

**EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK
ÜZERE YENİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
FORMÜLASYONU ÇALIŞMALARI**

Yüksek Lisans Tezi

Kadir AYKAÇ

Eskişehir 2020

**EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLERİN FORMÜLASYONU ÇALIŞMALARI**

Kadir AYKAÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ebru BAŞARAN**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ocak 2020**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kadir AYKAÇ'ın "Epilepsi Tedavisinde Kullanılmak Üzere Yeni İlaç Taşıyıcı istemlerin Formüla yonu Çalışmaları" başlıklı tezi 10./01./2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Doç. Dr. Ebru BAŞARAN

Üye : Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Umay Merve GÜVEN

Prof. Dr. Nalan GUNDOĞDU KARABURUN

Enstitü Müdürü

ÖZET

EPİLEPSİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE YENİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN FORMÜLASYONU ÇALIŞMALARI

Kadir AYKAÇ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2020

Danışman: Doç. Dr. Ebru BAŞARAN

Epilepsi, beynin çeşitli bölgelerinde sinirsel iletimin aksaklığa uğraması sonucunda meydana gelen ve hastada dalgın bakış, istemsiz mimikler, kasılmalar, anlamsız konuşmalar, tekrarlayan hareketler ve bilinç kaybı gibi belirtilerin tamamı veya birkaçının birlikte gözlenebileceği nöbetlerle ortaya çıkan bir hastalıktır. Epilepsi nöbetlerini kontrol altına almak için uygulanan ilaçların düşük biyoyararlanımı, ciddi yan etkileri ve nöbet esnasında ağız yolu ile ilaç uygulanamaması yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ve farklı uygulama yollarına olan ihtiyaçları göz önüne sermektedir. Bu tez çalışmasında, beyine geçiş oranı oldukça düşük olan ve buna bağlı olarak oral dozu yüksek olan lakozamid için kullanım dozunu düşürerek oluşan ciddi yan etkileri azaltmak ve yeni ilaç taşıyıcı sistemlere bağlı olarak biyoyararlanımını arttırmak amacı ile nazal yoldan uygulanmak üzere mikroigne ve *in situ* jelleşen ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sodyum aljinat, karboksi metil selüloz (CMC) ve Eudragit® S 100 polimerleri kullanılarak mikroigneler mikrodöküm yöntemiyle hazırlanmıştır. Ayrıca Poloxamer® 407 ile lakozamid yüklenmiş *in situ* jelleşen ilaç taşıyıcı sistemler de başarı ile hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların, *in vitro* karakteristik özellikleri detaylı olarak incelenmiş ve analiz sonuçları değerlendirildiğinde hazırlanan formülasyonların epilepsi tedavisinde kullanılabilecek umut vaat eden sistemler olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Lakozamid, Mikroigne, *In situ* jelleşen sistemler, Nazal uygulama

ABSTRACT

FORMULATION STUDIES OF NEW DRUG DELIVERY SYSTEMS FOR THE TREATMENT OF EPILEPSY

Kadir AYKAÇ

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, January 2020

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru BAŞARAN

Epilepsy is a disease that occurs as a result of disruption of neural conduction in various parts of the brain and seizures in which all or several symptoms can be observed together with pensive gaze, involuntary mimics and contractions, meaningless speeches, repetitive movements and loss of consciousness. Considering low oral bioavailability, serious side effects, low transition rate to the brain and impossibility of oral drug application during seizures resulted in urgent need for novel drug delivery systems and alternative routes of administration for enhanced treatment. Considering high applied dose of lacosamide due to the low oral bioavailability, in this study, formulation studies of microneedle and *in situ* gelling systems were performed for nasal route in order to reduce the applied dose of lacosamide for minimizing severe side effects while maintaining enhanced bioavailability. Microneedles were formulated by micro molding method using alginate sodium, carboxy methyl cellulose (CMC) and Eudragit® S 100 polymers. Lacosamide incorporated *in situ* gelling systems with Poloxamer® 407 also have been formulated successfully. *In vitro* characteristic properties of the formulations were evaluated in detail and analyses results revealed that the formulations are promising systems that can be used for the treatment of epilepsy.

Keywords: Lacosamide, Microneedles, *In situ* gelling systems, Nasal application

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, her zaman değerli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olan, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen, çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirmeleri ve bilgilendirmeleri ile çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren ve bana verdiği değerli bilgilerden meslek hayatımda da her daim faydalanacağımı düşündüğüm çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarım Prof. Dr. Yasemin YAZAN'a, Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Doktor Öğretim Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Doktor Öğretim Üyesi Behiye ŞENEL'e, Doktor Öğretim Üyesi Gülsel YURTDAS KIRIMLIOĞLU'na, Doktor Öğretim Üyesi Ahmet Alper ÖZTÜRK'e bana yüksek lisans eğitimim boyunca kazandırdıkları ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve son olarak çalışmamda desteklerini benden esirgemeyen, beni bu günlere sevgi ve saygı ile yetiştirerek getiren ve bana maddi manevi her türlü desteği sağlayan fedakar aileme sonsuz teşekkürler.

Kadir AYKAÇ

10/01/2020

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.

Kerem AYKAC

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
GÖRSELLER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Epilepsi	2
2.2. Lakozamid	5
2.2.1. Lakozamidin farmakokinetik özellikleri	6
2.2.2. Lakozamid ile yapılan çalışmalar	7
2.3. Nazal İlaç Uygulama	8
2.3.1. Burundan ilaç geçişi	9
2.3.1.1. Etkin madde ve formülasyon ile ilgili parametreler	9
2.3.1.2. Anatomik ve fiyolojik parametreler	10
2.3.2. Burun anatomisi	10
2.3.3. Burun fizyolojisi	11

	<u>Sayfa</u>
2.3.3.1. <i>Burun hücreleri</i>	11
2.3.3.2. <i>Nazal mukoza</i>	12
2.3.4. <i>Nazal uygulamanın üstünlükleri ve sakıncaları</i>	13
2.3.4.1. <i>Burundan beyine ilaç geçişi</i>	13
2.4. Mikroiğneler	15
2.4.1. Mikroiğnelerin üretim yöntemleri	17
2.4.1.1. <i>Litografi</i>	18
2.4.1.1.1. <i>Fotolitografi</i>	18
2.4.1.1.2. <i>Yumuşak litografi</i>	20
2.4.1.1.3. <i>Çekme (drawing) litografi</i>	21
2.4.1.2. <i>Damlatma-kurutma yöntemi</i>	22
2.4.1.3. <i>Mikrodöküm</i>	23
2.4.1.4. <i>Diğer yöntemler</i>	24
2.4.1.4.1. <i>Mikro-oyma</i>	24
2.4.1.4.2. <i>Lazer-oyma</i>	25
2.4.1.4.3. <i>Sıcak kabartma</i>	25
2.4.1.4.4. <i>3D Yazma</i>	25
2.4.2. Mikroiğneler ile yapılan çalışmalar	25
2.5. <i>İn Situ</i> Jelleşen Sistemler	26
3. GEREÇLER	34
3.1. Kullanılan Maddeler	34
3.2. Kullanılan Cihazlar	35
4. YÖNTEMLER	36
4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları	36

	<u>Sayfa</u>
4.1.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması	36
4.1.1.1. Doğrusallık	36
4.1.1.2. Kesinlik	37
4.1.1.3. Doğruluk	37
4.1.1.4. Duyarlılık	37
4.1.1.5. Seçicilik	38
4.2. Ön Formülasyon Çalışmaları	39
4.2.1. Lakozamid ile yapılan analizler	39
4.2.1.1. Termal analiz	39
4.2.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi	39
4.2.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi	39
4.2.2. Polimerlerle yapılan çalışmalar	39
4.2.2.1. Eudragit® S 100'e ait analizler	39
4.2.2.1.1. Termal analiz	39
4.2.2.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi	40
4.2.2.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi	40
4.2.2.2. Karboksi metil selüloza ait analizler	40
4.2.2.2.1. Termal analiz	40
4.2.2.2.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi	40
4.2.2.2.3. Nükleer manyetik rezonans analizi	40
4.2.2.3. Sodyum aljinata ait analizler	40
4.2.2.3.1. Termal analiz	40
4.2.2.3.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi	41
4.2.2.3.3. Nükleer manyetik rezonans analizi	41

	<u>Sayfa</u>
4.2.2.4. <i>Poloksamer® 407'ye ait analizler</i>	41
4.2.2.4.1. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	41
4.2.2.4.2. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	41
4.3. Mikroïğne formülasyonları ile ilgili çalışmalar	41
4.3.1. Mikrodöküm yöntemi ve kalıpların hazırlanışı	41
4.3.2. Formülasyon geliştirme çalışmaları	43
4.3.2.1. <i>Eudragit® S 100 ile mikroïğne formülasyon çalışmaları</i>	43
4.3.2.2. <i>Karboksi metil selüloz ile mikroïğne formülasyon</i> <i>çalışmaları</i>	44
4.3.2.3. <i>Sodyum aljinat ile mikroïğne formülasyon çalışmaları</i>	44
4.3.3. Uygun formülasyonların seçimi ve etkin madde içeren formülasyonların hazırlanması	44
4.3.4. Mikroïğnelerin karakterizasyon çalışmaları.....	45
4.3.4.1. <i>Morfolojik inceleme</i>	45
4.3.4.2. <i>Termal analiz</i>	45
4.3.4.3. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	45
4.3.4.4. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	45
4.3.4.5. <i>Miktar tayini</i>	45
4.3.4.6. <i>İn vitro salım çalışması</i>	45
4.4. <i>İn Situ</i> Jel Formülasyon Çalışmaları	46
4.4.1. Ön formülasyon çalışmaları	46
4.4.2. <i>İn situ</i> jel formülasyonlarının hazırlanışı	46
4.4.3. <i>İn situ</i> jel formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları	47
4.4.3.1. <i>Fiziksel görünüş ve saydamlık</i>	47

	<u>Sayfa</u>
4.4.3.2. <i>Jelleşme kapasitesinin belirlenmesi</i>	47
4.4.3.3. <i>Şişme kapasitesinin belirlenmesi</i>	47
4.4.3.4. <i>pH analizleri</i>	48
4.4.3.5. <i>Reolojik analizler</i>	48
4.4.3.6. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri</i>	48
4.4.3.7. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	48
4.4.3.8. <i>Miktar tayini</i>	48
4.4.3.9. <i>İn vitro salım çalışması</i>	48
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	50
5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları	50
5.1.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması	50
5.1.1.1. <i>Doğrusallık</i>	50
5.1.1.2. <i>Kesinlik</i>	51
5.1.1.3. <i>Doğruluk</i>	52
5.1.1.4. <i>Duyarlılık</i>	53
5.1.1.5. <i>Seçicilik</i>	53
5.2. Ön Formülasyon Çalışmaları	57
5.2.1. Lakoamid ile yapılan çalışmalar	57
5.2.1.1. <i>Termal analiz</i>	57
5.2.1.2. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	57
5.2.1.3. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	58
5.2.2. Polimerlerle yapılan çalışmalar	59
5.2.2.1. <i>Eudragit® S 100'e ait analizler</i>	59
5.2.2.1.1. <i>Termal analiz</i>	59

	<u>Sayfa</u>
5.2.2.1.2. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	60
5.2.2.1.3. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	60
5.2.2.2. <i>Karboksi metil selüloza ait analizler</i>	61
5.2.2.2.1. <i>Termal analiz</i>	61
5.2.2.2.2. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	62
5.2.2.2.3. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	63
5.2.2.3. <i>Sodyum aljinata ait analizler</i>	63
5.2.2.3.1. <i>Termal analiz</i>	63
5.2.2.3.2. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	64
5.2.2.3.3. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	65
5.2.2.4. <i>Poloxamer® 407'ye ait analizler</i>	65
5.2.2.4.1. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi</i>	66
5.2.2.4.2. <i>Nükleer manyetik rezonans analizi</i>	66
5.3. Mikroiğne formülasyonları ile ilgili çalışmalar	67
5.3.1. Mikrodöküm yöntemi ve kalıpların hazırlanışı	67
5.3.2. Formülasyon geliştirme çalışmaları	68
5.3.3. Uygun formülasyonların seçimi ve etkin madde içeren formülasyonların hazırlanması	72
5.3.4. Mikroiğnelerin karakterizasyon çalışmaları	72
5.3.4.1. <i>Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroiğnelerin karakterizasyon çalışmaları</i>	72
5.3.4.1.1. <i>Morfolojik inceleme</i>	72
5.3.4.1.2. <i>Termal analiz</i>	81
5.3.4.1.3. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri</i>	82
5.3.4.1.4. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	87

	<u>Sayfa</u>
5.3.4.1.5. <i>Miktar tayini</i>	91
5.3.4.1.6. <i>İn vitro salım çalışması</i>	91
5.3.4.2. <i>Karboksi metil selüloz ile hazırlanan mikroğnelerin karakterizasyon çalışmaları</i>	92
5.3.4.2.1. <i>Morfolojik inceleme</i>	92
5.3.4.2.2. <i>Termal analiz</i>	102
5.3.4.2.3. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri</i>	103
5.3.4.2.4. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	108
5.3.4.2.5. <i>Miktar tayini</i>	112
5.3.4.2.6. <i>İn vitro salım çalışması</i>	112
5.3.4.3. <i>Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroğnelerin karakterizasyon çalışmaları</i>	114
5.3.4.3.1. <i>Morfolojik inceleme</i>	114
5.3.4.3.2. <i>Termal analiz</i>	119
5.3.4.3.3. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri</i>	121
5.3.4.3.4. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	125
5.3.4.3.5. <i>Miktar tayini</i>	130
5.3.4.3.6. <i>İn vitro salım çalışması</i>	130
5.4. <i>İn Situ Jel Formülasyon Çalışmaları</i>	130
5.4.1. <i>Ön formülasyon çalışmaları</i>	130
5.4.2. <i>İn situ jel formülasyonlarının hazırlanışı</i>	131
5.4.3. <i>İn situ jel formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları</i>	131
5.4.3.1. <i>Fiziksel görünüş ve saydıamlık</i>	131
5.4.3.2. <i>Jelleşme kapasitesinin belirlenmesi</i>	131
5.4.3.3. <i>Şişme kapasitesinin belirlenmesi</i>	132

