler ve zorunlu bir hal almıştır. Gittikçe artan bu beklentiyle birlikte yapılan çalışmalar hız kazanmış ve elde edilen sonuçlar çoğalmıştır. Bir ilaç taşıyıcı sistem organizmanın karmaşık yapısını geçerek etkin maddenin hedef organa istenilen miktar ve sıklıkta ulaşması için çaba göstermektedir.

Polimerler ise yaklaşık yarım yüzyıldır kullanılmakla birlikte bazı temel avantajlarından dolayı göze çarpmaktadır. Genellikle birçok etkin maddeyle geçimli olmaları, vücutla uyumlu olmaları, dayanıklı ve nispeten kolay elde edilebilirlikleri bunların başında gelmektedir.

Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA) eczacılık teknolojisi ve tıp alanında pek çok yerde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bilinen en önemli kullanım şekli yara veya doku alanı kapatmada dikiş malzemesi olarak kullanılmasıdır. Ayrıca pek çok etkin madde çalışmaları mevcuttur. Vücutla son derece uyumludur ve güvenle uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Ketoprofen lizin tuzu (KLT) ise ağrı kesici ve anti enflamatuar özellikleri bulunan bir non-steroidal anti enflamatuar (NSAİ) ajandır. Özellikle tuz olmayan formu yani ketoprofen uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ancak çözünürlük ve gastrointestinal yan etkileri özellikle ketoprofenin kullanımını sınırlandırmaktadır.

Bu tezde ketoprofen gibi değerli bir etkin maddenin, çözünürlük problemini tuz formu olan KLT'nin kullanımıyla, gastrointestinal yan etkilerini ise PLGA gibi güvenilir bir polimerle aşmaya çalışılmıştır. Bu tezde doğru KLT-PLGA formülasyonu seçilmesi, geliştirilmesi, karakterizasyonu, ve *in-vitro* salım çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. Ketoprofen Lizin Tuzu

Ketoprofen kimyasal ismi 2-(3-benzoilfenil) propiyonik asit olan, ankilozan spondilit, osteoartrit ve romatoid artrit gibi romatizmal bozukluklarda ve diğer romatoid kökenli olmayan kas, iskelet ve eklem hastalıklarında, dismenore gibi hafif ve orta şiddetteki ağrılarda kullanılan bir etkin maddedir (Martindale, 1989, s. 78).

Genellikle kullanım önerisi oral yolla yemekle birlikte günde 2 kez 50-100 mg olarak önerilmektedir, ayrıca supozituar formülasyonları rektal olarak da genellikle geceleri 100 mg dozda kullanılmaktadır (Martindale, 1989, s. 78).

KLT 2-arilpropiyonik asit türevi steroid olmayan bir antiinflamatuvar etkin madde olup, analjezik, antiinflamatuvar ve antipretik özellikleri bulunmaktadır. KLT'nin semptomları azaltıcı özellikleri bulunmaktadır. Yanma hissinde azalma, ağrı ve ödem azaltıcı etkileri de yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Passali vd., 2001, s. 1509).

NSAİ ilaçlar kimyasal yapılarına göre 6 sınıfa ayrılmıştır:

I. Karboksilik asitler:

a. Salisilik asit ve esterleri

b. Antranilik asit türevleri: Flufenamikasit, mefanamikasit

II. Asetik Asitler:

a. Fenilasetik Asit: Diklofenak, fenklofenak

b. Karbo ve heterosiklik asitler: İnfometazin, etodolak, sulindak, tolmeltin

III. Propionik asitler: Ebusuprofen, ketoprofen, flurbiprofen, suprofen, naproxen, fenoprofen, tiaprofenik asit

IV. Fenamik Asitler: flufenamik, mefenamik, meklofenamik

V. Enolik Asitler:

a. Pirazolonlar: fenilbutazen, oksifenbutazon, azopropazon

b. Oksikamlar: piroksikam, pesoksikam, sudoksikam

VI. Nonaisidik Ajanlar: prokuazom, tramid, pflunizol, naubmetan (Haşçelik, 2001).

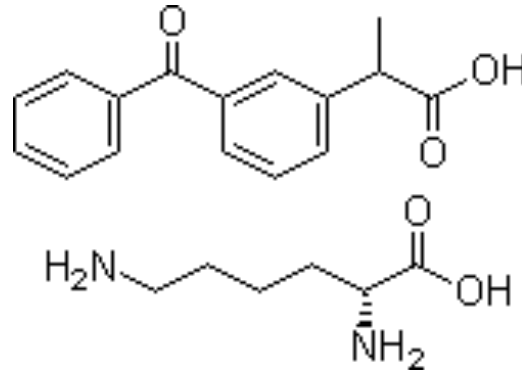
Ketoprofen NSAİ'lar arasında propiyonik asit türevidir ve güçlü bir non-steroidal antiinflamatuvar ajandır. Ketoprofen güçlü santral ve periferik analjezik etkinliğe sahiptir (Messeri vd., 2003, s. 574).

KLT ketoprofen ile karşılaştırıldığında daha iyi farmakokinetik özellikler ve tolere edilebilirlik göstermektedir. Ketoprofen lizin tuzu oral kullanımda 1-2 saatlik yarı ömre

sahiptir, bu nedenle çoklu dozlamaya veya kontrollü salım sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Cerciello vd., 2016, s. 2063).

Ketoprofenin ek özelliklerine ek olarak güçlü merkezi ve periferel analjezik etkinliği vardır (Messeri vd., 2003, s. 574).

Oral kullanılan düzenli salım preparatlarında ketoprofen, hızla absorbe olur ve dozun alınmasından sonra pik konsantrasyonları 0.5 ile 2 saat arasında görülür, 1-3 saat arasında plazma yarı ömrü bulunmaktadır. Diğer NSAİ'lar gibi ketoprofenin de gastrointestinal sisteme yan etkileri bulunmaktadır (Çomoğlu vd., 2002, s. 192).



Şekil 2.1. Ketoprofen Lizin Tuzunun Kimyasal Yapısı (<http-1>)

Kokki ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada cerrahi operasyona giren çocuklarda ketoprofenin iyi bir güvenlik profiline sahip ve etkili bir analjezik olduğu kanıtlanmıştır. Bu uygulamada post-operatif ağrıları azaltmak için ketoprofen lizin tuzu parasetamol ile karşılaştırılmıştır (Messeri vd., 2003, s. 574).

KLT travmatik ve ortopedik bozukluklarda antienflamatuar analjezik özelliklerinden dolayı reçete edilen bir ajandır ve Artrosilene® Fiale tek müstahzarı olarak intravenöz infüzyon şeklinde diğer anti enflamatuar, anti hemorajik, anti ülser ve antibakteriyel preparatlarla kombine halde sıklıkla kullanılmaktadır (Anacardio vd., 2005, s. 791).

KLT bradikinin tarafından indüklenmiş bronkokonstrüksiyonu modüle edebilir ve siklooksijenaz blokajına bağlı olarak azalan bradikinin seviyesinin neticesinde büyük ölçüde havayolu geçirgenliğini artırdığı rapor edilmiştir (Daffonchio vd., 2002, s. 224).

## 2.2. Enflamasyon

Enflamasyon, ilk olarak travmatik, iskemik, enfeksiyöz, otoimmün, toksik veya bunlardan birkaçının aynı anda gerçekleşmesiyle bir organda bulunan hücreleri etkiler ardından ortaya çıkan hücre ölümü başka hücrelerin ölümünü de tetikler örneğin nötrofiller ardından ortamda sıvı birikimiyle kendini gösterir. Son yıllarda enflamasyonun hem steril yani non-patojenik ortamlarda ve steril olmayan ortamlarda aynı şekilde gerçekleştiği anlaşılmıştır (Mack, 2018, s. 68-69).

Akut ve kronik enflamasyonda temel amaç organizmaya yönelik tehditlerin ortadan kaldırılmasıdır. Enflamasyon zedelenme veya enfeksiyonun başlangıcından sonra bazı reseptörler tarafından fark edilmesiyle başlar. Ardından organizmanın proinflamatuvar yanıt sistemi sitokinler gibi çözünebilir bazı mediyatörler ile harekete geçirilir. Tüm bu oluşum, dolaşımda bulunan lökositler ve endotel hücreleri üzerinde bulunan adezyon işlemini kolaylaştıracak molekülleri harekete geçirir bu sayede granülosit ve magositlerin kandan bölgeye akışını teşvik eder. Nötrofil gibi bazı granülosit çeşitleri organizmayı rahatsız eden faktör her ne ise bunu ortadan kaldırmak için bölgeye göç eder fagositoz, hidrojen peroksit, süperoksit anyonlar ve hidroksil radikalleri gibi mekanizmalar ya da bunlardan birkaçı ile mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için işlev görür. Genellikle enflamasyon tedavilerinde non-steroidal anti enflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), antistokin tedavileri içeren ilaçlar örneğin anti-tümör nekrozis faktör (TNF)  $\alpha$  gibi ilaçlar enflamasyonu tetikleyen aracılardan sentezini veya etkisini inhibe etmeyi hedefler (Feehan and Gilroy, 2019, s. 198).

## 2.3. Ağrı

Uluslararası ağrı araştırma derneğine göre (IASP) ağrının tanımı, kişi veya bireye hoş gelmeyen veya istenmeyen hissiyat çeşididir. Bu durum duyuşal veya duygusal olabilmekte birlikte subjektiftir çünkü kişiden kişiye göre tanımlamaları yani miktarı değişkenlik gösterir. Aynı zamanda ağrıyı kısaca doku hasarına bağlı olarak kişilerin hissettikleri şeklinde tanımlamakta mümkündür (Apkarian, 2019, s. 1-2).

Daha bilimsel olarak ağrı: nöroseptif nöronların algıladıkları ardından bunun raporlanması, değerlendirilmesi ve buna verilen tepki şeklinde birçok yolak, protein hareketi ve cevaptan oluşmaktadır. Bu nöroseptif nöronların normal günlük yaşantımızda ağrıdan bağımsız şekildeki rolleride unutulmamalıdır. Ağrı mekanizmasının doğru çalışması için bilinç gereksinimi de unutulmamalıdır (Apkarian, 2019, s. 1-2).

Akut ağrı organizma için önemlidir, hayatta kalmak veya organizmanın sağlıklı kalması için bir uyarı şeklidir. Kronik ağrı pek faydalı bir koruyucu mekanizma ortaya koymaz. Beden için rahatsız edicidir ve analjezikler tarafından kontrol altında tutulmaya çalışılır. Temel olarak ağrı mekanizmasında, zararlı uyarıyı perifer bölgede algılayan nosiseptör adı verilen yapılar omuriliğe elektriksel iletim sağlar, ardından bu bilgi beyin tarafından algılanır (Malcangio, 2018, s. 102).

#### **2.4. Polimerler, Nanopartiküller ve PLGA**

Kısa bir tanımla polimer; birden çok küçük molekülün kovalent bağlar aracılığıyla bağlanarak oluşturduğu büyük moleküllerdir. Polimerler hayatımızın her alanında geniş kullanıma sahiptirler çünkü hafif, kolay işlenebilir, gerekli mekanik özelliklere cevap verebilir olmaları polimerler için geniş kullanım alanı yaratmaktadır. Polimerlerin doğasından kaynaklı ortaya çıkan makromoleküler yapıları, onlara üstünlükler kazandırmaktadır. Özellikle mekanik olarak beklenen gerekli özellikler büyük ve uzun zincir yapılarında ortaya çıkmaktadır (Erdem ve Morgil, 2002, s. 88).

Polimerler son yıllarda hedeflendirilmiş tümör terapilerinden, immün sistemin modülasyonuna kadar çok geniş bir alanda giderek artan ilgiye sahip taşıyıcı sistemlerdir. (Mccall and Sirianni, 2013, s. 1).

Sentetik polimerler doğal polimerlere göre yüksek saflıkta üretilebilirler, biyobozunmaları kontrol edilebilir ve toksik olmayan yan ürünlere sahiptirler tüm bu sebeplerden dolayı ilaç taşıyıcı sistem olarak sıklıkla kullanılırlar (Küçükturhan, A. ve ark., 2010, s. 215).

Biyobozunur polimerler doğal veya sentetik kökenli olabilir ancak her ikisinde *in-vivo* ortamda parçalanırlar. Bu parçalanma enzimatik veya enzimatik olmayan şekilde gerçekleşebilir. Ortaya çıkan non-toksik ürünler normal metabolik yollar aracılığıyla ortadan kaldırılırlar. Polimerik materyal içerisine yüklenen ilaç difüzyon, polimerin erozyonu veya her ikisi aracılığıyla salınabilir (Jain, 2000, s. 2476).

Birçok doğal ve sentetik polimer kontrollü salım ve hedeflendirme için araştırılmasına rağmen çok azı biyoyumludur (Jain, 2000, s. 2476).

Son yıllarda, etkili ilaç taşıyıcılar olarak biyobozunur nanopartiküller taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi büyük ilgi çekmektedir. Polimerler, ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmakta ve bu sistemler etkili ilaç taşınmasını sağlamaktadır. Ayrıca polimerik nanopartiküller sistemler terapötik yararlanımı artırırken yan etkileri minimize etmektedir.

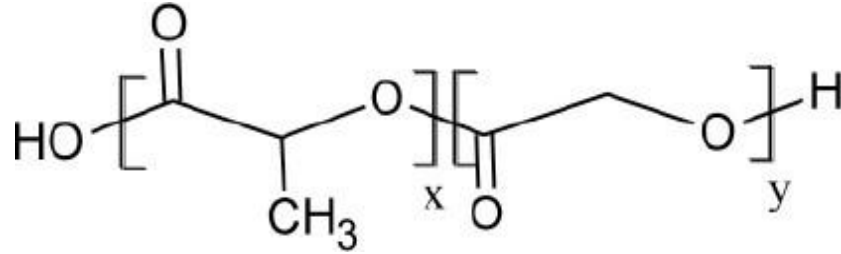
Bu sistemlerin geliştirilmesindeki temel amaç kontrollü salım elde etmekle beraber ilacın farmakolojik etki göstereceği alana optimal dozda ve oranda taşınmasını sağlamaktır. Örneğin lipozomlarda ilaç taşıyıcı sistem olarak bu avantajları gösterirler ancak düşük enkapsülasyon hacmi, kan bileşenleri ortamında suda çözünürlüğü yüksek ilaçların ani salınması ve düşük saklama stabilitesi gibi dezavantajları vardır. Fakat polimerik nanopartiküllerin lipozomlara kıyasla ilaç veya proteinin stabilitesini artırmak ve kullanışlı kontrollü salıma sahip olmak gibi avantajları vardır (Kumaresh vd., 2001, s. 2).

Nanopartiküller doğal veya sentetik polimerlerle hazırlanabilirler, hazırlanış şekline bağlı olarak nanoküre veya nanokapsül şeklinde olabilirler. Nanokapsül ve nanoküreler farklı salım karakteristiklerine sahiptirler. Nanokapsüller sistemlerde etkin madde bir boşluğa hapsedilmiştir. Nanoküre de ise etkin madde polimer içerisinde homojen bir şekilde dağılmış halde bulunur. Bu sistemlerde etkin madde matris içerisinde dağıtılmış, çözündürülmüş, yüzeye tutunmuş veya sistem içerisinde hapsedilmiş halde bulunabilir. Poli laktik-ko- glikolik asit ilaç taşıyıcı polimerik sistemlere bakıldığında sıklıkla araştırılan polimerdir. (Derman, Kızılbey ve Akdeste, 2013, s. 107-109)

Nanopartiküller sistemler kendi içinde çeşitli avantajlara sahiptirler. Bunlardan ilki taşıyıcı sistemin nanoboyutta olmasından dolayı ilacın hücre içerisine geçişi kolaylaşır ve hedef dokuda toplanması sağlanır. Bir diğer önemli avantajları ise biyobozunur veya biyoyumlu olmalarından ileri gelir. Böylece istenilen alanda kontrollü salım uygun biyobozunma aracılığıyla sağlanabilir. Diğer avantajları ise sterilizasyonları boyutlarından dolayı kolaydır. Vücut içerisinde parçalanırlar, açığa çıkan parçalanma ürünleri biyoyumludur, toksik değildir (Makadia and Siegel, 2011, s. 1378-1379).

Oral yolla verilen etkin maddenin biyoyararlanımında artış olur. Uzun süreli ve kontrollü salım sağlanabilir. Hedeflendirme yapılabilir. Polimerik sistem tarafından taşınan etkin madde istenilen bölgeye ulaşana kadar degradasyondan korunur. Hedeflendirmeye imkan sağladıkları için yalnızca istenilen bölgeye ulaşmaları ve diğer dokulara verilecek ilaç zararından korunmuş olur. Üretim şekilleri ve stabiliteyi diğer sistemlere kıyasla kolaydır. Stabiliteyi artırmak amaçlı ilaç ürününe konulacak maddelere ihtiyaç kalmaz ve bu maddelerin toksik etkileri ortadan kalkar. (Derman, Kızılbey, ve Akdeste, 2013, s. 107-109)

Poli laktid (PLA) ve PLGA polimerleri biyoyumlu ve biyobozunabilir özelliklerinden dolayı ilaç formülasyonlarında geniş kullanım alanlarına sahiptir (Gavini vd., 2001, s. 194).



Şekil 2.2 PLGA Kimyasal Yapısı (Maharshi vd.,2018, s. 1039).

PLGA uzun süredir emilebilir dikiş, suture materyali olarak kullanılmakta ve insanlarda kullanımı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylı olduğu için oldukça popüler bir ilaç taşıyıcı sistemdir (Gavini vd., 2001, s. 196-197).

PLGA polimerik partiküllerinin NSAİ ilaçlar ile yüklenmesi için püskürterek kurutma uygun bir methoddur. Püskürterek kurutma ilaç-polimer çözeltisinin basit bir şekilde hazırlanmasını içerir ve hızlı bir methoddur. Gavini ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan bir çalışmada ketoprofen etkin maddesi PLGA polimeri içerisine püskürterek kurutma methoduyla yüklenmeye çalışılmıştır mikro-küre içeriğine bağlı olarak %35- %45 oranında ürün verimliliği sağlanmıştır, bu sonuç püskürterek kurutma için sıkça karşılaşılan bir durumdur. Fakat mükemmel enkapsülasyon etkililiği elde edilmiş ve teorik olarak beklenen değerlere oldukça yaklaşmıştır (Gavini vd., 2001, s. 196-197).

PLGA'nın insan sağlığıyla ilgili yerlerde kullanılmasının en büyük sebebi bu polimerin biyoyumlu, non-toksik ve oluşan degradasyon ürünlerinin biyolojik olarak emilebilir olmasından ileri gelir. Laktid ve glikolit içeren polimerler içerilerinde bulunan oranlara göre geniş ve çeşitli fizikokimyasal özellikler gösterirler (Sah vd., 2013, s. 748).

Biyolojik olarak degradasyona uğrayabilen PLGA nanopartikülleri ilaçlar, protein-peptit yapılı moleküller, aşı ve nükleotidler için taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Bu nanopartikülleri ilacı parçalanmadan korurken kontrollü salım sağlar (Sah vd., 2013, s. 748).

PLGA'nın karakteristik özellikleri laktik asitin stereokimyası (D, L ve D-L karışık formları), kristalinite derecesi, laktik asit /glikolik asit oranı ve molekül ağırlığıyla

değiştirilebilir veya kontrol edilebilir. Genellikle son grubu lauril veya metil esterleriyle kapatılmış olan PLGA kapatılmamış olan diğer türevlerine göre daha kararlılı olmaktadır (Sah vd., 2013, s. 748).

Yeni ilaç taşıyıcı sistemler düşünüldüğünde, nanoteknolojik temelli sistemlerin çeşitli avantajları göze çarpmaktadır. Örneğin; organ ve dokulara hedeflendirme, ilaçların toksik etkileri azaltılarak biyolojik geçimlilikleri artırılabilir, kontrollü ve geciktirilmiş salıma olanak sağlayabilirler. PLGA iyi derecede biyoyumluluk ve biyodegradasyon özellikleri sergileyen hidrofobik sentetik bir polimerdir. PLGA'nın biyodegradasyonu sonucu açığa çıkan ürünler insan vücudunun normal metabolik yolları aracılığıyla elimine edilmektedir. PLGA ile enkapsüle edilmiş ilaç molekülleri yalnızca istenmeyen degradasyondan korunmaz aynı zamanda biyoyararlanımları da artar (Wang vd. 2015, s. 5672).

PLGA nanopartikülleri terapötik ajanı korurlar ve kararlılıklarını artırır, farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini geliştirerek terapötik ajanların kontrollü salım yapmasını sağlayabilirler. PLGA formülasyonları çeşitli ilaçların taşıyıcı sistemi olarak amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) ve avrupa ilaç ajansı (EMA) tarafından onaylanmıştır. PLGA nanopartikülleri retiküloendotelyal sistem tarafından yüksek düzeyde opsonizasyona uğramaktadır. Bu durum PLGA nanopartiküllerinin kullanımını kısıtlamaktadır. PLGA bazlı nanopartiküllerin bu olumsuz ve kullanımını kısıtlayan özelliğinin önüne geçmek için yüzey kaplaması gibi çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bu durum PLGA'nın normalde hidrofobik olan yüzeyinin su sever ajanlarla kaplanması sonucu retiküloendotelyal sistem hücrelerinin bu nanopartiküllere opsonizasyonu azaltılmıştır. PEG, poloksamerler ve kitosan gibi çeşitli ajanlarda PLGA'nın negatif yüzey yükünü nötralizeetmekte veya azaltmaktadır. PLGA'nın negatif zeta potansiyelinin azaltılması sonucuda retiküloendotelyal sistem hücreleri tarafından fagositlenmesi azalmaktadır. Fakat yüzeyi modifiye edilmiş PLGA'nın yüksek katılıktaki çekirdeğinden dolayı karaciğerde lokalize olduğu tespit edilmiştir ve bu konunun çözümü için araştırmalar hızlanmıştır. (Manoochehri vd., 2013, s. 2).

#### **2.4.1. PLGA'nın biyodegradasyonu**

Tıp ve biyolojide biyodegrade olabilen polimerler önemli rol oynamaktadır. Biyodegradasyona uğrayabilen polimerler kontrollü salım, cerrahi implantasyon, süturlar, cerrahi iplikler ve birçok alanda kullanılmaktadır. Tıp alanında kullanılan



polimerlerin kimyasal içerikleri farklılık göstermekle beraber bozunma mekanizmaları genelde hidroliz yani su aracılı olmaktadır (Murthy vd., 2017, s. 547).

Alifatik poliesterler en yaygın çalışılan biyo bozunur sentetik materyallerdir. PLGA ise alifatik poliesterler grubunun bir üyesidir. Biyolojik parçalanabilen polimerlerden, endüstri ve akademideki araştırmalarda kontrollü salım için en çok kullanılan polimerler laktik asit ve glikolik asit tabanlıdır. 1970'lerde cerrahi suture materyali olarak kullanımdan itibaren pek çok toksikolojik ve klinik veriye sahiptirler (Sequeira, vd., 2018, s. 380).

Poli laktik asit (PLA) ana kaynağı mısır nişastası olan, doğrusal bir alifatik biyobozunur polimerdir. Bununla birlikte şeker kamışı, manyok kökü ve patatesten de elde edilebilir. Hem PLA hemde PLGA biyoyumlu, biyobozunur ve hidroliz altında degrade olabilirler. Laktik asit vücutta karbonhidrat mekanizmasıyla bozulan bir monomerdir (Amreddy vd., 2019, s. 83).

PLGA sentetik biyo bozunur bir polimerdir. PLGA'nın vücut tarafından degradasyonunda yüzey ve kütleli erozyonla birlikte yüzeysel ve kütleli difüzyon açısından değerlendirilerek kümülatif bir mantık yürütülmelidir. PLGA ko-polimerinin vücutta bozunma hızı zincir bileşimine, kristalinite derecesine, molekül ağırlığı, camı geçiş sıcaklığı ve hidrofilik/hidrofobik oranı gibi çeşitli faktörlerle değişebilir. Ko-polimer içerisindeki PLA oranı arttıkça veya PGA oranı azaldıkça bozunma hızı yavaşlamaktadır (Ahmad, vd. 2019, s. 157-158).

PLGA kuru ortamlarda stabilken vücut gibi su içeren bölgelerde hidrolize uğramaya başlar. Hidrolitik zincir reaksiyonuyla polimerler ilk önce oligomere sonra monomerlerine kadar parçalanır. Parçalanmış haldeki PLGA'dan ortaya laktik asit (LA) ve glikolik asit (GA) çıkar. Vücudun endojen metabolitlerinden olan LA ve GA Krebs döngüsüne girerek vücuttan karbondioksit ve su şeklinde atılır. Bu zararsız metabolitler sonucu bir miktar pH artışı ve hafif lokal toksisite gözlenebilir (Sequeira, vd., 2018, s. 381).

Bir polimerin biyobozunur olabilmesi için su veya enzimler aracılığıyla bağlarının kopabilmesi gerekir, örneğin: poliesterler, poliamidler, polianhidritler, polikarbonatlar ve poliüretanlar gibi. Hem LA hem GA poliesterler grubunun üyesidirler (Uhrich and Abdelhamid, 2016, s. 63)

PLGA içerisinde laktik asit oranı azaldıkça biyodegradasyon hızlanmaktadır. Ester bağlarının kopmasını hızlandıran özellikler polimerin parçalanma hızını artırmaktadır.

Bazik bileşikler uygun miktarlarda karboksilik uçları nötralize ederler ve biyolojik parçalanma hızını yavaşlatırlar (Anderson and Shive, 2012, s. 73).

Molekül ağırlığı ve dağılımı da degradasyon hızı için önem taşıyabilir. Yüksek molekül ağırlığı dağılımı karboksilik uç sayısı artırmakta ve buna bağlı otokatalitik degradasyon işlemi hızlanmaktadır. PLGA *in-vivo* terapötik uygulamalarda lokal veya sistemik reaksiyon göstermeyen biyouyumlu bir polimerdir. Mikrokürelerin boyutu 5 mikrondan daha az olursa makrofaj ve diğer hücreler tarafından alıkonma veya yakalanmaya maruz kalacaktır ancak 5µ-10µ mikron aralığında olanlar yakalanmayabilir ve 10µ üzerindeki tamamen yakalanmaz olarak kabul edilir. Polimerin boyutu ayarlanarak retiküloendotelyal sistem tarafından fagositozu engellenebilir. Fagosite edilen partiküllerin degradasyonu çok hızlı olmaktadır (Anderson and Shive, 2012, s. 73).

1993 yılında Pistner ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada eriyik halden oluşturulan katı poli laktid blokları ratlara subkütan olarak yerleştirilmiştir. Bu çalışmada poli laktidlerin kristalinitesinin biyodegradasyon hızına olan etkisi araştırılmıştır. Kristalinite polimerlerin biyodegradasyon hızında önemli rol oynayabilir. Amorf yapıdaki PLGA'nın yarı kristalin haldeki bloğa göre daha hızlı degrade olduğu görülmüştür. Ayrıca yarı kristalin yapıda önce amorf kısımların parçalandığı sonra kristal kısımların parçalanmaya başladığı görülmüştür. Degradasyon esnasında kristalinite derecesi başlangıca oranla artar ve hidrolize daha dayanıklı bir yapı açığa çıkar (Pistner vd., 1993, s. 292-293).

PLGA'nın içerisindeki PLA oranı %70 den az olursa amorf özellik gösterir, yüksek biyobozunurluğa sahiptir ve düşük mekanik dayanıklılığı vardır. Ancak PLA oranı %70 in üzerinde olursa yüksek mekanik dayanıklılık ortaya çıkar biyobozunurluk azalır bu durumda PLGA genellikle doku mühendisliği ve diğer biyomedikal alanlarda tercih edilir. Bu özellikleri PLGA'ya PLA oranının'ın değiştirilerek müdehalesini sağlar. Değişen oranlarla kontrollü salım değiştirilebilir. PLA PGA'ya göre daha hidrofobiktir. PLA oranı arttıkça hidrofobiklik artar (Amreddy vd., 2019, s. 83).

Shokrolahi ve arkadaşları bir lipit düşürücü etkin madde olan atorvastatin yüklü PLGA nanopartikülleri üzerinde çalışmışlardır. Çalışmadaki amaç enjekte edilebilir appetit kaplı atorvastatin kalsiyum yüklü PLGA kürelerinin adipoz türevli mezenkimal kök hücrelere etki edip etmediğini anlamaktır. Su içerisinde yağ emülsiyonundan katı bir madde almak yöntemiyle, 20-50 µm boyutunda partiküller elde ettikten sonra %10 oranında atorvastatin kalsiyum partiküllere zarar vermeden yüklenmiştir. Atorvastatin

kalsiyum içeren PLGA partikülleri osteojenik hücrelerdeki değişimi azalttığı gözlemlenmiştir (Shokrolahi vd, 2019, s. 95-96).

Yamaguchi ve arkadaşları insülin yüklü kontrollü salıma sahip PLGA küreleri üzerinde çalışmışlardır. PLGA mikrokapsülleri çözücü buharlaştırma ve çoklu emülsiyon işlemleriyle hazırlanmıştır. Yağ içerisinde su emülsiyonu şeklinde diklorometanda dağıtılan kristalize insülinlerin birçoğunun PLGA mikrokapsüllerine bağlandığı gözlenmiştir. Ardından yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalarda yüklenmiş insülinin birkaç saat içerisinde hızlı bir şekilde ortama salındığı gözlendi. Primer diklorometan emülsiyonuna ortama gliserol veya su ilavesi ilk salım etkisini büyük ölçüde azaltır. İnsülin ve PLGA'da amfifilik özellikler taşımaktadır. Ortama hazırlama esnasında ekstradan eklenecek su veya gliserol olması durumunda insülinler PLGA'nın içerisine heterojen olarak dağılacak ve bu neticede ilk hızlı salım engellenerek kontrollü bir salım vücut içerisinde sağlanabilecektir. Gliserolün ek bir etkisi olarakta PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığını 42.5 C° 'dan 36.7 C° dereceye düşürür. Yapılan in-vivo çalışmalar sonucu vücut içerisine subkütan verilen PLGA'nın porözlü yapısı kaybolmuş bu sayede kontrollü salım elde edilmiştir. Tip 1 diabet hastaları için yeni bir umut ışığı geliştirilmiştir. (Yamaguchi, vd. 2002, s. 235).