	<u>Sayfa</u>
5.4.3.4. <i>pH analizleri</i>	133
5.4.3.5. <i>Reolojik özellikler</i>	134
5.4.3.6. <i>Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri</i>	136
5.4.3.7. <i>Nükleer manyetik rezonans analizleri</i>	140
5.4.3.8. <i>Miktar tayini</i>	144
5.4.3.9. <i>İn vitro salım çalışması</i>	145
SONUÇ	147
KAYNAKÇA	148
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. <i>In situ</i> jeller ile yapılan çalışmalar	31
Çizelge 4.1. YBSK çalışma koşulları	36
Çizelge 4.2. Jelleşme kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılan parametreler	47
Çizelge 5.1. Kesinlik çalışması ve bulguları	51
Çizelge 5.2. Doğruluk çalışması için hazırlanan seriler ve % geri kazanım bulguları	52
Çizelge 5.3. Duyarlılık çalışması bulguları	53
Çizelge 5.4. Hazırlanan mikroğnelerin sertlik derecelerinin belirlenmesinde kullanılan parametreler	68
Çizelge 5.5. Eudragit® S 100 ile hazırlanan formülasyonlar	69
Çizelge 5.6. Karboksi metil selüloz ile hazırlanan formülasyonlar	69
Çizelge 5.7. Sodyum aljinat ile hazırlanan formülasyonlar	70
Çizelge 5.8. Eudragit® sınıfına ait farklı polimerler ile hazırlanan mikroğne formülasyonları	70
Çizelge 5.9. PVP ile hazırlanan mikroğne formülasyonları	71
Çizelge 5.10. Hazırlanan mikroğne formülasyonlarının içerikleri	72
Çizelge 5.11. ES-FX kodlu formülasyonların miktar tayini sonuçları	91
Çizelge 5.12. ES-FX kodlu formülasyonların benzerlik ve fark faktörleri.....	93
Çizelge 5.13. ES-FX kodlu formülasyonların etkin madde salım modelleri	93
Çizelge 5.14. CMC-FX kodlu formülasyonların miktar tayini sonuçları	112
Çizelge 5.15. CMC-FX kodlu formülasyonların etkin madde salım modelleri	113
Çizelge 5.16. CMC-FX kodlu formülasyonların benzerlik ve fark faktörleri	114

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 5.17. AL-FX kodlu formülasyonların miktar tayini sonuçları	130
Çizelge 5.18. Farklı Poloxamer® 407 derişimlerine ait jel sıcaklıkları ve jelleşme kapasiteleri	130
Çizelge 5.19. <i>İn situ</i> jel formülasyonları	131
Çizelge 5.20. <i>İn situ</i> jel formülasyonların jelleşme kapasiteleri	132
Çizelge 5.21. Şişme kapasitesi çalışma sonuçları	133
Çizelge 5.22. <i>İn situ</i> jel formülasyonlara ait pH sonuçları	133
Çizelge 5.23. <i>İn situ</i> jel formülasyonların miktar tayini sonuçları	144
Çizelge 5.24. <i>İn situ</i> jel formülasyonların salım modelleri	146
Çizelge 5.25. <i>İn situ</i> jel formülasyonların lakozamide göre benzerlik ve fark faktörleri	146

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Burun anatomisi	11
Şekil 2.2. Burundan beyine geçiş yolları	14
Şekil 2.3. Mikroigne türleri	16
Şekil 2.4. Fotolitografi yöntemiyle mikroigne hazırlanması	19
Şekil 2.5. Çekme litografi yöntemi ile mikroignelerin hazırlanması	22
Şekil 2.6. Damlatma kurutma yöntemi ile mikroignelerin hazırlanması	23
Şekil 2.7. Mikrodöküm yöntemi ile mikroignelerin hazırlanması	24
Şekil 2.8. Sıvı, kübik ve heksagonal yapı	29
Şekil 5.1. Lakozamide ait doğrusallık grafiği	50
Şekil 5.2. Lakozamid, Mobil faz, Fosfat tampon (pH:6,4) ve metanole ait referans kromatogramlar	54
Şekil 5.3. Eudragit® S 100 ile hazırlanan formülasyonlara ait seçicilik kromatogramları	55
Şekil 5.4. CMC ile hazırlanan formülasyonlara ait seçicilik kromatogramları	55
Şekil 5.5. Sodyum aljinat ile hazırlanan formülasyonların seçicilik kromatogramları	56
Şekil 5.6. Poloxamer® 407 ile hazırlanan formülasyonlara ait seçicilik kromatogramları	56
Şekil 5.7. Lakozamide ait DSC termogramı	57
Şekil 5.8. Lakozamide ait FT-IR spektrumu	58
Şekil 5.9. Lakozamide ait ¹ H-NMR spektrumu	59
Şekil 5.10. Eudragit® S 100'e ait DSC termogramı	59
Şekil 5.11. Eudragit® S 100'e ait FT-IR spektrumu	60

	<u>Sayfa</u>
Şekil 5.12. Eudragit® S 100'e ait ¹ H-NMR spektrumu	61
Şekil 5.13. CMC'ye ait DSC termogramı	61
Şekil 5.14. CMC'ye ait FT-IR spektrumu	62
Şekil 5.15. CMC'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	63
Şekil 5.16. Sodyum aljinata ait DSC termogramı	64
Şekil 5.17. Sodyum aljinata ait FT-IR spektrumu	64
Şekil 5.18. Sodyum aljinata ait ¹ H-NMR spektrumu	65
Şekil 5.19. Poloxamer® 407'ye ait FT-IR spektrumu	66
Şekil 5.20. Poloxamer® 407'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	67
Şekil 5.21. ES-F0 mikroïğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	73
Şekil 5.22. ES-F1 mikroïğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	75
Şekil 5.23. ES-F2 mikroïğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	77
Şekil 5.24. ES-F3 mikroïğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	79
Şekil 5.25. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait DSC termogramları	82
Şekil 5.26. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR spektrumları	83
Şekil 5.27. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait ¹ H-NMR spektrumları	87
Şekil 5.28. Fosfat tamponunda (pH:6,4) Eudragit® S 100 mikroïğnelерinden lakozamid ve saf lakozamid salım grafiği	92
Şekil 5.29. CMC-F0 mikroïğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	94
Şekil 5.30. CMC-F1 mikroïğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	96
Şekil 5.31. CMC-F2 mikroïğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	98

	<u>Sayfa</u>
Şekil 5.32. CMC-F3 mikroïgne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	100
Şekil 5.33. CMC ile hazırlanan mikroïgnelere ve bileşenlere ait DSC termogramları	103
Şekil 5.34. CMC ile hazırlanan mikroïgnelere ve bileşenlere ait FT-IR spektrumları	104
Şekil 5.35. CMC ile hazırlanan mikroïgnelere ve bileşenlere ait ¹ H-NMR spektrumları	108
Şekil 5.36. Fosfat tamponunda (pH:6,4) CMC mikroïgnelerinden lakozamid ve saf lakozamid salım grafiği	112
Şekil 5.37. AL-F0 mikroïgne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	114
Şekil 5.38. AL-F1 mikroïgne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	117
Şekil 5.39. AL-F2 mikroïgne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	118
Şekil 5.40. AL-F3 mikroïgne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri	119
Şekil 5.41. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïgnelere ve bileşenlere ait DSC termogramları	121
Şekil 5.42. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïgnelere ve bileşenlere ait FT-IR spektrumları	122
Şekil 5.43. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïgnelere ve bileşenlere ait ¹ H-NMR spektrumları	127
Şekil. 5.44. Şişme kapasitesi çalışma bulguları	134
Şekil. 5.45. PL0 <i>in situ</i> jel formülasyonlara ait reogramlar	135
Şekil. 5.46. PL1 <i>in situ</i> jel formülasyonlara ait reogramlar	136
Şekil. 5.47. PL2 <i>in situ</i> jel formülasyonlara ait reogramlar	136
Şekil. 5.48. PL3 <i>in situ</i> jel formülasyonlara ait reogramlar	137

	<u>Sayfa</u>
Şekil 5.49. Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumu	138
Şekil 5.50. Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait ¹ H-NMR spektrumu	142
Şekil 5.51. <i>İn situ</i> jel formülasyonlardan salım grafiği	146

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 4.1. Pozitif kalıp olarak kullanılan Dermapen iğneleri	42
Görsel 5.1. Pozitif (sol) ve negatif (sağ) mikro iğne kalıpları	68
Görsel 5.2. Sıcaklığa bağlı faz değişimi	133

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a	: ağırlık (gram)
AIC	: Akaike bilgi kriteri
CMC	: Karboksi metil selüloz
dk	: dakika
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
D-DMSO	: Dötoro-Dimetil sülfoksit
COC	: Siklik-Olefin Kopolimer
EEG	: Elektro Ensefalogram
EO	: Etilen Oksit
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Analizi
GABA	: Gama Amino Bütirik Asit
h	: hacim (mL)
HLB	: Hidrofil-Lipofil Denge
¹ H-NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Analizleri
HPMC	: Hidroksi Propil Metil Selüloz
IPM	: İzopropil miristat
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
MSC	: Model seçim kriteri
MWCO	: Molecular weight cut off
NIR	: Yakın Kızılötesi
PDMS	: Poli Dimetil Siloksan
PEGDA	: Poli Etilen Glikol Diakrilat
PFPE	: Perfloro Polieter
PGA	: Poli-Glikolik Asit
PLA	: Poli-L-Laktik Asit
PLGA	: Poli Laktik-Glikolik Asit
PVA	: Polivinil alkol

PEG	: Polietilen glikol
PVP	: Polivinil Prolidon
PO	: Propilen Oksit
sa	: saat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	: Standart Hata
UV	: Ultra viyole (mor ötesi)
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Epilepsi, beynin çeşitli bölgelerinde sinirsel iletimin aksaklığa uğraması sonucunda meydana gelen ve hastada dalgın bakış, istemsiz mimikler ve kasılmalar, anlamsız konuşmalar, tekrarlayan hareketler ve bilinç kaybı gibi belirtilerin tamamı veya birkaçının birlikte gözlenebileceği nöbetlerle ortaya çıkan bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Günümüze kadar birçok epilepsi türü tanımlanmıştır ancak sınıflandırma konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Günümüzde dünya çapında 65 milyondan fazla epilepsi hastası olduğu bilinmektedir.

Epilepsi nöbetlerini kontrol altına almak için ilaç tedavisi uygulanmakta ancak etkin maddelerin düşük biyoyararlanımı, ciddi yan etkileri, düşük oranda beyine geçiş ve nöbet esnasında ağız yolu ile ilaç uygulanamaması gibi nedenler ile yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ve alternatif uygulama yollarına olan ihtiyaçları göz önüne sermiştir.

Epilepsi tedavisi için yeni ilaç taşıyıcı sistem geliştirme çalışmaları pek çok araştırmacı tarafından yapılmaktadır. Bu tez çalışmasında da düşük oranda beyine geçen ve buna bağlı olarak yüksek oral doza sahip olan lakozamid için kullanım dozunu düşürmek ve kan beyin bariyerini aşarak doğrudan beyine ulaşmasını sağlamak amacıyla, nazal uygulanmak üzere, mikroiğne ve *in situ* jel formülasyonları geliştirilmiş ve *in vitro* karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları ile formülasyonların karakteristik özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Elde edilen analiz sonuçları değerlendirildiğinde nazal yoldan uygulanabilecek etkin ve güvenilir formülasyonlar başarı ile oluşturulmuştur.

Sonuç olarak çalışmamız kapsamında hazırlanan lakozamid içeren mikroiğne ve *in situ* jel formülasyonlarının epilepsi tedavisinde başarıyla kullanılacak umut vaat eden sistemler olduğu sonucuna varılmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Epilepsi

Beyin, birçok hücrenin bağlantı içinde olduğu bir yapıya sahiptir. Bu bağlantılar sayesinde beyinde sinirsel iletim gerçekleşmektedir. Epilepsi hücre düzeyinde ele alındığında, bir hücreye gelen uyarıcı ve durdurucu sinyallerin üretimindeki dengesizlik sonucunda oluşmaktadır. Epilepsili hastalarda bu denge, uyarıcı sinyallere doğru bozulmuştur. Yani uyaran sinyaller durduran sinyallerden daha fazla gönderilmektedir. Bu durum sonucunda hücreler olması gerekenden fazla uyarılmakta ve sonuç olarak nöbetler oluşmaktadır (Schwartzkroin, 2012).

Sinir hücreleri arasındaki bağlantılarda gerçekleşen anormal dalgalanmalar sonucunda beyin çalışması aksamakta ve sinirsel iletim düzgün bir şekilde gerçekleşmemektedir. Bu durum, elektroensefalogramda (EEG) gözlenebilir ve “epilepsi biçimi paroksizmal veya iktal aktivite” olarak adlandırılmaktadır. Epilepsi hastaları çoğunlukla normal bir EEG’ye sahiptir ve bu durum bazen davranışlara yansımaya fakat EEG’de gözlenen aksaklıklarla ortaya çıkan hafif nöbetlerle ve anormal davranışların sergilendiği şiddetli nöbetlerle bölünmektedir (Da Silva vd., 2012). Epilepsinin oluşmasından sorumlu mekanizmaları kesin olarak belirlemek deneylerle mümkün olsa bile, üstü kapalı belirtileri ve diğer nörolojik hastalıkların belirtileri ile karışabileceği için, epilepsi teşhisi koymak hiç de kolay değildir. EEG, beyin korteksindeki etkinliğin her milisaniyede değişen değerinin doğrudan ölçülmesiyle nörolojik hastalıkların belirlenmesinde kullanılan, en bilindik yöntemdir. Elde edilen EEG değerleri nöbet esnasındaki beyin etkinliğini elektriksel olarak ölçerek epilepsinin altında yatan mekanizmanın anlaşılmasına aracı olmaktadır. İnsan beyni milyonlarca nörondan oluşmaktadır ve çok fazla sinirsel bağlantısı vardır. Haliyle birçok noktada elektrik üretimi olmakta ve bu durum EEG sonuçlarının orantısız, karmaşık ve değişken olmasına sebep olmaktadır. EEG verilerinin çıplak gözle incelenmesi pek mümkün değildir ve uzun süren çalışmaların sonucunda uzmanlaşan kişilerin şahsi yorumları gereklidir ancak, uzmanlarca yapılan değerlendirmeden sonra bile EEG verisindeki hataları en aza indirmek oldukça zordur. Bu yüzden değerlendirme yapmak için bilgisayar desteğine ihtiyaç duyulmaktadır (Saini ve Dutta, 2018).

Beynin yapısı, genetik durum, enfeksiyonlar, metabolizma, bağışıklık sistemi, kaza sonucu ve bilinmeyen sebepler epilepsiye neden olabilmektedir (Berg vd., 2010; Karasin ve Karasin, 2017). Nöronlar arasında gerçekleşen iletişimin durdurucu/uyarıcı dengesi bozulduğunda nöbetler oluşmaktadır. Bu dengesizlik, genlerden hücre altı kaskat sinyallerine kadar geniş çaplı bir nöronal dolaşımın herhangi bir noktasında oluşan aksaklık sonucu olabilir. Epilepsiye yol açan genetik patolojiler, anormal sinaps bağlantısı gibi sinirsel iletim düzeyinden, anormal γ -amino bütirik asit (GABA) reseptör alt ünitesi (Angelman sendromu) gibi reseptör düzeyinde ve yenidoğan epilepsisinde gözlenen potasyum kanal mutasyonu gibi anormal iyonik kanal fonksiyonu düzeyine kadar herhangi bir şekilde oluşabilmektedir. Aynı şekilde serebral hasar da sinirsel iletimin aksamasına yol açabilir. Özellikle gelişmekte olan bir beyin çeşitli fizyolojik sebeplerden dolayı nöbetlere meyillidir. Sağlıklı bir beyinde önce uyarıcı sinyaller gelişmekte ardından durdurucu sinyaller oluşmaktadır. Ayrıca bebeklik döneminde GABA, durdurucu sinyallerden ziyade uyarıcı sinyaller oluşturmaktadır (Stafstrom ve Carmant, 2015).

Nöbetlerin ve epilepsinin sınıflandırılması 1969 yılına dayanır. Daha sonra yapılan sınıflandırmalar kademeli olarak geliştirilmiştir (Berg ve Cross, 2012). Ancak nöbetlerin bu kadar çok çeşitli olması sınıflandırmayı güçleştirmekte ve çeşitli anlaşmazlıklar meydana getirmektedir. Sınıflandırmaya dair son güncelleme 2010 yılında yapılmıştır ancak hala eksiklikler mevcuttur (Hussein vd., 2018). Genel olarak iki ana başlık altında toplanan nöbetler beyin tamamında gerçekleşen (jeneralize) ve beyin belirli bir bölgesinde gerçekleşen (parsiyel veya fokal) olmak üzere ayrılmıştır. Jeneralize epilepsi nöbetler, sinir hücrelerinden birinde belirli bir noktadan başlayıp hızlıca beyne yayılmasıyla bilinmektedir. Parsiyel nöbetler ise bütün kortekse yayılmaz fakat kortekste ve subkortekste gözlenebilmektedir. Her ne kadar nöbetler bölgesel görünse de nöbetler arası tutarlılık yoktur. Nöbetin meydana geldiği beyin bölgesi değişkenlik göstermektedir (Berg vd., 2010). Ayrıca nöbetlerin birçoğu kısa sürelidir ve bazen fark edilememektedir. Hastalar akli karışmış gibi gözükür ve nöbet geçirdikten sonra olup biteni hatırlamayabilmektedir (Qazi vd., 2016).

Jeneralize nöbetler beyin her iki lobunu etkilemektedir. Nöbet esnasında uzun süreli veya geçici bilinç kaybı oluşmaktadır. Jeneralize nöbetler tonik-klonik, miyoklonik, absans ve atonik adlı dört alt gruba ayrılmaktadır (Berg vd., 2010). Absans

nöbetler (eski adıyla petit mal) dış uyaranlara tepki vermemekle başlamakta ve sürekli göz kırpmaya ve baş sallama ile devam etmektedir. Tonik-klonik nöbetlerde (eski adıyla grand mal) bütün uzuvların iki taraflı kasılmasıyla birlikte bilinç kaybı da gözlenmektedir. Nöbet esnasında güçlü kasılmaları takip eden titreme-sarsılma durumu oluşmaktadır. Miyoklonik nöbetler aniden gelişen, bilinç kaybının açıkça gözlenmediği kısa süreli nöbetlerdir ancak genellikle diğer nöbet tipleri ile bir arada gözlenmekte ve bu durumda bilinç kaybı da ortaya çıkmaktadır. Kısa süreli istemsiz kasılmalar birkaç kasta gözlenir bu yüzden myoklonik nöbetler jeneralize veya fokal her iki şekilde de adlandırılabilir. Atonik nöbetlerde vücut kasları gevşemekte ve sonuç olarak düşme veya baş düşmesi gözlenmektedir. Kas tonusunun azalması vücudun belirli kısımlarında gözlenmektedir (Magazi vd., 2018; Stafstrom ve Carmant, 2015).

Fokal veya parsiyel nöbetler ise bir bölgeyle sınırlıdır. Belirli bir bölgedeki nöronlarda gerçekleşmektedir. Tutulumlar alt kortekste (subkortekste) gözlenebilmektedir. Her nöbetin başlangıç noktası sabittir ve beynin zıt lobuna yayılabilmektedir. Parsiyel nöbetler bilindik bir mekanizmaya göre belirlenen herhangi bir sınıfa girmemektedir (Berg ve Cross, 2012). Parsiyel nöbetlerde başlangıç noktasına göre belirtiler değişebilmektedir. Oksipital lobdan başlayan bir nöbette görme kaybı oluşabilirken, precentral girustan başlayan bir nöbette ritmik tonik-klonik motor aktivite şeklinde ve postcentral girustan başlayan nöbetlerde parestezi gibi duyuşal semptomlar şeklinde oluşabilmektedir. Parsiyel nöbet sırasında bilinç kaybı varsa yani sözlü ve fiziksel uyarılara cevap vermiyorsa bu durum kompleks parsiyel nöbet olarak sınıflandırılır ve genellikle temporal lobdan başlayan nöbetler kompleks parsiyeldir. Bazı nöbetler ön-belirtilerle gelişimini bildirmektedir. Hasta bilinci yerinde olup; motor, duyuşal, otonom veya psikişik belirtilerin farkında olmakta ve en çok temporal lob epilepsili hastalarda gözlenmektedir (Stafstrom ve Carmant, 2015) yani kompleks parsiyel nöbetlerin kaynağı çoğunlukla temporal lobdur (Melekoğlu, 2012).

Parsiyel nöbetler basit, karmaşık (kompleks) ve ikincil jeneralize olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Basit parsiyel nöbetlerde bilinç yerindedir. Bu tip nöbetler motor, otonom, psikişik ve somatik belirtilerle görülebilmektedir. Kaslarda seğirme, anormal duyuşlar, anormal görüntüler, sesler veya kokular ve algıda bozulma ile kendini göstermektedir. Nöbetler otonom sinir sistemine de sıçrayabilmekte ve sonuç olarak karıncalanma ve bulantı gibi hisler oluşturabilmektedir. Basit parsiyel nöbetlerde bilinç açıktır ya da hasta

bulanık durumdan mutlaka kendine gelmektedir. Bilinç kaybı gözleniyorsa eğer karmaşık parsiyel nöbet olarak adlandırılmaktadır. Eskiden “psikomotor nöbetler”, “temporal lob nöbetleri” veya “limbik nöbetler” olarak adlandırılan karmaşık parsiyel nöbetler ise deja vu, bulantı, ateş veya seğirme ya da duyu bozuklukları gibi aura denilen nöbet öncesi bir uyarı ile gelebilmektedir. Karmaşık parsiyel nöbetli hastaların yarısında aura görülmemektedir. Karmaşık parsiyel nöbetler esnasında hastalar dudak şapırdatmak, kıyafet seçmek, amaçsızca dolaşmak, saçma sapan söylemlerde bulunmak gibi tekrarlı eylemler gerçekleştirebilmektedir. Bu amaçsız ve tekrarlı eylemler otomatizm olarak adlandırılmaktadır. Karmaşık parsiyel epilepsili hastaların %75’inde otomatizm vardır (Suruchi Sharma ve Dixit, 2013).

Parsiyel epilepsi nöbetlerinin tedavisinde karbamazepin, fenobarbital, fenitoin, valproik asit, felbamat, gabapentin, lamotrijin, levetirasetam, okskarbazepin, tiagabin, topiramet, zonisamit, eslikarbazepin, lakozamid, perampanel ve pregabalin kullanılmaktadır (Krasowski ve Mcmillin, 2014). Bu ilaçlar, epilepsi tedavisinde tek başına veya birkaç ilaçtan oluşan kombinasyonlar şeklinde kullanılabilir. Uzmanların önerilerine göre, ilk olarak tek bir ilaçla nöbetler kontrol altına alınmalıdır. Eğer kontrol sağlanmazsa ilaç değiştirilir ve yine kontrolün sağlanamadığı durumlarda nöbetler kontrol altına alınana dek, üç ilaca kadar, kombinasyonlar denenmelidir (Shih vd., 2017).

2.2. Lakozamid

Fonksiyonel grup eklenmiş bir amino asit olan lakozamid (diğer adıyla harkoserid), 2-asetamido-N-benzil-3-metoksipropiyonamid’in R enantiyomeri olan, antiepileptik ve antinosiseptik (ağrı iletimini engelleyen) özelliklere sahiptir (Halford ve Lapointe, 2009). Lakozamid, parenteral formülasyon geliştirmeye imkan tanıyacak kadar hidrofil ve kan beyin bariyerini geçecek kadar lipofil olmasını sağlayan amfifilik yapıya sahip D-serin amino asidine fonksiyonel grupların eklenmesiyle sentezlenmiştir (Cawello vd., 2014). Lakozamidin ikinci karbonu kiral merkezidir ve moleküler yapıda izomere sebep olmaktadır. S izomeri ise inaktiftir (Rogawski vd., 2015).

Lakozamid, 200-600 mg dozları arasında parsiyel epilepsili hastalarda nöbet sıklığını azaltmıştır. Tedaviye günde iki defa 50 mg dozlarında başlanır ve hastanın gösterdiği toleransa ve nöbet sıklığına göre maksimum doza çıkana kadar alınabilir

(Cawello vd., 2014). Avrupa'da kullanım dozu, tek başına kullanıldığında günlük maksimum 600 mg, diğer antiepileptiklere ek olarak uygulandığında ise 400 mg olarak, parsiyel (fokal) nöbetler için kabul edilmiştir (Sanmartí-Vilaplana ve Díaz-Gómez, 2018). 4 yaş üstü çocuklarda, ergenlerde ve yetişkinlerde kullanılabilir (Hoy, 2018). Ayrıca nöropatik ağrı üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur ve olumlu sonuçlar alınmaktadır (Geis vd., 2011).

Yetişkinlerde ve ergenlerde (+16 yaş) diğer antiepileptiklere ek olarak ağızdan lakozamid uygulanması, kısa süreli tedavide (18 haftaya kadar) nöbet sıklığını azaltma açısından genellikle etkili olmuştur ve 8 yıllık tedaviye kadar yeterli etki gözlenmiştir. Nöbet sıklığını düşürme açısından karbamazepinden geri kalmadığı da gösterilmiştir (Hoy, 2018).

Lakozamid hayvanlarda (epilepsi modellerinde) etkisini, fenitoin ve karbamazepin gibi antiepileptik ilaçların etki mekanizmasına benzer şekilde sodyum kanallarını kapatarak göstermektedir ancak bu ilaçlar gibi milisaniyeler içinde devamlı tekrar eden bir ateşleme ya da voltaj kapılı sodyum kanallarının hızlı inaktivasyonu şeklinde değildir. Lakozamid, inaktivasyon eğrisini daha polarize potansiyellere kaydırır ve inaktif durumda olan kanalların sayısını arttırarak etki eder ve bu etki yavaş inaktivasyon olarak adlandırılmaktadır (Beyreuther vd., 2007; Cawello vd., 2014; Rogawski vd., 2015).

2.2.1. Lakozamidin farmakokinetik özellikleri

Lakozamidin oral biyoyararlanımı yüksektir, doğrusal (lineer) farmakokinetik özellik göstermektedir ve kullanım dozu bireyler arasında çok çeşitlilik göstermemektedir. Lakozamid gastrointestinal sistemden tamamen ve hızlıca emilir ve plazma doruk derişimi 0,5-4 saat arasında gözlenmektedir. Beslenme ile gastrointestinal sistemden emilimi değişmemektedir. Plazma proteinlerine ise düşük oranda (%15) bağlanmaktadır. Lakozamid tablet ya da diğer oral dozaj şekilleri fark etmeksizin, vücutta sabit dağılım göstermiştir (Cawello vd., 2014; de Biase vd., 2017). Oral biyoyararlanımı yüksek olmasına rağmen lakozamidin, düşük oranda beyine geçtiği yapılan çalışmalarca tespit edilmiştir (Gáll ve Vancea, 2018; Koo vd., 2011).

Lakozamidin metabolizması ise demetilasyon ile olmaktadır. O-desmetil lakozamid en çok oluşan metabolittir ve farmakolojik olarak inaktiftir. Oral ve i.v. uygulamada herhangi bir metabolik fark ve ilk geçiş etkisi yoktur. Elde edilen verilere göre CYP2C19

lakoamidin demetilasyonundan sorumludur. CYP3A4 ve CYP2C9 de O-desmetil lakoamid oluşumunu kataliz etmektedir. Ayrıca yapılan araştırmalar sonucunda herhangi bir CYP enziminin etkinliğiyle de etkileşimi olmadığı tespit edilmiştir (Cawello vd., 2014; de Biase vd., 2017).

Lakoamidin itrahi, büyük oranda idrarla gerçekleşmektedir (%99+). Sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalara göre verilen dozun %82'si 48 saat içinde atılmış, 168 saat sonunda ise bu oran %95'e yükselmiştir. Doku veya kanda herhangi bir birikim göstermemiştir. İdrarla atılan kısmın %30'u desmetil lakoamiddir, yaklaşık %40'ı değişmeden idrara geçmiştir ve %20'si henüz tanımlanmamıştır. Diğer metabolitler ise %3 gibi küçük miktarlarda tespit edilmiştir (Cawello vd., 2014; de Biase vd., 2017). Ayrıca yaş ve cinsiyet gibi kişisel unsurların lakoamidin metabolizmasını etkilemediği gösterilmiştir (Schaefer vd., 2015)

Parsiyel epilepsili yetişkin bireylerde yapılan iki farklı çalışmada ağızdan uygulama yönteminin i.v. olarak değiştirilmesinin etkisi gözlenmiş, iki uygulama arasında plazma derişimi-zaman grafiğinde bir fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak uygulama yolunu değiştirmek için doz titrasyonu yapma gereği yoktur (Cawello vd., 2014; de Biase vd., 2017).

2.2.2. Lakoamid ile yapılan çalışmalar

Lakoamid etkin maddesini içeren yeni geliştirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler ile ilgili pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Ticari olarak geleneksel dozaj şekillerinden tablet, şurup ve enjeksiyonluk çözelti olarak bulunmaktadır. Yeni nesil dozaj şekli olarak herhangi bir preparatı bulunmamakla birlikte yapılan birkaç çalışma mevcuttur (Madhra vd., 2013).

Han vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada lakoamid içeren mikropartiküller, püskürterek kurutma yöntemiyle üretilmiş ve acı tadını maskelemek amaçlanmıştır. Çalışma için Eudragit® E 100 polimeri kullanılmış ve acı tadı başarı ile maskelenmiştir. Ayrıca hazırlanan mikropartiküller, beklendiği üzere lakoamid çözeltisine kıyasla daha uzun sürede etkin maddenin salımını gerçekleştirmiştir (Han vd., 2019).

Bir diğer çalışmada ise PLGA polimeri kullanılarak lakoamid yüklü nanofibler (nanofibers) üretilmiş ve implant haline getirilerek sıçanlara subdural olarak uygulanmıştır. *İn vitro* salım çalışması sonucunda 90 gün içinde etkin maddenin

tamamının serbestleştığı bir formülasyon elde edilmiş, bu formülasyon ise epilepsi modeli oluşturulan sıçanlara uygulanarak EEG sonuçları, 7 hafta boyunca incelenmiş ve oldukça etkin formülasyonların oluşturulduğu belirlenmiştir (Bauquier vd., 2016).