Bir başka çalışmada romatoid artrit, anti enflamatuar amaçlar ve üveitte sıkça kullanılan bir NSAİ ajan olan naproksen yüklü PLGA partiküllerinin fizikokimyasal karakterizasyonu yapılmıştır. Nanopartiküller tekli emülsiyon yöntemiyle, çözücü buharlaştırma ve ekstraksiyonu yöntemiyle hazırlanmıştır. Fizikokimyasal karakterizasyonu için partikül boyutu analizi, diferansiyel taramalı kalorimetri, X ışını kristalografisi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ve elektron mikroskobu kullanılmıştır. 352-571 nm boyutunda küresel ve pürüzsüz partiküller elde edilmiştir. Etkin madde ve PLGA arasınd bir etkileşim gözlenmemiş ve düşük kristalinite gözlenmiştir. Nanoparçacıklar fiziksel karışıma oranla yavaş salım göstermiştir. Bu çalışma sonucu ilacın fizikokimyasal özellikleri iyileşmiştir ve tahmin edilmektedir ki terapötik bir iyileşmede sağlanacaktır (Jawadzadeh, vd., 2010, s. 492).

2008 yılında yapılan bir başka çalışmada rifampisin etkin maddesi, kitosan, PLGA ve bunların kombinasyonları üzerinde durulmuştur. PLGA, kitosan ve PLGA-kitosan partikülleri emülsiyon ya da çöktürme teknikleriyle hazırlanmıştır. Hazırlanan partiküllerin nebulizasyon şeklinde kullanımı ve kullanım sırasındaki stabiliteyi ölçülmüştür. PLGA mikropartiküllerinin kitosana nazaran daha yüksek rifampisin

yükleme kapasitesinin ve sitotoksitesinin olduğu anlaşılmıştır. Kitosan oranının % 0.75 ve % 0.50 olduğu serilerde en yüksek yükleme kapasitesine, nebulizasyon verimine ulaşılmıştır. Bu nebulizasyondan sonra toplama kapasitesi mukus ortamında bakılmıştır. Çalışmanın sonunda nebulizasyonla rifampisin yüklü PLGA'nın kitosana göre daha iyi bir alveolar taşıyıcı olduğu ortaya konmuştur. Ancak iki polimerin bazı oranlardaki kombinasyonu tek kullanılmış hallerine göre daha az alveolar sitotoksitesine ve daha çok rifampisin yüklemeye kapasitesine sahiptir. PLGA-kitosan kombinasyonlu mikro partiküller nebulizasyon esnasında en yüksek stabiliteye, pozitif yüzey yüküne ve iyi bir mukoadhezyona sahiptirler (Manca, vd., 2008, s. 220-230-231).

## 2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bir nanometre metrenin milyarda birine eşittir,  $1\text{nm}=10^{-9}$  m. (Chavda, 2019, s.70-71). Nanoenkapsülasyon 1-1000 nm boyutunda olan polimerik taşıyıcıların içerisine ilaç hapsedilmesi anlamına gelir (Reis vd., 2006, s. 9).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle beraber, ilaç taşıyan nanopartiküller kontrollü salım, sürekli salım, ilacın kimyasal bozunmaya karşı korunması ve biyodegradasyonun önlenmesi gibi konularda ortaya çıkmışlardır. Nanopartiküller intravenöz, pulmoner, oral, transdermal, oküler ve nazal uygulanabilmektedirler. Özellikle transdermal yol aracılığıyla hastanın tedavi uyuncu, terapötik verim artırılabilir ve hedeflendirme nanopartiküler sistemlerde yapılabilir (Sharma, 2019, s. 499).

Polimerik nanopartikül kavramı her çeşit polimerik nanopartikülü nitelese de özellikle nanokapsül ve nanoküreler içindir. Polimerik nanopartiküller çoğunlukla katı taşıyıcı sistemlerdir. Nanoküreler matris, nanokapsüller ise ilaca ait molekülleri orta çekirdekte barındıran veziküler yapıya sahiptirler. Nanokapsüller ilaç etkin maddesini çoğunlukla merkezlerinde barındırmalarına rağmen kapsülün yüzeyinde veya yüzey ile çekirdek kısmı arasında kalmış molekülleri de barındırabilirler. Hidrofobik yüzeye sahip polimerler intestinal epitelden hidrofilik olanlara göre daha fazla absorplanır. Genellikle hidrofobik polimerlerin pozitif yüklü veya yüksüz halde olanları bağırsak mukoza epiteline, negatif yüklü olanlara göre fazla afinite gösterir. Bu durumun aksine hidrofilik yüzeyli ve negatif yüklü polimerler bağırsak mukozasına yüksek afinite gösterirler ve enterositler tarafından absorplanırlar (Reis vd., 2006, s. 9).

Nanopartiküler sistemler ilaçların farmakokinetik özelliklerini değiştirebilir. Zayıf çözünürlüğe sahip veya biyoyararlanımı düşük ilaçları daha üstün özelliklere sahip hale

getirebilirler. Etkin maddenin stabilitesini artırarak biyoyararlanıma etki edebilirler (Das, Das and Kammari, 2017, s. 106).

Nanoboyuttaki taşıyıcı sistemlerin bir diğer avantajı ise yüzey alanının artmasıdır. Lipozomlar, katı lipit nanopartiküller, dendrimerler, karbon nanotüpler, metalik ve manyetik nanopartiküller, polimerik nanopartiküller başlıca nanopartiküler sistemlerdendir. Vücut içerisindeki uygulamalarda bu partiküllerin opsonizasyonu, nanopartiküllerin boyutu hepatik filtrasyon, itrah gibi önemli konular mutlaka değerlendirilmelidir (Chavda, 2019, s. 70-71).

Nanopartikül hazırlamak için birçok metod geliştirilmiştir. Ancak bu metodlar temelde ikiye ayrılabilir. İlk metod önceden hazırlanmış bir polimer veya makromolekülden hazırlanan nanopartikülleri içerir diğer metod grubunda ise formülasyon hazırlanma aşamasında polimerizasyon reaksiyonu gerçekleşir (Reis vd., 2006, s. 9).

Polimerizasyonun formülasyon aşamasında oluşturulan metodlar, kendi içinde emülsiyon ve ara yüzey polimerizasyon yöntemleri olarak ayrılır. Sürekli faza bağlı olarak emülsiyon yöntemi organik faz ve sulu faz olarak ikiye ayrılır (Reis vd., 2006, s. 9).

### **2.5.1. Polimerik nanopartiküller (PNP) ve hazırlanmaları**

PNP'ler yüksek enkapsülasyon etkinlikleri, diğer partiküler sistemlere göre yüksek hücre emilim, doku ve hücrelerle daha iyi biyouyumluluk, hedeflendirme ve etken maddenin özelliklerinin iyileştirilmesi gibi önemli avantajlara sahiptir. Ancak hazırlanmalarında kullanılan ajanların toksik özellikleri, pahalı ve zor hazırlanma yöntemleri, bazı polimerlerin biyo bozunur olmayışı gibi olumsuz özellikleride göz önünde bulundurulmalıdır (Lu vd.,2011, s. 301).

Polimerik nanopartiküller doğrudan bir monomerin polimerizasyonu veya önceden hazırlanmış bir polimerin dağıtılması (disperse edilmesi ile) hazırlanabilirler (Lu vd.,2011, s. 302).

Çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme, diyaliz ve süperkritik sıvı teknolojisi, süperkritik bir çözeltinin ani genişlemesi veya sıvı bir çözücüde süperkritik bir çözeltinin hızla genişlemesi yöntemleri önceden hazırlanmış polimerlerden hareketle polimerik nanopartikül eldesinde kullanılabilir (Crucho and Barros, 2017, s. 772).

Ayrıca mikro emülsiyon, mini emülsiyon, sürfektan içermeyen emülsiyon, yüzeyler arası polimerizasyon gibi çeşitli yöntemler de monomerlerden hareketle doğrudan polimerik nanopartikül eldesinde kullanılabilir (Crucho and Barros, 2017, s. 772).

Polimerik nanopartikül hazırlanma yönteminin seçimi, etken maddenin özellikleri, uygulama şekli gibi özelliklere göre tayin edilebilir (Rao and Geckeler, 2011, s. 889). Örneğin polimerik sistem biyomedikal alanlarda kullanılacaksa yüzey etkin madde veya organik solvanlar gibi toksik olabilecek maddeler içermemelidir. Bu durumda polimerik nanopartikül hazırlama yöntemlerinden süperkritik sıvı yöntemleri ön plana çıkmaktadır. PNP hazırlanma yöntemlerinin şematik gösterimi **şekil 2.3.**'de sunulmuştur. Süper kritik sıvı teknolojisi ile organik solvanlara veya yüzey etkin maddelere gerek duyulmadan polimerik nanopartikül hazırlanabilmektedir (Rao and Geckeler, 2011, s. 889).



**Şekil 2.3.** PNP eldesinin gösterimi (Crucho and Barros, 2017, s.772).

### 2.5.1.1. Önceden hazırlanmış bir polimerin disperse edilmesiyle hazırlanan PNP'ler

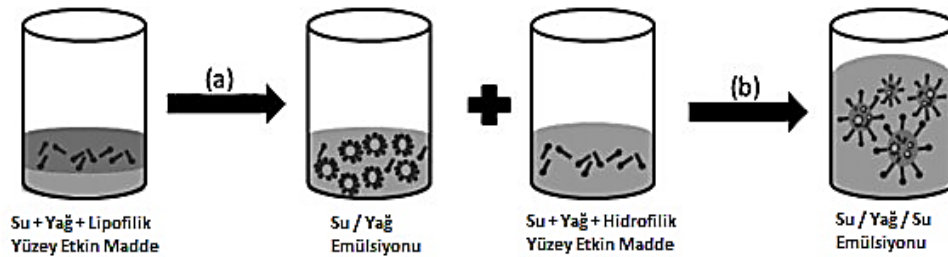
Nanopartiküller polimerler, proteinler ve polisakkartiler gibi makromoleküllerden hareketle hazırlanabilirler. Önceden hazırlanmış olan polimerin kullanılması, hazırlama aşamasında kullanılan yüzey etkin madde, monomer kalıntıları gibi toksik maddeleri barındırmaz. Bu toksik maddeler bazı hazırlama yöntemlerinde sistemin içerisinde kalarak toksik, advers veya etken maddenin istenilen performansını etkileyebilir. Önceden hazırlanmış bir polimerin kullanılması ayrıca yapılacak bir saflaştırma işlemide gerektirmez (Nimesh, 2013, s. 25-26).

### 2.5.1.1.1. Çözücü buharlaştırma

Çözücü buharlaştırma önceden hazırlanmış polimer çözeltileri aracılığıyla polimerik nanopartikül eldesinde kullanılan ilk yöntemdir (Nimesh, 2013, s. 26).

Çözücü buharlaştırma yöntemi polimerik nano ve mikro boyutlarda partikül eldesinde yaygın şekilde kullanılır. Bu yöntemin temeli etken maddenin çözündürülmesi ile sulu faz oluşturulması ve diğer fazın içinde dağıtılarak bir emülsiyon oluşturulmasına dayanır. Bazı durumlarda çözünmek yerine sıvı fazda disperse edilmiş halde de yöntem uygulanabilir. Ardından çözücünün buharlaştırılmasıyla etken madde ve polimer birbirleri içerisine yüklenir. Çift emülsiyonlu yöntemde yapılan çalışmalar nanoparçacıkların daha büyük partiküllerin etrafında toplanarak hazırlanan sistemin patlama etkili salım (*burst release*) etkisini artırdığını göstermiştir (Stevanović, 2017, s. 366).

Bu yöntemde emülsiyonlar formüle edilerek polimer çözeltileri uçucu çözücüler içerisinde hazırlanır. Önceleri dikloro metan ve kloroform sıkça kullanılırdı artık daha az toksik olan etil asetat bu çözücülerin yerini almıştır. Bu yöntemlerde yüksek hızda homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanılır ardından, oda sıcaklığında sürekli manyetik karıştırıcı veya basıncın düşürülmesiyle çözücünün buharlaşması sağlanır. Sonradan katılmış olan nanopartiküller ultrasantrifüjle toplanır ve istenmeyen maddelerden distile su ile yıkanarak arındırılabilir. Son olarak ürün liyofilize edilir. Genellikle polimer yağ fazında çözünür. Çözücü buharlaştırma metodunda kullanılan çift emülsiyon hazırlanma tekniği **şekil 2.4.**'te gösterilmiştir (Rao and Geckeler, 2011, s. 890).



**Şekil 2.4.** Su/yağ/su çift emülsiyonun hazırlanışı, a: yüksek gerilimli emülsiyon

b: düşük gerilimli emülsiyon (Rao and Geckeler, 2011, s. 890).

Örneğin amfoterisin B bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalarda ortaya çıkan mantar enfeksiyonları için kullanılmaktadır. Bu ilacın intravenöz olarak uygulanmasında ortaya nefrotoksisite, anemi ve elektrolit anomalileri gibi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkileri engellemek için amfoterisin B lipozom içerisine yüklenmiştir. Lipozom preparatı amfoterisin B'nin toksisitesini azaltmış mantarlı hücrelere seçici olarak taşınmasını ve antibiyotiğin yavaş salımını sağlamıştır. Ancak lipozomların kararlılığı önemli bir problemdir. Bu kararlılık sorunu düşünüldüğünde amfoterisin B için daha stabil ancak lipozomun avantajlarını koruyabilecek bir sistem geliştirilmesi gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmada PLGA nanopartikülleri içerisine amfoterisin B etkin maddesi çözücü buharlaştırma yoluyla yüklenmiştir.  $130 \pm 27$  nm boyutunda nanopartiküller elde edilmiştir (Venier-Julienne and Benoit, 1995, s. 121).

Çözücü buharlaştırma metodu, polimerik nanopartikül hazırlamak için basit bir yöntem olsada zaman alıcı ve buharlaştırma esnasında nano damlacıkların koalesansa uğrayabilir olması sebebiyle sonuç ürününün partikül boyutu ve morfolojik özelliklerini değiştirebilmektedir. Polimerin konsantrasyonu, emülsiyon hazırlamada kullanılan çözücü gibi faktörler de ayrıca sonuç ürünü etkilemektedir. Etil asetat ve metilen klorür ile hazırlanan iki farklı PNP'de bu etki gösterilmiştir. Sonuç ürününde polimerin dağıtıldığı faz metilen klorür olursa parçacık boyutu etil asetata göre daha büyük olmaktadır (Rao and Geckeler, 2011, s. 890-891)

Çözücü buharlaştırma yönteminde partikül boyutu etken maddenin salım hızını ve yükleme kapasitesini etkilediğinden önemlidir. Karıştırma hızı, organik fazın viskozitesi, su fazı, polimer yoğunluğu ve sıcaklık parçacık boyutunu etkileyebilen faktörlerdendir. PLGA ve PLA çözücü buharlaştırma metoduyla sıklıkla hazırlanan polimerik nanopartiküllerdendir (Lim and Hamid, 2018, s. 225).

#### **2.5.1.1.2. Tuzla Çöktürme**

Bu yöntemin temeli suyla karışabilen bir çözücünün tuzla çöktürme etkisiyle sıvı fazdan ayrıştırılması temeline dayanır. Bu sistemde tuzla-çöktürme ajanının seçimi önemli rol oynar ve etken maddenin enkapsülasyon verimini belirler (Nimesh, 2013, s. 29).

Tuzla çöktürme emülsiyon metodlarının biraz daha değiştirilmiş bir halidir. Bu metotta etken madde ve polimer suda çözünebilir bir sıvı içerisinde (aseton etanol, metanol) birlikte çözündürülür. Bu çözündürülmüş etken madde ve polimer içeriğinde



aynı zamanda yüksek miktarda tuzla çöktürme ajanı ve stabilizatörlü jel içerir. Tuzla çöktürme ajanı olarak magnezyum klorür, kalsiyum klorür veya magnezyum asetat gibi tuzlar kullanılır. Yüksek hızda karıştırma ile beraber su içerisinde yağ şeklinde bir emülsiyon meydana gelir. Ardından emülsiyondaki su fazı artırılır. Dışardan gelen bu uyarım sayesinde katılma başlar ve polimerik nanopartiküller katılarak çökme başlar. Ultrasonik veya çözücünün buharlaştırılmasıyla PNP'ler elde edilir (Lim and Hamid, 2018, s. 227)

Tuzla çöktürme yapılırken genelde çevreye ve fizyolojik ortamlara zararlı organik çözücülerin kullanımı gerekmektedir. Emülsiyonun büyük miktarlarda su ile seyreltilmesi ters tuzlama etkisine ve emülsiyon damlacıkları içerisinde bulunan polimerin çökmesine neden olur. Çeşitli kaynaklardan elde edilen bilgilere göre; PLGA için tuzla çöktürme ajanı olarak magnezyum klorür, kalsiyum klorür, poli vinil asetat kullanılmıştır. Organik çözücü olarak ise asetonitril, tetrahidrofuran ve dimetilsulfoksit kullanılmıştır. Zang ve ekibi tarafından yapılan bir araştırmada karıştırma hızının ve polimer konsantrasyonunun partikül boyutuna olan etkisi emülsiyon yöntemine göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca karşılaştırılabilir şartlar altında tuzla çöktürme yönteminde daima daha küçük partikül boyutları elde edilmiştir. Bu farklılığın sebebi tuzla çöktürme yönteminde organik fazın suyla karışabilir olmasından kaynaklanmaktadır. Tuzla çöktürme yönteminde damlacık oluşumu için gereken enerjinin daha az olması beklenmektedir (Rao ve Geckeler, 2011, s. 892).

Bu yöntem temel olarak birbirleriyle karışabilen iki faza daha sonra tuz eklenerek birbirlerinden ayrılması esasına dayanır. Tuzla çöktürme yönteminde genellikle etken madde ve polimer asetonda çözündürülür ardından sürekli faza tuz ve stabilize edici ajan eklenerek bir emülsiyon oluşturulur. Son aşama olarak elektrolit bulunan fazın kontrollü biçimde dilüe edilmesiyle aseton damlacıkları tekrar çözünebilir hale gelir. Ortamda PNP oluşumu sağlanır (McCarron, Donnelly and Marouf, 2006, s. 481).

#### **2.5.1.1.3. Nanoçöktürme**

Bu yöntem çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da bilinen hızlı ve maliyeti ucuz bir yöntemdir. Polimer su ile çözünebilir bir çözücüde çözündürülür ardından yavaş yavaş su eklenir ve PNP'ler ara yüzeylerde toplanmaya başlar. Ortamdan sulu faz uzaklaştırılır elde edilen PNP'lerde etken madde PNP içerisinde, dış kısmında veya homojen bir şekilde dağılım gösterebilir (Öztürk, 2017, s. 15)

Nanoçöktürmedeki temel prensip polimerin lipofilik bir çözücüde suyla karışabilen yarı-polar bir çözücü aracılığıyla ara yüzeyde biriktirilmesine dayanır. Çözücü faz ile çözücü olmayan fazın birbirine hızla difüzyonu iki faz arasındaki gerilimi düşürür, yüzey alanının artmasına ve küçük organik faz damlacıklarının oluşumuna neden olur. Polimerin çözünebildiği organik çözücü suyla karışabilen ortamdan kolayca buharlaştırılabilen etanol, aseton, hekzan, metilen klorür ve dioksan gibi çözücüler olabilir. Bu metot da genellikle polimer çözücüsü olarak aseton, bazı durumlarda ise ikili çözücü karışımları kullanılabilir. Bir veya daha fazla sıvı içeren non-solvan faz doğal olarak oluşan ya da sentetik yüzey etkin maddelerle desteklenir. İyi şekilde oluşan polimerik nanopartikül yapıları organik fazın non-solvan faz içerisinde ani ve dar dağılımıyla karakterizedir. Bu sebepten organik fazın non-solvan fazda dağılımını etkileyen fizikokimyasal faktörler oluşan polimerlerin yapılarında belirlemiş olur. Bu faktörlerden bazıları: organik fazın non-solvan faza enjeksiyon oranı, organik fazın non-solvan faz içerisindeki dağılımı, organik faz non-solvan oranı, organik fazın hızlı dağılımı için non-solvan fazın gerekli karıştırma (çalkalama) miktarı gibi parametreler önem taşımaktadır. Nanopresipitasyon yönteminde yüzey etkin madde kullanımı şart değildir. Ancak partikül boyutu yüzey etkin maddenin yapısı ve konsantrasyonundan etkilenmektedir. Ayrıca yüzey etkin madde varlığı oluşacak nanopartiküllerin aglomerasyonunu engellemekte ve oluşan nanopartiküllerin saklama esnasında da aglomere olmasını zorlaştırmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011, s. 893).

Özellikle lipofilik etken maddeler için nanoçöktürme veziküler veya matris sistemli kolloidal taşıyıcılar üretiminde çokça kullanılan bir metoddur. Bu metod, önceden hazırlanmış bir polimerin organik çözücüde çözündürülmesi ve yüzey etkin maddenin varlığında sulu bir ortamda difüze olarak nano boyutlarda çökmesini kapsar (Barichello, vd., 1999, s. 471).

Nanoçöktürme yönteminde PNP oluşumu, iki faz arasındaki arayüzeyde oluşan türbülans veya iki faz arasında iplikçik şeklinde oluşan etkileşimler olarak açıklanabilir. Polimer çözücüsünü içeren çözücü, manyetik olarak karıştırılan sıvı faza ilave edilir. Ardından polimerin içerisinde bulunduğu organik solvan suya difüze olur. Az çözünen ortamda bulunan polimerler zincirler oluşturmaya, birbirlerine tutunarak agrage olmaya başlarlar. Bu mekanizma su-çözücü, çözücü-polimer ve su- polimer arasındaki ilişkilerle açıklanabilir (Galindo-Rodriguez, vd., 2004, s. 1435).

Nanoçöktürme metodunda çözücü ve non-çözücü olarak iki fazdan söz edilebilir. Çözücü içerisinde çözünen etken madde ve polimer, anti-çözücü içerisine dökülür. Çözünmedikleri bir ortama geçen etken madde ve polimer hızlıca çökmeye başlar. Nanopresipitasyon yöntemi hızlı ve kolay uygulanabilir bir teknik olmasının yanı sıra dezavantajı sıvı fazla kullanılan yüzey etkin maddelerdir. Bu zararlı maddeler ilaç içerisinde kalarak toksik etkiler açığa çıkarabilir (Zhang, vd., 2006, s. 153-154).

Nanoçöktürme yöntemi basit, hızlı, tekrarlanabilir ayrıca hem nanoküre hemde nanokapsül hazırlamada kullanılan bir yöntemdir. Lince ve ark. nanoçöktürme yönteminde partikül oluşumunun çekirdekleşme, büyüme ve agregasyon olarak üç basamakta gerçekleştiğini söylemişlerdir. Bu basamaklardan her birinin hızı partikül boyutunu belirlemektedir. Nanoçöktürme esnasında gerçekleşen çekirdekleşme ve büyüme basamakları arasındaki dağılım homojen partikül oluşumunu etkilemektedir. Bu yöntemde ideal olan çalışma koşulları yüksek çekirdekleşme ve düşük büyüme oranına izin vermelidir (Rao ve Geckeler, 2011, s. 893-894).

#### **2.5.1.1.4. Diyaliz**

Diyaliz yöntemi polimerik nanopartikül hazırlanmasında basit ve etkili bir yöntemdir aynı zamanda küçük ve birbirine yakın boyutlarda yani dar dağılımlı sonuç ürünleri elde edilmesini de sağlar (Nimesh, 2013, s. 30).

Polimer bir organik solvent içerisinde çözündürülür ve uygun büyüklükte bir diyaliz torbasının içine aktarılır. Diyaliz polimerin diğer ortamda çözünmediği bir sıvı aracılığıyla yapılır. Membranın geçirgen yapısı sayesinde diyaliz torbasının içindeki çözücü dışarı çıkar, içeriye ise polimerin çözünmediği faz girer. Polimerin çözünürlüğü azalır çökme ve agregasyon başlar. Bu haliyle metod çözünmeyen fazlardan faydalanılmasıyla bir miktar nanopresipitasyon yöntemine benzetilebilir. Diyaliz membranı polimerik partikülleri bırakmayan bir fiziksel bariyer görevi görür (Nagavarma, vd., 2012, s. 17).

Diyaliz yönteminde polimer, sürfektanlar ve etken madde diyaliz membranı torbasında çözündürülür. Çözünmeyen sıvının içeriye girişiyle polimer ve etken madde sisteminin agregasyon süreci başlar. Ardından homojen şekilde bir nano veya mikropartikül oluşumuyla sonuçlanır (Errico, vd., 2009, s. 2).

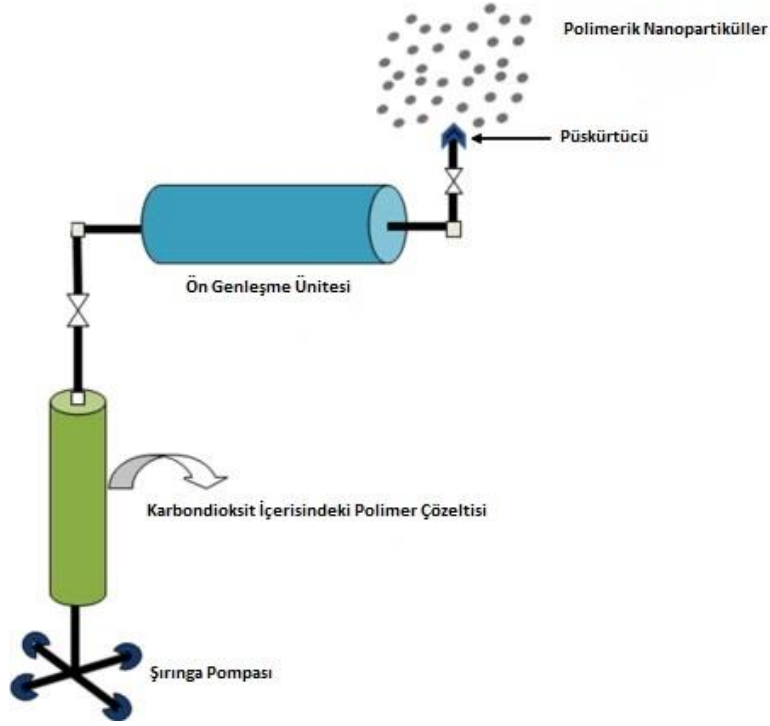
### **2.5.1.1.5. Süperkritik sıvı teknolojisi**

Süperkritik sıvı teknolojisi, farmasötik alanda, polimerler, biyopolimerler, organik veya inorganik materyal üretimi gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Süperkritik sıvı teknolojisinin anlaşılması gereken kısımları, süperkritik çözeltilerin hızla genişmesi, anti çözücü kullanımı (kullanılan gazla karışabilir olmalıdır), gaz çözeltileri içerisindeki partiküllerdir. Bu teknoloji sayesinde nanomateryalleri şekillendirme, yüzey modifikasyonları, kaplama ajanları gibi konularda da istenilen beklentileri almak mümkündür. Süperkritik koşullarda genellikle çözücü olarak CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O kullanılır (Byrappa, Ohara and Adschiri, 2008, s. 301-322).

Nanopartikül hazırlanmasında geleneksel metodların çoğunda kullanılan çevreye ve insan sağlığına zararlı organik çözücüler süperkritik sıvı teknolojisinde kullanım gerektirmezler. Süperkritik sıvı kritik sıcaklığının üzerinde bir çözücünün basınçtan bağımsız olarak tek bir faz halinde kalabilmesi esasına dayanır. Süperkritik sıvı teknolojisinde kritik koşullarının uygunluğu, ucuz olması, non-toksik, yanmaz olması dolayısıyla yaygın olarak CO<sub>2</sub> kullanılır. Ayrıca süperkritik non-solvan tekniği daha sıkça kullanılan yöntemdir. Burada bir çözücü içerisinde polimer ve etken madde çözündürülür, ardından tank içerisinde süperkritik sıvı ile karıştırılır. Polimer çözünmediği ortam miktarının artmasıyla agra olmaya başlar. Püskürtme işlemiyle nanopartiküller ortaya çıkar. Kullanılan çözücü ve süperkritik sıvı gaz şeklinde buharlaşarak ortamdan uzaklaşır. Bu teknoloji herhangi bir atık madde bırakmadığı için çevreye ve üretilen madde için toksik bir atık oluşturmaz. Ancak pahalı ve özel ekipmanlar gerektirmektedir (Mohanraj and Chen, 2006, s. 564).

Süperkritik sıvının hızla genişmesi tekniği içerisinde kullanılan sıvının eşsiz özellikleri sayesinde başarılı olmaktadır. Bu teknikle üretilen polimerik partiküllerin parçacık boyutu aralığı birbirine yakın olarak elde edilebilmektedir (Sun and Rolins, 1998, s. 585).

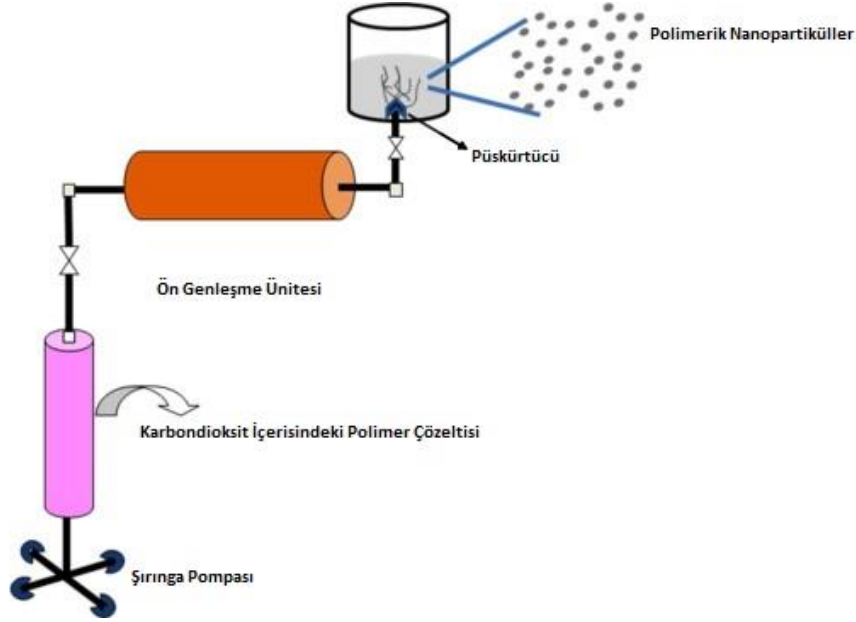
Bu sistemle polimerin süperkritik sıvı içerisinde çözündürüldükten sonra doğrudan püskürtülmesiyle PNP eldesi veya süperkritik sıvı ile karışabilen bir çözücüde polimerin çözündürüldükten sonra akışkan çözücünün püskürtülerek genişmesiyle PNP eldesi mümkündür (Öztürk, 2017, s. 17-18).