Bir diğer çalışmada ise, elektroçirime (electrospinning) yöntemi kullanılarak, çeşitli derişimlerde PLGA polimeriyle lakozamid yüklü mikroküre ve mikrolifler (microfiber) hazırlanmış ve yüksek etkin madde içeren, biyoyumluluğu yüksek etkili formülasyonların başarı ile hazırlandığı belirtilmiştir (Chen vd., 2017).

Farklı bir çalışmada ise lakozamid içeren uzatılmış salımlı tablet geliştirmek amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, farklı oranlarda, püskürterek kurutulmuş laktoz, Povidone® K30, etil selüloz, silikon dioksit, magnezyum stearat kullanılmıştır. Yaş granülasyon yöntemiyle tabletler hazırlanmış ve farmakokinetik çalışmaları yapılmıştır. Palet yöntemiyle *in vitro* salım çalışması yapılmış, *in vivo* olarak da farmakokinetik çalışmalar tazılarda gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 2 saat içinde etkin maddenin %50'si, 12 saat içinde de tamamı salınmıştır. Tazılarda yapılan farmakokinetik sonuçlarına göre ise dozlaşma sıklığının azaltılabileceği gösterilmiştir (Ahn vd., 2014).

2.3. Nazal İlaç Uygulama

Burun yoluyla vücuda ilaç verilmesi çok eski zamanlardan beri yapılan bir işlemdir. Nazal uygulama etkin maddenin biyoyararlanımının arttırılması amacı ile tercih edilen uygulama yollarından biridir (Jadhav vd., 2008). Her ne kadar ilk zamanlarda bölgesel bir etki sağlamak düşünülse de zamanla sistemik dolaşıma ilaç vermek ve koku sinirleri aracılığıyla beyne ilaç taşımak amaçlanmıştır. Burun içinde oldukça fazla bulunan kılcak damarlar ve beyne çok yakın olan koku sinirleri bu iki farklı amaca ulaşmayı kolaylaştıran unsurlardır (Appasaheb vd., 2013). Ayrıca nazal ilaç taşıyıcı sistemler oral ve parenteral uygulama yollarının oluşturduğu sakıncalardan kaçınmak için uygun bir yöntemdir (Jassim ve Al-akkam, 2018).

Nazal uygulama yolu burun enfeksiyonları, akıntı ve tıkanıklık gibi bölgesel rahatsızlıklar için hali hazırda kullanılmaktadır ancak son yıllarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki burun yoluyla sistemik etki elde etmek, küçük molekül ağırlıklı ilaçlar, peptit ve proteinler gibi etkin maddeler için mümkündür. Sumatriptan, zolmitriptan, ergotamin, butorfanol, kalsitonin, desmopresin ve buserelin etkin maddelerine ait nazal

müstahzarlar piyasada bulunmaktadır. Nazal yoldan uygulanmak üzere araştırma-geliştirme aşamasında olan çok sayıda ürün bulunmaktadır (Illum, 2003).

Buruna uygulanmak üzere hazırlanan dozaj şeklinin karakteristik özellikleri, etkin maddenin emilimi açısından oldukça önemlidir. Uygun dozaj şeklinin seçimi, kullanılan etkin maddeye, etkinin devamlılığına ve hasta profiline bağlı olarak değerlendirilmektedir. Burun damlaları, burun tozları, nazal jeller, çözelti veya koloidal nazal spreiler, süspansiyonlar, emülsiyonlar, lipozomlar, mikroküreler, nanopartiküller ve hidrojeller nazal yol ile uygulanan dozaj şekilleri arasında yer almaktadır (Jassim ve Al-akkam, 2018; Swamy ve Abbas, 2012).

2.3.1. Burundan ilaç geçişi

İlaçların burundan emiliminin solunum bölgesinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Burundan ilaç geçişi bütün vücutta olduğu gibi, hücreler arası ve hücre içi olarak meydana gelmektedir. İlaçların emiliminde burnun anatomik ve fizyolojik yapısı, etkin maddenin yükü, molekül ağırlığı, lipofilitesi gibi fizikokimyasal özellikleri ve formülasyonun pH değeri, viskozitesi, ozmotik basıncı, derişimi, hacmi ve dozaj şekli etkili olmaktadır (Dhakar vd., 2011; Illum, 2002).

2.3.1.1. Etkin madde ve formülasyon ile ilgili parametreler

300 Da'dan küçük moleküllerin emiliminin, etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinden etkilenmediği belirtilmiştir. Molekül ağırlığı arttıkça emilim azalmaktadır. Etkin maddenin kimyasal yapısı polariteyi ve dolayısı ile çözünürlüğü etkileyeceği için emilim açısından önemlidir. Lipofil ilaçların daha yüksek oranda emilim gösterdiği belirtilmektedir ayrıca maddenin polimorfik özellikleri de etkin maddenin emilimini etkileyen unsurlar arasındadır (Jadhav vd., 2008; Kaur vd., 2016).

Lipofil yapıda bulunan ilaçlar, pasif difüzyon ya da endositoz ile hücre içi yoldan etkin derişimde kana geçebilmektedir. Hidrofil yapılu ilaçların ise hücreler arası boşluktan kana karıştığı varsayılmaktadır. Açılıp kapanabilen dinamik bir yapıya sahip olmasına rağmen, hücreler arası boşluklar 10 Å kadardır. Molekül ağırlığı 1000 Da'dan büyük olan maddelerin hücreler arası boşluktan emilimi zayıftır (Illum, 2002; Kaur vd., 2016).

Propranolol, progesteron, pentazosin ve fentanil gibi lipofilik yapılu etkin maddeler burundan hızlı bir şekilde emilim göstermiş ve parenteral uygulamaya benzer bir

biyoyararlanım profili elde edilmiştir. Hidrofil yapıya sahip etkin maddelerin ise burundan emilimi zayıftır. Düşük molekül ağırlıklı morfin, alniditan ve sumatriptan gibi polar ilaçların nazal biyoyararlanımlarının %10'u geçmediği belirtilmiştir ve çalışma sonuçları burundan emilim esas olarak hücre içi yollardan gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Illum, 2002).

Formülasyon geliştirmenin temel amaçlarından biri etkin maddenin biyoyararlanımını arttırmaktır. Formülasyona eklenen yardımcı maddeler etkin maddeye ait özellikleri değiştireceği gibi ortam koşullarında da birtakım değişiklikler yaparak etkin madde biyoyararlanımının artmasını sağlamaktadır. Formülasyonun pH değeri, viskozitesi, ozmolaritesi, tampon kapasitesi, barındırdığı etkin madde miktarı ve doz hacmi gibi unsurlar burun ortamında ve etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinde değişiklikler meydana getirerek biyoyararlanımını etkilemektedir (Kaur vd., 2016).

2.3.1.2. Anatomik ve fizyolojik parametreler

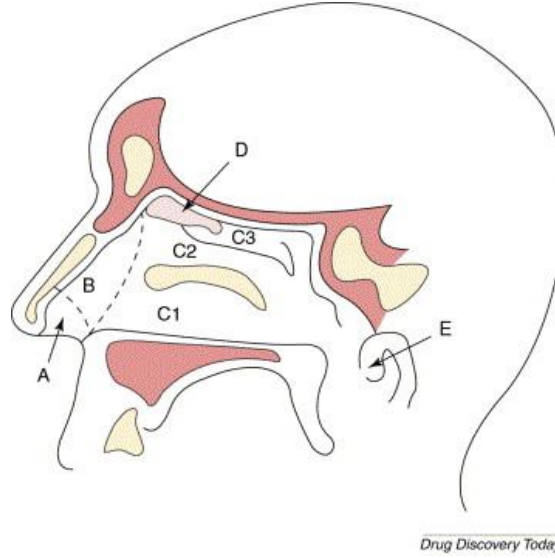
Burunun her bölgesinde emilim aynı oranda gerçekleşmemektedir. Koku bölgesinde bulunan viskoz mukus formülasyonun uzun süre tutunmasına yardımcı olabilmekte ve bu sayede emilimi kolaylaştırmaktadır. Ayrıca burun içinde oldukça fazla kılcal damar yer almakta ve bu da emilimin artmasını sağlamaktadır. Ek olarak burun mukozasında yer alan enzimler ilaç kararlılığını etkilemekte ve biyoyararlanımı azaltabilmektedir (Kaur vd., 2016).

Solunum bölgesinde yer alan silialar sürekli hareket halindedir ve bölgedeki mukusun yenilenmesini sağlamaktadır (Ugwoke vd., 2005). Mukus yutağa doğru dakikada yaklaşık olarak 5 mm hareket etmektedir. Siliaların bu hareketinden dolayı uygulanan formülasyon bölgede tutunmakta zorluk çekmekte ve etkin maddenin emilimini etkilemekte ve biyoyararlanımın azalmasına sebep olmaktadır (Illum, 2002). Bir formülasyon buruna uygulandığında yaklaşık olarak 21 dakika içinde silialar tarafından temizlenmektedir (Arora vd., 2002).

2.3.2. Burun anatomisi

Burun boşluğu, üst damak ile kafatasının tabanı arasını doldurmaktadır. Üstten etmoidal kemiklerle, yandan maksiller kemiklerle ve önden konka kemikleriyle desteklenmiştir. Burun boşluğunun hacmi kişiden kişiye değişmekle birlikte 15-20 mL'dir ve yüzey alanı yaklaşık 150 cm²'dir. Nazal bölgenin sıcaklığı 24,5-34 °C arasında

değerler almaktadır (Keck vd., 2000). Nazal septum burunda iki simetrik boşluk oluşturmaktadır. Bu boşluk yüz kısmında burun deliklerine ve iç kısımda nazofarinkse (üst yutak) açılmaktadır. Bu iki simetrik parça yüzden iç kısma doğru (Şekil 2.1) burun vestibülü, nazal atriyum, solunum bölgesi ve koku bölgesinden oluşmaktadır (Tangri ve Khurana, 2011).



Şekil 2.1. *Burun anatomisi: (A) burun vestibülü, (B) atriyum, (C1) solunum bölgesi alt konka, (C2) orta konka, (C3) üst konka, (D) koku bölgesi ve (E) nazofarinks (geniz) (Arora vd., 2002)*

2.3.3. Burun fizyolojisi

2.3.3.1. Burun hücreleri

Epitel hücrelerin tabakalaştığı burun vestibülü yapısı gereği kurumaya karşı hayli dirençlidir ve çevreden gelen zararlı maddelere karşı koyarak burundan solunum bölgesine geçişi sınırlamaktadır. Atriyum bölgesi tabakalaşmış epitel hücrelerden önde skuamöz hücrelerle, arka tarafta da yalancı-tabakalaşmış mikrovillüslü kolonumsu epitel hücreleriyle kaplıdır. Kolonumsu epitel hücreleri, goblet hücreleriyle birlikte atriyum içinde dağılmıştır ve epitel altı seromukus bezleri solunum bölgesine açılmaktadır. Bu hücreler mikrovillüslere ve silialara (tüycük) sahiptir. Her bir hücrede yaklaşık 100 tane silia vardır. Hücrelerin tamamında ise yaklaşık 300 tane mikrovillüs vardır. Mikrovillüsler silialardan daha küçüktür fakat aynı işlemi görmektedir. Siliaların dalga benzeri hareketi, herhangi bir parçacığın burundan içeriye girişine engel olmaktadır. Solunum bölgesindeki epitel dokunun altında zemin (bazal) hücreleri yer almaktadır. Bu

hücreler arasındaki boşluk sıkı değildir. Dolayısıyla hücreler-arası sıvı için geniş bir alana sahiptir (Mathison vd., 1998; Ugwoke vd., 2005).

Koku bölgesi epiteli burun boşluğunun çok üst kısmında yer almaktadır. Orta burun ile iki yanal duvar arasında yer alan koku bölgesi, hava akımından muaf ve burun içinde 10 cm² gibi çok küçük bir alanı işgal etmektedir. Solunum bölgesi epitel dokusu gibi yalancı-tabakalaşmış kolonumsu hücrelere sahiptir. Solunum epitelinden farklı olarak reseptör hücrelere sahiptir ve bu hücreler birincil koku nöronları olarak da bilinir ve kokunun beyne iletilmesini sağlamaktadır. Trigeminal sinirin göze uzanan dalları da koku bölgesinde yer almaktadır. Epitel dokunun iç kısımlarında reseptör hücrelere ait çubuk şekilli uzantılar yer almaktadır. Mikrovilluslerden fazla reseptör hücre uzantıları vardır. Reseptör hücreler destek hücreleri ile karmaşık bağlantılara sahiptir. Koku bölgesine ait epitel doku hücrelerinde silialar bulunmamaktadır (Crowe vd., 2018; Mathison vd., 1998).

2.3.3.2. Nazal mukoza

Mukus tabakası epitel hücreye temas edebilmek için aşılması gereken ilk tabakadır. Goblet hücreleri, nazal bezler ve gözyaşı bezleri mukusun oluşumunda rol almaktadır. Burun sıvısı çeşitli elektrolitleri, glikoproteinleri ve lizozimler, enzimler ve immunoglobulin, albumin gibi çeşitli proteinleri içermektedir (Mathison vd., 1998).

Solunum bölgesinde siliaların güçlü hareketliliği nedeniyle devamlı akış halinde olan bir mukus tabakası vardır. Mukus tabakası her on dakikada bir yenilenmektedir ve salgılanan mukusun pH değeri yetişkin bireylerde 5,5-6,5 arasında, çocuklarda ise 5,0-6,7 arasında değişmektedir (Mathison vd., 1998).

Koku bölgesinde yer alan epitel doku hücreleri daha yoğun ve hafif sarı renkli bir mukus tabakasına sahiptir. Bowman bezleri ve destek hücreleri koku mukozasına ait bileşenlerin büyük bir kısmını barındırmaktadır. Solunum bölgesindeki epitel dokunun aksine, koku bölgesindeki epitel dokularda mukusun hareketini sağlayacak silialar bulunmamaktadır. Bu bölgede mukus oldukça viskozdur ve aşırı bir salgılama olmadığı sürece hareketsizdir. Fazla mukus salgısı olduğunda, yavaşça solunum gölgesine doğru akış gerçekleşmektedir. Birkaç çözünebilir parçacık da bölgeye doğru gelen hava akımı sebebiyle koku bölgesinden içeri girmektedir. Çözünen bir parçacık koku mukozasına

temas ettiğinde, akışkanlığın olmayışı sebebiyle bölgeden kolayca uzaklaştırılmamakta ve böylece koku epiteline temas etme imkanı yakalamaktadır (Mathison vd., 1998).

2.3.4. Nazal uygulamanın üstünlükleri ve sakıncaları

Nazal uygulama yolu, vücuda ilaç vermek adına, diğer uygulama yolları gibi bir seçenektir ve birtakım üstünlükleri ve sakıncaları beraberinde taşımaktadır. Etkinin çabuk başlaması, hızlı emilim ve ilk geçiş etkisinden kaçış sağlaması üstünlüklerindedir. Ayrıca hasta ilacı kendisi uygulayabilmekte ve biyoyararlanım grafiği parenteral uygulamaya benzer özellik göstermektedir. Bu sayede uygulanacak dozun ve maliyetin azalmasını ve parenteral uygulamada oluşan ağrıyı ortadan kaldırarak hasta uyuncunun artmasını sağlamaktadır. Burun içinde damarlanma oldukça fazladır ve burun yüzey alanı oldukça geniştir. Bu durum sistemik dolaşıma geçiş için elverişli ortam oluşturmaktadır. Ayrıca burundan uygulanan bir ilaç, kan beyin bariyerine takılmaksızın, doğrudan beyine gidebilmektedir (Kaur vd., 2016; Misra ve Kher, 2012).

Ancak bunların yanı sıra uygulama yolunun birtakım kısıtlamaları da vardır. Burun yoluyla uygulanacak formülasyonların düşük hacme sahip olması gerekmektedir. Burun mukozasında yer alan enzimler etkin maddenin parçalanmasına ve biyoyararlanımının azalmasına sebep olabilmektedir. Nazal uygulamanın sık sık kullanılması burunda tahriş ve mukoza hasarı oluşturabilmektedir (Misra ve Kher, 2012). Ayrıca siliaların hareketlerinden dolayı burunda sürekli bir temizlik söz konusudur. Dolayısıyla etkin maddenin emilimi için gereken süreden önce formülasyon bölgeden uzaklaştırılabilmektedir (Kaur vd., 2016). Ayrıca literatürde nazal uygulamaya dair hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalara dayanan veriler yetersizdir (Crowe vd., 2018).

Etkin maddenin burun içi emilimini arttırmak için burun içinde kalış süresinin uzaması adına silia hareketlerini kısıtlamak, emilimin daha hızlı gerçekleşmesi adına mukoza hücrelerinin arasındaki bağlantıları gevşetmek, etkin maddenin kararlılığı adına burun içi enzim aktivitesini durdurmak gibi tedbirler alınabilir (Jassim ve Al-akkam, 2018).

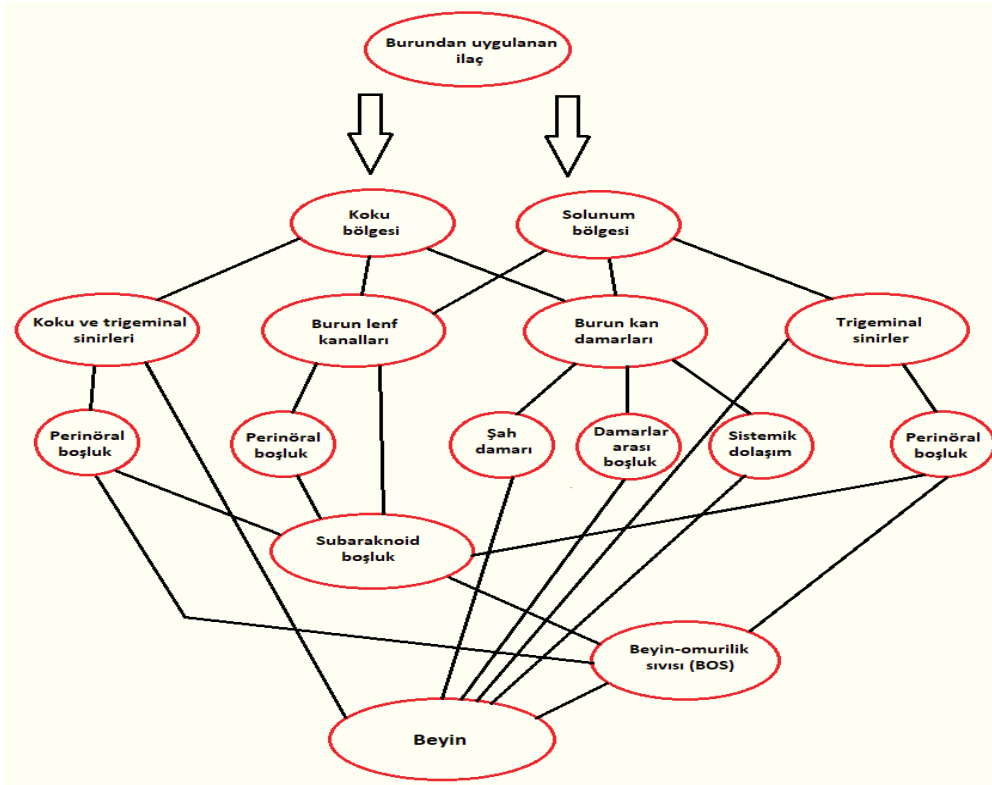
2.3.4.1. Burundan beyine ilaç geçişi

Nazal uygulama ile serebro-spinal sıvıda terapötik derişimde etkin madde varlığını sağlamak mümkündür. Bu koku sinirleri aracılığıyla olabileceği gibi kanda oluşan

terapötik derişim sayesinde de olabilmektedir (Şekil 2.2). Serebro-spinal sıvıdan ve beyin dokusundan ilaç geçişi etkin maddenin molekül ağırlığına ve lipofil oluşuna bağıdır (Illum, 2003). Yüksek doz uygulamasıyla birlikte formülasyonun burunda kalış süresinin artırılması beyne geçişi arttırmaktadır (Feng vd., 2018).

Moleküllerin burun boşluğundan beyine doğru geçişine koku ve trigeminal sinir hücreleri aracılık etmektedir. Moleküller önce beynin merkezindeki sinir hücrelerinde ve ponsta, ardından beynin içinde dağılmaktadır. Beyne geçiş de yine hücre içi ve hücreler arası yol ile gerçekleşmektedir. Hücre içi mekanizma, koku sinirinin akson uzantısı içine endositoz yoluyla molekülün girmesiyle başlamaktadır. Hücreler arası yol ise burun epitelinin daha içteki tabakalara doğru difüzyonla gerçekleşmektedir (Crowe vd., 2018).

Koku nöronları mitral hücrelere doğru çıkıntı yapan akson bölgelerine sahiptir. Bu aksonlar “Schwann benzeri hücreler” ile sarılmıştır. Oluşan yapının üzerinde ise nöral fibroblastlar yer almaktadır. Fibroblastlar beyin zarına kadar devam etmektedir. Dolayısıyla, fibroblastlar ile schwann benzeri hücreler arasında, subaraknoid boşluğa kadar devam eden hücreler arası tabaka oluşmaktadır. Bu tabaka beyne ilaç geçişinden sorumludur (Crowe vd., 2018).



Şekil 2.2. Burundan beyine geçiş yolları (Misra ve Kher, 2012)

Yapılan çalışmalar sonucunda, burundaki koku siniri hücrelerinin, influenza ve polio virüsü, çeşitli boyutlardaki alüminyum laktat, insülin ve albümin gibi proteinleri ve altın nanopartiküllerini endositoz yoluyla bünyesine dahil ettiği tespit edilmiştir (Crowe vd., 2018). Bir çalışmada karbamazepin jel içerisine yüklenip sıçanlara nazal yoldan uygulanmıştır. Parenteral ve ağızdan uygulamaya göre nazal yoldan uygulanan formülasyon beyin dokusunda etkin derişimlere ulaşmıştır (Barakat vd., 2006). Ayrıca klinik çalışmalara göre nazal yoldan midazolam ve diazepam uygulandığında yüksek biyoyararlanım elde edildiği belirtilmiştir (Erdö vd., 2018). Bir başka çalışmada risperidon nano-emülsiyon içerisinde nazal yoldan uygulanmıştır. Önemli miktarda risperidonun beyine ulaştığı ve hemen etki gösterdiği kaydedilmiştir (Kumar vd., 2008).

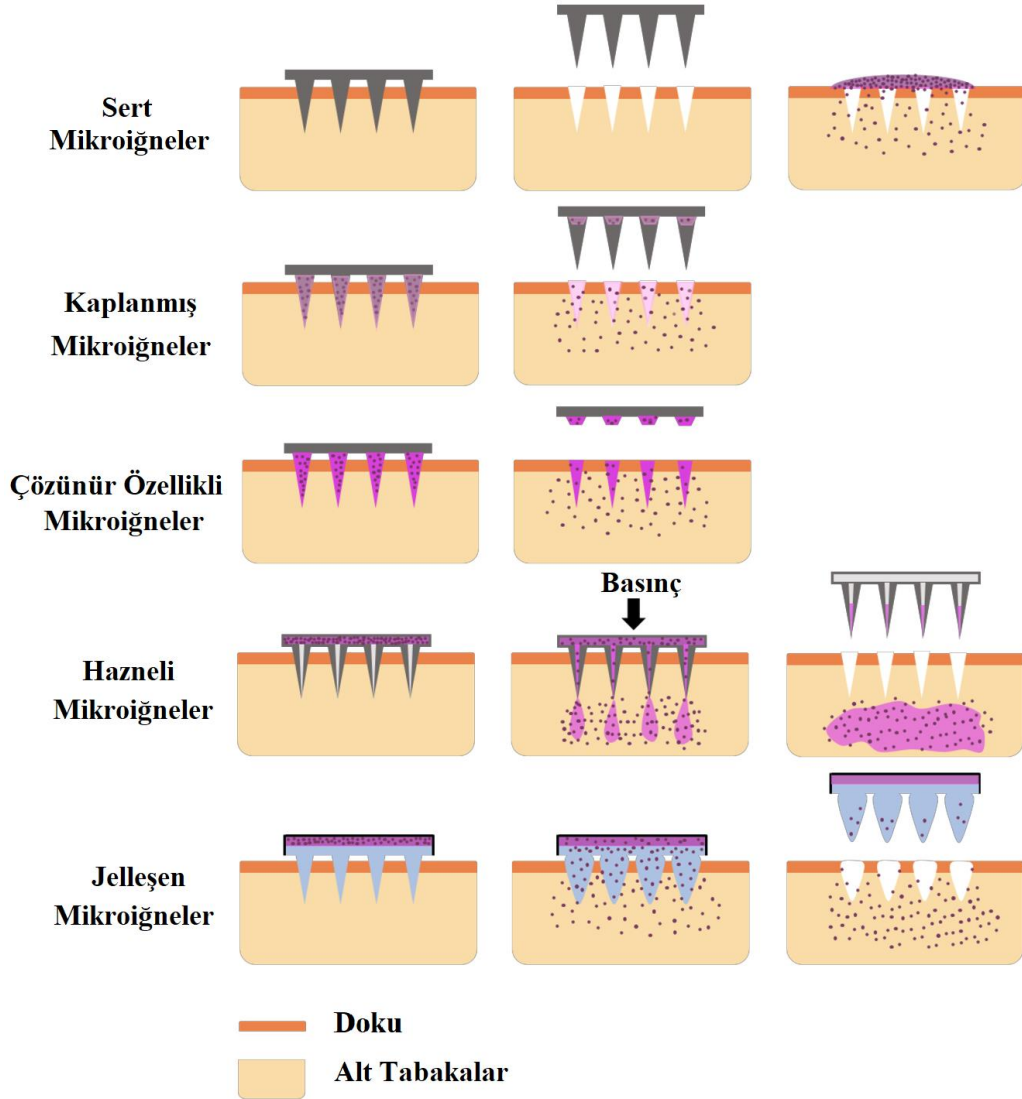
2.4. Mikroığneler

Mikroığneler, deriden ilaç geçişini arttırmak üzere tasarlanan, derinin epidermis kısmında yer alan stratum korneum tabakasını aşip daha derinlere etkin maddeyi taşımayı hedeflerken bir taraftan da enjektör ile parenteral uygulamada oluşan ağırdan kaçınmayı amaçlayan, çeşitli polimerlerden veya metallere üretilen, mikron boyutlarında bir dizi iğneden oluşmaktadır. Mikroığneler için en çok transdermal uygulama tercih edilmiştir fakat oftalmik ve nazal uygulamalar da mevcuttur (Ravi vd., 2017). Mikroığneler; yapılarına, boyutlarına, üretim süreçlerine, tasarımına ve kullanım amacına göre sınıflandırılabilir ancak en baskın sınıflandırma uygulama açısından yapılmıştır. Buna göre mikroığneler katı, kaplanmış, hazneli, çözünen ve hidrojel mikroığneler olmak üzere beşe ayırmak mümkündür (Şekil 2.3) (Ita, 2017, 2018a; Rzhvskiy vd., 2018; Tuan-Mahmood vd., 2013).

Sert mikroığneler genellikle paslanmaz çelik, silikon ve titanyum gibi farklı tiplerde metallere üretilmektedir (Şekil 2.3). Sert mikroığneler vücutta mikron boyutlarda delikler açmak için kullanılır ve ardından formülasyon uygulanmaktadır. Sert mikroığneler ilaç taşıyıcı sistemler açısından, ilaç uygulamadan önce transdermal penetrasyonu arttırmak amacıyla stratum korneum tabakasında mikro-oyuklar açmak için kullanılmaktadır. Literatürde bu amaç doğrultusunda yapılan çalışmalar mevcuttur (Gill ve Prausnitz, 2007; Ita, 2017).

Kaplanmış mikroığneler ise sert mikroığnelerin formülasyon ile kaplanmasıyla üretilmektedir. Daldırarak kaplama, püskürterek kaplama ve elektrodinamik

atomlaştırma gibi cihazlarla yapılabileceği gibi doğrudan formülasyonu mikroığne üzerine damlatıp kurutarak da kaplama işlemi yapılabilmektedir. Son zamanlarda sert mikroığneler influenza virüs benzeri partiküllerle kaplanmış ve deri altı aşılama işlemi için deriye yerleştirilmiştir (Ita, 2018b).



Şekil 2.3. Mikroığne türleri (Rzhevskiy vd., 2018)

Hazneli mikroığneler ise içine formülasyonu doldurulabilen türden mikroığnelerdir (Şekil 2.3). İç kısmında formülasyonu doldurmak için boş bir hazne barındırmaktadır. İç hacimleri oldukça küçük olduğu için, düşük dozda kullanılan ve ağızdan alımı mümkün olmayan peptit, protein, aşı ve insülin gibi biyoteknolojik ürünlerle geliştirilen formülasyonlar için oldukça uygundur. Hazneli mikroığneler genellikle metallere üretilir ve içinde yer alan formülasyon uygulandıktan sonra iğne uzaklaştırılır. Tek bir mikroığneden enjeksiyon yapma ve dizi halinde mikroığneleri kullanarak transdermal

yama şeklinde uygulama olmak üzere iki türlü yaklaşım vardır. Sıvı formülasyonlar için kullanım uygulama kolaylığı sağlar. Hazneli mikroıǧneleri küçük bir formülasyon haznesiyle birleştirmek ve ıǧneleri enjeksiyon için kullanmak da mümkündür (Kim vd., 2012). Kaplanmış mikroıǧnelerle kıyaslandığı zaman yüksek miktarda etkin maddeyi salabilme kapasitesine sahiptir (Gill ve Prausnitz, 2007; Ita, 2017; Van Der Maaden vd., 2012).