**Şekil 2.5.** Süperkritik Akışkanlarla Polimerik Nanopartikül Eldesinin

*Sistemik Şeması (Rao and Geckeler, 2011, s. 897)*

Konsantrasyon, doygunluk derecesi, madde özellikleri, sürecin koşulları, polimerin molekül ağırlığı gibi faktörler süperkritik akışkan sıvı teknolojisinde sonuç ürününün partikül boyutunda önemli rol oynamaktadır. Bu yöntem polimerik nanopartikül eldesinde her ne kadar organik solvan kullanımından uzak bir teknik olsa da yöntem aracılığıyla elde edilen ürünlerin nano boyuttan ziyade mikro boyutta sonuç ürünleri elde ediliyor olması yöntemin en büyük dezavantajıdır. Bu sakıncanın üstesinden gelebilmek için çözelti içerisindeki süperkritik sıvının hızlı genişmesi tekniği geliştirilmiştir. Süperkritik akışkanlarla nanopartikül eldesi **Şekil 2.5.** ve **Şekil 2.6.**'da şematize edilmiştir (Rao and Geckeler, 2011, s. 896-897).



**Şekil 2.6.** Çözelti İçerisindeki Polimerin Süperkritik Sıvı ile Birlikte Hızla Genleştirilerek PNP üretimi (Öztürk, 2017, s. 19).

#### 2.5.1.1.6. Püskürterek kurutma

Nano veya mikro enkapsülasyon işlemleri hem etkin maddeyi korumakta hemde ilacın doğru yere istenilen miktar ve zamanda ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Bilindiği üzere, kapsüller ve tabletler başta olmak üzere pek çok farmasötik form kuru ve katı haldedir. Bu açıdan özellikle sıvı veya diğer yarı katı ilaç formlarının kurutularak daha kararlı ve kullanılabilir bir forma getirilmesinde püskürterek kurutma önemli bir metoddur (Arpagaus vd., 2018, s. 196).

Sıcak hava odasına çözelti püskürtülürken yüksek atomizasyon enerjisi ile küçük boyutlu parçacıklar, düşük atomizasyon enerjisi ile büyük boyutlu parçacıklar elde edilebilir. Aynı zamanda yüzey geriliminin düşürülmesi, viskozite gibi faktörlerde partikül boyutunu etkilemektedir. Genellikle kurutma işlemi sonucunda birbirleriyle eş boyutlarda parçacıklar istenir (Liu, Chen and Selomulya, 2015, s. 2).

Bu yöntemdeki temel amaç sıvı haldeki taşıyıcı sistemi katı hale getirmektir. Yöntemin işleyişi sıvı haldeki etkin maddeyi atomizer denilen birimden kuvvetli şekilde püskürtür, püskürtme odasında havada asılı kalan sıvı damlacıkları sıcaklığın etkisiyle hızlı bir şekilde çözücüsünden ayrılır. Elde edilen katı haldeki parçacıklar cihazın katı parçacık toplama haznesinde birikir, buharlaşan sıvı ise ortamdan çekilerek uzaklaştırılır.

Cihazın en büyük problem oluşan katı parçacıklarında ortamdaki çözücü buharını uzaklaştıran sistem tarafından dışarıya atılmasıdır (Öztürk, 2017, s. 19-20).

Püskürterek kurutma yönteminde maddenin ısıya dayanıklılığı önemlidir. Bunun için eş akışlı veya karşı akışlı püskürterek kurutma cihazları vardır. Eş akışlı olan teknikte çözücü buharlaştıktan sonra kalan partiküller sıcak odadan uzaklaştırılır. Ancak karşı akışlı cihazda çözücüsü buharlaşan materyal yüksek ısıya daha uzun süre maruz kalacağından maddenin ısıya duyarlılığı düşünülmelidir (Liu, Chen and Selomulya, 2015, s. 2).

### **2.5.1.2. Bir monomerin polimerizasyonu ile elde edilen PNP'ler**

Monomerden hareketle elde edilen polimerler üç temel başlık altında tartışılabilir bunlar mini, mikro ve emülsiyon polimerizasyonu teknikleridir. Ayrıca ters-faz polimerizasyonları örneğin yüzeyler arası ve kontrollü radikal polimerizasyonları gibi yöntemlerden bahsedilebilir (Crucho and Barros, 2017, s. 772).

#### **2.5.1.2.1. Emülsiyon polimerizasyonu**

Emülsiyon polimerizasyonu polimer hazırlanmasında sıkça kullanılan bir tekniktir, çeşitli inorganik materyallerinde enkapsülasyonuna uyarlanmıştır (Casado, 2007, s. 2554).

Emülsiyon polimerizasyonu, farklı katkı maddelerinin oranları ve monomer çeşitlerinin kullanımıyla bizlere morfoloji, şekil, bileşen anlamında istediğimiz özelliklere sahip son ürünler verebilmektedir (Anderson and Daniels, 2003, s. 6).

Emülsiyon polimerizasyonu nanometre boyutlarında partikül sentezlemek için güçlü bir yöntemdir. PNP eldesinde, nanopresipitasyon yöntemine göre genellikle daha fazla yüzey etkin madde, tampon çözeltiler, stabilizatörler gibi kimyasalları içeriyor olması daha fazla yıkama işlemi gerektirmektedir. Bu çok sayıda komplike yıkama işlemi sonucunda elde edilmek istenen ürünün saflığında azalmalar olabilir (Wackerlig and Lieberzeit, 2015, s.147).

Emülsiyon polimerizasyonu tekniği nanopartikül hazırlamada hızlı bir tekniktir. Metod temel olarak sürekli fazın organik veya sulu olmasına göre iki kategoriye ayrılabilir. Sürekli organik faz yönteminde, monomerin organik faz içerisinde emülsiyon veya ters emülsiyon şeklinde dispersiyonunun oluşturulması esastır. Polimerleşmenin erken evrelerinde agregasyonu önlemek için bu yöntemde kullanılan kimyasallar

yöntemin kullanılabilirliğini azaltır. Sürekli sulu faz metodolojisinde monomer sulu fazda çözünür ve herhangi bir kimyasal maddeye gerek olmaz. Çözünmüş olarak bulunan monomerdeki polimerizasyonu başlatmak için iyon veya serbest radikal içeren öncü bir molekül kullanılır. Bu moleküllere alternatif olarak radyoaktif bir ışına veya uygun bir ışın gönderilerek sistemdeki polimerleşme başlatabilir. Faz ayrılması ve PNP'lerin ortaya çıkışı polimerizasyon reaksiyonunun bitmesiyle veya daha erken olabilir (Nagavarma, vd., 2012, s. 19).

Emülsiyon polimerizasyonu yüzey etkin madde kullanımına bağlı olarak kendi içinde konvansiyonel ve yüzey etkin maddesiz olarak ikiye ayrılabilir (Rao ve Geckeler, 2011, s. 898).

Konvansiyonel emülsiyon polimerizasyonunda, bileşenler, su, sudaki çözünürlüğü düşük bir polimer, suda çözünür bir başlatıcı ajan ve yüzey etkin maddedir. Reaksiyon polimer moleküllerinin kolloidleri sürekli fazın içerisinde bir iyon veya serbest radikalle karşılaştığında başlar. Ayrıca polimer molekülleri iyonize radyasyon, gama radyasyonu, ultra viyole ya da güçlü görünür ışıkla uyarılabilir ve bu etkide reaksiyon başlamasına yol açabilir. Polimerik nanopartiküllerin çapı kullanılan yüzey etkin madde miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bu yöntemde gereken polimerleşmeyi başlatmak için kimyasal veya fiziksel bir uyarıcı, kullanılan yüksek yüzey etkin maddelerin ortamdan çıkarılma maliyet zamanı, artan toksisite bu metodun dezavantajlarından (Asua, 2004, s. 1025-1026).

Bu duruma alternatif olarak yüzey etkin madde kullanılmadan yapılan emülsiyon polimerizasyonuna bazı kaynaklar çeşitli isimler vermektedir bunlar: sürfektansız emülsiyon polimerizasyonu, emülsiyon yapıcısız emülsiyon polimerizasyonu ve sabunsuz emülsiyon polimerizasyonu olabilir. Bu teknik basit ve çevre dostu yapısıyla göze çarpmaktadır. Ancak polimerizasyon başlatıcı bir ajanın kullanımı, yardımcı çözücü ve kararlılığı artırmak için kullanılan maddelerin toksisite ve etken madde etkileşimleri göz önünde bulundurulmalıdır (Rao ve Geckeler, 2011, s. 899).

### **2.5.2. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu**

Nanoboyutta sentezlenmiş partiküllerin karakterizasyonu, içerisinde bulunan maddelerin özelliklerinin ve yapısının araştırılmasını kapsayan genel bir terimdir. Karakterizasyon aynı zamanda elde edilen sonuç üründe kullanılan metodun başarılı olup



olmadığını anlamamızda sağlayan kalitatif ve kantitatif tekniklerden oluşur (Titus, Samuel and Roopan, 2019, s. 305).

Nanopartiküllerin karakterizasyonu mikroskopik yöntemler, kromatografik yöntemler, spektroskopik yöntemler, santrifüjleme ve filtrasyon teknikleri, diğer bazı teknikler olarak temel başlıklar altında incelenebilir. Geçirimli elektron mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu en popüler olan mikroskopik tekniklerdir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) metodu nanopartikül boyutlandırılması, agregasyonun anlaşılabilmesi için en yaygın kullanılan spektroskopik yöntemdir. X-ışını kırınımı ve kütle spektrometreside diğer spektroskopik teknikler arasındadır. Zeta potansiyel ise nanopartikül karakterizasyonunda diğer teknikler arasında gösterilebilir. Özellikle koloidal sistemin kararlılığı bu sayede anlaşılabilir (Dağlıoğlu ve Özkan-Yılmaz, 2018, s. 4-5).

### **2.5.2.1. Morfoloji**

Nanopartiküllerin parçacık boyutu, parçacık dağılımının dağılımı ve yüzey yapısı biyodegradasyonda, hedeflendirmede ve ilacın salınımını belirlemede önemlidir. Bu nedenlerden dolayı nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemin yüzey özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir (Öztürk, 2017, s. 23).

Morfolojik karakterizasyon işlemleri için çeşitli mikroskopik teknikler kullanılabilir (Mayeen, vd., 2018, s. 335).

Partiküllerin yüzey morfolojisi ve şeklini belirlemek amacıyla genellikle geçirimli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılır (Nimesh, 2013, s. 51).

#### **2.5.2.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)**

Bu elektron mikroskobu temelli teknik parçacıkların direkt görüntülenerek boyut, şekil ve yüzey morfolojisinin belirlemede kullanılır. Bu teknik çeşitli avantajların yanı sıra parçacıkların boyut dağılımı ve ortalama boyut hakkında yeterli bilgi vermez. Bu teknikte ölçüm yapılırken nanopartikül çözeltileri ilk olarak kuru toz haline dönüştürülmelidir. Bu kuru toz numuneyi tutacak bir panelin üzerine yerleştirildikten sonra üzeri altın gibi bir iletken metal ile püskürtülerek kaplanır. Daha sonra tüm numune odaklandırılmış ince bir elektron demeti tarafından analiz edilir. Numuneye çarpan ve saçılan ikincil elektronlar maddenin yüzey özelliklerini belirler. Genellikle bu elektron

bombardımanı numuneye zarar verir. Bu işlem vakum altında gerçekleşir. Ayrıca bu teknikler zaman alıcı, masraflı ve genellikle partikül boyut dağılımı hakkında elde edilecek ek bilgilere ihtiyaç duymaktadır (Bhatia, 2016, s. 40).

Bu metodla kristal yapılar, yüzey morfolojisi, agrage olmuş partiküllerde dahil tüm partiküllerin kesin boyutları anlaşılabilir (Singh, 2016, s. 127).

SEM’ de görüntü alabilmek için incelenecek örneğin üzerine yüksek enerjili elektron saçılımları gönderilir. Analizlerin yapılabilmesi için kuru örneklerin üzerine altın veya platin bir kaplama yapılır (Nimesh, 2013, s. 51).

Bir çalışmada PLGA polimerleri içerisinde bir büyüme faktörü yüklenmiştir ve yüklenen bu etken maddenin kemik dokusu üzerine ilaç taşıma sistemi olarak kullanımı düşünülmüştür. Yapılan çalışmada partiküllerin morfolojisi SEM ile elde edilmiştir (Ortega-Oller, vd., 2015, s. 6).

#### **2.5.2.1.2. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)**

Klasik ışık mikroskobuna çok benzeyen bu teknikte gözle görülür ışığa göre daha göre daha küçük dalga boyunda olan elektronlar kullanılmaktadır. TEM ile neredeyse atomik boyutlara kadar küçük partiküller hakkında bilgi edinmek mümkündür. Bu teknik sayesinde partiküllerin yüzey özellikleri, boyutları, yapıları hakkında detaylı ve yüksek çözünürlükte incelemeler yapılabilmektedir. Yöntemle ilgili problemler ise, cihazın boyutları büyüktür, örnek hazırlamak zahmetlidir, özel eğitim gerektirir, örnek elektron geçirimine müsait olacak kadar ince olmalıdır, görüntülemeler siyah beyazdır (Chirayil, vd., 2017, s. 16).

Çok ince örneklerin hazırlanarak üzerlerine karbon kaplamalarla stabil hale getirilerek elektron ışınlarının bu örnekler içerisinde geçirilmesiyle yüzey yapısı ve morfoloji hakkında bizlere bilgi verir (Newton and Kaur, 2019, s. 316-317).

TEM’de elektron demeti inceleme yapılacak maddenin üzerine düşer ve içinden geçer ardından madde üzerinden saçılan elektron demetleri cihaz tarafından okunur üç boyutlu olarak bilgi edinilmiş olur ancak SEM’de elektronlar yalnızca yüzeyle etkileşim gösterir ve yüzeysel morfoloji hakkında bilgi alınabilir (Mayeen, vd., 2018, s. 336).

Geçirimli elektron mikroskobu teknikleri numunenin görüntülenmesi, difraksiyonu ve numune hakkında spektroskopik bilgiler verebilir. Geçirimli elektron mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu farklı prensiplerle çalışırlar fakat incelenen yapı hakkında birbirlerine benzer datalar verirler. Elektron geçirimi prensibi nedeniyle TEM için

hazırlanacak numunenin çok ince olarak hazırlanması gerekmektedir. Bu ince numune hazırlama prosesi maliyetli, zahmetli ve zaman alıcıdır. Geçirimli elektron mikroskopunda numuneler filmler veya ızgaralarla desteklenmelidir. Nanopartiküller fosfotungstik asit türevleri, uranyum asetat gibi negatif bir materyalle boyanarak sabitlenmelidir. Bu inceleme öncesi prosedür inceleme esnasında cihazın içerisinde oluşacak vakuma dayanıklı olmasını sağlar. Elektron demeti numune içerisinden geçtikten sonra numune hakkında morfolojik yapı aydınlatılmış olur (Bhatia, 2016, s. 42).

#### **2.5.2.2. Partikül boyutu, dağılımı ve yapısal analizi**

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda partikül boyutu ve dağılımı oldukça önemlidir. Morfoloji ve boyutlar elektron mikroskobu aracılığıyla belirlenebilir. Nanopartiküller sistemlerde salım, biyodegradasyon ve hedeflendirme üzerine çalışıldığından partikül boyutu önemlidir ve ilacın salımını etkilemektedir. Küçük partiküller hızlı salım sağlar, büyük partiküllerin biyodegradasyonu ve etken maddenin difüzyonu daha yavaştır ve küçük partiküller bekleme süresi arttıkça agrage olarak büyüme gösterebilir (Pal, vd., 2011, s. 231).

Bu aşamada maksimum stabilite ve uygun parçacık boyutu göz önünde bulundurularak optimum formülasyon tercih edilmelidir. Ayrıca partikül boyutu polimerin degradasyonunu etkiler. Örneğin PLGA nanopartiküllerinin partikül boyutu arttıkça bozunma hızlarının in-vitro olarak arttığı gözlenmiştir (Bhatia, 2016, s. 40).

Partikül boyutu belirlemede kullanılan teknikler:

DLS süspand edilmiş partiküllerin Brownian hareketlerini baz alarak bunların hızlarını Stokes-Einstein denklemiyle bağdaştırıp boyutlarını hesaplar. Doğru sonuçlar elde edebilmek için parçacıkların iyi dağıtılması, örnek hazırlama esnasında toz veya istenmeyen partiküllerin örneğin içinde bulunmaması gerekir (Kumar and Dixit, 2017, s. 44-45).

DLS aynı zamanda foton korelasyon spektroskopisi olarak da bilinir. Polimerik çözeltilerin kolloidal süspansiyonlarında partikül boyutunun belirlenmesinde kullanılır. DLS mekanizması, parçacık ne kadar küçük olursa o kadar hızlı hareket eder ve zamana bağlı ışık saçılımının bir korelasyonuna göre hesaplama yapar. Özellikle taşıyıcı sistemdeki aglomerasyon ve agregasyonların belirlenmesinde TEM' e göre başarılı bir tekniktir. Sistem ayrıca bu istenmeyen agregasyonların PDI'sını da belirlemektedir (Raval, vd., 2019, s. 373).

PDI: 0 ile 1 arasında sonuçlar ortaya koyar sistem 0.1'den düşükse parçacıklar birbirine yakın boyutlarda ve homojendir. 1'e yakın olan değerler ise heterojen bir parçacık dağılımını ifade eder (Raval, vd., 2019, s. 374).

#### **2.5.2.2.1. X-ışını difraktometresi (XRD)**

Spektroskopik X ışını yöntemleri atomik yapıdaki maddelerin kristalin yapılarını çözmek için kullanışlı yöntemlerdir. X ışını incelenecek örnek içerisine gönderilir ardından kristal yapılardan yansıyan ışının kırınma miktarı ölçülür. Ancak X-ışını kırınımı düşük olan maddelerin ölçümü birbirine yakın çıkar (Lin. vd., 2014, s. 10).

XRD numuneyi tahrip etmez ve bileşiklerin elemental yapısı ve kristalografik özellikleri hakkında bilgi verir (Dağlıoğlu ve Özkan-Yılmaz, 2018, s. 4).

XRD çoğunlukla örneklerin toz formu için uygulanır, koloidal çözeltilerde ise kurutma işlemi uygulandıktan sonra analiz yapılır. Bu metod amorf materyaller için uygun değildir (Mourdikoudis, Pallares and Thanh, 2018, s. 12874).

#### **2.5.2.2.2. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)**

Maddelerin ısı kapasitelerinin sıcaklık değişimiyle nasıl etkilendiğini gösteren termoanalitik bir yöntemdir. Bir referans materyale göre örneğin ısı değişiminin ölçülmesi esasına dayanır. Materyalin erime, camsı geçiş sıcaklığı, faz değişimleri, etkin maddelerin polimere hapsedilmesi ve polimerin sertleşmesi tespit edebilir (Nikolic, vd., 2019, s. 610).

#### **2.5.2.2.3. Nükleer manyetik rezonans (NMR)**

NMR spektroskopisi nanoboyuttaki partiküllerin yapısal analizlerin ve kantitatif miktar tayinlerinde oldukça önemli bir methodur. Sistem güçlü bir manyetik alanın ortasına yerleştirilen çekirdeklerin elektromanyetik ışınları absorplaması üzerine çalışır. Örnek içerisindeki yapının tayininde kullanılır. Demir ve demir bazlı manyetik materyaller için kullanımı uygun değildir (Mourdikoudis, Pallares and Thanh, 2018, s. 12874).

### **2.5.2.3. Zeta potansiyel (ZP)**

Partiküller arasındaki pozitif veya negatif elektrik yükü farketmeksizin aynı elektrik yüküne sahip olmaları agregasyonu engellemektedir (Kumar, Bakowsky and Lehr, 2004, s.1774).

Metastatik kanser hücreleri tedavisi için kurkumin yüklü PLGA küreleri üretilmiş bunların partikül boyutları incelenmiştir. Yüzey özellik ve yüklerini anlamak için zeta potansiyelleri ölçülmüştür (Yallapu, vd., 2010, s.25).

ZP ‘Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek’ (DLVO) teorisi kuramına göre, kolloidal sistemlerdeki parçacıkların birbirlerini itme ve çekme kuvvetleri elektrostatik itme ve Van der Waals çekme kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır. Taşıyıcı sistem içerisindeki parçacıkların yüksek yüzey yükleri ile birbirlerini itmeleri daha kararlı sistemler oluşmasına neden olur. Bu gibi durumlarda agregat oluşumuna daha nadir rastlanır. Genellikle ZP partikül yüzeyindeki kimyasal kompozisyonu tanımlayabilmek için önemli bir parametredir. Bu sayede fonksiyonel gruplar, absorpsiyon-desorpsiyon veya kimyasal yapının stabilitesi hakkında bilgiler edinmemizi sağlayabilir. Fakat zeta potansiyel, stabil bir parametre değildir. Formülasyonun doğal özelliklerine veya boyut, konsantrasyon, kimyasal içerik ve morfoloji gibi fiziko-kimyasal özelliklerine göre değişiklik gösterebilir (Marin vd., 2017, s. 517).

ZP kolloidal sistemlerdeki elektrokinetik potansiyelin terimsel ismidir. ZP ortamdaki sıvı ile disperse olmuş partiküllerin yüzeyinde bulunan, sıvı stabil tabaka arasındaki potansiyel farktır. Genellikle birimi mili-volt cinsinden ifade edilir. Yüzey yüklü kolloidlerin karakterizasyonu için en basit ve kolay yol zeta potansiyel hesaplanmasıdır. ZP nano sistemlerin vücut içerisindeki farmakokinetik özelliklerini etkileyebilir. ZP ölçümleri distile su içerisinde veya parçacıkların kendi dispersiyon ortamlarında yapılmalıdır. ZP ölçümünde dispersiyon ortamında bulunan parçacıklar zeta potansiyellerinin büyüklüklerine bağlı olarak ters yüklü şarjlanmış elektroda doğru göç ederler. Ölçüm temelinde bu prensip üzerinden yapılır (Honary ve Zahir., 2013, s. 255-256).

### **2.5.2.4. Etkin madde yüklenmesi ve salım**

Nanopartiküller sistemlerde temel amaç uzun raf ömürlü, düşük toksisiteli, etkin madde yüklenmesinin ve salımı optimize edilmiş şekilde nanopartiküller elde etmektir (Honary ve Zahir., 2013, s. 255-2569).

Partiküllerin bir diğer materyal tarafından çevrelenerek kaplanmasına enkapsülasyon denir. Genellikle enkapsülasyon teknolojileri ilaç, kimya, kozmetik ve gıda sektöründe kullanılır. Kontrollü salım etkin maddenin istenilen yerde ve düzeyde ortama verilmesi anlamına gelir. İlaç endüstrisinde kontrollü salım teknolojileri doku ve istenen hedef organa etkin maddeyi taşıyabilmek için özellikle son yirmi yılda büyük bir gelişme göstermiştir (Gluzza and Kennedy, 2008, s. 216).

İlacın salımı terapötik sistem için emilim ve biyoyararlanım açısından en önemli ön şarttır (Bruschi, 2015, s. 63).

Kontrollü salım sistemlerinde etkin maddenin dışarı çıkışında dört temel yaklaşım söz konusudur. Bu yaklaşımlar: difüzyon, kimyasal erozyon, polimerin şişmesi ve ozmotik pompalama şeklinde ifade edilmiştir (Himmelstein, 1991, s. 304).

Temel olarak ilacın salımı, etkin maddenin difüzyonunun sınırlandırılması veya çeşitli polimerik matrislerle içerden ya da dışardan uyaranlarla kontrol edilebilir. Uygulamada ise sıkıştırılmış tabletler, çapraz bağlanmış jeller, mikropartiküller veya nanopartiküller istenilen salımı gerçekleştirebilir (Uchegbu, 2001, s. 179).

Dışardan bir uyaranla etkin madde salımı yapmak için sıcaklık, pH, enzimler, elektrik akımı, manyetik alan oluşturulması veya ultrasonik bir uyaran gerekmektedir. İçerden bir uyaran ise osmotik basınç olabilir (Uchegbu, 2001, s. 179).

Farmasötik alanlarda mikro ve nano boyutlarda kapsülleme işlemi daha yüksek etkinlik, düşük toksisite, daha uzun kararlılık için tercih edilmektedir (Barba, vd., 2019, s. 272).

İlaçların insan vücudunda dağıtılması, istenilen yere ulaştırılması çok geniş teknikler gerektirir. Farmasötik sistemler tarafından salımın kontrol edilebilmesi, biyolojik, fizikokimyasal veya matematiksel prensiplere dayandırılabilir (Bruschi, 2015, s. 37).

Kontrollü salım teknikleri etkin maddeye bağlı olarak geliştirilir, organizmanın ilaca maruz kalacağı süre, ilacın biyodegradasyondan korunmasını ve etki yöresine istenilen miktarda ulaştırılması hedeflenir. Salımın kontrolünde kimyasal veya biyolojik etkinler rol oynayabilir, basitçe bunlar: dissolüsyon, difüzyon, osmoz, mekaniksel parçalanma, şişme, erozyon ve hedeflemedir (Bruschi, 2015, s. 37).

#### 2.5.2.4.1. Farmakokinetik modelleme

Polimerik sistemlerden ilaç salımı matematiksel modellemeler aracılığıyla önemli oranda gelişmiştir. Özellikle son yarım yüzyıldır birçok karmaşık ilaç tasarım sistemi tasarlanmış ve bunların genel salım-difüzyon davranışlarını tespit etmek için matematiksel modellemeler geliştirmeye çalışılmıştır. Bu matematiksel modeller temelde enkapsüle edilmiş moleküllerin zamana karşı salımını hesaplamaktadır (Peppas and Narasimhan, 2014, s. 75-81).

Salım kinetiklerinin modellenmesi muhtemelen Higuchi'nin 1961 yılındaki bir merhemden etkin maddenin çıkış hızınının zamanın kareköküyle orantılı olarak analiz etmesinden başlamaktadır. O yıllardan itibaren daha karmaşık ancak açıklayıcı birçok model önerilmiştir. Bu modellemeler geliştirilirken laboratuvarında geçirilen saatler, kullanım kolaylığı ve matematiksel olarak anlaşılabilir olması önemlidir. Bu yüzden Peppas ve arkadaşları Higuchi'nin modellemesini daha da geliştirdiler. İlaç salımının zamanın arasında yeni bir kinetik modelleme ortaya koydular. Peppas modellemesi aşağıda eşitlik 1'de gösterilmiştir: (Barba, vd., 2019, s. 293).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \mathbf{2.1.}$$

- $M_t$  : Salınan etkin madde miktarı  
 $M_\infty$  : İlacın başlangıçtaki miktarı veya sonsuz zamanda serbest bırakılan ilaç miktarı  
 $k$  : Sistemin tasarım değişkenlerini yansıtan sabit değer

İlacın salım modeli 0 ve 1. dereceden kinetikleri barındırır. Ayrıca bazen hızlı ilk doz etkinliğinin ardından 0. ve 1. Derece modellemeleri salım için konuşulabilir. Etkin maddenin hızlı bir şekilde etkili terapotik aralığa ulaştığı ilk salıma aynı zamanda 'burst release' denir. İlaça ait salım kinetiğini önceden belirleyebilmek için kütleli taşınma mekanizmalarıyla beraber kantitatif olarak ilaç salım kinetiklerini bilmek gerekir. Matematiksel denklemler aracılığıyla salım kinetiklerini zamanın fonksiyonuna göre önceden belirlemek mümkündür. Salım hızını anlayabilmek için, çözünme hızını anlamak, çözünme davranışlarını anlamak, hangi faktörler bunlara etki eder iyi bilmek gerekir. Bu modellemeler enkapsülasyon sonucu ilacın zamana karşı nasıl salındığını anlamak için geliştirilmiştir. Bu modellerin en temelleri, 0. Derece 1. Derece. Higuchi,

Hixon-crowell, Korsmeyer-Peppas, Baker-Lonsdale, Weibull, Hopfenberg ve Gomperz'dir (Bruschi, 2015, s. 64).

## 2.6. Hücre Kültürü

Hücre kültürü basitçe hücrelerin yapay bir ortamda çoğaltılması yaşılabilmesi ve yeniden üretilmesi anlamına gelir. Hücre kültürü çalışmaları özel ortamlar gerektirmektedir. Laboratuvar ortamı steril olmalı, kontaminasyon olmamalıdır. Hücrelerin gelişmek için yeterli alan ve besine sahip olması gerekmektedir (Uysal, vd., 2018, s. 391-392).

Hücre kültürü hücrelerin organizmadan ayrılarak dış bir sıvı ortamda yetiştirilmesi ve yaşatılması esasına dayanır. 1907 yılında Yale üniversitesinde Ross Harrison adındaki bir araştırmacı kurbağadan aldığı sinir hücrelerini dış ortamda bir süre yaşatmayı başarmıştır. Fizyoloji, patoloji, tıp ve farmakolojide önemli kullanım alanları vardır (Lynn, 2009, s. 144-145).

20. yüzyılın başlarından itibaren doku bazlı solüsyonlarda veya basit tuz solüsyonlarında çeşitli hayvan hücrelerinin kültürü yapılmaktadır. Temel olarak hücre kültürü çalışmalarında medium olarak inorganik tuzlar, karbonhidratlar, aminoasitler ve vitaminler kullanılır. Günümüzde hücre kültürü, biyofarmasötikler, moleküler biyoloji, toksikoloji ve yenilenebilir tıp gibi alanlarda önemli rol oynamaktadır (Whitford, vd., 2018, s. 147).

Farmakoloji ve terapötik araştırmacılar tarafından yeni ilaç moleküllerinin aktivitelerinin ne denli olduğunun anlaşılması ve kısa zaman gerektirmesinden dolayı hücre kültürü yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ghanemi, 2015, s. 453).

Temelde hücre kültürü hayvana ait hücreleri dış bir ortamda *in-vitro* olarak yaşatmayı amaçlar. *İn-vivo* çalışmalara göre *in-vitro* hücre kültürü hızlı, ucuz ve daha az hayvan gerektirir. Ancak doğru bir şekilde vücudun tepkilerini yansıtabildiği, sinirsel iletimlerin aktarılıp aktarılamadığı, yani hücresel iletişimin bu yapay ortamda var olup olmadığı düşünülmeli ve değerlendirmeler bu çizgiler ışığında yapılmalıdır. *İn-vivo* koşullar düşünüldüğünde hücre kültüründeki çalışmalarda müdahale şansı yüksek erişilebilirlik fazladır (Carter and Shieh, 2010, s. 281).



### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

##### Madde adı

Agar-agar

Aseton

Asetonitril

Ketoprofen lizin (KLT)

PLGA (Resomer RG 504 H)

Polivinilalkol (PVA)

Etil asetat

RPMI 1640

Sodyum asetat trihidrat

Metanol

##### Firma adı

Merck, Almanya

Sigma Aldrich, Almanya

Carlo Erba, Fransa

Berko İlaç, Türkiye

Evonik Industries, Almanya

Sigma-Aldrich, Almanya

Panreac Química, İspanya

Sigma Aldrich, Almanya

Panreac Química, İspanya

Merck, Almanya

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

##### Madde adı

Buzdolabı

Derin dondurucu

Dideransiyel taramalı kalorimetre

Dissolüsyon cihazı

Distile su cihazı

Elisa okuyucu

FT-IR

Hassas terazi

İnfrared spektrofotometresi

Liyofilizatör

Manyetik karıştırıcı

Mikropipet seti

NMR spektrofotometresi

pH metre

Plakalar 96'lı

Püskürterek kurutma cihazı

##### Firma adı

Arçelik, Türkiye

Liebherr Medline, LGEX 3410, Almanya

Shimadzu DSC-60, Japonya

Pharma Test PTWS 820D, Almanya

MilliQ Millipore, Fransa

BioTek Cytation 5, m BioTek Ins., Germany

Schimadzu IR Prestige-21, Japonya

Mettler AM 100, Amerika Birleşik

Devletleri

Shimadzu IR-Prestige-21, Japonya

Scanvac Coolsafepro Labogene, Danimarka

Jeoitech MS-53M, Güney Kore

Eppendorf, Almanya

Ultra Shield CP MAS NMR, Almanya

WTW profi Lab. pH 597, Almanya

Greiner, Sigma-Aldrich, Almanya

Nanospray Dryer B-90 Buchi, İsviçre

Santrifüj Cihazı	Nüve NF400, Türkiye
Santifüj Cihazı	Eppendorf 5810, Almanya
Su banyosu	GLF, Tissue float bath 1052, Almanya
Taramalı elektron mikroskobu	Zeiss ultra plus feSEM, Almanya
Ultrasonik banyo	Wisd laboratory Ins., WUC-A03H, Güney Kore
Vorteks karıştırıcı	Jeoitech VM96B, Güney Kore
X-ışını kırınımı cihazı	XRD-Rikagu Rint 2000, Japonya
YBSK kolonu	150×4.6 mm LiChrospher® 100 RP-18
YBSK cihazı	Shimadzu 20-A, Japonya
Zeta potansiyel analiz cihazı	Zetasizer Nano Series, İngiltere Birleşik Krallık

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Formülasyonlarda Etkin Madde Miktar Tayini için Gerekli Analitik Yöntemin Optimizasyonu ve Validasyon İşlemleri

Etkin madde miktar tayini ve salım çalışmalarında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) kullanılmıştır. Bu nedenle öncelikle YBSK analizlerinde araştırma laboratuvarımızda mevcut olan (150x4.6 mm 5µm) özellikteki YBSK kolon kullanılarak analitik çalışmalara yapılmıştır. Mobil faz olarak farklı oranlarda asetonitril, metanol ve fosfat tamponu karışımları kullanılmıştır (Anacardio, vd., 2005, s. 1236).

Belirlenen miktarda etkin madde tartılarak stok çözelti hazırlanmış ve bu hazırlanan stok çözeltilerden hareketle farklı oranlarda seyreltmeler yapılarak doğrusallık çalışması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla lineer regresyon eğrisi çizilerek korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Yöntem validasyonunda; doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, seçicilik, sistem uygunluk testleri ve kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### 4.1.1. Analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları

*In-vitro* çalışmalarda KLT'nin miktar tayini Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırması ve yapılan denemeler sonrasında karar verilen ve analiz çalışmalarında kullanılan YBSK'nin çalışma koşulları **Çizelge 4.1.**'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.1.** Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları

Cihaz	Shimadzu-20 A
Kolon	150×4.6 mm LiChrospher® 100 RP-18 oktadesil silan kolon, 5 µm
Fırın Sıcaklığı	25°C
Hareketli Faz	0.03 M potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 3.0): asetonitril (40:60 h/h)
Çalışılan Dalga Boyu	242 nm
Akış Hızı	1.0 mL-dk <sup>-1</sup>

Çizelge 4.1. (devam) Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi çalışma koşulları

Enjeksiyon Hacmi 20 µL

---

Analitik yöntem validasyonunun amacı kullanılacak yöntemin uygunluğunu kanıtlamaktır. Miktar tayini validasyonunda doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri değerlendirilmiştir.

## 4.2. Formülasyonların Hazırlanması

Ketoprofen lizin yüklü PLGA nanopartikül sistemleri farklı molekül ağırlıklarına sahip PLGA polimerleri kullanılarak formülasyon çalışmaları yapılmıştır. PLGA nanopartikülleri çözücü buharlaştırma yöntemi, nanoçöktürme yöntemi ve püskürterek kurutma yöntemleriyle hazırlanmıştır (Bao vd., 2006, s. 473) (Draheim vd., 2015, s. 2610).

### 4.2.1. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi

Uygun miktarda PLGA (80 mg) 2 mL etil asetat içinde manyetik karıştırıcıda çözüldürülmüş ve ardından bu çözeltiye 100 µL PVA (Poli vinil alkol) çözeltisi (%0.5, *a/h*) ultrasonik banyoda eklenmiştir. İlk S/Y emülsiyon bu şekilde oluşturulmuştur. Daha sonra 10 mL PVA çözeltisi (%0.5, *a/h*) buz banyosuna sabitlenen balona konulmuş ilk hazırlanan S/Y (Yağ içinde su) emülsiyonu enjektör yardımı ile damla damla bu çözeltiye 24000 rpm’de çalışan yüksek hızlı karıştırıcı altında eklenmiş ve cihaz 1 dakika boyunca çalıştırılmıştır ve elde edilen ürün S/Y/S (Su/yağ/su) emülsiyonu olmuştur. Süre sonunda organik çözücü olan etil asetat’ın ortamdan uçurulması için formülasyonlar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı altında 4 saat bekletilmiştir. Etil asetat uçurulduktan sonra formülasyonlar 30 dakika 11000 rpm’de 4°C’de santrifüj edilmiştir. İlk santrifüj sonunda elde edilen süpernatant yükleme kapasitesi hesaplanması için ayrılmıştır. Geriye kalan çökelek üzerine 10 mL distile su ilave edilmiş ve pipetleme işlemi yapılarak tekrar aynı koşullarda santrifüj işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra formülasyonlar -20°C’de dondurulmuş ve ardından liyofilize edilerek, toz halinde formülasyonlar elde edilmiştir. Bu formülasyonlar projenin bir sonraki döneminde gerçekleştirilecek olan çalışmalar için kapalı, hava almayan kaplarda uygun koşullar altında saklanmıştır.

Plasebo formülasyonlar yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış olup aynı hazırlama yöntemi kullanılarak polimere göre %5 (4 mg) ve % 10 (8 mg) oranında etkin madde içeren formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar, bir önceki bölümde anlatılan etkin maddesiz formülasyon hazırlama prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır. Yukarıdaki prosedürde uygun miktarda PLGA (80 mg) 2 mL etil asetat içinde manyetik karıştırıcıda çözündürülmüş ve ardından bu çözeltiye 100 µL PVA çözeltisi (%0.5 *a/h*) ultrasonik banyoda eklenmiştir. Etkin maddeli formülasyondaki fark 100 µL PVA çözeltisine uygun miktarda etkin maddenin eklenmesidir. **Çizelge 4.2.**'de formülasyonlar PLGA miktarı ve KLT miktarı gösterilmiştir.

Çözücü uçurma yönteminde etil asetat çözücüsü yerine bir de aseton çözücü olarak denenmiş ve aynı basamaklar tekrarlanmıştır.

**Çizelge 4.2.** Çift emülsiyon çözücü uçurma yönteminde kullanılan formülasyonların içerikleri, E-1, E-2 ve plasebo

Kod	PLGA	Etil Asetat	KLT	PVA (%5, a/h)
Plasebo	80 mg	2mL	-	100 µL
E-1	80 mg	2mL	4 mg	100 µL
E-2	80 mg	2mL	8 mg	100 µL

#### 4.2.2. Nanoçöktürme yöntemi

Uygun miktarda PLGA (80 mg) 2 mL etil asetat içinde manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Ardından bu çözelti 150 rpm hızdaki manyetik karıştırıcı altında bulunan PVA çözeltisine (%0.5, *a/h*) enjektör yardımı ile 5mL/saat hızda olacak şekilde damlatılmıştır. Damlatma işlemi bittikten sonra organik çözücü olan etil asetat'ın ortamdan uçurulması için formülasyonlar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı altında 4 saat bekletilmiştir. Etil asetat uçurulduktan sonra formülasyonlar 30 dakika 11000 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 4°C'de santrifüj edilmiştir. İlk santrifüj sonunda elde edilen süpernatant yükleme kapasitesi hesaplanması için ayrılmıştır. Geriye kalan çökelek üzerine 10 mL distile su ilave edilmiş ve pipetleme işlemi yapılarak tekrar aynı koşullarda santrifüj işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandıktan sonra formülasyonlar -20°C'de dondurulmuş ve ardından liyofilize edilerek, toz haline formülasyonlar elde edilmiştir. Bu formülasyonlar projenin bir sonraki döneminde gerçekleştirilecek olan çalışmalara için kapalı hava almayan kaplarda uygun koşullar altında saklanmıştır.

Plasebo formülasyonlar yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış olup aynı hazırlama yöntemi kullanılarak polimere göre %5 (4 mg) ve %10 (8 mg) oranında etkin madde içeren formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar, bir önceki bölümde anlatılan etkin maddesiz formülasyon hazırlama prosedürüne uygun olarak hazırlanmıştır. Yukarıdaki prosedürde uygun miktarda PLGA (80 mg) 2 mL etil asetat içinde manyetik karıştırıcıda çözündürülmüş, etkin maddesiz formülasyondan farklı olarak PVA çözeltisinin içerisine gerekli miktarda etkin madde eklenerek aynı prosedür takip edilmiştir. Hazırlanan formülasyonların içeriğinde kullanılan etkin madde, polimer ve yardımcı madde oranları **Çizelge 4.3.**'te gösterilmiştir.

Nanoçöktürme tekniğinde etil asetat çözücüsü yerine bir de aseton çözücü olarak denenmiş ve aynı basamaklar tekrarlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlarda yapılan karakterizasyon neticesinde bu yöntemde çok yüksek partikül boyutu elde edildiği için diğer iki yöntemle hazırlanan formülasyonlarla çalışmaya devam edilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Çift emülsiyon çözücü uçurma yönteminde kullanılan formülasyonların içerikleri, E-1, E-2 ve plasebo

Kod	PLGA	Etil Asetat	KLT
Plasebo	80 mg	2mL	-
N-1	80 mg	2mL	4 mg
N-2	80 mg	2mL	8 mg

#### 4.2.3. Püskürterek kurutma yöntemi

PLGA bazlı formülasyonlar, bazı modifikasyonlarla püskürtülerek kurutma yöntemi izlenerek hazırlanmıştır (Öztürk vd., 2017, s. 65). Tam tartılmış PLGA, 250 rpm karıştırma koşulu altında 30 dakika boyunca 49mL aseton içinde çözülmüştür. KLT, 1mL distile su içinde çözündürüldü, ardından 5 dakika boyunca karıştırma altında eklendi. Son şeffaf çözelti daha sonra 100°C giriş sıcaklığına ve 50°C çıkış sıcaklığına sahip bir B-90 (Büchi, İsviçre) püskürterek kurutucu kullanılarak ve boş formülasyonlar ayrıca KLT eklenmeden hazırlanmıştır. **Çizelge 4.4.**'te püskürterek kurutma metodunda kullanılan KLT, PLGA, aseton ve distile su oranlarıyla hazırlanan formülasyonlar gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Püskürterek kurutma yönteminde kullanılan S-1, S-2 ve plasebo formülasyon içerikleri

Kod	PLGA	KLT	Distile Su	Aseton
Plasebo	500 mg	-	1 mL	49 mL
S-1	500 mg	25 mg	1 mL	49 mL
S-2	500 mg	50 mg	1 mL	49 mL

### **4.3. Karakterizasyon Çalışmaları**

#### **4.3.1. Termal analiz**

DSC cihazı (Schimadzu DSC-60, Japonya) kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk<sup>-1</sup> azot gazı akış hızında ve 10°C.dk<sup>-1</sup> ısı artışı ile 50-250°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir (Öztürk vd., 2017).

#### **4.3.2. X-Işını kırınımı**

XRD 5-45° aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2θ açısı ve 2°C.dk<sup>-1</sup> ilerleme hızında Rikagu jeneratör (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya) yardımıyla yapılmıştır (Gupta vd., 2010, s. 326).

#### **4.3.3. FT-IR analizi**

Saf etkin madde, PLGA ve formülasyonların IR özellikleri FT-IR (Schimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında saptanmıştır (Blasi vd., 2006, s. E80-E81).

#### **4.3.4. Nükleer manyetik rezonans (<sup>1</sup>H-NMR)**

<sup>1</sup>H-NMR analizi, liyofilize edildikten sonra saklanan formülasyonların dötero kloroform (CDCl<sub>3</sub>) içinde çözüldükten sonra bekletilmeden <sup>1</sup>H-NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Bae vd., 2009, s. 38-42).

#### **4.3.5. ZP ve parçacık büyüklüğü analizi**

Formülasyonların zeta potansiyel ve parçacık boyutları NaCl ile 50 µS iletkenliğe ayarlanmış distile su ile seyreltilerek ölçümlenmiştir. Ölçümler Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) cihazıyla tek kullanımlık kılcal zeta hücrelerinde yapılmıştır. Parçacık boyutu ve dağılımında da aynı cihaz ve aynı özelliklerdeki su kullanılmıştır (Seju, Kumar and Sawant, 2011, s. 4170).

#### **4.3.6. Partiküllerin morfolojisi ve yüzey özellikleri**

Partiküllerin yüzey özellikleri ve partikül şekli karbon bantlar üzerinde SEM (Zeiss ultra plus feseem, Almanya) cihazı ile görüntülenmiştir (Liu vd., 2007, s. 2206).

### **4.4. Sitotoksitenin Belirlenmesi**

*In-vitro* sitotoksitenin çalışmasında KLT içeren PLGA formülasyonunun hücreler üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile araştırılmıştır. Deney aşamasında formülasyonlar

farklı konsantrasyon aralığında hücreler üzerine 24 ve 48 saat süresince uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda absorbands ölçümleri BioTek Cytation 5 (BioTek Instruments, Germany) çoklu plaka okuyucu ile 572 nm'de yapılmıştır. Sitotoksosite testi her bir formülasyon için 3 plaka ve her bir konsantrasyon için 8 kuyuda çalışılmıştır. Absorbans değeri bu plakalarda ölçülen absorbandsların ortalaması alınarak hesaplanmıştır (Jain vd., 2014, s. 2-3).

#### 4.5. *İn-vitro* Salım Çalışmaları

Formülasyonların *in-vitro* salım profili 15 gün boyunca araştırılmıştır. PLGA formülasyonlarından etkin maddenin salınması, diyaliz membran yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Formülasyonların salım çalışmaları selüloz diyaliz membranı ile 100 rpm karıştırma hızında ve  $37 \pm 0.5$  °C sıcaklıkta yapılmıştır. In vitro salım çalışmaları pH 7,4 de gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan 50 mL diyaliz ortamı  $37 \pm 1$  ° C'deki manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırılmıştır. Önceden belirlenmiş (5. dk, 10. dk, 15. dk, 30. dk ve 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 7. saat, 8. saat, 12. Saat ve 24. saat) zaman aralıklarında sırasıyla çözündürme ortamından 1 ml örnek alınmış ve eksilen miktar 1 ml salım ortamı ile tamamlanmıştır. Alınan örneklerdeki etkin madde miktarı YBSK cihazında edilmiştir. Farklı zamanlarda salınan etkin madde miktarları belirlenerek, formülasyon için % kümülatif salınan etkin madde değerinin zamana karşı grafiği çizilmiştir.

#### 4.6. Enkapsülasyon Etkinliği

Liyofilize formülasyonlar (5 mg), doğru bir şekilde tartılmış, daha sonra 1 mL etil asetat ilave edilip karışım içindeki partikülleri çözmek için vortekslenmiştir. Bundan sonra, tüm çözelti 0.22 µm polyamid filtre ile filtre edilmiş ve KLT tespiti için YBSK sistemi ile analiz edilmiştir. İlaç içeriği

$$\% EE = ((\text{Enkapsüle edilen KLT miktarı}) / (\text{Formülasyondaki KLT toplam miktarı})) \times 100 \quad (4.1.)$$

ile hesaplanmıştır (Kılınç-Budama, 2019, s.49).



## 5. BULGULAR

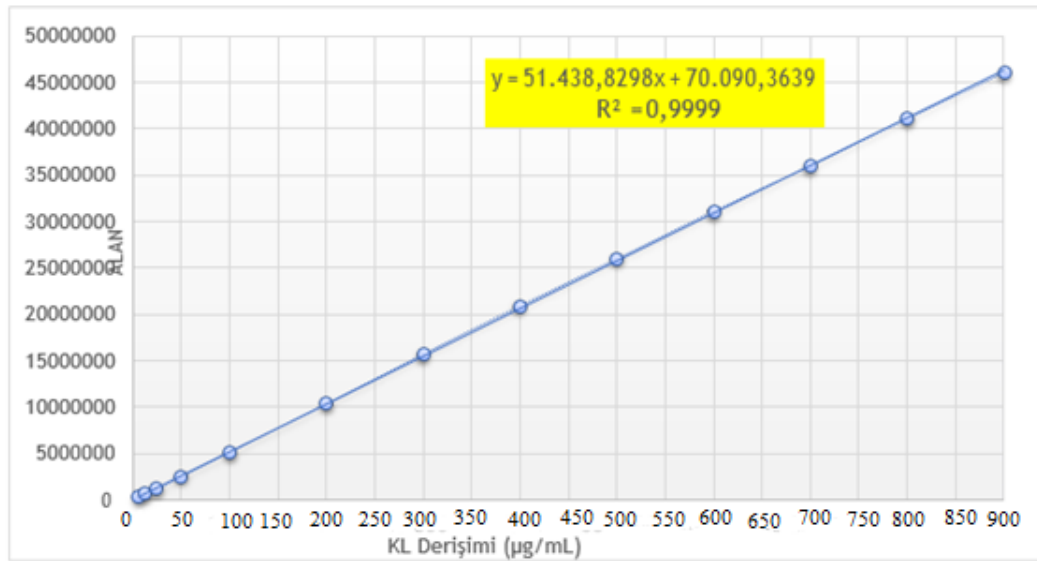
### 5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

#### 5.1.1. Doğrusallık

Standart eğrinin belirlenmesi için, Ketoprofen Lizin tuzu mobil fazda çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. 5 ile 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  aralığında 10 adet farklı derişimde çözelti hazırlanmıştır ardından analiz edilmiştir. Bu derişimlere karşılık gelen alan değerleri **Çizelge 5.1.**'de sunulmuştur. Alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğrusallık eşitliği **Şekil 5.1.** de sunulmuştur.

**Çizelge 5.1.** Doğrusallık çalışması için hazırlanan serileri ve alan değerleri (n=10)

KL $\mu\text{g}/\text{mL}$	Alan Değerleri						
	1.Seri	2.Seri	3.Seri	4.Seri	5.Seri	6.Seri	Ortalama
5,000	7,766	8,487	8,320	7,979	8,632	8,296	8,246667
10,000	14,819	16,800	16,347	15,417	15,702	15,241	15,721
15,000	22,960	23,020	23,111	22,573	24,109	23,810	23,26383
20,000	30,679	31,781	30,955	31,247	31,000	31,305	31,16117
25,000	38,568	39,578	38,903	38,559	38,702	40,222	39,08867
30,000	48,069	47,421	47,336	49,663	49,533	49,231	48,54217
35,000	55,744	56,474	56,516	56,571	57,878	56,380	56,59383
40,000	64,312	64,617	65,213	62,485	67,048	63,321	64,49933
45,000	71,124	70,060	74,108	72,719	73,911	70,851	72,12883
50,000	77,637	83,228	81,758	77,368	79,661	87,075	81,12117



**Şekil 5.1** KLT'nin YBSK'ya ait standart eğri ve doğrusallık eşitliği (n=12)

### 5.1.2. Kesinlik

Mobil faz ortamında etkin maddenin üç farklı konsantrasyonda (75 µL, 125 µL, 175 µL) çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin pik alanlarına göre konsantrasyonları YBSK enjeksiyonu sonrasında belirlenmiştir. Her konsantrasyon için deney 6 kez tekrarlanmış ve 1. gün yapılan çalışmalar 2., ve 3. günde tekrar edilmiştir (k=3). Kesinlik ile ilgili gün-içi kesinlik ve günler-arası tekraredilebilirlik değerleri kullanılarak yöntemin kesinliği hesaplanmıştır. Kesinlik çalışması sonuçları **Çizelge 5.2.**, **Çizelge 5.3.** ve **Çizelge 5.4.**'de sunulmuştur.

**Çizelge 5.2.** 75 µg.mL<sup>-1</sup> derişim için kesinlik sonuçları

75 µg.mL <sup>-1</sup>	1.Gün (Alan)	2. Gün (Alan)	3. Gün (Alan)
	3945132	3935385	3919885
	3980260	3983725	3970237
	3940097	3970099	4004689
	1.Gün (Derişim)	2.Gün (Derişim)	3.Gün (Derişim)
	75,3330	75,1435	74,8422
	76,0159	76,0833	75,8211
	75,2351	75,8184	76,4908
Ortalama	75,528	75,68173	75,71803
Standart Hata	0,4254	0,4846	0,8291
Varyasyon Katsayısı	0,5632	0,6403	1,0950
%95 Güven aralığı	1,0566	1,2037	2,0597

**Çizelge 5.3.** 125 µg.mL<sup>-1</sup> derişim için kesinlik sonuçları

125 µg.mL <sup>-1</sup>	1.Gün (Alan)	2. Gün (Alan)	3. Gün (Alan)
	6659914	6502503	6501461
	6543415	6504707	6536577
	6440079	6516947	6525628
	1.Gün (Derişim)	2.Gün (Derişim)	3.Gün (Derişim)
	128,1099	125,0497	125,0295
	125,8451	125,0926	125,7122
	123,8362	125,3305	125,4993
Ortalama	125,9304	125,1576	125,4137
Standart Hata	2,1381	0,1513	0,3493
Varyasyon Katsayısı	1,6979	0,1209	0,2785
%95 Güven aralığı	5,3114	0,3758	0,8677

**Çizelge 5.4.** 175 µg.mL<sup>-1</sup> derişim için kesinlik sonuçları

175 µg.mL <sup>-1</sup>			
	1.Gün (Alan)	2. Gün (Alan)	3. Gün (Alan)
	9103261	9094887	9092224
	9113094	9095543	9062181
	9120553	9061005	9082168
	1.Gün (Derişim)	2.Gün (Derişim)	3.Gün (Derişim)
	175,6100	175,4472	175,3954
	175,8011	175,4599	174,8113
	175,9461	174,7885	175,1999
Ortalama	175,7857	175,2319	175,1355
Standart Hata	0,1686	0,3840	0,2973
Varyasyon Katsayısı	0,0959	0,2192	0,1698
%95 Güven aralığı	0,4189	0,6253	0,7385

### 5.1.3. Doğruluk

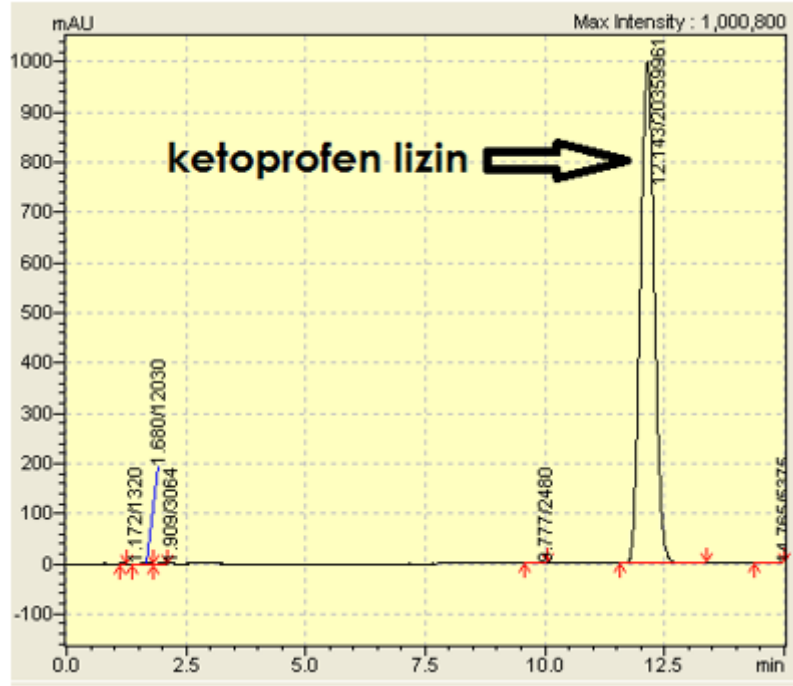
Doğruluk çalışması için, etkin maddenin üç farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve örneklerin geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlardan, doğru denklemi yardımı ile konsantrasyonlar hesaplanmış, eklenen konsantrasyonlar ile karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu yüzde değer olarak bulunmuştur. Sonuçlar **Çizelge 5.5**.de sunulmuştur.

**Çizelge 5.5.** Doğruluk çalışması sonuçları

Eklenen Derişim	100µg/mL	200µg/mL	300µg/mL
Elde Edilen Alan	5197129	10355342	15583997
	5191512	10383805	15554833
	5199743	10362902	15516574
Bulunan Derişim	99,6725	199,9511	301,5991
	99,5633	200,5045	301,0322
	99,7234	200,0981	300,2884
% Geri Kazanım	99,6725	99,9756	100,5330
	99,5633	100,2522	100,3441
	99,7234	100,0490	100,0961
Ortalama % Geri Kazanım	99,65307	100,0923	100,3244
Standat Hata	0,0818	0,1433	0,2191
Varyasyon Katsayısı	0,0820	0,1432	0,2184
%95 Güven aralığı	0,2031	0,3560	0,5443

### 5.1.4. Seçicilik

Etkin maddesiz formülasyonların mobil faz ile ekstraksiyonun ardından YBSK enjeksiyonu yapılmış ve kromatogramlar elde edilmiştir. Elde edilen kromatogramlara dayanarak etkin maddenin seçiciliği değerlendirilmiştir. **Şekil 5.5.**' te elde edilen kromatogram sonucu verilmiştir. Yöntemin seçiciliği, etkin maddesiz analiz ve etkin madde miktar tayininde kullanılan çözücüler kullanılmıştır.



Şekil 5.2. KLT'ye ait YBSK piki

### 5.1.6. Duyarlılık

Kullanılan yöntemin, derişimdeki küçük değişimleri saptama kapasitesi ve düşük konsantrasyonları saptama yeteneğini belirlemek için, saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamada kullanılan eşitlikler aşağıda verilmiştir. Eşitlik yardımı ile bulunan LOD değeri 0.00002 µg/mL ve LOQ değeri 0.00005 µg/mL olarak bulunmuştur. LOQ ve LOD değerleri için kullanılan **Eşitlik 5.1** ve **Eşitlik 5.2** bir sonraki sayfada verilmiştir.

$$LOD = \frac{3.3 \times SS}{m} \quad (5.1.)$$

SS y eksenini kesen noktanın standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimini ifade etmektedir.