Çözünen ve hidrojel mikroıǧneler ise, vücuda uygulandığı zaman çözünme, şişme veya ufalanarak küçülme şeklinde kendini gösteren, bu esnada da etkin madde salımını gerçekleştiren mikroıǧnelerdir (Şekil 2.3). Çözünen ve hidrojel mikroıǧnelerin bir arada sınıflandırılmasının nedeni üretim yönteminden kaynaklanmaktadır. Her iki tip mikroıǧne de polimer çözeltilsinin ya da sıvı halinin mikroıǧne kalıbında katılaştırılmasıyla elde edilmektedir. Bu tür mikroıǧneler ilaç taşıyıcı sistemin bir aracısı değil, doğrudan formülasyonun kendisidir. Uygulandıktan bir süre sonra çözünerek ya da hidrojel gibi şişerek etkin maddenin vücuda dağılmasını sağlar (Ita, 2017). Çeşitli polimerlerden üretilen mikroıǧneler bu grupta yer almaktadır. Poli-L-laktik asit (PLA), poli-glikolik asit (PGA), poli laktik-glikolik asit (PLGA), siklik-olefin kopolimer (COC), polivinil prolidon (PVP), polivinil alkol (PVA), karboksimetil selüloz (CMC), kitosan, sodyum aljinat, sodyum hyalüronat, poli akrilik asit, poli etil-vinil eter maleik asit, polikaprolakton ve ipek olduğu kadar; galaktoz, maltoz ve dekstrin gibi şeker türevleri de çözünen mikroıǧnelerin üretiminde kullanılmıştır (Chen vd., 2013; Chen vd., 2015; Seong vd., 2017; Yu vd., 2017; Zhan vd., 2018).

2.4.1. Mikroıǧnelerin üretim yöntemleri

Mikroıǧnelerin üretimi için litografi, damlatma-kurutma ve mikrodöküm yöntemi gibi pek çok yöntem kullanılmaktadır (Duarah vd., 2019; Ita, 2017; Sanjay Sharma vd., 2019; Waghule vd., 2019). Üretim yönteminin seçilmesinde en önemli parametre, mikroıǧnenin çeşidini (hazneli, katı, aşınan vs.) de belirleyen kullanılacak malzemedir. Fotolitografi yöntemi, katı ve hazneli mikroıǧnelerin üretimi için oldukça uygun bir yöntemdir ancak aşınan ve hidrojel mikroıǧnelerin üretiminde, kullanılan malzemedен dolayı, faydasızdır (Duarah vd., 2019; Ita, 2017; Sanjay Sharma vd., 2019; Waghule vd., 2019). Ayrıca yapılan literatür taramaları sonucunda, benzer özelliklere ancak farklı ortam koşullarına (sıcak uygulama gibi) sahip üretim yöntemlerinin farklı isimlerle anıldığı görülmüştür.

2.4.1.1. Litografi

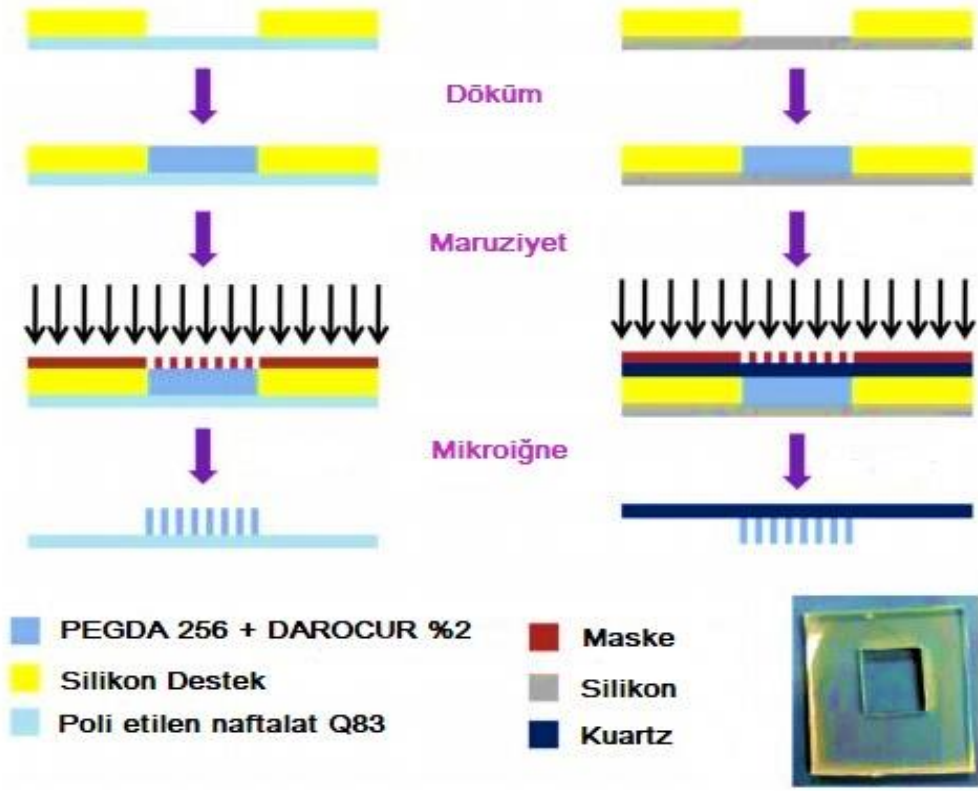
Litografi, mikro ve nano boyutlar gibi son derece küçük ölçeklerde, iki boyutlu ve üç boyutlu yapıların üretimi için kullanılan bir yöntemdir. Düz bir taş veya levha yüzeyine işleme yöntemini baz alarak yapılır. 18. yüzyılda yaşamış olan Alois Senefelder tarafından icat edilen yöntemin günümüz teknolojiyle geliştirilmesi sonucu oluşan litografi yöntemi ile mikro ve nano boyutlarda üretim yapmak mümkün olmuştur. Litografi yöntemi özellikle yarı-iletkenlerin ve entegre devrelerin üretimini mümkün kılmış ve bilgisayar, elektronik ve yazılım alanında gerçekleşen ilerlemenin öncüsü olmuştur. Son yıllarda biyomedikal ve ilaç taşıyıcı sistemler için de litografi yönteminin kullanımı yöntem maliyetinin nispeten azalmasıyla gündeme gelmiştir (Tran ve Nguyen, 2017).

Litografi yöntemleri kullanılan yöntemlere göre adlandırılır. Mikroıĝnelerin üretimi için kullanılan litografi yöntemleri; fotolitografi, yumuşak litografi, çekme (drawing) litografidir (Larrañeta vd., 2016; Sanjay Sharma vd., 2019).

2.4.1.1.1. Fotolitografi

İlk mikroıĝne üretimi, entegre devre elemanlarının hammaddesini oluşturan silikon levhadan fotolitografi (Şekil 2.4) ve reaktif iyon aşındırma (reactive ion etching) yöntemleriyle yapılmıştır. Hızlı ve en az hatayla üretim yapmak fotolitografi yöntemiyle mümkündür ancak pahalı ve zahmetli bir iştir. Ayrıca hammadde olarak uygun maddeler (silikon gibi) ender bulunur. Bunun yanısıra üretilen silikon mikroıĝneler bir başka üretim yöntemi olan mikrodöküm için gerekli olan dişi kalıpların üretimi için kullanılabilir (Van Der Maaden vd., 2012).

Fotolitografi, UV ışığa hassas malzemelerin üzerine istenilen şablonu aktarmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu işlem için en uygun malzeme silikon levhalardır. UV ışınların uygun şablon üzerinden bir mercek aracılığıyla gönderilerek istenilen desen, levhaların üzerindeki, ışığa duyarlı fotorezistte oluşur. Fotorezistin yapısına bağlı olarak UV ışınlar yerine X-ışınları, iyon bulutu, elektron bombardımanı gibi yöntemler de tercih edilebilir. Bu yöntem en çok entegre devre üretiminde kullanılmaktadır ancak katı ve hazneli mikroıĝnelerin üretimi için de uygundur. Üretim için steril alan gereklidir ve bu gereklilik maliyeti arttırmaktadır (Rajagopalan vd., 2013; Tran ve Nguyen, 2017; Van Der Maaden vd., 2012).



Şekil 2.4. Fotolitografi yöntemiyle mikroiğne hazırlanması (Dardano vd., 2015)

Poli etilen glikol diakrilat (PEGDA) mikroiğne hammaddesi olarak, DAROCUR[®] ise UV ışığa maruziyeti kolaylaştırmak için yani ışıklara duyarlılığı arttırmak için kullanılmıştır (Dardano vd., 2015).

Fotolitografi için yüzey önce UV ışığa duyarlı bir malzeme ile kaplanmaktadır. Kaplama işlemi çeşitli yöntemlerle yapılabilmekte fakat genellikle döndürerek kaplama (yüzey 1500-8000 rpm hızda dönerken üzerine polimer çözeltisi dökülür) tercih edilmektedir. Ardından çözücü yüksek sıcaklıkta (75-100 °C) uzaklaştırılmaktadır. Uzaklaştırma işlemiyle levha yüzeyine ışığa duyarlı madde (fotorezist) yapışmış olur. Sonrasında ise istenilen şablonu taşıyan maske üzerinden UV ışın kaplanmış levha yüzeyine uygulanır. Levha üzerinde UV ışığa maruz kalan duyarlı polimer, kimyasal tepkimeye girerek çözünür hale gelir. İşlem tamamlandıktan sonra ise uygun bir çözücü kullanılarak levha yıkanır ve istenilen desen (mikroiğne, entegre devre yolları vs.) levha üzerinde belirir. Bu aşamaların ardından levhanın asitle yıkanması (etching) gerekir. Bu işlem oluşan şeklin belirgin hale gelmesini sağlar ve kalan pürüzleri ortadan kaldırmaktadır (Larrañeta vd., 2016; J. X. J. Zhang ve Hoshino, 2019).

Litografi işleminde öncelikle kullanılan madde silikondur fakat işlem aşamaları boyunca kararlı yapısını koruyan malzemeler de kullanılabilir. PEGDA mikroıǧneler bunun için uygun bir örnektir (Dardano vd., 2015). Protein ve hücre gibi biyolojik örneklerle çalışmak gerektiğinde UV ışın yerine NIR (yakın kızılötesi) ışınları tercih edilmektedir (Tran ve Nguyen, 2017).

2.4.1.1.2. Yumuşak litografi

Yumuşak litografi yöntemi, özellikle maliyeti azaltmak istendiğinde, esnek, eğimli veya düz zemin üzerine mikro ve nano ölçekli çeşitli şekillerin birkaç farklı yöntem ile uygun kalıp aracılığıyla üretilmesine verilen addır. Yumuşak litografi yöntemi, fotolitografiden farklı olarak maske ve radyasyon kaynağı (UV ışın, elektron bombardımanı, X ışınları) yerine istenilen şekli taşıyan bir kalıp kullanılır. Kalıp üzerine uygun elastomer (genellikle poli dimetil siloksan) dökülür ve kavisleri doldurur. Uygun yöntemle katılaştırılan elastomer kalıptan soyulur ve istenen şekil elastomer yapıya aktarılır. Mikro-temas, döküm, mikro-aktarma döküm, kılcal mikro-döküm, çözücü destekli mikrodöküm, faz değiştirme, nano-aktarma, çıkarma-aktarma litografisi ve nano-yontma teknikleri yumuşak litografi prensibiyle geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin temelinde uygun bir elastomer ile basım, döküm ve kabartma vardır (Kang, 2010; Qin vd., 2010).

Yumuşak litografi yöntemi; istenilen şeklin bilgisayarda tasarlanması, fotolitografi yöntemiyle kalıbın oluşturulması ve elde edilen kalıptan (basım, döküm ve kabartma yöntemiyle) mikro-nano boyutlarda istenilen yapıların üretilmesi şeklindedir. Kalıbın oluşturulması için elektron bombardıman litografi yöntemi de kullanılabilir ancak fotolitografiye göre daha masraflı bir yöntemdir (Qin vd., 2010).

Elde edilen kalıbın aynısını üretmek için, kalıp ile oluşturulan taslak tekrar kalıp olarak kullanılır ve bu sayede en başta tasarlanan şekle, istenilen malzeme ile ulaşılır. Fotolitografi yöntemi kullanılarak her türlü malzeme ile çalışmak mümkün olmadığı için, özellikle biyomedikal alanlarda, yumuşak litografi kullanımı gerekmektedir (Qin vd., 2010).

Mikroıǧnelerin üretimi için elverişli bir yöntemdir. Seçilen kalıba göre doğrudan mikroıǧneleri üretmek (dişi ya da negatif kalıp) veya mikroıǧneleri üretmek için kullanılacak kalıbı üretmek (erkek veya pozitif kalıp) mümkündür. Yumuşak litografi

yöntemiyle genellikle dişi kalıp üretilmekte ve bu kalıp kullanılarak çözünen ve hidrojel mikroığneler üretilmektedir. Yumuşak litografi yönteminde poli dimetil siloksan (PDMS) kalıbın katı-elastik yapısını kazanması için ısı uygulandığından kullanılan polimerin ısıya dayanıklı olması gerekmektedir (Ami vd., 2011; Kai vd., 2016).

Moga ve arkadaşları, polivinil prolidon ve polivinil asetat karışımı bir polimer olan Luvitec® VA64 ile soft litografi yöntemiyle mikroığne üretmiştir. Mikroığneleri üretmek için PDMS erkek kalıptan perfloropolietir (PFPE) kullanılarak dişi kalıp üretilmiştir. UV ışına duyarlı olan PFPE, PDMS erkek kalıp üzerine dökülüp UV ışın altında katılaştırılmıştır. Elde edilen PFPE kalıba, Luvitec® VA64 çözeltisi dökülüp boşlukların tamamen dolması için 105 °C'ye ısıtılmıştır. Ardından soğutulmuş ve oluşan mikroığneler kalıptan çıkarılmıştır (Moga vd., 2013). Yumuşak litografinin literatürde çeşitli alt dalları bulunsa da yöntemin temeli polimer çözeltisinin kalıba dökülmesi, buharlaştırma veya UV ışınlarla katılaştırmanın yapılması, kalıptan ayırma ve istenilen ürünün (mikroığne) elde edilmesi şekildedir (Qin vd., 2010). Büyük ölçekte ve az maliyetle üretim sağlanabilecek bir yöntemdir ancak uygulanan yüksek sıcaklık, antijen, protein ve insülin gibi ısıya hassas maddelerin formülasyonu açısından elverişli değildir (Leone vd., 2017).