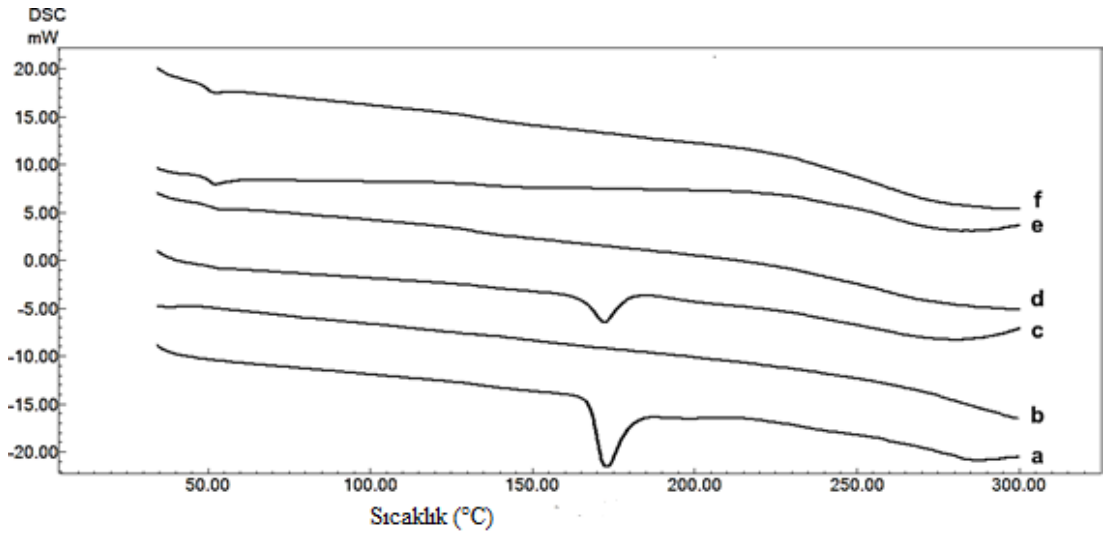
$$LOQ = \frac{10 \times SS}{m} \quad (5.2.)$$

SS y eksenini kesen noktanın standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimini ifade etmektedir.

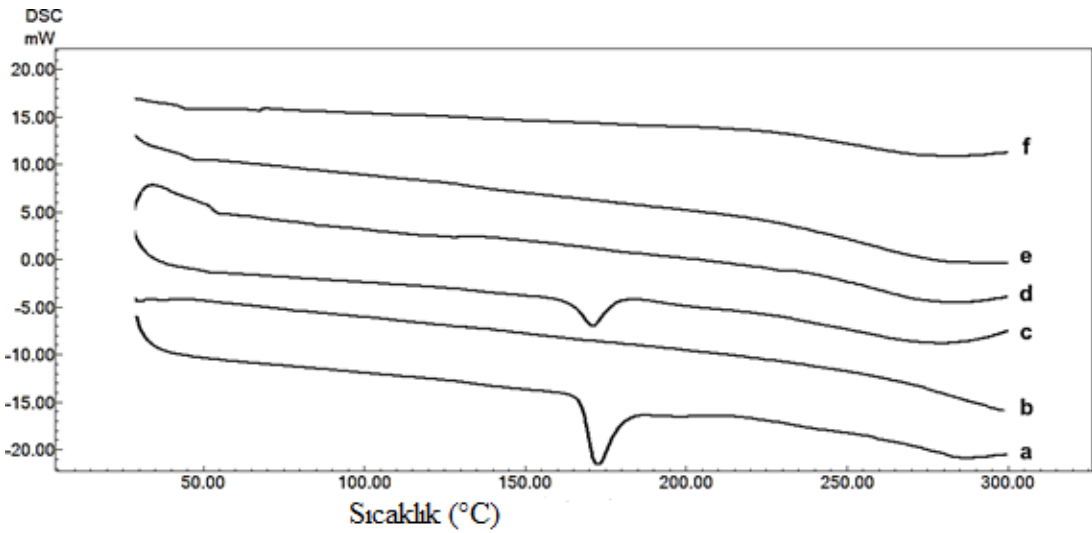
## 5.2. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

### 5.2.1. Termal analiz

Hazırlanan Formülasyonların termal analizi DSC (Schimadzu DSC-60, Japonya) cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabı, 50 mL<sup>dk-1</sup> azot gazı akış hızı ve 30°C - 300°C aralığında 10°C<sup>dk-1</sup> ısı artışı kullanılarak alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.'de verilmiştir.



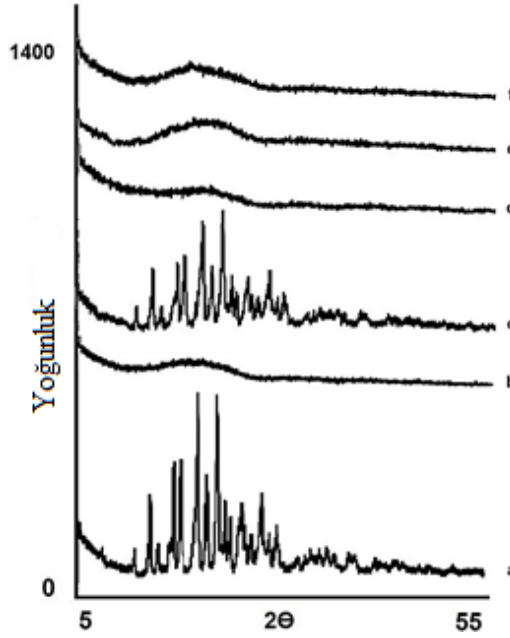
Şekil 5.3. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait DSC termogramları, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: E-plasebo e: E-1 f: E-2



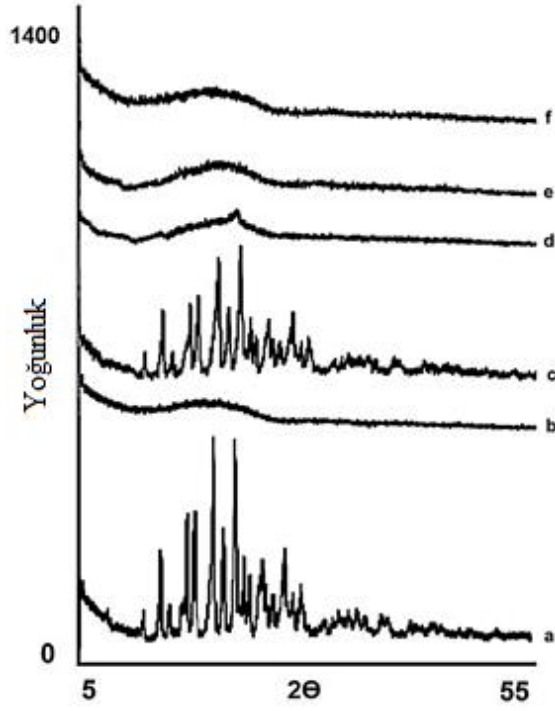
Şekil 5.4. Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait DSC termogramları, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: S-plasebo e: S-1 f: S-2

### 5.2.2. X-ışını kırınımı (XRD)

Formülasyonların XRD analizinde 5-55° aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2 $\theta$  açısı ve 2°·dk<sup>-1</sup> ilerleme hızında rikagu jeneratör (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya) kullanılmıştır. Sonuçlar Şekil 5.5. ve Şekil 5.6.'de verilmiştir.



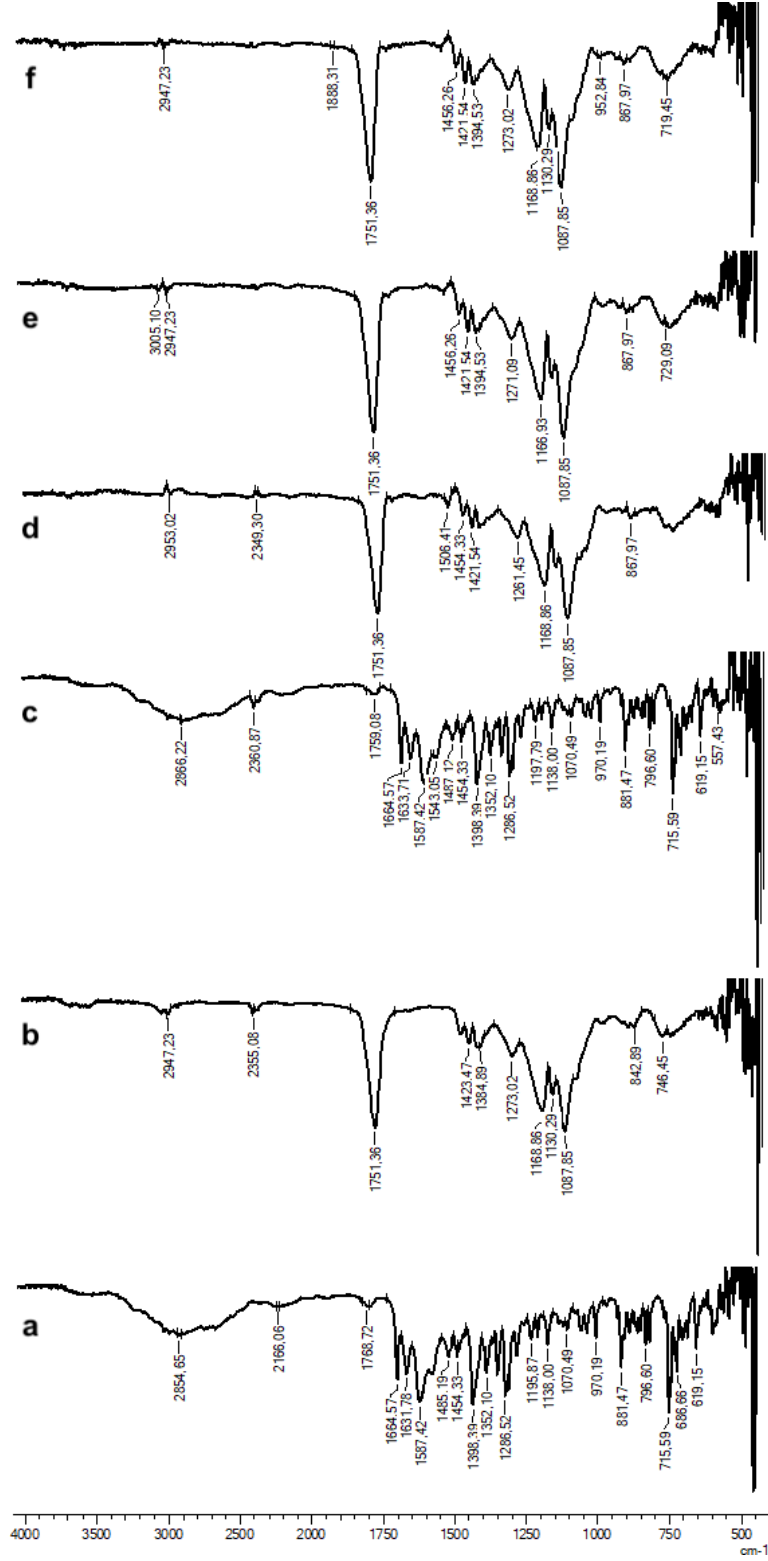
Şekil 5.5. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait XRD analiz pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: E- plasebo e: E-1 f: E-2



Şekil 5.6. Püskürterek kurutma tekniği ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait XRD analiz pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel Karışım d: S-plasebo e: S-1 f: S-2

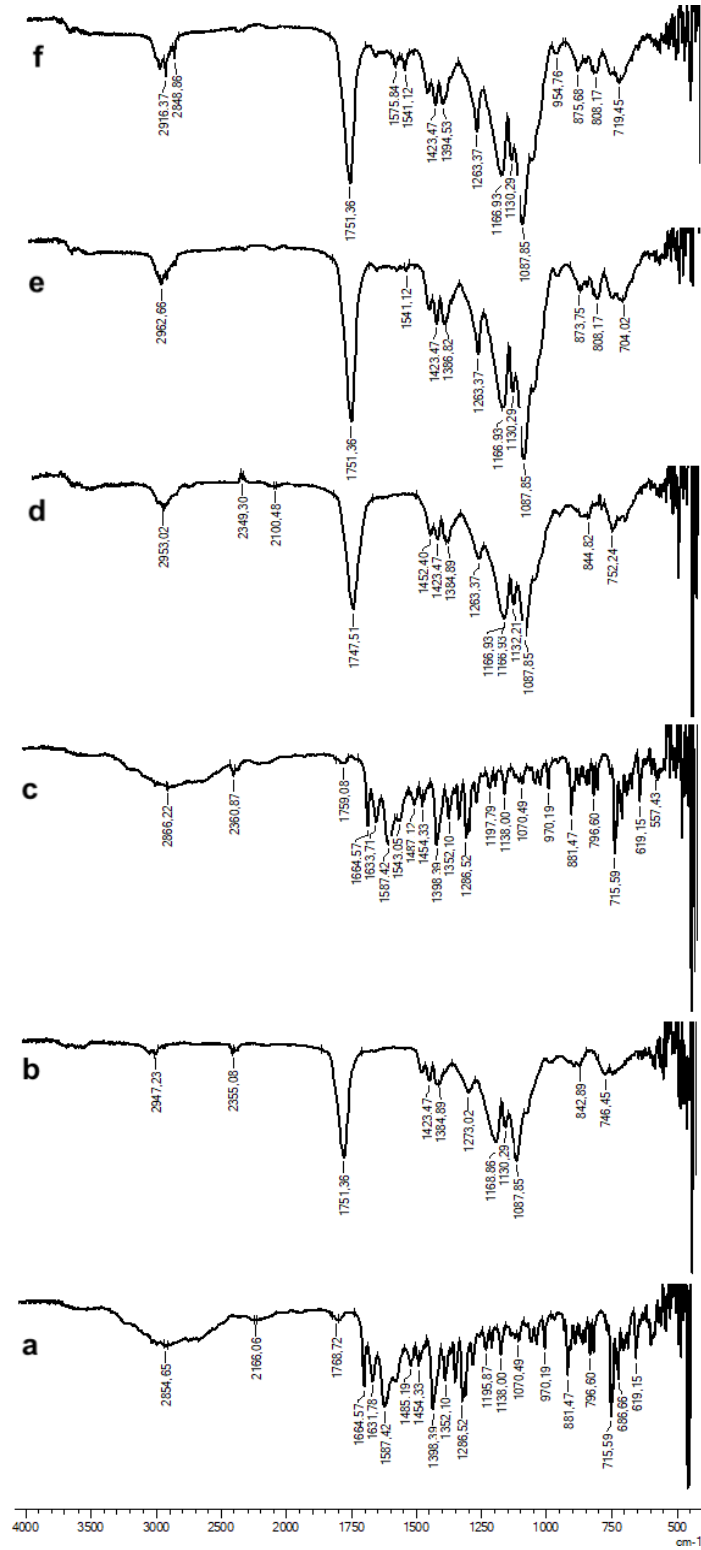
### 5.2.3. Infrared (FT-IR) analizleri

Maddelerin IR analizi FT-IR (Schimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak  $4000-500\text{ cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.7. ve Şekil 5.8.'de verilmiştir.



Şekil 5.7. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait FT-IR analiz sonuçları, a: KL b: PLGA c) Fiziksel Karışım d: E-1 plasebo e: E-1 f: E-2

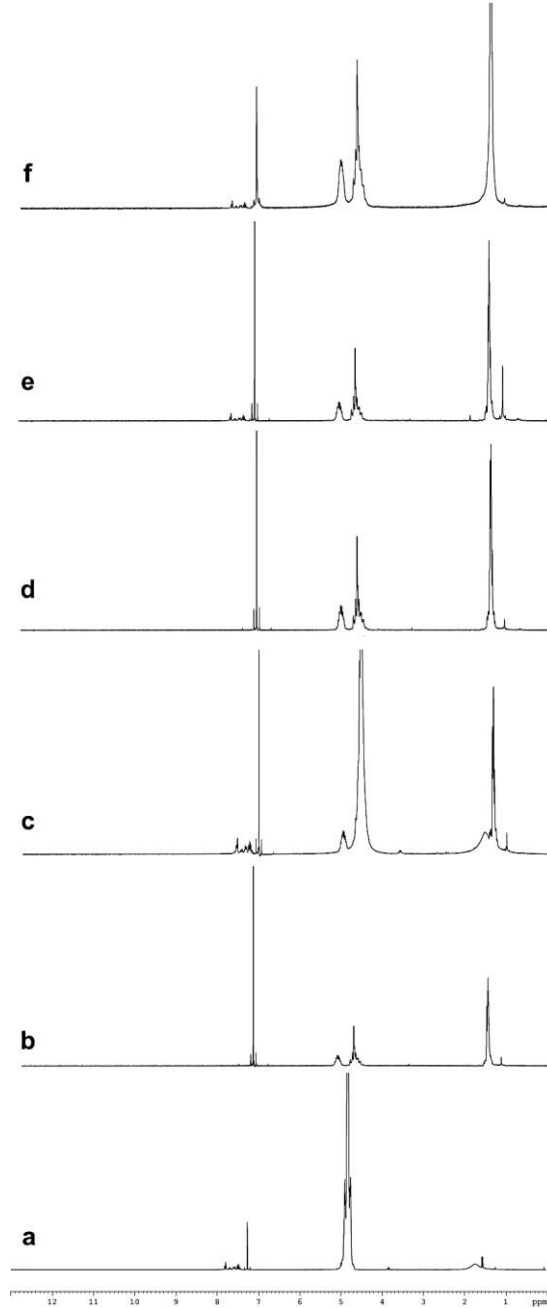




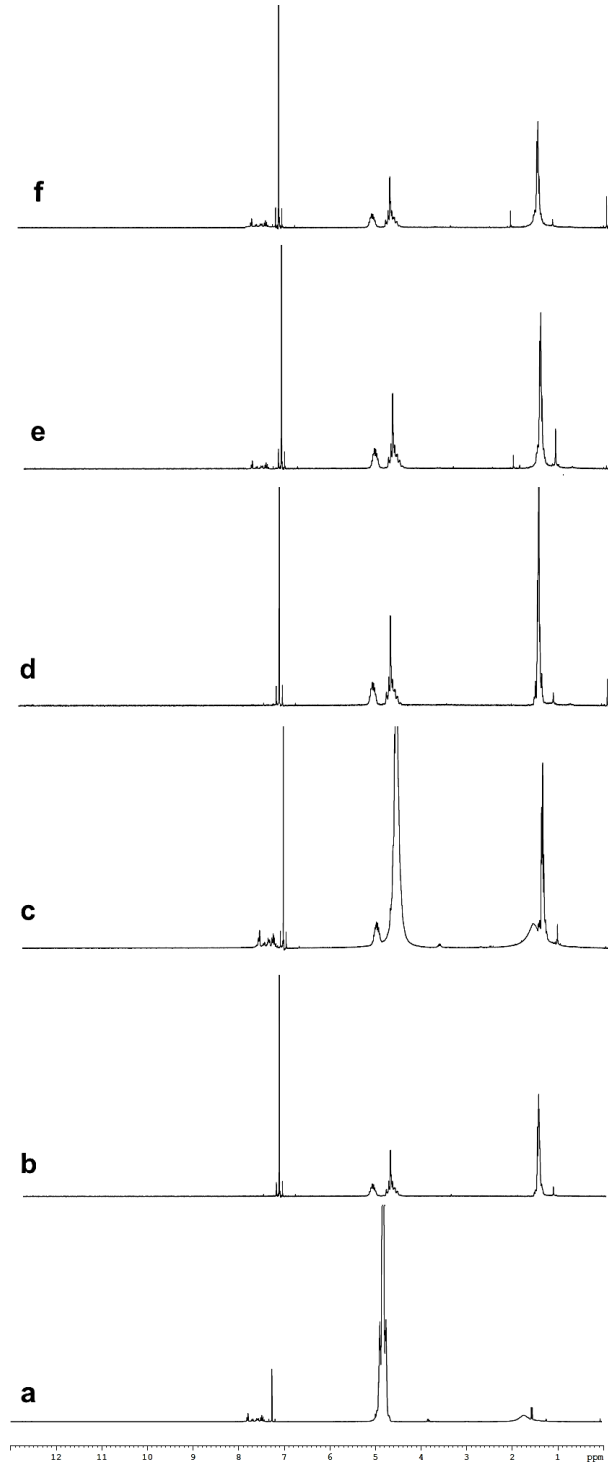
Şekil 5.8. Püskürterek kurutma yöntemi ile hazırlanan saf etken madde, PLGA ve formülasyonlara ait FT-IR analiz sonuçları, a:KL b:PLGA c:Fiziksel Karışım d: S- plasebo e: S-1 f: S-2

#### 5.2.4. Nükleer manyetik rezonans ( $^1\text{H-NMR}$ ) analizi

Maddelerin dötero kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) içinde çözündürülerek hazırlanan çözeltilisinin NMR analizi ( $^1\text{H-NMR}$ ) NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar **Şekil 5.9.** ve **Şekil 5.10.**'da verilmiştir.



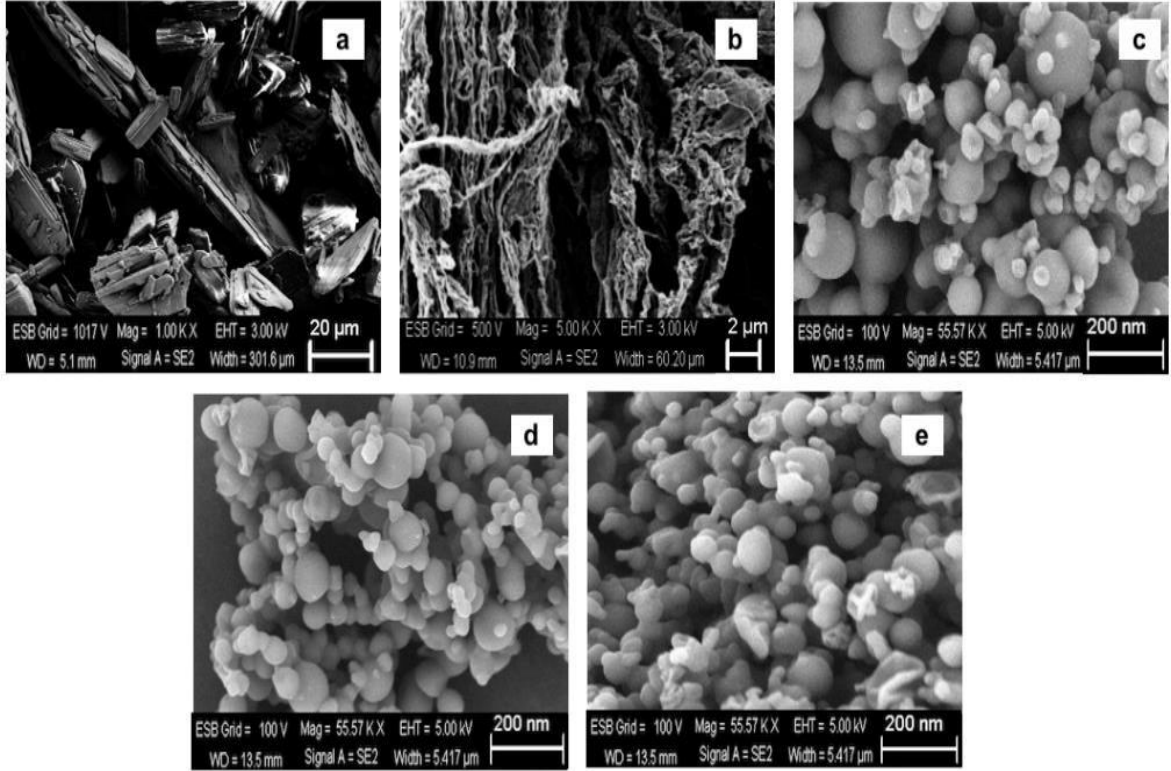
**Şekil 5.9.** Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemiyle hazırlanmış formülasyonlar, saf etkin madde ve PLGA'ya ait  $^1\text{H-NMR}$  pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel karışım d: E- plasebo e: E-1 f: E-2



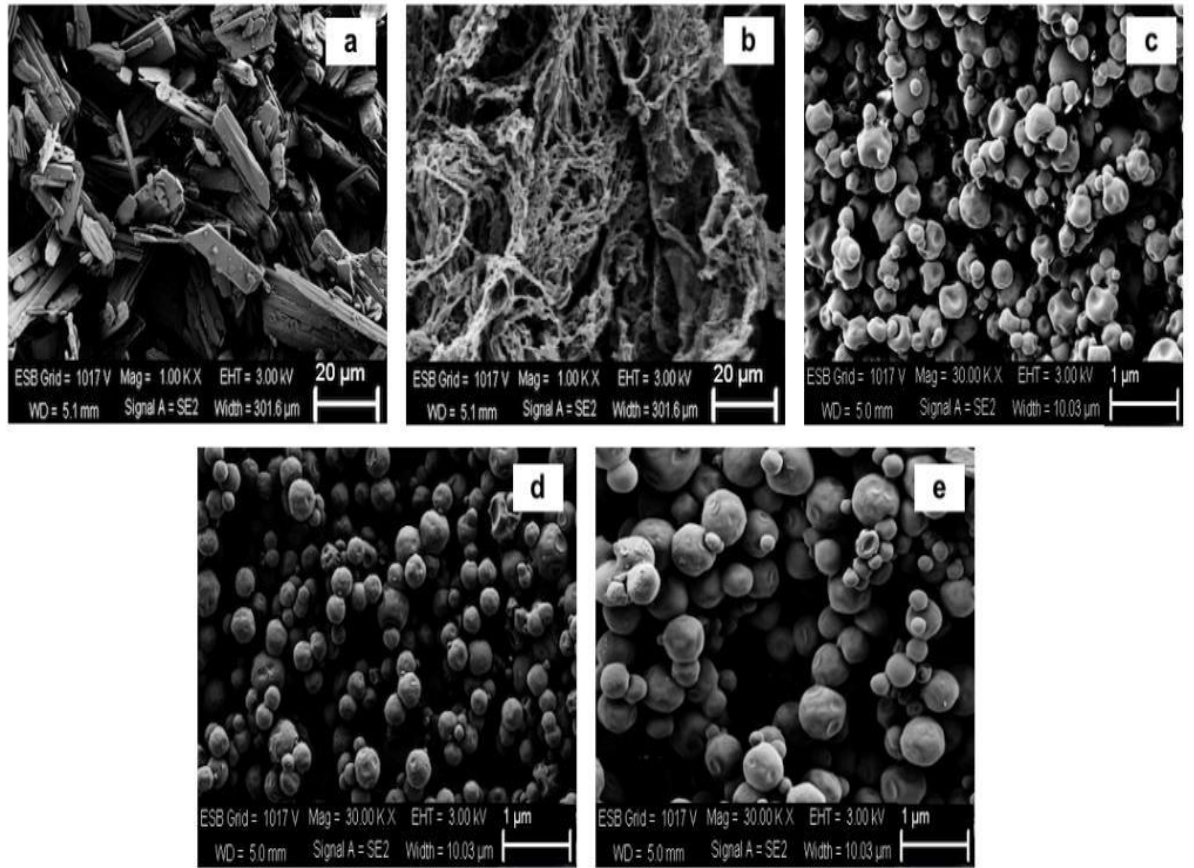
**Şekil 5.10.** Püskürterek kurutma yöntemiyle hazırlanmış formülasyonlar, saf etkin madde ve PLGA'ya ait  $^1\text{H-NMR}$  pikleri, a: KL b: PLGA c: Fiziksel karışım d: S-plasebo e: S-1 f: S-2

### 5.2.5. Morfolojik analiz

Formülasyonların morfolojik yapısı ve yüzey özelliği karbon bandı üzerine yayılıp altın ile kaplandıktan sonra SEM (Zeiss ultra plus fesem, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 5.11. ve Şekil 5.12.'de verilmiştir.



Şekil 5.11. Çift emülsiyon çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan partiküller, saf etkin madde ve PLGA'ya ait SEM morfolojik analizinin görüntüleri, a: KL b: PLGA c: E-plasebo d: E-1 e: E- 2



**Şekil 5.12.** Püskürterek Kurutma yöntemi ile hazırlanan patiküller, saf etkin madde ve PLGA'ya ait SEM morfolojik analizinin görüntüleri, a: KL b: PLGA c: S-placebo d: S-1 e: S-2

### 5.2.6. Partikül boyutu, zeta analizi ve verim

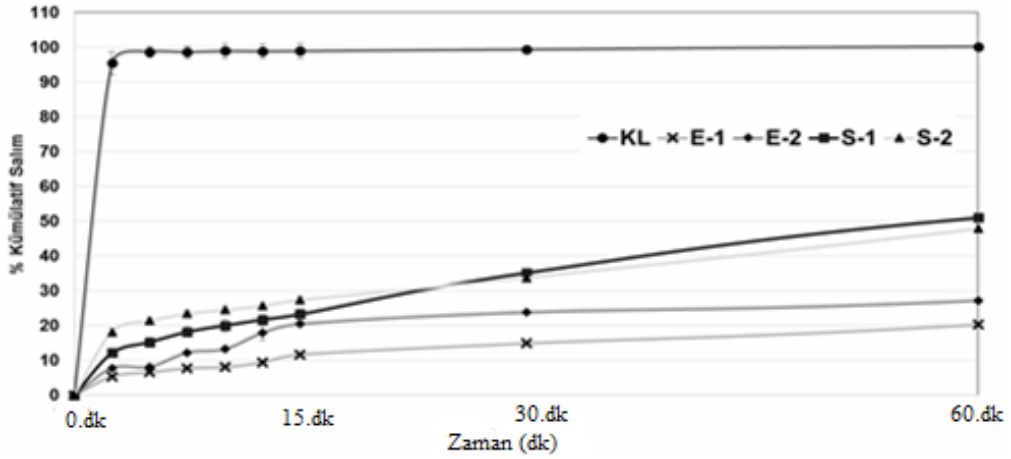
Formülasyonları parçacık boyutları, boyut dağılımları, zeta potansiyel ölçümleri ve etkin madde yükleme oranları **Çizelge 5.6.**'da verilmiştir.

**Çizelge 5.6.** Formülasyonların partikül boyutu, dağılımı, zeta potansiyel ve yükleme oranları

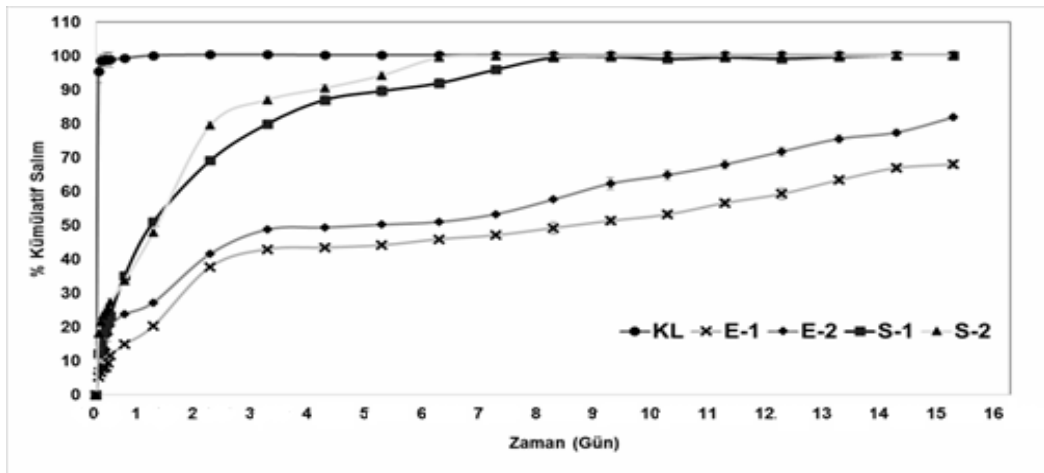
KOD	Partikül Boyutu	PDI	Zeta Potansiyel	% EE
Plasebo E	101,7 ± 2,3	0,08 ± 0,09	-28 ± 0,13	-
E-1	143,9 ± 0,1	0,27 ± 0,02	-26 ± 0,12	77,105 ± 2,127
E-2	141,2 ± 4,9	0,31 ± 0,06	-24 ± 0,23	74,026 ± 3,002
Plasebo S	490,3 ± 2,2	0,27 ± 0,02	-28 ± 0,21	-
S-1	512,6 ± 5,2	0,43 ± 0,03	-27 ± 1,13	78,789 ± 0,953
S-2	518,3 ± 3,1	0,44 ± 0,02	-20 ± 1,21	59,634 ± 1,624

### 5.2.7. *In-vitro* salım çalışmaları

Formülasyonların salım çalışmaları selüloz diyaliz membranı ile 100 rpm karıştırma hızında ve  $37 \pm 0.5$  °C sıcaklıkta yapılmıştır. *In-vitro* salım çalışmaları pH 7,4 de gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan 50 mL diyaliz ortamı  $37 \pm 1$ °C'deki manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırıldı. Önceden belirlenmiş (5. dk, 10. dk, 15. dk, 30. dk ve 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 7. saat, 8. saat, 12. Saat ve 24. saat) zaman aralıklarında sırasıyla çözündürme ortamından 1 mL örnek alınmış ve eksilen miktar 1 mL salım ortamı ile tamamlanmıştır. Alınan örneklerdeki etkin madde miktarı YBSK cihazında analiz edilmiştir. Farklı zamanlarda salınan etkin madde miktarları belirlenerek, formülasyon için % kümülatif salınan etkin madde değerinin zamana karşı grafiği çizilmiştir. Her formülasyon için deney 6 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlara ait grafikler Şekil 5.13. ve Şekil 5.14'de verilmiştir.



Şekil 5.13. Tüm formülasyonlar ve saf etkin maddeye ait ilk 1 saatlik salım profili



Şekil 5.14. Tüm formülasyonlar ve etkin maddeye ait salım profili

### 5.2.8. Salım kinetikleri

DDSolver programı ile yapılan kinetik inceleme sonuçları **Çizelge 5.7.'de** sunulmuştur.

**Çizelge 5.7. *In vitro* salım kinetiği sonuçları**

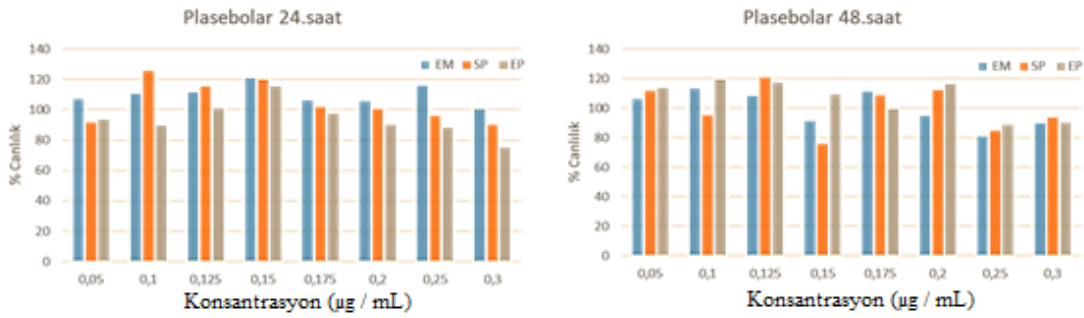
KOD	Model Eşitliği	Değerlendirme Kriteri					
		k	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Adjusted	AIC	MSC	n
E-1	0. derece modeli	5,437	0,803	0,803	169,236	1,533	-
E-2		6,436	0,786	0,786	175,688	1,451	-
S-2		9,394	0,971	0,971	148,260	3,446	-
S-2		9,549	0,957	0,957	155,518	3,066	-
E-1	1. derece modeli	0,082	0,648	0,648	181,998	0,953	-
E-2		0,111	0,583	0,583	190,337	0,785	-
S-1		0,730	0,234	0,234	220,224	0,175	-
S-2		0,904	0,023	0,023	224,476	0,068	-
E-1	Higuchi modeli	18,109	0,957	0,957	135,876	3,050	-
E-2		21,460	0,944	0,944	146,232	2,789	-
S-1		32,114	0,827	0,827	187,538	1,661	-
S-2		32,871	0,738	0,738	195,500	1,249	-
E-1	Korsmeyer-Peppas modeli	20,707	0,971	0,970	128,893	3,367	0,447
E-2		27,914	0,983	0,982	121,579	3,910	0,384
S-1		43,350	0,896	0,891	178,318	2,080	0,396
S-2		50,787	0,753	0,740	196,249	1,215	0,372
E-1	Korsmeyer -Peppas with Tlag modeli	21,499	0,976	0,973	127,350	3,437	0,436
E-2		28,815	0,985	0,983	121,668	3,906	0,367
S-1		44,195	0,932	0,924	171,083	2,409	0,368
S-2		49,674	0,921	0,913	173,120	2,266	0,317
E-1	Korsmeyer -Peppas with F0 modeli	17,357	0,957	0,953	139,540	2,883	0,515
E-2		23,391	0,977	0,974	130,694	3,496	0,448
S-1		35,834	0,890	0,878	181,525	1,934	0,448
S-2		38,758	0,886	0,873	181,299	1,895	0,403
E-1	Hixson-Crowell modeli	0,024	0,761	0,761	173,488	1,340	-
E-2		0,030	0,734	0,734	180,484	1,233	-
S-1		0,082	0,831	0,831	186,965	1,687	-
S-2		0,065	0,602	0,602	204,710	0,830	-
E-1	Hopfenberg modeli	0,024	0,761	0,749	175,488	1,249	-
E-2		0,030	0,734	0,720	182,484	1,142	-
S-1		0,123	0,926	0,922	170,853	2,419	-
S-2		0,131	0,939	0,936	165,426	2,616	-
E-1	Peppas-Sahlin modeli	24,374	0,979	0,977	123,447	3,614	-
E-2		29,901	0,980	0,978	127,642	3,634	-
S-1		56,466	0,997	0,996	103,913	5,462	-
S-2		68,061	0,984	0,982	137,977	3,864	-

### 5.2.9. Hücre kültürü çalışmaları

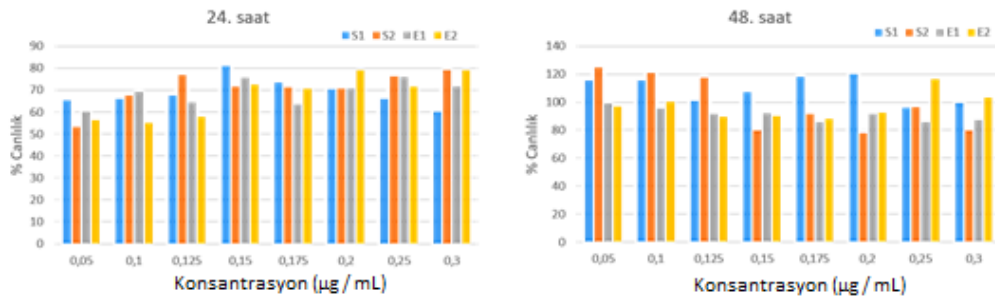
Tüm formülasyonların *in-vitro* sitotoksitesi 3T3 fare embriyo fibroblast hücre dizileri kullanılarak MTT yöntemi ile incelenmiştir. Kısaca, hücreler yaklaşık 2 x 10<sup>4</sup> yoğunlukta,

%10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin / streptomisin) içeren RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Almanya) besiyeri ile 96'lı plakalara (Greiner, Sigma-Aldrich, Almanya) ekilmiştir. Hücreler 37 ° C'de 24 saat boyunca % 5 CO<sub>2</sub> içeren ve bir atmosferlik etüvde inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda, formülasyonlar hücre kültürü ortamı ile belirlenen oranlarda hücrelere ilave edilmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat inkübasyon için bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda kuyulardaki besiyeri ortamı kuyulardan çekilmiş ve 20 µL MTT boya (5 mg / mL konsantrasyon için PBS ile seyreltilmiş) solüsyonu ilave edilmiştir. Plakalar, daha önce bahsedilen aynı koşullar altında 4 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda formazan kristallerinin çözülmesi için 200 µL spektrofotometrik DMSO her kuyucuğa ilave edilerek 30 dakika daha inkübasyonda bırakılmış ve çözünen formazanın absorbansı, çok modlu bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Kontrol hücrelerindeki canlılık % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Etkin madde, plasebo formülasyonlar ve etkin madde yüklü formülasyonlara ait 24 ve 48 saatlik sonuçlar **Şekil 5.15** ve **Şekil 5.16**'da verilmiştir.



**Şekil 5.15.** Etkin madde ve Plasebo formülasyonların 24 ve 48 saatlik doza bağlı sitotoksosite değerleri



**Şekil 5.16.** S1, S2 ve E1, E2 Formülasyonlarına ait 24 ve 48 saatlik doza bağlı sitotoksosite değerleri



## 6. TARTIŞMA

YBSK validasyon çalışmasında, doğrusallığın  $y = 51438x + 70090$  ( $r^2 = 0.9999$ ) doğrusallık denklemiyle 5-50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyon aralığında olduğu belirlenmiştir. Yöntemin hem tekrarlanabilirlik hem de hassasiyeti için  $<2\%$  RSD değerleri nedeniyle kesin olduğuna karar verilmiştir. Kullanılan YBSK metodu, sırasıyla 100, 200 ve 300  $\mu\text{g} / \text{ml}$  konsantrasyonlarında  $99.653 \pm 0.081$ ,  $100.092 \pm 0.143$  ve  $100.324 \pm 0.219$  hassasiyet göstermiştir ( $n = 6$ ). Yöntemin geri kazanımı,  $<2\%$  RSD değeri nedeniyle tatmin edici bulunmuştur. Tespit limiti (LOD) ve kantitatif limiti (LOQ) sırasıyla 0.00002 ve  $0.00005 \mu\text{g.ml}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Doğrusallık çalışmasında korelasyon katsayısı ( $r^2$ ) 0,9999 olarak bulunmuştur. Hem orta hassasiyet hem de tekrarlanabilirlik için RSD değerleri  $<2\%$  idi. Mükemmel kesinlik ve kesinlik doğrusallık, kesinlik ve kesinlik istatistiksel analizi ile değerlendirildi. ICH Q2 (R1) kılavuzlarına dayanan validasyon testleri, KLT'nin rutin analizi için geliştirilen yöntemin saf ve farmasötik preparasyonlar ve formülasyonlarda kullanıldığını göstermiştir (ICH, 2014, s. 2). Sonuç olarak, bu çalışmada önerilen prosedür rutin ve eşzamanlı KLT tayini için kullanılabilir olarak yorumlanmıştır.

Asetonitril ve 0.03 M  $\text{KH}_2\text{P}_0_4$  tamponu ve akış hızlarının farklı oranları, metod optimizasyonu için test edilmiş ve asetonitril: 0.03 M  $\text{KH}_2\text{P}_0_4$  tamponunun, 60:40 ( $h / h$ ) oranında ve  $1 \text{ ml.min}^{-1}$ 'lik bir akış hızına karar verilmiştir.

PNP'lere ilaç yükleme kapasitesi formülasyonlarda önemli bir faktördür, çünkü daha yüksek yükleme belirli bir doz için daha az miktarda NP gerektirir (Zuo, vd., 2014, s.8). % EE'nin yüzdesi olarak hazırlanan tüm NP'ler için daha yüksek değerler elde edilmiştir. % EE, polimere bağlı olarak %59 ile %78 arasında değişmiştir. Hazırlanan PNP'lerin formülasyonlarında, polimerde kapsüllenen KLT miktarının, KLT miktarı arttıkça azaldığı gözlenmiştir. Başlangıçta kullanılan KLT miktarına (ağırlıkça% 5 ve% 10) göre, KLT konsantrasyonu arttıkça EE azalır. Bu, ilacın dağılmış halde polimer matrisinde yakalanabilecek maksimum miktarda bulunması anlamına gelir; yani, polimer aktif ilaç maddesiyle karışabilirlik sınırına ulaşmıştır (Martins vd.,2018).

Hazırlanan KLT nanoparçacıklarının formülasyonlarının tümü *in-vitro* salım çalışmalarında salım özellikleri açısından saf etkin madde ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Salım çalışmaları, pH 7.4 fosfat tamponunda difüzyon tekniği ile manyetik bir karıştırıcı kullanılarak yapılmıştır. Polimer konsantrasyonu arttıkça, formülasyonun ilaç salımının azaldığı ve tüm formülasyonların ilk patlama etkisi ile iki

fazlı bir salım gösterdiği gözlenmiştir (Bhambere, vd.,2013, s. 538-539). Patlama yayılma mekanizmasının iki faktöre bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu faktörlerin ilki, nanopartiküllerin yüzeyinde emilen KLT'den kaynaklanır. İkinci faktörün KLT'nin nanopartiküllerden sızmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Bhambere, vd.2013, s.538-539). Literatürde, büyük mikro kürelerin küçük mikro kürelerden daha hızlı bozulduğu gösterilmiştir. Bu muhtemelen büyük mikro kürelerde polimer hidrolizi sonucunda yükselen asitli ürünlerin birikmesinden kaynaklanmaktadır.

PLGA tabanlı sistemlerde oluşan hidroliz hemen su ile başlar. Hidroliz, hidrolizi katalize eden asitleri üretir. Bu otokatalitik işlem, PLGA yapısının matrisinin ortasındaki yüzeyin daha hızlı bozulmasına yol açar. Bu etki nanoparçacık sisteminin büyüklüğü arttıkça daha belirgin hale gelir (Martins, vd,2018- Fredenberg, vd. 2011). S-2 kodlu formülasyonun daha büyük bir partikül boyutuna sahip olduğu ve parçalanması nispeten daha hızlı olduğu ve E-1, E2 ve S-1 kodlu formülasyonlardan daha yüksek bir salım hızına sahip olduğu belirlenmiştir.

KLT'nin PNP'lerden salıverilmesine ilişkin olarak, hızlı bir fazdan sonra yavaş bir salıverme fazından oluşan iki fazlı bir profil gözlenmiş ve 8 günlük çözünme periyodu boyunca salıverme gözlenirken, saf KLT%  $100.153 \pm 0.244\%$  hızlı bir salım profili sergilemiştir. Hazırlanan formülasyonlardaki salım hızları, S-1 ve S-2 formülasyonları için sırasıyla 16 gün sonra, sırasıyla  $99.465 \pm 0.054$  (ortalama  $\pm$  SD) ve  $99.972 \pm 0.143$  (ortalama  $\pm$  SD),  $82.156 \pm 0.024$  (ortalama  $\pm$  SD)  $66.456 \pm 0.033$  (ortalama  $\pm$  SD) 'de gözlenmiştir.

Yeni bir oral dozaj formu geliştirildiğinde, çözünme davranışı kantitatif olarak analiz edilmelidir. Çözünme analizi, çözülme profillerinin karşılaştırılmasını ve ilaç salım paternini tanımlamak için matematiksel modellerin uygulanmasını içerir. Bu çalışmada, çözünme deneylerinden elde edilen verileri analiz etmek için tasarlanmış bir Excel eklenti yazılım paketi olan DDSolver adlı uygulama kullanılmıştır (Zhang, vd.,2019, s.9). Çözünürlük verilerinin yerleştirilmesi için uygun bir modelin seçimi sadece nicel değerlendirme için esastır. İlaç salım özelliklerinin yanı sıra, modele bağlı yaklaşımlar kullanılarak çözünme profillerinin karşılaştırılması için de kullanılmaktadır (Zuo, vd., 2014, s. 7-8).

DDSolver, korelasyon katsayısı ( $R_{obs-pre}$ ), saptama katsayısı ( $R_{sqr}$ ,  $R^2$ , COD), düzeltilmiş saptama katsayısı ( $R_{sqr}$ ,  $R^2$ , COD), düzeltilmiş saptama katsayısı ( $R_{sqr\_adj}$ ,  $R^2$  ortalama karesi dahil olmak üzere bir modelin uygunluğunu değerlendirmek için bir

takım istatistiksel kriterler sunar hata (MSE), Akaike Bilgi Kriteri (AIC) ve Model Seçim Kriterleri (MSC) kullanılmaktadır (Martins, vd.,2018, Zhang, vd., 2019 s.9, Öztürk, vd.,2017 s. 65). Bu kriterler arasında,  $R^2$  (düzeltilmiş), AIC ve MSC çözünürlük modeli tanımında en popüler olanlardır (Zhang, vd., 2019 s. 9). Çalışma, Sıfır dereceli kinetik, birinci dereceden kinetik, Higuchi, Korsmeyer-Peppas modeli, Tlag modeli ile Korsmeyer- Peppas, F0 modeli ile Korsmeyer-Peppas, Hopfenberg, Hixon-Crowell ve Peppas-Sahlin modelleri DDSolver programında değerlendirilmek üzere seçilmiştir.

Serbest bırakılan kümülatif miktarın hesaplanmasından sonra, elde edilen veriler önemli kriterleri belirlemek için DDSolver programına aktarılmış, en yüksek  $R^2$  ayarlı ve MSC değerleri ve en düşük AIC değerleri en iyi uyumun değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Bu modelleri yukarıda belirtilen önemli kriterlere göre karşılaştırırken, Peppas-Sahlin modeli en iyi kinetik model olarak seçilmiştir.

Literatüre göre  $n / m = 0.43$  olduğunda ilaç salım mekanizması Fickian difüzyonu tarafından yönetilir,  $0.43 < n < 0.85$  olduğunda bu anormal (Fickian olmayan) taşınım ve  $n = 0.85$  olduğunda case II taşınımıdır. S-1 ve S-2 kodlu formülasyonlar için 'm' değerleri sırasıyla 0.542 ve 0.450 olarak bulunmuştur. Hazırlanan formülasyonlarda, üstel katsayının m, Fickian olmayan difüzyon bazı ile ilişkili olduğu belirlendi (Unagolla and Jayasuriya, 2018, s.199-209).

Tüm formülasyonlarda ortaya çıkan sonuç, ilaç salım mekanizmasının Fickian olmayan difüzyon tarafından kontrol edildiğini gösteren Peppas-Sahlin modeline uyum gösterdiği gözlenmiştir.

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı, PNP'ler gibi kolloidal sistemlerin önemli fiziksel özelliklerinden biridir. PNP formülasyonunun parçacık büyüklüğü dağılımı, kolloidal sistemlerin fiziksel stabilitesi ve aktivitesinde önemli bir rol oynar. PNP'lerin boyutunun biyolojik hücrelerle yapışma ve etkileşimde önemli bir rol oynadığı da bulunmuştur (Yenilmez, 2017, s. 151-152). Tüm formülasyonların ortalama tanecik boyutları ve zeta potansiyel değerleri incelenmiş ve homojen dağılım olduğu gözlenmiştir.

Küçük parçacıklar, kapsüllenmiş ilacın nanoparçacıklardan difüzyon ve yüzey erozyonu yoluyla salınmasını kolaylaştıran daha yüksek bir yüzey alanı / hacim oranına sahiptir ve ayrıca ilaç yüklü nanopartiküllere nüfuz etme ve fizyolojik ilaç engellerine nüfuz etme avantajına sahiptir (Yenilmez, 2017, s. 151-152-Thagele, Mishra ve Pathak, 2011, s. 511-515). Partikül büyüklüğü dağılımını tanımlayan PDI değeri, monofazik sistemler için 0.01 ve 0.5-0.7 aralığındadır; 0.7'den büyük olan değerler çok geniş bir

partikül büyüklüğü dağılımının göstergesidir ve sıfıra yakın değer dar partikül büyüklüğü dağılımı anlamına gelir (Öztürk vd., 2017, s. 65; Lopedota vd., 2009). Bu çalışmada hazırlanan tüm PNP formülasyonları, 0.44'ten düşük PDI değerleri sunmuş ve bu nedenle partikül büyüklüğü dağılımının üniform olduğuna karar verilmiştir.

PNP'lerin kısa / uzun vadeli stabilitesi ile ilişkili Zeta potansiyeli (ZP) değeri, yüksek pozitif veya düşük negatif (+ 30 / -30 mV) değerleri gösterir; PNP'lerin yüzey özelliklerini karakterize etmek için kullanılır. PLGA polimer üzerindeki kimyasal grupların toplam negatif yükleri nedeniyle negatif olduğu bulundu. Literatürde de benzer sonuçlar görülmüştür (Martins vd., 2018). PNP'lerin ZP'si -20 mV'nin altında ölçülmüş, bu da sulu ortamda askıya alınan PNP'lerin yüksek stabilitesini kanıtlamıştır (Martins, vd., 2018).

SEM tarafından elde edilen PLGA PNP'lerin yüzey görüntülerini göstermektedir. SEM görüntüleri, hazırlanan tüm PNP'lerin pürüzsüz yüzeylerle küresel biçimde olduğunu göstermiştir. KLT'nin, her iki polimere başarılı bir şekilde dahil edildiğini gösteren formülasyonlarda KLT'ler kristal yapı gözlenmemiştir (Öztürk, vd., 2017, s. 65; Gupta, vd., 2013).

Etkin maddenin nanopartiküllerdeki ve kontrol numunelerindeki, yani ham madde (saf KLT ve saf PLGA) ve fiziksel karışımdaki fiziksel yapısı hakkında niceliksel ve niteliksel bilgi sağlayan DSC eğrilerini gösterdi. Saf KLT, 170 ° C'de erimeye karşılık gelen kristalimsi doğasını gösteren keskin bir endotermik tepe gösterdi. Ek olarak, KLT'nin 170 ° C'de endotermik zirvesi literatürle uyumluydu (Cerciello, vd., 2016). Saf PLGA, cam geçişini takiben gevşeme ışık zirvesine karşılık gelen endotermik bir olay (60 °) sergiler.

Erime pikinin gözlenmemesinin nedeni PLGA'nın amorf yapısıdır (Hajavi, vd., 2018, s. 2540-2551). KL'nin fiziksel karışımdaki tepe görünümü ve KLT tepe noktasının tamamen ortadan kalkması, ya homojen polimerik matris oluşumundan ya da polimerin seyreltme etkisinden kaynaklanabilir (Wang vd., 2015, s. 5671-5685). Hazırlanan PNP'lerin tüm DSC eğrilerinde endotermik KLT pikinin kaybolması, KLT, homojen matris oluşumu ve amorf yapının dahil olduğunu göstermiştir (Maindes, vd., 2006, s.524-Pagar ve Vavia, 2013, s.865). KLT'nin PLGA'nın (fiziksel karışım) PLGA ile DSC eğrileri, kristal yapıda KLT'nin varlığı nedeniyle aktif maddenin polimerik taşıyıcıdaki stabilitesini göstermiştir (Silva, vd., 2015, s. 14).

XRD, nanoteknolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan en önemli ve iyi tanımlanmış analitik yöntemlerden biridir, çünkü nanopartiküllerin moleküler yapısını açıklar, kristal halini inceler / polimorfizmi araştırır ve ayrıca stabilite hakkında bilgi sağlar, böylece kırınım modeli nanomalzemelerin kristalin / amorf yapısının detayını verir (Öztürk, vd.,2017, s. 65).

Aktif ajanların polimorfik değişiklikleri ilacın çözünme hızını ve ilacın biyoyararlanımını etkileyebilecek önemli faktörler olduğundan yapısal değişikliklerin izlenmesi gerekir. XRD difraksiyon profili, KLT, kristal yapıyı gösteren 2 $\theta$  açısında keskin tepe noktaları göstermiştir. KLT'nin, DSC'nin sonuçları ile gösterildiği gibi amorf polimer matris içinde dağıldığını gösteren hiçbir kristal tepe / sinyal tespit edilmemiştir (Öztürk, vd., 2017, s. 65-Martins, vd.,2018).

FT-IR, polimerik nanoparçacıklar, metalik nanoparçacıklar, karbon nanomalzemelerinin yanı sıra çekirdek kabuklu ve hibrit nanoparçacıklar dahil olmak üzere çeşitli nanoparçacıkların karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan bir teknik olarak kabul edilmektedir. FT-IR, NP'lerin yüzeyinde fonksiyonel grupların ve adsorbe edilmiş moleküllerin tespitine ve ayrıca yüzey kimyası değişikliklerinin izlenmesine izin verir (Lopez and mizaikoff, 2016, s.97-106). FT-IR analizleri, nanopartiküllerin hazırlama aşamaları sırasında ilaç ve polimer arasındaki etkileşimleri değerlendirerek, malzemelerin sıklığı ve yoğunluğundaki değişiklikleri saf malzemelerin FT-IR sinyalleriyle uyumunu inceler (Devie and Gayathri, 2010).

KLT spektrumu, sırasıyla 1664, 1631, 3300-3100  $\text{cm}^{-1}$ 'de ortaya çıkan, aromatik halkanın C= O germe titreşimi, C = O, keton, OH bandı ve C = C germe titreşimi için emme bantlarını göstermektedir (Anderson, vd., 2012, s.81). 1541-1575 ve 1138-1195  $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar sırasıyla N - H düzlemde bükülme ve C - N amin gerilmesiyle ortaya çıkar (Choi, vd., 2001, s.785). PLGA polimerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde, karbonil gruplarında gösterildiği gibi fonksiyonel gruplarının moleküler titreşimleri ortaya çıktığında, yoğun bantlarla 1751  $\text{cm}^{-1}$  gözlenmiş; sırasıyla asimetric ve simetric CC (= O), O - S gerilmelerle bağlantılı olduğu değerlendirilmiştir. Bu bölgelerdeki bantlar, esterlerin karakterizasyonunda sıklıkla kullanılan farklı bantlardır (Choi, vd., 2001, s. 785-Carneir, vd., 2016). KLT ve PLGA arasındaki temel fark N-H bağlarıdır. N-H bağları KLT, Fiziksel karışım, S1 ve S2; ancak PLGA ve S-blank'te gözlenmedi. Karakteristik KLT tepe noktalarının gözlendiği ve tüm KLT yüklü PNP'ler için KLT kristalliliğinin azaldığı gözlendi. Bu, KLT'nin DSC ve XRD sonuçlarını destekleyen

polimerik yapı içinde moleküler olarak dağılmış ve kapsüllenmiş olduğunu ve ayrıca PNP'lerin FT-IR spektrumundaki yeni KLT tepelerinin bulunmamasından dolayı PLGA ve KLT arasında kimyasal bir etkileşim bulunmadığı anlaşılmıştır (Öztürk, vd.,2017, s. 65,Mainardes, vd., 2016, s. 523-530, Vino, vd., 2014).

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri, aktif bileşenlerin polimerler / katkı maddeleri ile etkileşimi ve moleküler mobilite NMR analizi ile belirlenebilir (Jenning, Mader and Gohla, 2000, s. 15-16). Bu çalışmada gerçekleştirilen <sup>1</sup>H-NMR analizi, polimerik yapıdaki kapsülleme ve polimerlerle etkileşimin herhangi bir KLT değişimini belirlemek için önemlidir (Öztürk, vd.,2017, s. 65-Akagi, Baba and Akashi, 2011). Bu çalışmada gerçekleştirilen <sup>1</sup>H-NMR analizi, polimerik yapıdaki kapsülleme ve polimerlerle etkileşimin herhangi bir KL değişimini belirlemek için önemlidir. Plasebo ve PLGA'nın <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda 7-8 ppm aralığında hiçbir KLT zirvesi gözlenmezken, KLT yüklü PLGA bazlı nanopartiküllerin spektrumunda KLT spesifik zirvelerin varlığı gözlenmiştir. <sup>1</sup>H-NMR sonuçları, KLT'nin PLGA nanoparçacıklarına enkapsülasyonu olarak da yorumlanabilen polimerik yapılardaki moleküler KLT dispersiyonunu ifade etmektedir (Erbetta, 2012, s. 216).

Partikül hazırlanmasının herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olan KLT'nin toksisite profilini değiştirip değiştiremeyeceğini belirlemek için PNP'ler, NIH / 3T3 fare sağlıklı fibroblast hücresi kullanılarak test edildi. NIH / 3T3 hücreleri, kontrol olarak artan KL konsantrasyonları ve 5 ila 30 µg (ketoprofen içeriği olarak ifade edilen) konsantrasyonlarında S-Blank, S-1 ve S-2 ile E-blank E-1 ve E-2 formülasyonları ile muamele edildi. Hücre canlılığı, hücre kültüründe elde edilen absorbans değerleri ile belirlendi ve sonuçlar, standart sapmalarla birlikte. Tüm veriler, her biri iki kopya halinde yapılan üç bağımsız deneyin ortalama ± SD'si olarak gösterilmiştir.

Kolorimetrik 3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi, hücre sitotoksitesinin kantitatif tespiti için kullanılmaktadır (Büyükköroğlu, vd.,2016). Sonuçlar, artan KLT dozu ve formülasyonları ile ilişkili olarak 48 saat boyunca hücre yaşayabilirliğinde % 50'den (IC50) daha az azalma olmadığını göstermiştir. KLT, plasebo ve tüm formülasyonların, hücre yenilenme özelliği gösteren kontrol grubundan daha yüksek hücre canlılığı değerleri göstermiştir. KLT'nin hücre yenileme özelliği, KLT'de lizinin varlığının, ketoprofen serbest asidi gözlenmeden epitelinin belirgin bir koruması olduğunu bildirmiştir (Brandolini, 2018).