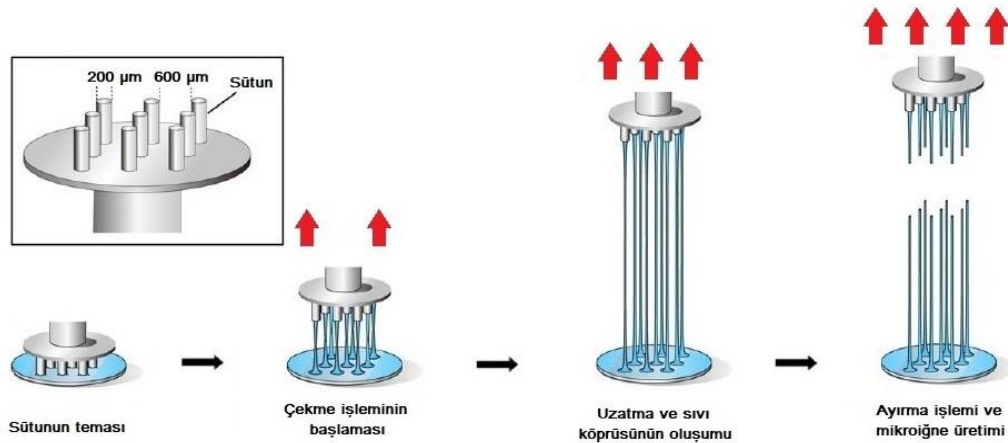
2.4.1.1.3. Çekme (drawing) litografi

Çekme litografi yöntemi, küçük (mikro ve nano) ölçekli ve üç boyutlu yapıların üretimi için polimerin camsı geçiş sıcaklığındaki viskozitesinden faydalanan bir yöntemdir. Camsı geçiş sıcaklığındaki viskoz polimer çekme litografi süreci için uygun hale gelir. İki destek levhası içine yerleştirilen polimer, camsı geçiş sıcaklığının üzerinde ısıtılmakta ve ısınan polimer viskoz bir sıvıya dönüşmektedir. Levhaların birbirinden uzaklaştırılmasıyla polimer git gide esneyerek uzatılır (Şekil 2.5). Uzayan polimer, sıvı köprüsünü oluşturur ve soğutma işlemi yapılır. Camsı geçiş sıcaklığının altına gelindiğinde ayırma işlemi gerçekleştirilmekte ve mikroığne üretimi tamamlanmaktadır (Lee ve Jung, 2012).

Bu yöntemle üretilen mikroığneler, yüksek en-boy oranına sahip olmaktadır ve deri içine ilaç uygulamak için elverişlidir. Üretilen mikroığneler, hazneli mikroığneleri üretmek için kalıp olarak da kullanılabilir (Lee vd., 2010). Literatürde epoksi bazlı

bir fotorezist olan SU-8'in ve poli glikolik asidin çekme litografisi yöntemiyle mikroıgne üretiminde kullanıldığı görülmüştür (Lee vd., 2010; J. Zhang vd., 2016).

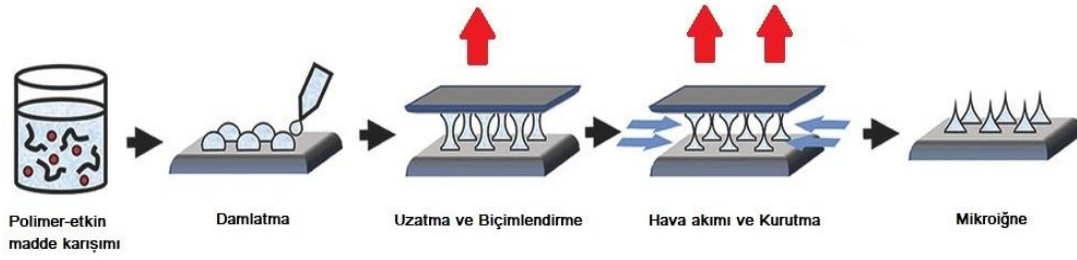
Bu yöntemde kullanıldığı belirtilen iki polimerin camsı geçiş sıcaklığı oldukça yüksek (200-220 °C) olduğu için polimerlerin etkin madde yüklendikten sonra mikroıgne üretimini yapmak, kararlılık açısından sorun teşkil edebilir. Çekme litografisi yönteminin bir manyetik alan içinde gerçekleştirilmesiyle daha uygun sıcaklıklarda (90-100 °C) üretim yapmak mümkün olmuştur (Z. Chen vd., 2018). Üretilen mikroıgneleler etkin madde ile kaplanarak veya çözünen mikroıgnelelerin üretimi için gereken kalıbı oluşturmak amacıyla kullanılabilir. Çözünen ve hidrojel mikroıgnelelerin üretimi için bu yöntemi doğrudan kullanmak henüz mümkün değildir. Maltoz ile yapılması düşünülen mikroıgnele üretim girişimi camsı geçiş sıcaklığının kısa sürede değişmesi yüzünden başarısız olmuştur (Lee ve Jung, 2012).



Şekil 2.5. Çekme litografisi yöntemi ile mikroıgnelelerin hazırlanması (K. Lee ve Jung, 2012)

2.4.1.2. Damlatma-kurutma yöntemi

Damlatma-kurutma yöntemi, çözünen ve hidrojel mikroıgnelelerin üretimi için kullanılabilir. Litografisi yöntemine kıyasla, UV ışın ve yüksek sıcaklık gerektirmediği gibi on dakika civarında bir sürede ve özel bir ortam gerektirmeksizin üretim sağlanabilecek bir yöntemdir (Kim vd., 2013). Ancak üretimi az maliyetli ve hızlı olsa da uygulama esnasında mekanik direnç sorunları yaşanmaktadır ve etkin madde yükleme kapasitesi sınırlı bir üretim yöntemidir (Kim vd., 2018).



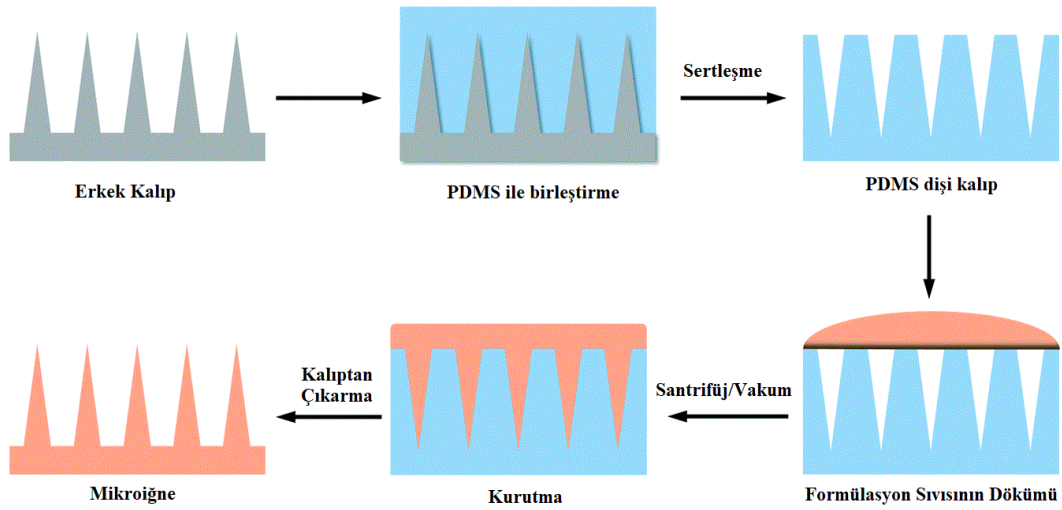
Şekil 2.6. Damlatma kurutma yöntemi ile mikroiğnelerin hazırlanması (Lee vd., 2018)

Bir levha üzerine etkin madde formülasyonunu içeren polimer çözeltisi çok küçük damlalar halinde dizilir (Şekil 2.6). Bir başka levha bu damlalar üzerine temas ettirilir ve çekme litografi yönteminde olduğu gibi sıvı köprüsü oluşturmak için iki levha birbirinden uzaklaştırılmaktadır. Uzaklaştırma işleminin ardından sıvı köprüleri üzerine hava akımı uygulanmakta ve katılma sağlanmaktadır. Katılan formülasyona ayırma işlemi uygulanmakta ve iki tabakada da çözünen veya hidrojel mikroiğneler hazırlanmaktadır (Leone vd., 2017). Literatürde damlatma kurutma yöntemi ile mikroiğne üretimine çok rastlanmamıştır. Bu yüzden üretim aşamasında karşılaşılan sorunlar tam olarak bilinmemektedir.

2.4.1.3. Mikrodöküm

Mikrodöküm yöntemi, çözünen ve hidrojel mikroiğneleri üretmek için oldukça yaygın olarak kullanılan ve yumuşak litografi ile birtakım benzerlikleri olan bir yöntemdir (Ita, 2017). Yumuşak litografiden farklı olarak sıcaklık uygulanmadan üretimin yapılabilmesidir. Bu yöntemi kullanmak için ya derişik polimer çözeltisi ya da erimiş polimer kullanılmalı ve donmaya bırakılmalıdır. Standart uygulama için ilaç yüklü polimerin, PDMS'den yapılan dişi kalıba dökülmesinin ardından iğne haznelerini doldurması gerekmektedir. Doldurma işleminin eksiksiz gerçekleşmesi ve hava kabarcıklarının oluşumunu engellemek için de vakum ya da santrifüj kullanılmaktadır. Genellikle, polimer çözeltisi dişi kalıpların mikro boşluklarına dökülmektedir; bunlar daha sonra vakum veya basınç altında doldurulmakta, ardından ortam koşullarında, santrifüj veya basınç altında kurutulmaktadır (Ita, 2017). Yüksek sıcaklıkta döküm, sulu çözelti döküm, iki adımlı döküm gibi farklı aşamalarla bu yöntemi çeşitlendirmek mümkündür (Lin vd., 2018).

Dişi kalıbın yapımı için kullanılan ana kalıp litografi yöntemleri kullanılarak üretilir. Ana kalıp paslanmaz çelik ya da silikon mikroığnelerden oluşur. Silikon bazlı PDMS, dişi kalıp üretimi için en uygun malzemedir. PDMS kalıp, ana kalıbın yapısını kopyalamaktadır. Kalıp olarak seçilmesinin sebebi de esnek olmasıdır. Yüzey adezyonunun olmaması da polimer mikroığnelerin kolay soyulabilmesini sağlamaktadır. Polimer çözeltisi, mikroığnelerin şekillenmesi için PDMS kalıba dökülmektedir (Şekil 2.7). Polimer çözeltisini barındıran kalıp ise boşlukta hapsolan hava kabarcıklarını uzaklaştırmak ve kalıptaki oyukların tamamen dolmasını sağlamak için vakum altına bırakılmaktadır. Ardından kalıp, polimer çözeltisinin iğne haznelerine iyice yerleşmesi için santrifüj işleme tabi tutulmaktadır. Mikroığnelerin üst kısmı farklı polimerden de üretmek mümkündür. Mikroığneler kalıp içerisinde bir müddet kurutulmakta ve oda sıcaklığında saklanmaktadır. Mikroığnelerin dökümü, mikroenjeksiyon cihazı ile tekrar edilebilir uygulama ve dozlama doğruluğu hayli yüksek mikroığneler başarılı bir şekilde elde edilmiştir (Ita, 2017; Juster vd., 2019).



Şekil 2.7. Mikrodöküm yöntemi ile mikroığnelerin hazırlanması (Min Wang vd., 2017)

2.4.1.4. Diğer yöntemler

Bu yöntemler arasında nadir kullanılan yöntemler yer almaktadır. Bunlar mikro-oyma, lazer oyma, sıcak kabartma ve 3D yazma yöntemleridir (Juster vd., 2019).

2.4.1.4.1. Mikro-oyma

Mikro-oyma yöntemi ile 50 µm çapa sahip iğneleri üretmek mümkündür. Bu yöntem ile istenilen şekle sahip mikroığneleri üretmek daha kolay olmaktadır. Sert

mikroiğnelerin üretimi için ya da mikrodöküm yöntemi için gereken ana kalıbın üretimi için kullanılabilir (Juster vd., 2019). Literatürdeki çalışmalar, ana kalıp üretimi için mikro-oyma yönteminin uygun olduğunu işaret etmektedir (Bediz vd., 2014; Demir vd., 2013; Korkmaz vd., 2015).

2.4.1.4.2. Lazer-oyma

Lazer oyma yöntemiyle yüksek en-boy oranına sahip mikroiğnelerin üretimi yapılabilmektedir (Juster vd., 2019). Bir çalışmada PDMS dişi kalıpların üretimi için lazer oyma yöntemi kullanılmış ve mikroiğneler mikrodöküm yöntemiyle üretilmiştir. Lazer ışınlarının katılaştırılmış PDMS kütle üzerinde oyuklar açmasıyla dişi kalıp üretilmiştir. Bahsedilen çalışmada lazer gücü ve lazer hızının mikroiğne yapısını etkileyen temel unsurlar olduğu belirtilmiştir (Wang vd., 2016).

2.4.1.4.3. Sıcak kabartma

Sıcak kabartma yöntemi mikrodöküm yöntemine benzer bir yöntemdir. Litografi yöntemleriyle üretilen dişi kalıp üzerine termoplastik polimer kütle yerleştirilir. Kalıp ve polimer vakum altında ısıtılır. Isıl işleme birlikte esneklik kazanan polimer, kalıp üzerindeki oyuklara yerleşir. Ardından oda sıcaklığına soğutulur ve ayırma işleminin ardından mikroiğneler hazır hale gelir (Trautmann vd., 2005).

2.4.1.4.4. 3D Yazma

Günümüz itibariyle mikroiğne üretiminde en yeni yöntem 3D yazma yöntemidir. Bu yöntem kullanılarak en-boy oranı yüksek mikroiğnelerin üretimi sağlanabilmektedir. 3D yazıcı aracılığıyla sert mikroiğneler üretilmekte ve mikrodöküm yöntemi için kalıp olarak kullanmak mümkün olmaktadır (Krieger vd., 2019).

2.4.2. Mikroiğneler ile yapılan çalışmalar

Bir çalışmada Alzheimer hastalığında kullanılan bir ilaç olan amantadin HCl ve parkinson tedavisinde kullanılan pramipeksol HCl salımı, sert mikroiğnelerle muamele edilmiş domuz derisinde *in vitro* olarak incelenmiştir. Amantadin HCl'nin deriden geçişi iki katına kadar artarken, pramipeksol HCl'nin geçişini arttıran bir etkisi olmamıştır (Hoang vd., 2015).

Araştırmacılar, katı mikroiğne uygulanan deride iki antiepileptik ilaç olan karbamazepin ve tiagabin HCl'nin geçişini incelemiştir. Tiagabin HCl'nin deriden geçişi

yaklaşık yedi kat artmışken karbamazepinin geçişinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Nguyen vd., 2016).