Lisinin oksidatif stres sinyallerinin belirgin bir düzenlemesi ile ilişkili olduğu ve hücre üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Brandolini, 2018- Stigliani, vd., 2013). Çalışmamızın sonuçları, KLT'nin PLGA içine her iki yöntemi kullanılarak enkapsülasyonunun, toksik olmayan ve hücre yenileme özellikleri yüksek bir şekilde hücrelerin çoğalmasında sinerjistik etkiler gösterdiğini göstermektedir. E-1, E-2, S-1 ve S-2 formülasyonlarının en yüksek konsantrasyonda bile uzun süreli salım modellerinde toksik olmayacağı ortaya çıkarmaktadır.

Bu çalışmada KLT yüklenmiş PLGA bazlı polimerik nanopartiküller oral uygulamaya için uzatılmış analjezik etki için formüle edilmiştir. Polimerik nanopartiküllerin *in-vitro* karakteristik özellikleri ve siktotoksik profili detaylı olarak değerlendirilmiştir. Analiz sonuçları, küresel parçacıkların her iki yöntemle başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermektedir. Katı hal karakterizasyonu (DSC, XRD, FT-IR ve NMR) sonuçları birbirlerini desteklemiş ve bu sonuçlar KLT'nin polimerlere yüklendiğini kanıtlamıştır. Nanopartiküllerin yüksek kapsülleme etkinliğinden dolayı, KLT hazırlanan formülasyonların terapötik etkinliğini artırarak 8 güne kadar uzatmıştır. Sitotoksik değerlendirme, belirli konsantrasyonlarda nispeten yüksek hücre yaşayabilirliği olan PNP'lerin güvenliğini ortaya çıkarmıştır, çünkü 48 saat boyunca en yüksek konsantrasyonda bile toksik olmayan formülasyonlar, kontrol grubundan ve KLT'den daha yüksek hücre yaşayabilirlik değerleri göstermiştir.

## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Analizler sonucunda, Ketoprofen Lizin yüklü Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA) bazlı polimerik nanopartiküller hazırlanmış, KLT'nin oral olarak serbest bırakılması için etkili taşıyıcı adayları olduğu sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, *in-vivo* deneyler, elde edilen *in-vitro* sonuçları desteklemek ve son kararı vermek için gereklidir.



## KAYNAKÇA

- Ahmad, H., Arya, A., Agrawal, S., Dwivedi, A. K. (2019). PLGA scaffolds: building blocks for new age therapeutics. *Materials for Biomedical Engineering*, 155–201.
- Akagi, T., Baba, M., ve Akashi, M. (2011). Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Advanced Polymer Science*, 1-34.
- Amreddy, N., Babu, A., Munshi, A., Ramesh, R. (2019). Poly ( $\alpha$ -hydroxy acid)-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery for Cancer Therapy. *Polymeric Nanoparticles as a Promising Tool for Anti-cancer Therapeutics*, 81-99.
- Anacardio, R., Bartolini, S., Gentile, M. M., Bagnasco, M., & Carlucci, G. (2005). HPLC Investigated Physicochemical Compatibility between Artrosilene® Injectable Solution and other Pharmaceutical Products Frequently Used for Combined Therapy into Elastomeric Baxter LV5 Infusion Devices. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 18(4), 791–798.
- Anacardio, R., Perilli, O., Bartolini, S., Gentile, M. M., Mazzeo, P., and Carlucci, G. (2003). Physicochemical compatibility between ketoprofen lysine salt injections (Artrosilene®) and pharmaceutical products frequently used for combined therapy by intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1235–1241.
- Anderson, C. D. and Daniels, E. S. (2003). Emulsion Polymerisation and Latex Applications. *Rapra Review Reports*, 14(4), 3-32.
- Anderson, J. M., Shive, M. S. (2012). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 72-82.
- Apkarian, A. V. (2019). Definitions of nociception, pain, and chronic pain with implications regarding science and society. *Neuroscience Letters*, 702, 1-2.
- Arpagaus, C., Collenberg, A., Rütli, D., Assadpour, E., Jafari, S. M. (2018). Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics*, 546(1-2), 194-214.
- Asua, J. M. (2004). Emulsion polymerization: From fundamental mechanisms to process developments. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(5), 1025–1041.

- Bae, S. E., Son, J. S., Park, K., and Han, D. K. (2009). Fabrication of covered porous PLGA microspheres using hydrogen peroxide for controlled drug delivery and regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*, 133(1), 37–43.
- Bao, W., Zhou, J., Luo, J., and Wu, D. (2006). PLGA microspheres with high drug loading and high encapsulation efficiency prepared by a novel solvent evaporation technique. *Journal of Microencapsulation*, 23(5), 471–479.
- Barba, A. A., Bochicchio, S., Dalmoro, A., Caccavo, D., Cascone, S. and Lamberti, G. (2019). Polymeric and lipid-based systems for controlled drug release: an engineering point of view. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, 267–304.
- Barichello, J. M., Morishita, M., Takayama, K., and Nagai, T. (1999). Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25(4), 471–476.
- Bhambere D, Shirivastava B, Sharma P, Bukan N, Gide P. Preparation and optimization of dry plga nanoparticles by spray drying technique. *Particular Science Technology*, 2013, 31(5), 533- 40.
- Bhatia, S. (2016). Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 33-93.
- Blasi, P., Schoubben, A., Giovagnoli, S., Perioli, L., Ricci, M., and Rossi, C. (2007). Ketoprofen poly(lactide-co-glycolide) physical interaction. *AAPS PharmSciTech*, 8(2), E78–E85.
- Brandolini L, d'Angelo M, Antonosante A, Villa S, Cristiano L, Castelli V, Parashuraman S. Differential protein modulation by ketoprofen and ibuprofen underlines different cellular response by gastric epithelium. *Journal of Cell Physiology*, 2018,233(3),2304-2312.
- Budama-Kılınc, Y. (2019). Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 49(1), 47-54.
- Burischi, M. L. (2015). Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. *WoodHead Publishing Series in Biomedicine*, 1-215.

- Büyükköroğlu G, Şenel B, Gezgin S, Dinh T. The simultaneous delivery of paclitaxel and Herceptin® using solid lipid nanoparticles: in vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science Technology*, 2016,35, 98-105.
- Byrappa, K., Ohara, S., and Adschiri, T. (2008). Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(3), 299–327.
- Carneir J, Döll-Boscardin PM, Fiorin BC, Nadal JM, Farago PV, Paula JPD. Development and characterization of hyaluronic acid-lysine nanoparticles with potential as innovative dermal filling. *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences*, 2016, 52(4), 645-651.
- Carter, M. and Shieh, J. C. (2010). Cell Culture Techniques. *Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 281–296.
- Casado, R. M., Lovell, P. A., Navabpour, P. and Stanford J. L. (2007). Polymer encapsulation of surface-modified carbon blacks using surfactant-free emulsion polymerisation. *Polymer*, 48(2007), 2554-2563.
- Cerciello, A., Auriemma, G., Gaudio, P. D., Cantarini, M., Aquino, R. P. (2016). Natural Polysaccharides Platforms For Oral Controlled Release of Ketoprofen Lysine Salt. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 42(12), 2063-2069
- Chavda, V. P. (2019). Nanobased Nano Drug Delivery: A Comprehensive Review. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, 69–92.
- Chirayil, C. J., Abraham, J., Mishra, R. K., George, S. C. and Thomas, S. (2017). Instrumental Techniques for the Characterization of Nanoparticles. *Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization*, 1–36.
- Choi SH, Kim SY, Ryoo JJ, Park JY, Lee KP. FT-Raman and FT-IR spectra of the non-steroidal anti-inflammatory drug ketoprofen included in cyclodextrins. *Analytical Sciences*. 2001, 17, s.785.
- Crucho, C. I. C., and Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, (80), 771–784.
- Çomoğlu, T., Gönül, N., Baykara, T. (2002). The Effects of Pressure and Direct Compression on Tableting of Microsponges. *The International Journal of Pharmaceutics*. 242 (1-2), 191-195.

- Daffonchio, L., Novellini, R., Bertuglia, S. (2002). Protective effect of ketoprofen lysine salt on interleukin-1b and bradykinin induced inflammatory changes in hamster cheek pouch microcirculation. *Imflammation Research*. 51, 223-228.
- Dağlıoğlu, Y. ve Özkan-Yılmaz, H. (2018). Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksisite DeneYlerindeKi Önemi. *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*. 30 (1), 1-17.
- Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste, Z. M. (2013). Polymeric Nanoparticles, *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi.*, 107-120.
- Devi TR, Gayathri S. (2010). FTIR and FT-Raman spectral analysis of paclitaxel drugs. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2(2), 106-110.
- Draheim, C., de Crécy, F., Hansen, S., Collnot, E.-M., & Lehr, C.-M. (2015). A Design of Experiment Study of Nanoprecipitation and Nano Spray Drying as Processes to Prepare PLGA Nano- and Microparticles with Defined Sizes and Size Distributions. *Pharmaceutical Research*. 32(8), 2609-2624.
- Erbetta, C. D. H., Alves, R. J., Resende, M. J., Freitas, S. F. R., Sousa, G. R. (2012) Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, 208-225.
- Erdem, E. ve Morgil, İ. (2002). Lise öğrencilerinin temel polimer bilgileri üzerine bir çalışma. *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23, 88-94.
- Errico, C., Bartoli, C., Chiellini, F., and Chiellini, E. (2009). Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–10.
- Feehan, K. T. And Gilroy, D. W. (2019). Is Resolution the End of Inflammation. *Trends in Molecular Medicine*, 25(3), 198-214.
- file:///C:/Users/Ak%C4%B1n/Downloads/9783319411286-c1.pdf
- Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-a review. *Int J Pharm*, 2011,415(1-2),34-52.
- Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H., and Doelker, E. (2004). Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research*, 21(8), 1428–1439.

- Gavini, E., Sanna, V., Juliano, C., Giunchedi, P. (2002). Compressed biodegradable matrices of spray-dried PLGA microspheres for the modified release of ketoprofen. *Journal of Microencapsulation*. 20(2), 193-201.
- Ghanemi, A. (2015). Cell cultures in drug development: Applications, challenges and limitations. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(4), 453–454.
- Gluza, K. And Kennedy, J. F. (2008). Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42 (2), 216.
- Gupta, H., Aqil, M., Khar, R. K., Ali, A., Bhatnagar, A., and Mittal, G. (2010). Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 324–333.
- Gupta NV, Natasha S, Getyala A, Bhat RS. Bioadhesive vaginal tablets containing spray dried microspheres loaded with clotrimazole for treatment of vaginal candidiasis. *Acta Pharm* 2013, 63(3),359-372.
- Hajavi, J., Ebrahimian, M., Sankian, M., Khakzad, M. R., & Hashemi, M. (2018). Optimization of PLGA formulation containing protein or peptide-based antigen: *Recent advances. Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(9), 2540-2551.
- Hasçelik, Z. (2001). Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 10(1).
- Himmelstein, K. J. (1991). Controlled release: A quantitative treatment. *Journal of pharmaceutical sciences*, 80(3), 394.
- Honary, S., Zahir, F. (2013). Effect of a Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems- A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12(2), 255-264.
- ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, in: ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) 2014, 1-13.

- Jain, D. S., Athawale, R. B., Bajaj, A. N., Shrikhande, S. S., Goel, P. N., Nikam, Y., and Gude, R. P. (2014). Unraveling the cytotoxic potential of Temozolomide loaded into PLGA nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 18.
- Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21(23) 2475-2490.
- Javadzadeh, Y., Ahadi, F., Davaran, S., Mohammadi, G., Sabzevari, A., Adibkia, K. (2010). Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(2), 498–502.
- Jenning V, Mäder K, Gohla SH. Solid lipid nanoparticles (SLN™) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a 1H-NMR study. *Int J Pharm*, 2000, 205(1-2), 15-21.
- Kammari, R., Das, N. G. and Das, S. K. (2017). Nanoparticulate Systems for Therapeutic and Diagnostic Applications. *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*, 105–144.
- Kumar, A. and Dixit, C. K. (2017). Methods for characterization of nanoparticles. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*, 43–58.
- Kumar, R. M. N. V., Bakowsky, U. and Lehr, C. M. (2004). Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25(10), 1771–1777.
- Küçükturhan, A., Yılgör, B., Hasırcı, N. ve Hasırcı, V. (2010). Poli(laktik asit-koglikolik asit) (PLGA) Nano-Mikroparçacıkların Deri Hastalıkları Tedavisi İçin İlaç Salım Sistemleri Olarak Tasarımı. 3. *Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi*' nde sunulmuş poster. Kocaeli: Kocaeli Üniversitesi
- Lim, K., and Hamid, Z. A. A. (2018). Polymer nanoparticle carriers in drug delivery systems. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*, 217–237.
- Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., and Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711–726.
- Liu, C., Chen, X. D., Selomulya, C. (2015). On the spray drying of uniform functional microparticles. *Particuology*. 22, 1-12.
- Liu, J., Zhang, S. M., Chen, P. P., Cheng, L., Zhou, W., Tang, W. X., Ke, C. M. (2007). Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within

PVA hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(11), 2205–2210.

Lopedota A, Trapani A, Cutrignelli A, Chiarantini L, Pantucci E, Curci R, Manuali E, Trapani G. The use of Eudragit® RS 100/cyclodextrin nanoparticles for the transmucosal administration of glutathione. *Eur J Pharm Biopharm* 2009,72, 509-520.

López-Lorente ÁI, Mizaikoff B. Recent advances on the characterization of nanoparticles using infrared spectroscopy. *Trends Anal Chem*, 2016, 84, 94-106.

Lu, X.-Y., Wu, D.-C., Li, Z.-J., and Chen, G.-Q. (2011). Polymer Nanoparticles. *Nanoparticles in Translational Science and Medicine*, 104, 299–323.

Lynn, D. E. (2009). Cell Culture. *Encyclopedia of Insects*, second edition, 144–145.

Mack, M. (2018). Inflammation and Fibrosis. *Matrix Biology.*, 2018(ağustos), 68-69.

Maharshi, P., Singh, S. K., Gulati, M., Yadav, A. K., Garg, V., Kumari, B., & Gowthamarajan, K. (2018). A Novel Three-pronged Approach for Colon Delivery of Sulfasalazine: Concomitant Use of pH-Responsive, *Microbially Triggered Polymers and Liquisolid Technology*. *Current drug delivery*, 15(7), 1038-1054.

Mainardes RM, Gremião MPD, Evangelista RC. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006,42(4),523-30.

Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397.

Malcangio, M. (2018). GABA<sub>B</sub> receptors and pain. *Neuropharmacology*, 136(A), 102-105.

Manca, M. L., Mourtas, S., Dracopoulos, V., Fadda, A. M., Antimisariaris, S. G. (2008). PLGA, chitosan or chitosan-coated PLGA microparticles for alveolar delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62(2), 220–231.

Manoochehri, S., Darvishi, B., Kamalinia, G., Amini, M., Fallah, M., Ostad, N. S., Atyabi, F., Dinarvand., R. (2013). Surface modification of PLGA nanoparticles via human serum albumin conjugation for controlled delivery of docetaxel. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1),1-10

Marin, R. R. R., Babick, F., Hillemann, L. (2017). Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles–Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 532, 516-521.

- Martindale. (1989). The Extra Pharmacopoeia (29. Baskı) Londra.
- Martins, C., Sousa, F., Araújo, F., & Sarmiento, B. (2018). Functionalizing PLGA and PLGA derivatives for drug delivery and tissue regeneration applications. *Advanced Healthcare Materials*, 7(1).
- Mayeen, A., Shaji, L. K., Nair, A. K., and Kalarikkal, N. (2018). Morphological Characterization of Nanomaterials. *Characterization of Nanomaterials*, 335–364.
- McCarron, P. A., Donnelly, R. F., and Marouf, W. (2006). Celecoxib-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using a novel and controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. *Journal of Microencapsulation*, 23(5), 480–498.
- Messeri, A., Busoni, P., Noccioli, B., Murolo, S., Ivani, G., Grossetti, R., Gallini, C., Maestri, L., Fedele, G., Novellini, R. (2003). Analgesic efficacy and tolerability of ketoprofen lysine salt vs paracetamol in common paediatric surgery. A randomized, single-blind, parallel, multicentre trial. *Pediatric Anesthesia*, 13 (7), 574-578.
- Messeri, A., Busoni, P., Noccioli, B., Murolo, S., Ivani, G., Grossetti, R., Gallini, C., Maestri, L., Fedele, G., Novellini, R. (2003). Analgesic efficacy and tolerability of ketoprofen lysine salt vs paracetamol in common paediatric surgery. A randomized, single-blind, parallel, multicentre trial. *Pediatric Anesthesia*. 13 (7), 574-578.
- Mohanraj, V. J. and Chen, Y. (2006). Nanoparticles- A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561-573.
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., and Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934.
- Murthy, N., Wilson, S., Sy, J. C., Aqida, S. N. (2017). Biodegradation of Polymers. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, 9, 547-560.
- Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K.S., Ayaz, A., Vasudha, L.S., and Shivakumar, H.G. (2012). Different Techniques For Preparation of Polymeric Nanoparticles. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 16-23.
- Newton, A. M. J. and Kaur, S. (2019). Solid lipid nanoparticles for skin and drug delivery. *Nanoarchitectonics in Biomedicine*, 295–334.
- Nikolić, V., Ilić-Stojanović, S., Petrović, S., Tačić, A., and Nikolić, L. (2019). Administration Routes for Nano Drugs and Characterization of Nano Drug Loading. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, 587–625.



- Nimesh, S. (2013). Methods of nanoparticle preparation. Gene Therapy içinde (13–42). Woodhead Publishing.
- Nimesh, S. (2013). Tools and techniques for physico-chemical characterization of nanoparticles. *Gene Therapy*, 43–63.
- Ortega-Oller, I., Padial-Molina, M., Galindo-Moreno, P., O’Valle, F., Jódar-Reyes, A. B., & Peula-García, J. M. (2015). Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *BioMed Research International*, 2015, 1–18.
- Öztürk AA, Yenilmez E, Arslan R, Şenel B & Yazan Y. Dexketoprofen trometamol-loaded kollidon® SR and eudragit® RS 100 polymeric nanoparticles: *formulation and in vitro-in vivo evaluation*. *Lat. Am. J. Pharm. Am. J. Pharm* 2017, 36(2153)-65.
- Öztürk. A. A. (2017). Deksketoprofen trometamol yüklü kontrollü salım gösteren nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve in vitro/in vivo değerlendirilmesi. Yayınlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Pagar K, Vavia P. Rivastigmine-loaded l-lactide-depsipeptide polymeric nanoparticles: decisive formulation variable optimization. *Sci Pharm* 2013, 81(3), 865.
- Pal, L. S., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P. and Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(6), 228-234
- Passali, D., Volonte, M., Passali, G. C., Damiani, V., Bellussi, L. (2001). Efficacy and Safety of Ketoprofen Lysine Salt Mouthwash Versus Benzydamine Hydrochloride Mouthwash in Acute Pharyngeal Inflammation: A Randomized, Single-Blind Study. *Clinical Therapeutics* , 23(9). 1508-1518
- Peppas, N. A. And Narasimhan, B. (2014). Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 190, 75-81.
- Pistner, H., Bendix, D. R., Muhling, J., Reuther, J. F. (1993). Poly (L-lactide): a long-term degradation study in vivo: Part III. Analytical characterization. *Biomaterials*, 14 (4), 291-298.
- Rao, J. P. and Geckeler, K. E. (2011). Polymer Nanoparticles : Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, (36) 7, 887 – 913.

- Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., and Tekade, R. K. (2019). Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, 369–400.
- Reis, P. T., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2(1), 8-21
- Sah, H., Thoma, L. A., Desu, H. R., Sah, E., Wood, G. C. (2013) Concepts and practices used to develop functional PLGA-based nanoparticulate systems. *International Journal of Nanomedicine*. 8 (1), 747-765.
- Seju, U., Kumar, A., and Sawant, K. K. (2011). Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. *Acta Biomaterialia*, 7(12), 4169–4176.
- Sequeira, J. A. D., Santos, A. C., Serra, J., Veiga, F., Ribeiro, A. J. (2018). Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) matrix implants. *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs*, 375–402.
- Sharma, M. (2019). Transdermal and Intravenous Nano Drug Delivery Systems. *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*, 499–550.
- Shokrollahi, F., Khodabakhshi, K., Shokrollahi, P., Badiani, R., Moghadam, Z. M. (2019). Atorvastatin loaded PLGA microspheres: Preparation, HAp coating, drug release and effect on osteogenic differentiation of ADMSCs. *International Journal of Pharmaceutics*, 565, 95-107.
- Silva, R. C. T. A., Cardoso, B. C. O., e Silva, R. S. E. M., Freitas, R. F. S., Sousa, R. G. (2015). Synthesis, Characterization, and Study of PLGA Copolymer in Vitro Degradation. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 6, 8-19.
- Singh, A. K. (2016). Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles. *Engineered Nanoparticles*, 125–170.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 70 (1-2), 1-20.
- Stevanović, M. (2017). Polymeric micro- and nanoparticles for controlled and targeted drug delivery. *Nanostructures for Drug Delivery*, 355–378.

- Stigliani M, Aquino RP, Del Gaudio P, Mencherini T, Sansone F, Russo P. Non-steroidal anti-inflammatory drug for pulmonary administration: design and investigation of ketoprofen lysinate fine dry powders. *Int J Pharm*, 2013,448(1), 198-204.
- Sun, Y.-P., and Rollins, H. W. (1998). Preparation of polymer-protected semiconductor nanoparticles through the rapid expansion of supercritical fluid solution. *Chemical Physics Letters*, 288(2-4), 585–588.
- Thagele R, Mishra A, Pathak AK. Formulation and characterization of clarithromycin based nanoparticulate drug delivery system. *Int J Pharm Life Sci* 2011, 2(1), 510-15.
- Titus, D., Samuel, E. J. J., and Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 303–319.
- Uchegbu, I. (2001). Handbook of pharmaceutical controlled release technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 220(1-2), 179-180.
- Uhrich, K. E. and Abdelhamid, D. (2016). Biodegradable and bioerodible polymers for medical applications. *Biosynthetic Polymers for Medical Applications*, 63–83.
- Unagolla JM, Jayasuriya AC. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. *Eur J Pharm Sci*, 2018, (114) 199-209.
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., Eker Sariboyaci, A. (2018). Cell and Tissue Culture. *Omics Technologies and Bio-Engineering*, 391–429.
- Venier - Julienne, M. C. and Benoit, J. P. (1995). Preparation, purification and morphology of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Pharmaceutics Acta Helvetiae*, 71, 121-128.
- Vino S, Abinaya A, Divya V, Ghosh AR. Controlled release of phenytoin sodium from casein microparticles. *Int J Pharm Biol Sci* 2014, 5(2),233-41.
- Wackerlig, J. and Lieberzeit, P. A. (2015). Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing- Synthesis, characterization and application. *Sensors and Actuators B: Chemicals*, 2017(A), 144-157.
- Wang, H., Liu, J., Tao, S., Chai, G., Wang, J., Hu, F., Yuan, H. (2015) Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system. *International Journal of Nanomedicine*. 10(1), 5671- 5685

Wang, H., Liu, J., Tao, S., Chai, G., Wang, J., Hu, F., Yuan, H. (2015) Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system. *International Journal of Nanomedicine*. 10(1), 5671- 5685.

Whitford, W. G., Lundgren, M., and Fairbank, A. (2018). Cell Culture Media in Bioprocessing. *Biopharmaceutical Processing*, 147–162.

Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M. and Chauhan, S. C. (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(1), 19–29.

Yamaguchi, Y., Takenaga, M., Kitagawa, A., Ogawa, Y., Mizushima, Y., Igarashi, R. (2002). Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives. *Journal of Controlled Release*, 81(3), 235–249.

Yenilmez E. Desloratadine-Eudragit® RS100 Nanoparticles: Formulation and Characterization. *Turk J Pharm Sci*,2017,14(2),148-56.

Zhang, H., Pu, C., Wang, Q., Tan, X., Gou, J., He, H., ... & Tang, X. (2019). Physicochemical Characterization and Pharmacokinetics of Agomelatine-Loaded PLGA Microspheres for Intramuscular Injection. *Pharmaceutical research*, 36(1), 9.

Zhang, J.-Y., Shen, Z.-G., Zhong, J., Hu, T.-T., Chen, J.-F., Ma, Z.-Q., and Yun, J. (2006). Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants. *International Journal of Pharmaceutics*, 323(1-2), 153–160.

Zuo J, Gao Y, Bou-Chacra N, Lobenberg R. Evaluation of DDSolver software applications. *Biomed Res Int*, 2014, 1-9.

http:-1: <http://www.chemnet.com/ChinaSuppliers/28327/Ketoprofen-Lysine-Salt-869455.html>





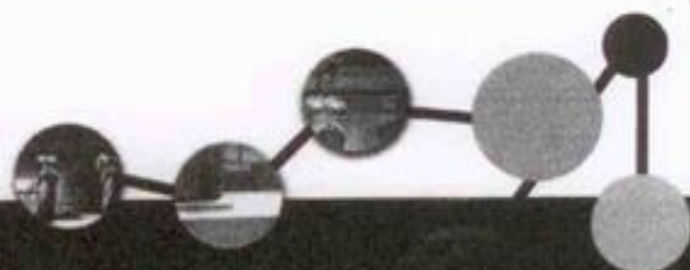
# EUFEPS Annual Meeting 2018

## Crossing Barriers for Future Medicines

---

**24-26 May 2018** Titania Hotel Athens, Greece

### Final Program





EP47

**IMPROVEMENT OF GABAPENTIN'S STABILITY BY USING DIFFERENT EXCIPIENTS AND VARYING THE AMBIENT CONDITION**

Yasmin Raniouss<sup>1</sup>, Tamas Soveny<sup>2</sup>, Géza Regdon, Jarmila Haasian<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>University of Szeged, Szeged, Hungary, <sup>2</sup>University of Damascus, Damascus, Syria

EP48

**PREPARATION AND CLINICAL EVALUATION OF MINERAL WATER BASED COSMETIC FORMULATIONS WITH OLIVE FLOWER EXTRACT**

Ozgen Ozer<sup>1</sup>, Evren Homan Gokce<sup>1</sup>, Serra Gurcan<sup>1</sup>, Fatih Karabey<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Ege University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Izmir, Turkey

EP49

**PHYSICO-CHEMICAL ANALYSIS IN THE FORMULATION DEVELOPMENT OF BAICALIN CONTAINING SELF-NANEMULSIFYING DRUG DELIVERY SYSTEM**

Geza Jakab<sup>1</sup>, Viktor Fülöp<sup>1</sup>, Tamas Bozo<sup>1</sup>, Ernes Balogh<sup>1</sup>, Istvan Antal<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Semmelweis University, Budapest, Hungary

EP51

**EVALUATION OF SOLUBILITY AND DERMAL PERMEATION OF FLURBIPROFEN NANOSUSPENSION**

Ayşe Nur Oktay<sup>1</sup>, Alptug Karakucuk<sup>1</sup>, Sibel Ilbasimis-Tamer<sup>1</sup>, Nevin Celebi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Gazi University Faculty of Pharmacy - Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey

EP52

**DENDRON-BASED MICELLES FOR DERMAL DELIVERY AND FOLLICULAR TARGETING**

Beyza Betül Gökçe<sup>1</sup>, Filiz Çalik<sup>2</sup>, Rana Sanyal<sup>3</sup>, Richard H. Guy<sup>4</sup>, Sevil Güneş<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Istanbul, 34116, Turkey, <sup>2</sup>Bogazici University, Department of Chemistry, Istanbul 34342, Turkey, <sup>3</sup>University of Bath, Department of Pharmacy & Pharmacology, Bath, BA2 7AY Bath, UK

EP53

**INVESTIGATION OF ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF SOUR CHERRY ANTHOCYANINS ON CACO-2 INFLAMMATORY MODEL**

Thi Le Phuong Nguyen<sup>1</sup>, Ferenc Fenyvesi<sup>2</sup>, Judit Bereményi<sup>3</sup>, Judit Homoki<sup>4</sup>, Ildiko Bacsokay<sup>5</sup>, Paloma Feher<sup>1</sup>, Zoltan Ujhelyi<sup>6</sup>, Gabor Vasvari<sup>7</sup>, Miklos Vecsernyés<sup>8</sup>, Judit Varadi<sup>9</sup>  
<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>2</sup>Department of Food Technology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>3</sup>Department of Food

EP54

**KETOPROFEN LYSINE LOADED POLY-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID (PLGA) NANOPARTICLES BY DOUBLE EMULSION SOLVENT EVAPORATION METHOD**

Akin Elmascakaya<sup>1</sup>, A. Alper Özlüklü<sup>2</sup>, Evrim Yenilmez<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey, <sup>2</sup>Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey

EP55

**FRACTAL OR FRACTIONAL KINETICS IN DRUG RELEASE STUDIES: A COMPARATIVE STUDY OF THE WEIBULL AND MITTAG-LEFFLER FUNCTIONS**

Kostas Kosmidis<sup>1</sup>, Panos Macheras<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece, <sup>2</sup>University of Athens, Athens, Greece

EP56

**FLURBIPROFEN LOADED EUDRAGIT® RSP0 AND EUDRAGIT® RLPO NANOPARTICLES FOR EXTENDED ANALGESIC ACTIVITY**

A. Alper Özlüklü<sup>1</sup>, Umay Merve Güven<sup>2</sup>, Evrim Yenilmez<sup>3</sup>, Behiye Senel<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey, <sup>2</sup>Cukurova University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Adana, Turkey, <sup>3</sup>Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey

EP57

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A NOVEL POST-BIOTIC ENTERIC FORMULATION IN A MOUSE MODEL OF METABOLIC SYNDROME**

Matteo Puccelli<sup>1</sup>, Monica Borghini<sup>2</sup>, Luigina Romanò<sup>3</sup>, Maurizio Ricci<sup>4</sup>, Mariilena Parrano<sup>5</sup>, Stefano Giovagnoli<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dpt. of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy, <sup>2</sup>Dpt. of Experimental Medicine, University of Perugia, Perugia, Italy

EP58

**FLURBIPROFEN LOADED GEL FORMULATION AND CHARACTERIZATION WITH NEW DEVELOPED UPLC METHOD**

A. Alper Özlüklü<sup>1</sup>, Umay Merve Güven<sup>2</sup>, Evrim Yenilmez<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey, <sup>2</sup>Cukurova University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Adana, Turkey

EP59

**MULTI-DRUG DELIVERY SYSTEM BLENDS AS A POTENTIAL STRATEGY TO IMPROVE QUALITY OF DRY POWDERS FOR INHALED THERAPIES**

Sylfiani Xiroudaki<sup>1</sup>, Matteo Puccelli<sup>1</sup>, Maurizio Ricci<sup>1</sup>, Dimitrios M. Rekkas<sup>2</sup>, Stefano Giovagnoli<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dpt. of Pharmaceutical Sciences, University of Perugia, Perugia, Italy, <sup>2</sup>Dpt. of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, National & Kapodistrian University of Athens, Greece, Athens, Greece

EP60

**BIOACTIVE POLYURETHANE ELASTOMERS FOR BONE TISSUE ENGINEERING**

Eda Ayşe Aksoy<sup>1</sup>, Betül Suyumbike Yagci<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey, <sup>2</sup>Hacettepe University, Institute of Science, Polymer Science and Technology Division, Ankara, Turkey

EP61

**SINGLE- AND MULTIPLE-DOSE TOLERABILITY, PHARMACOKINETICS, AND PHARMACODYNAMICS OF ACT-774312: A NOVEL CRTH2 ANTAGONIST**

Madlene Gebin<sup>1</sup>, Milena Issac<sup>2</sup>, Hervé Fariné<sup>3</sup>, Daniel Strasser<sup>4</sup>, Patricia Sidharta<sup>5</sup>, Jasper Dingemans<sup>6</sup>  
<sup>1</sup>Clinical Pharmacology, Idorsia Pharmaceuticals Ltd, Allschwil, Switzerland, <sup>2</sup>Translational Science Biology, Idorsia Pharmaceuticals Ltd, Allschwil, Switzerland

EP62

**DEVELOPMENT OF SOLID LIPID NANOPARTICLES CONTAINING RIBOFLAVIN BY FACTORIAL DESIGN**

Eren Aylekin<sup>1</sup>, Sibel Bozbag Pehlivan<sup>1</sup>, Semra Çalis<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, Turkey

Griemio, Maria EP36  
 Palmira OP-05  
 Grewys, Aljodas EP96  
 Grimaudo, Maria OP-07  
 Aurora OP-06  
 Grohganz, Hölger EP80  
 Gulbag, Sıla EP52, EP81  
 Güngör, Ayça EP48  
 Güngör, Serra EP56, EP58  
 Güven, Ursay Mevve EP52  
 Guy, Richard H EP30  
 Hafner, Anja EP84  
 Hajdu, Istvan EP17  
 Haloci, Entela EP01  
 Hanafy, Ahmed OP-19  
 Hanus, Jaroslav EP47  
 Hassian, Jamila OP-04  
 Heltovcis, Gabor EP64  
 Hermenau, Anca EP11, EP12  
 Ho, Sheau-Ling EP83  
 Hökenek, Nesrin OP-07  
 Holm, René EP87  
 Horman, Golice, Evren EP53  
 Hormoki, Judit OP-19  
 Hosek, Jan OP-03  
 Ilkaidok, Nasir EP51  
 Ilbasimis-Tamer EP85  
 Sibel EP72  
 Iliadis, Athanasios EP81  
 Ilyés, Kinga EP45

Imamoglu, Selin EP42  
 Iskit, Alper B EP91, FP-06  
 Jacqz-Algrain EP41  
 Evelynne EP84  
 Jadrjevic-Miadar EP49  
 Takac, Milena EP45  
 Jakab, Geza OP-04  
 Janska, Petra OP-17  
 Jordan, Tamas EP30  
 Joy, Abraham  
 Juric Simcic, Ana

## K

Kacar, Turgay EP23  
 Kadoglou, Nikolaos FP-04  
 Kadry, Hossam OP-17  
 Kalla, Yogeshvar N EP19  
 Kaplan, Ozan EP74, OP-21  
 Karabey, Fatih EP48  
 Karaca, Gizem EP13  
 Karakucuk, Alptug EP39, OP-06, EP51  
 Karalis, Vangelis EP02  
 Karatas, Aysegül EP80  
 Karavana, Sinem EP40  
 Kaspar, Ondrej EP45  
 Katev, Vladimir EP09  
 Kalona, Gabor EP18  
 Kerendicuff, Hugo OP-07  
 Kersten, Elisabeth EP71  
 Keser, Sabina EP31  
 Keshavarz, Ali OP-17  
 Kliest, Tessa OP-12  
 Knezlik, Zdenek EP45

Knopp, Matthias OP-07  
 Manne EP74, OP-21  
 Kocak, Engin EP86  
 Kosa, Annamaria EP55  
 Kosmidis, Kosmas  
 Kostomitsopoulos, FP-04, OP-08  
 Nikolaos EP05  
 Kourbani, Danae EP71  
 Koursari, Maria OP-09  
 Kovack, Pavel EP72  
 Kovacs, Norbert EP92  
 Kriszlan EP24, OP-12  
 Kraneveld, Aletta EP93  
 Krause, Julius EP38  
 Kreka, Manika

## L

Laffleur, Flavie OP-14  
 Letocky, Robert EP100  
 Lekka, Christina EP35  
 Liu, Xuan OP-11  
 Löbmann, Korbman OP-07  
 Lozoya-Agullo, EP03  
 Isabel EP38  
 Lupo, Mariangela EP30  
 Lusina, Kregar, Maja EP76  
 Machedo Querbino, EP10  
 Macheras, Panos EP41, EP55, EP85  
 Magn, Giulia EP21  
 Malanga, Milo EP64  
 Marosi, György EP72

Marques, Sara EP36  
 Maskova, Lucie EP45  
 Melagraki, Georgia EP85  
 Mellet, Carmen Ortiz OP-16  
 Merino-Samuan, EP03  
 Matilde EP78, EP99  
 Miele, Dalia EP41  
 Mikros, Emmanouel EP06  
 Milanovic, Ana EP16, EP21, OP-20  
 Minghetti, Paola EP90  
 Mirafi, Sarah EP28, EP33  
 Milsou, Evgenia EP19  
 Monod, Michel EP22  
 Morou, Paraskevi EP84  
 Kynaki EP84  
 Moric, Sandra Muehlebach, Stefan OP-02  
 Muenster, Uwe EP71  
 Musazzi, Umberto EP16, EP21

## N

Mulu Agardan, OP-06  
 Basaran EP43  
 Mulu Agardan, N Basaran EP43  
 Natria Escalera, Begonya EP38  
 Nagy, Zsombor EP72  
 Kristof EP91  
 Nemutlu, Emirhan EP41  
 Neuber, Anje EP53  
 Nguyen, Thi Le Phuong EP96  
 Nicoli, Sara EP44  
 Nielsen, Thorbjorn EP38  
 Terndrup EP33  
 Nika, Daniela EP33  
 Nikolic, Ines

Nilsen, Jeannette OP-05  
 Ning, Baiyang OP-11  
 Novak, Matej OP-09  
 Oktay, Ayse Nur EP51  
 Okur, Mehmet EP32, FP-03  
 Evren EP87  
 Onay, Ecehan EP74, OP-21  
 Oncul, Selin OP-16  
 Oncul, Selin OP-04  
 Övös, Zsolt EP48, EP73, EP77  
 Özer, Ozgen EP97, OP25  
 Özgüney, Isik EP63  
 Özogul, Candan EP54, EP56, EP58  
 Öztürk, A. Alper

## P

Padua, Cristina EP96  
 Pallagi, Edina EP45  
 Palmieri, Giovanni Filippo FP-05  
 Papachroni, Ioanna EP46  
 Papadimitriou, Vassiliki EP29, EP33  
 Papahadjis, Demetris EP29  
 Papay, Zsófia Edit EP86  
 Pappou, Efi EP29  
 Pariano, Mariena EP57  
 Pececek, Daniel EP100  
 Pepic, Ivan EP31  
 Perez Pardo, Paula OP-12  
 Perinelli, Diego R FP-05, EP76  
 Pescina, Silvia EP96

Pignataro, Valeria EP41  
 Piras, Anna Maria OP-23  
 Pirmohamed, Munir OP-11  
 Plavcova, Zuzana OP-19  
 Pleisa, Vasiliki EP29  
 Poirer, Christopher EP92  
 Prasanna, Maruthi EP15  
 Pratsinis, Harris EP29  
 Prezotti, Fabiola EP36  
 Priemel, Petra OP-07  
 Puccetti, Matteo EP57, EP59

## R

Rades, Thomas OP-07  
 Randjelovic, Danijela EP33  
 Ranjous, Yasmin EP47  
 Rantanen, Jukka OP-07  
 Regdon, J. Géza EP47  
 Rekkas, Dimitrios OP-08, EP59  
 Rejjic, Iva EP30, EP31  
 Remenyik, Judit EP53  
 Rençber, Seda OP25, EP40, EP97  
 Reppas, Christos EP71  
 Resch, Susanne EP25, EP26  
 Ribeiro De Araujo, Daniele EP10, EP27  
 Ricci, Maurizio EP57, EP59, EP76  
 Rocco, Paolo EP16  
 Romani, Luigina EP57  
 Romanos, Giannis EP71  
 Rosenberg, Jörg FP-01  
 Rossi, Silvia EP78, EP79, EP99  
 Ruggieri, Lucia EP41  
 Rui, Maria EP99





# EUFEPS Annual Meeting 2018

Crossing Barriers for Future Medicines

24-26/05/2018

## Certificate of Attendance

This is to certify that

**A. ALPER OZTURK**

has attended the

"EUFEPS Annual Meeting 2018",

which was held from

**24-26 May 2018** in Titania Hotel Athens, Greece.

**Prof. Dr.  
Erem Bilensoy**  
EUFEPS President

**Emeritus Professor  
Panos Macheras**  
Faculty of Pharmacy  
University of Athens

## KETOPROFEN LYSINE LOADED POLY-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID (PLGA) NANOPARTICLES BY DOUBLE EMULSION SOLVENT EVAPORATION METHOD

Akin Elmaskaya<sup>1</sup>, A. Alper Öztürk<sup>2</sup>, Evrin Yenilmez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey,

<sup>2</sup>Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir, Turkey

**Objectives:** The aim of this study was to formulate and characterize ketoprofen lysine salt (KLS) which is a water-soluble lysine salt of antiinflammatory agent ketoprofen as PLGA nanoparticles (1, 2).

**Methods:** KLS is a kind gift from Berko İlaç (Istanbul/Turkey). PLGA (Resomer® RG 504, PLGA 50:50) was obtained from Sigma(Germany). Formulations were prepared by double emulsion solvent evaporation method. Particle size (PS), poly dispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) measurements were performed on freshly prepared samples using a Malvern analyzer. The entrapment efficiency (EE%) and dissolution study of each formulation was performed with HPLC with reversed-phase column (4.6mmx150 mm, C18 Gravity, 3 µm). In vitro release study of the formulations was investigated over 15 days and performed in phosphate buffer (pH 7.4). Release kinetics of formulations were investigated using DDSolver software program.

**Results:**

Figure 1. In vitro dissolution profile of formulations and pure KLS

Table 1. Result of PS, PDI, ZP and EE% (n=3)

**Conclusions:** According to the characterization studies we can conclude that this polymeric system seems to be promising for controlled and sustained delivery of KLS for pain treatment.

**Acknowledgements**

This study was supported by Anadolu University Scientific Research Project No: 1708S471

**References:**

1. Cerciello, Andrea, et al. (2016). Natural polysaccharides platforms for oral controlled release of ketoprofen lysine salt. *Drug development and industrial pharmacy*, 42(12), 2063-2069.
2. McCall, R. L., & Sirianni, R. W. (2013). PLGA nanoparticles formed by single-or double-emulsion with vitamin E-TPGS. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (82).

Figure 1. *In vitro* dissolution profile of formulations and pure KLS

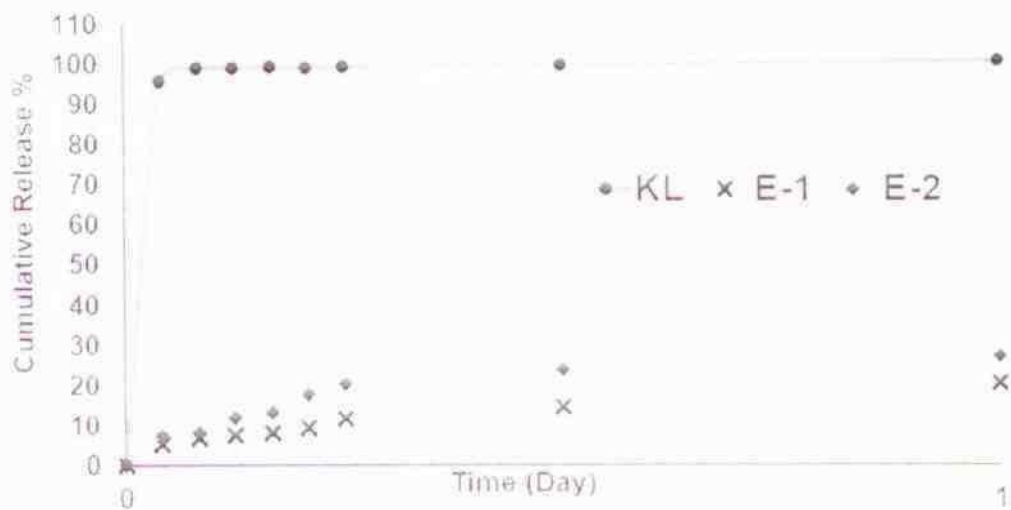
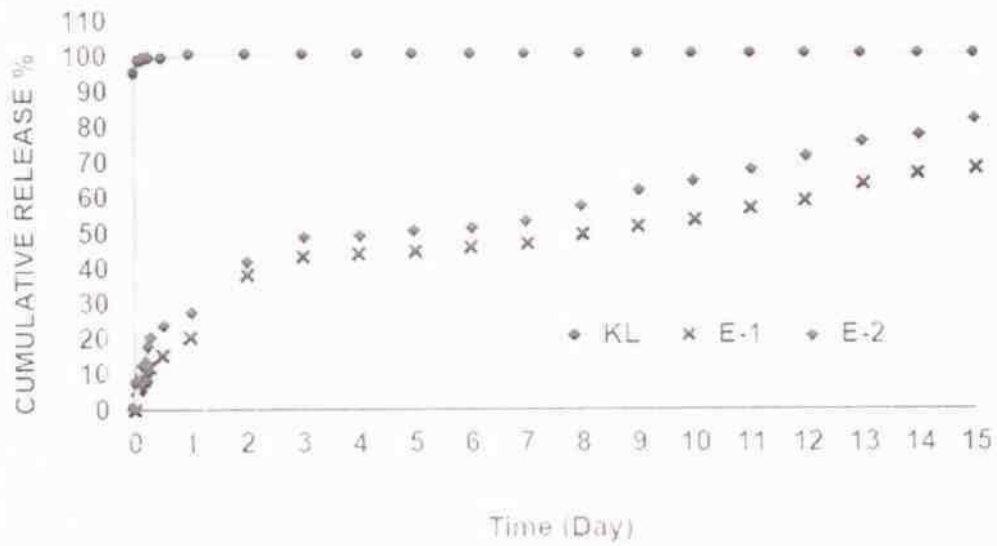


Table 1. Result of PS, PDI, ZP and EE% (n=3)

Code	Particle Size (nm)	PDI	ZP	%EE
E-Blank	101.7 ± 2.3	0.077 ± 0.085	-28 ± 0.13	-
E-1	143.9 ± 0.1	0.268 ± 0.019	-26 ± 0.12	77.105 ± 2.127
E-2	141.2 ± 4.9	0.313 ± 0.060	-24 ± 0.23	74.026 ± 3.002



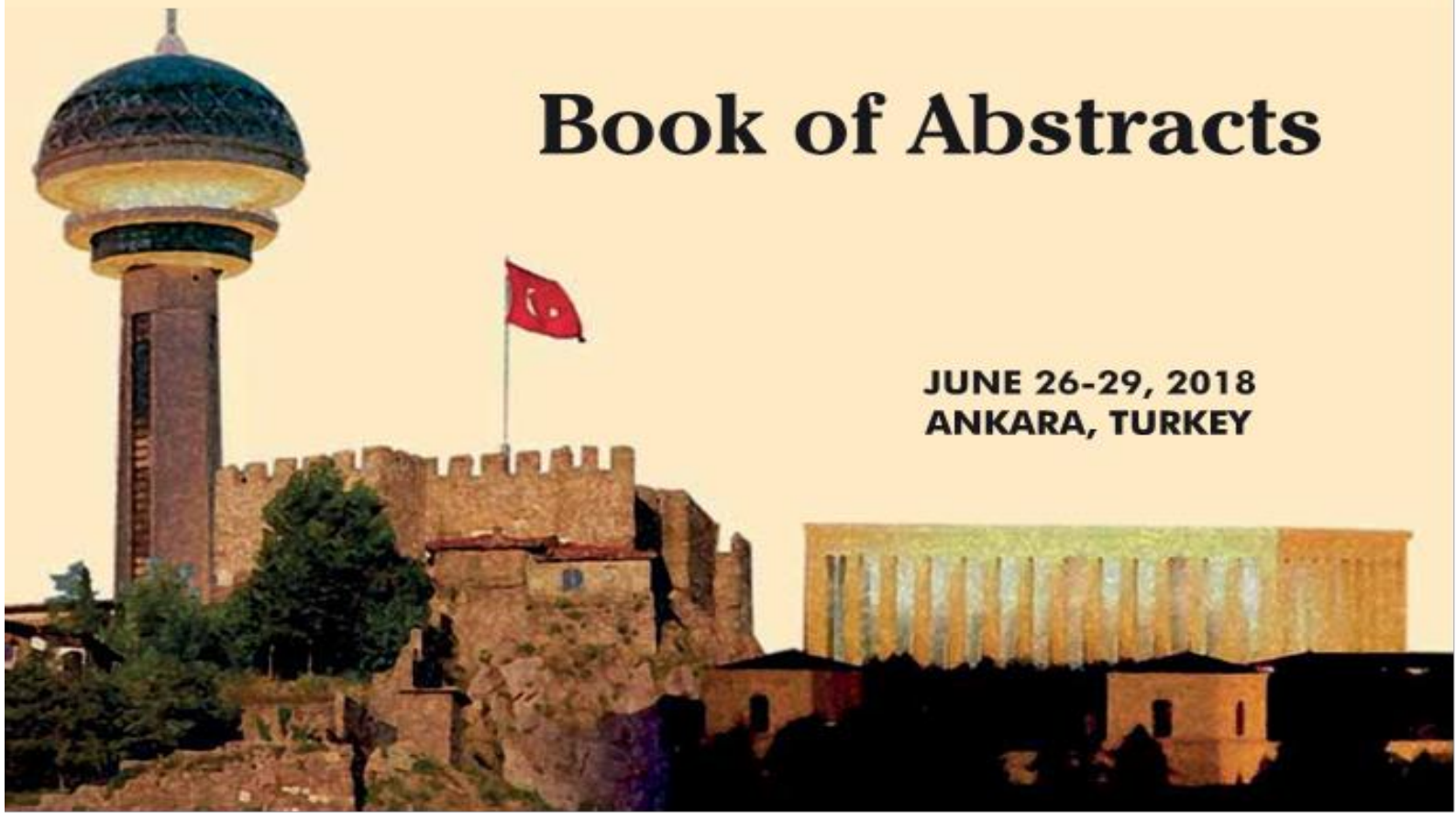
**ANKARA UNIVERSITY  
FACULTY OF PHARMACY**



**I  
S  
O  
P  
S** **12<sup>th</sup>** **International  
SYMPOSIUM ON  
PHARMACEUTICAL  
SCIENCES**

**Book of Abstracts**

**JUNE 26-29, 2018  
ANKARA, TURKEY**





were prepared using complete medium. Maximum DMSO concentration applied to cells was 0.28 %. Cell viability was evaluated by MTT assay after 24 h and 48 h incubation with LTG dilutions.

**RESULTS:**

Cell viability of L929 cells after 24 h incubation were 99.4, 104.9, 106.1, 130.1, 123.9, 116.5, 121.3 % for 2, 4, 6, 8,10, 12, 14 µg/mL of LTG concentrations, respectively. After 48 h incubation cell viability values of the L929 cells were determined as 95.0, 102.5, 99.8, 149.3,221.2, 156.9 and 161.8 % at the same concentrations.

**CONCLUSIONS:**

It was found that LTG had proliferative effects on the L929 cells at both low and high concentrations. As a result of this study, we may conclude that LTG does not have a cytotoxic effect on the L929 cell line.

**REFERENCES:**

1. Fisher R. S.,et al. (2014). *Epilepsia*,55(4):475–482.
1. Leng Y.,et al.(2013). *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16: 607–620.

**P-309: POLY-LACTIC-CO-GLYCOLIC ACID NANOPARTICLES CONTAINING KETOPROFEN LYSINE: PREPARATION AND CHARACTERIZATION**

Elmaskaya, A, **Ozturk, A.A.**, Yenilmez, E.

*Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Depart. of Pharmaceutical Technology, Eskisehir, Turkey*

**INTRODUCTION:**

Ketoprofen lysine (KL), the water soluble lysine salt of Ketoprofen, is one of the most widely used non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the symptomatic treatment of various chronic inflammatory diseases for its analgesic efficacy (1). However, due to its short half-life of 1–2 h, a multiple dose regimen is required therefore, KL is an ideal candidate for the development of controlled drug delivery systems which are able to release the drug at a desired rate and in desired amount (1). PLGA exhibits many of the ideal properties of a nanoscale delivery system, providing long term release of the encapsulated agent and degrading into the biocompatible products of lactic and glycolic acid (2). According to the aim of this study, KL-containing PLGA nanoparticles were prepared by spray drying method (2).

**MATERIALS AND METHODS:**

KL is kind gift from Berko İlaç (Istanbul/Turkey). PLGA (Resomer® RG 504, PLGA50:50) was obtained from Sigma(Germany). Formulations were prepared by spray drying method with Büchi B-290 spray dryer (Switzerland). Particle size (PS), poly dispersity index (PDI) and zeta potential (ZP) measurements were performed on freshly prepared samples using

a Malvern analyzer. The entrapment efficiency (EE%) and dissolution study of each formulation was performed with HPLC. In vitro release study of the formulations was investigated over 15 days and performed in phosphate buffer (pH 7.4). Results:

Figure 1. In vitro dissolution profile of formulations and pure KL

Table 1. Result of PS, PDI, ZP and EE% (n=3)

**CONCLUSIONS:**

According to the characterization and dissolution studies we can conclude that this polymeric system seems to be promising for controlled and sustained delivery of KL for pain treatment.

**ACKNOWLEDGEMENTS:**

This study was supported by Anadolu University Scientific Research Project No: 1708S471

Figure 1. In vitro dissolution profile of formulations and pure KL

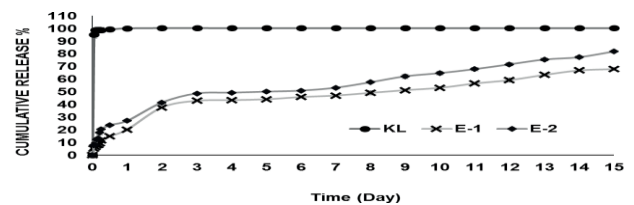


Table 1. Result of PS, PDI, ZP and EE% (n=3)

Code	Particle Size	PDI	Zeta	%EE
S-Blank	490.3 ± 2.2	0,27± 002	-28±0.21	-
S-1	512.6 ± 5.2	0.43±0.03	-27±1.13	%78.789±0.953
S-2	518.3 ± 3.1	0.44±0.02	-20±1.21	%59.634±1.624

**REFERENCES:**

1. Cimini, Annamaria, et al. (2015). *Journal of cellular physiology* 230.4 (2015): 813-820.
2. McCall, R. L., & Sirianni, R. W. (2013). *Journal of visualized experiments: JoVE*, (82).

- Ortak, H. 226, 227, 246, 247
- Oruc Emre, EE. 357, 358, 359, 360, 371, 372
- Osmancevic, S. 280
- Osmaniye, D. 219, 363, 364, 369, 403, 408, 410, 411
- Oszmiański, J. 126
- Otles, S. 266
- Ozadali Sari, K. 98
- Ozakar, E. 318
- Ozakca I 59
- Ozalp Y. 311
- Ozansoy, G. 195
- Ozates, NP. 109
- Ozatic O. 213
- Ozay, Y. 97
- Ozbay, E. 333
- Ozbay, N. 294, 298
- Ozbay, D. 435
- Ozbek, B. 415
- Ozbek, H. 140, 163, 181
- Ozbey, S. 355
- Ozbilgin, S. 149, 162, 178, 185
- Ozcan, S. 76, 229, 259, 265
- Ozcelikay, G. 245
- Ozcelikay, G. 51, 221, 222, 223, 224, 226
- Ozcelikay, T. 279
- Ozcelik, H. 103
- Ozcinar, O. 177
- Ozdal, ZD. 299
- Ozdemir, A. 104, 353, 364, 370, 372, 373, 387, 393
- Ozdemir, I. 401, 402
- Ozdemir, N. 41, 42, 53, 83, 88, 198, 200, 203, 209, 328
- Ozdemir, Ozge. 330
- Ozdemir, Z. 119
- Ozden Yilmaz, T. 157, 160
- Ozek, G. 150
- Ozel, A. 334
- Ozenver N. 40, 173
- Ozer, O. 46, 304
- Ozet, G. 38
- Ozgenc, E. 29, 93
- Ozgen, ZE. 199
- Ozhan, G. 70, 99, 112, 315, 340
- Ozkan Ariksoysal, D. 119
- Ozkan B. 293
- Ozkan, CK. 65, 284, 288, 332
- Ozkan, E. 88, 273
- Ozkan Hasanoglu, E. 339, 422
- Ozkan, SA. 22, 141, 231, 245, 249, 251, 252, 253, 260, 262, 269, 270, 275, 279, 288
- Ozkan, T. 418
- Ozkan, Y. 65, 122, 175, 176, 284, 280, 288, 332
- Ozkan Yilmaz, F. 343
- Ozkaya, AR. 122, 237
- Ozkay Demir, U. 198, 220
- Ozkay, Y. 259, 363, 364, 369, 374, 381, 403, 408, 410, 411
- Ozkemahli, G. 101, 416, 425
- Ozkul C. 139
- Ozler, MA. 360, 361
- Ozluer Hunt, A. 343
- Ozmen, N. 112, 289
- Ozpolat, B 7
- Ozsoy, N. 179
- Oztanir, M.N. 39
- Oztas, E. 70, 99, 112, 340
- Ozturk AA. 281, 282, 329
- Ozturk, AA. 298, 302, 315, 330
- Ozturk B. 335
- Ozturk, C. 267, 289
- Ozturk Ceylan, O. 396
- Ozturk, E. 35
- Ozturk, G. 115, 148, 160, 242, 244
- Ozturk, I. 138, 177
- Ozturk, K. 260
- Ozturk, M. 358, 360, 361
- Oztürk, N. 295
- Ozturk, O. 9
- Ozturk S. 39
- Oz, UC. 330
- Ozupek, B. 189
- Ozyazici, T. 406
- Ozyurek, B. 228, 267
- Ozyurt, VH. 266
- Palabiyik, IM 69, 79, 250
- Palaska, E. 268
- Parlar, A. 49
- Parlar, S. 100
- Parvizi Khosroshahi, S. 302
- Payze, U. 328
- Pedrero, M. 12
- Pehlic, E. 414
- Pehlivan, M. 49
- Pekacar S. 189
- Pekcan, AN. 87
- Pekel, A. 350, 351
- Pekel Bayramgil, N. 325, 326
- Peraica M. 16
- Perk, BO. 418
- Pezik, E. 295
- Pilevneli, AD. 166
- Pilipovic, S. 280
- Pilla, V. 21
- Pingarrón, J.M. 12
- Pirinci, Y. 409
- Polat, EC. 200, 424
- Polat, K. 309
- Popielarz Brzezińska M. 307
- Povedano, E. 12
- Poyraz, S. 346, 397, 398, 399
- Pratiwi, MY. 83
- Protsenko, O. 105

## Q

Qader, M. 168

## R

- Ráfols, C. 76
- Rahman, AFM. 85
- Rahou, I. 44, 258
- Ramadan, SS. 349
- Ratih, Asmari, M. 264
- Ražić, S. 23, 94
- Recber, T. 272
- Reis, R. 103
- Rencber, S. 68, 319
- Renda, G. 161, 214
- Rivas, G. 11
- Ruiz-Valdepeñas Montiel, V. 12

## P



**ISOPS-12 IS SUPPORTED BY TUBITAK**  
(The Scientific and Technological Research Council of Turkey)  
with 2223-B Program)

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Akın Elmaskaya  
**Yabancı Dil** : İngilizce  
**Doğum Yeri ve Yılı** : Sakarya 1991  
**E-Posta** : akinelmaskaya@hotmail.com

### Eğitim ve Mesleki Geçmiş

**İlköğretim** : Mümtaz Kuru İlköğretim Okulu  
**Lise** : Özel Diltaş Anadolu Lisesi  
**Lisans** : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
**Elmaskaya Eczanesi** : Serbest eczane eczacılığı

### Yayımlar

#### **Bildiriler**

- 1) **Elmaskaya A., Öztürk, A. A., Yenilmez, E.,** Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Nanoparticles Containing Ketoprofen Lysine: Preparation and Characterization, 12. International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS 12), 26.06.2018.
- 2) **Elmaskaya A., Öztürk, A. A., Yenilmez, E.,** Ketoprofen Lysine Loaded Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) Nanoparticles By Double Emulsion Solvent Evaporation Method, EUFEPS Annual Meeting 2018, 24.05.2018.

#### **Mesleki Birlik Üyelikleri**

- 1) Konya Eczacı Odası Üyeliği
- 2) Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği, 2016