Paslanmaz çelik mikroıǧneler, beyin tümörünün tespiti ve tedavisinde kullanılan 5-aminolevulinik asit ile kaplanmış ve domuz derisinde yapılan inceleme sonucunda %90 oranında etkin maddenin deriden geçtiği gözlenmiştir (Ita, 2018b).

Bir başka çalışmada SU-8 mikroıǧneler molibden ile kaplanmış ve sinirlerin uyarımı için elektrot olmak üzere tasarlanmıştır. Güncel kullanılan elektrotlara kıyasla mikroıǧne elektrotlar sinir uyarımında daha etkili bulunmuştur (Soltanzadeh vd., 2018).

Metal hazneli mikroıǧneler kaplama ve lazer kesim yöntemiyle üretilmiş ve transdermal insülin uygulaması için geliştirilmiştir. Mikroıǧneler deriye uygulanmış ve 4 saat içinde kontrol grubunda gözlenen glikoz seviyesindeki azalma %10 civarında iken, mikroıǧne uygulanan grupta bu oranın %40 civarında olduğu kaydedilmiştir (Davis vd., 2005).

Çok çeşitli gruptan etkin maddeler mikroıǧne formülasyonu geliştirmek için incelenmiştir. Yapılan çalışmalardan birinde karboksi metil selüloz (CMC) mikroıǧneler anti TNF- α antikolarıyla yüklenmiş ve farelerde geçiş etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda 5 dakika içerisinde, yüklenen antikoların %50'den fazlasının vücuda geçtiği tespit edilmiştir (Korkmaz vd., 2015).

Bir başka çalışmada yüksek dozlu kullanıma sahip olan ibuprofen sodyum içeren çözünen mikroıǧneler tasarlanmıştır. Çalışmada yüksek dozlu fakat düşük molekül ağırlıklı etkin maddelerin transdermal geçişini incelemek amaçlanmıştır. PVA, PVP, Eudragit® türleri aljinik asit gibi birçok polimer ile mikroıǧne üretimi için denemeler yapılmış fakat en uygun özellikleri taşıdığı için poli(metil vinil eter maleik asit) mikroıǧne üretimi için seçilmiştir. Franz difüzyon hücrelerinde yapılan salım çalışması sonucunda da $37,24 \pm 2,25$ mg ibuprofen sodyum içeren mikroıǧnelerden, 24 saat içinde %90 oranında etkin madde salımı gerçekleşmiştir (McCrudden vd., 2014).

2.5. *In situ* Jelleşen Sistemler

In situ jelleşen sistemler, uygulandığı yerde çözelti-jel geçişine uğrayan formülasyonlardır. *In situ* Latince kelime anlamı olarak "esas yerinde" demektir. Jel, katı ve sıvı arasında kalan bir madde halidir (Devasani vd., 2016; Kaur vd., 2016). Jel,

uygulama sırasında düşük viskoziteli çözelti halindedir. Uygulamadan sonra viskozite artmakta ve çözelti jelleşmektedir. Jel haline geçiş için pH, iyon değişikliği, sıcaklık, manyetik alan ya da biyolojik şartlar gibi birtakım değişiklikler gereklidir (Kopeček, 2007). Suda çözünen veya çözünmeyen, düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı birçok etkin madde ile uyumlu ve vücutla geçimliliği yüksek olan sistemlerdir (Aderibigbe, 2018).

Jeller, hidrojel ve organojel olmak üzere ikiye ayrılır. Hidrojeller suda çözünebilir polimerler ile su ve vücut sıvıları içinde şişerek ya da çözünerek hazırlanır. Organojeller ise suda çözünmeyen polimerler ile organik çözücülerle hazırlanır (Paul vd., 2017). Hidrojeller *in situ* yani yerinde oluşturulabilmektedir (Hoare ve Kohane, 2008). Hidrojeller katı, yarı katı ve sıvı hidrojel olarak sınıflandırılabilir. Katı hidrojel moleküller arasında iyonik veya kovalent yapılı çok güçlü çapraz bağlara sahiptir. Yarı katı hidrojel ise van der Waals, hidrojen bağları ve elektostatik etkileşimler gibi molekül yüzeyleri arasında oluşan, oldukça etkili bağlara sahiptir ve viskozitesi çok yüksektir. Sıvı hidrojel ise oda sıcaklığında sıvı haldedir. Ortamda pH, sıcaklık, manyetik alan, iyon değişikliği gibi bir uyaran bulunduğunda jel haline dönüşmektedir (Varaprasad vd., 2017). *In situ* jel sistemler için, uygulama kolaylığı sağladığı ve yerinde jel haline dönüştüğü için sıvı hidrojel tercih edilmektedir.

Burun damlaları ve spreyleri koku bölgesine etkin maddeyi ulaştırmakta yetersiz kalması nedeni ile beyine etkin madde taşımak amacı ile kullanılamamaktadır. Beyine ilaç taşımak için formülasyonun burun içinde kalış süresinin uzun olması gerekmektedir. Ancak mukozada yer alan siliaların hareketi sebebiyle bu süre kısıtlanmaktadır. Bu süreyi uzatmak adına yüksek viskoziteli formülasyonların geliştirilmesi ilk adım olmaktadır (Aderibigbe, 2018). *In situ* jelleşen formülasyonların uygulama sonrasında çözüldükten jelle dönüşümleri formülasyonun genizden akması engellenmekte ve kaybı azaltarak nazal mukozada formülasyonun daha uzun süre kalması sağlanmaktadır. Jel sistemlerin lokal ve sistemik etki oluşturmak amacıyla kullanımı mümkündür (Singh vd., 2013).

In situ jelleşen sistemler nazal uygulamalarda istenen yüksek viskoziteyi sağlayabilmektedir (Khan vd., 2017). Uygulama esnasında çözelti halinde olmaları kolaylık sağlamak ve uygulama sonrasındaki jel yapısına dönüşüm artan viskoziteye bağlı olarak burunda kalma süresini uzatmakta ve sonuç olarak nazal emilimin daha etkin olmasını sağlamaktadır (Aderibigbe, 2018).

Çözelti içinde bulunan polimerler, düz ve uzun zincirler halindedir. Bu zincirler belirli bir düzen içinde bir araya gelip ağısı bir yapı (veya iskele) oluşturduğu zaman jel halini almaktadır. Jel hali kimi zaman geri dönüşlü olabilir ve tekrar çözelti halini alabilmektedir (Redaelli vd., 2016). *In situ* jelleşen sistemlerde, uygulanan çözeltinin jel haline dönüşmesini; sıcaklık veya pH değişimi gibi fizyolojik değişiklikler, çözücü değişimi ya da şişme gibi formülasyondaki fiziksel değişiklikler ve UV radyasyon ve iyonik çapraz bağlanma gibi kimyasal tepkimeler sağlamaktadır. Burada gerçekleşen jelleşme işlemi geri dönüşlüdür ve jel oluşumunun uyarını ortadan kalktığında tekrar çözelti haline geçiş gözlenmektedir (Kaur vd., 2016).

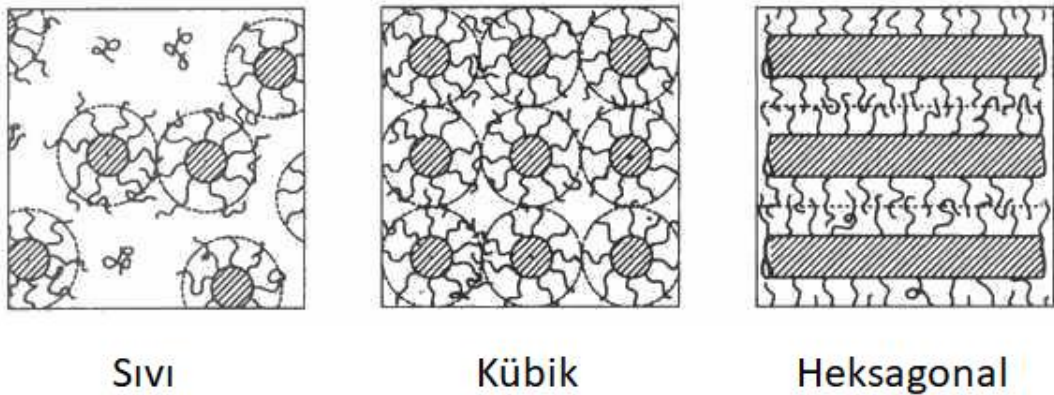
Elektromanyetik ışığa ile jelleşme aslında bir polimerizasyon işlemidir. Monomerlerden polimer sentezi yapılarak jelleşme sağlanmaktadır. Monomer çözeltisi dokuya uygulanmaktadır ve elektromanyetik dalgalar bölgeye uygulanarak jelleşme sağlanmaktadır. Akriyatlar bu işlem için uygun monomerlerdir. Elektromanyetik dalgalar yerine kısa dalga UV ve görünür bölge ışığı kullanılabilmekte ancak kısa dalga UV, dokudan geçişi sınırlı olduğu ve vücuda zararlı olduğu için pek tercih edilmemektedir (Mohanty vd., 2018).

İyonik çapraz bağlanma, bir başka *in situ* jel oluşturma yöntemidir. Karragenan, gellan zıncığı, pektin, sodyum aljinat gibi iyon duyarlılığı olan polimerler, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ gibi iyonların varlığında faz değiştirmektedir. Örnek olarak aljinik asitin zincirlerinde yer alan guluronik asit Ca^{2+} gibi +2 değerlikli katyonların varlığında çapraz bağlanarak jel oluşturmaktadır (Chand vd., 2016).

İyonik yapılara sahip polimerlerden oluşan jel sistemler buldukları ortamda proton alışverişi gerçekleştirerek pH değişikliğine sebep olmaktadır. Belirli bir pH değerinde, iyonlaşma derecesini belirten pK_a değeri şartıcı bir biçimde değişiklik göstermektedir. İyon yükünde gerçekleşen bu hızlı değişiklik, güçlü ozmotik şişmeye sebep olan iyonize gruplar arasında oluşan itme kuvvetinden kaynaklı ani hacim geçişine sebep olmaktadır. Bu durum jelleşme olarak gözlenmektedir. Anyonik ve katyonik olmak üzere iki tip pH duyarlı jel sistem vardır. Anyonik jellerde iyonik yapıyı karboksilik veya sülfonik asit grubu oluştururken, katyonik jellerde amin grupları oluşturmaktadır (Ullah vd., 2015). Carbopol, pH duyarlı jelleşme gösteren polimerlerden biridir (Wang vd., 2013).

Uygulama ve kontrol kolaylığı sağladığı için *in situ* jel sistemlerde en çok kullanılan uyaran sıcaklıktır (Devasani vd., 2016; Kaur vd., 2016; Mohanty vd., 2018). Polimerin yapısında yer alan hidrofil ve hidrofob kısımlar arasındaki denge ısı duyarlı *in situ* jel sistemler için önemlidir. Çünkü çözünen polimerin hidrofil ve hidrofob kısımlarının su ile olan etkileşimleri sıcaklıkla değişmektedir. Bu değişiklik çözelti-jel geçişini hızlandırmakta veya yavaşlatmaktadır (Chai vd., 2017). Jel-çözelti geçişi, polimerin özelliklerine göre sıcaklığın artmasıyla ya da azalmasıyla gerçekleşebilmektedir. Her iki sistem de ilaç taşıyıcı sistemler için uygundur ancak ısı artışıyla jelleşmenin gerçekleştiği sistemler daha çok tercih edilmektedir (Bajpai vd., 2008).

Sıcaklık artışıyla jel oluşumu gösteren sistemlerde mekanizma, polimerin hidrofobik kısmının etrafındaki su molekülleri ortamdaki sıcaklığın artmasıyla birlikte düzenini kaybetmektedir. Bu polimerler en düşük kritik çözelti sıcaklığı değerine sahiptir. Bu değer üzerindeki bir sıcaklıkta jel haline geçiş gözlenmektedir. Farklı polimer zincirindeki hidrofob bölgeler bu düzensizlikte karşı karşıya gelerek bağ oluşturmak üzere birbirini çeker ve hidrofil bölgeler de artan sıcaklıkla birlikte su ile oluşturdukları hidrojen bağlarını kaybederek, birbirleri arasındaki temasları arttırıp, tekrar düzene girmektedir. Polimer derişimi ve sıcaklık kritik noktanın üzerindeyse misel yapıları oluşturmaktadır. Jelin misel yapıda oluştuğu düşünülmektedir. Sıcaklık arttıkça misel yapılar sırasıyla sıvı, kübik ve heksagonal yapıya bürünmektedir (Şekil 2.8) (Başaran, 2008; Chonkar vd., 2015; Venkatesh vd., 2011).



Şekil 2.8. Sıvı, kübik ve heksagonal yapı (Escobar-Chávez vd., 2006)

Poli-N (izopropil akrilamid), polioksazon, Poloxamer[®] 407 ve poli organofosfazon ısıyla jelleşen sentetik polimerlerdir. Jelatin, selüloz ve türevleri, nişasta, dekstran, ksantan, zamk, karragenan, hyalüronik asit, poli- γ -glutamat, ksiloglukogan ve elastin ise ısıyla jelleşme gösteren doğal polimerlerdir (Chatterjee ve Chi-leung Hui, 2019; Karavasili ve Fatouros, 2016; Kaur vd., 2016). Kitosan ısıya tepki veren yarı sentetik bir polimerdir. Isı ile jelleşme gösteren polimerlerden en önemlisi ve en çok kullanılanı Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi polioksietilen-polioksipropilen gruplarından oluşan Poloxamer[®] 407 (Pluronic[®] F 127)’dir (Bajpai vd., 2008; Singh vd., 2013).

En fazla kullanılan polimerler arasında yer alan kitosan deniz kabuklularından elde edilen kitinden sentezlenen katyonik bir polisakkarittir. D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozaminin, β -(1-4) glikozit bağlarıyla birleşmesinden oluşan bir polimerdir. Sadece asidik ortamda çözelti oluşturmaktadır. Asitli ortama koyulduğu zaman, kitosan artı yüklenmekte ve bu da polimerin arasındaki bağların gevşemesini dolayısıyla suda çözünmesini sağlamaktadır. Isı duyarlı kitosan *in situ* jel elde etmek için genellikle ortama β -gliserofosfat gibi polioll tuzları eklenmektedir. Polioll tuzları kitosan etrafında bir kalkan gibi durarak pH artsa bile kitosanın çözünürlüğünü sürdürmesini sağlar (Supper vd., 2014; Wang vd., 2013).

Kitosan sıcaklığın artmasıyla jel haline geçen çözeltiler oluşturmaktadır. Jelleşme elektrostatik itme, hidrojen bağlarının kopması ve hidrofobik etkileşimlerin artması adımları sonrasında gerçekleşmektedir. β -gliserofosfatın nötrleşmesi ile kitosanın yapısında bulunan zincirler esnek bir hal almaktadır. Bu durum, etkin madde ve yardımcı maddelerin kitosan ile etkileşimini kolaylaştırmaktadır. Sıcaklığın artması kitosanın iç enerjisinin artmasına ve su ile kitosan arasındaki hidrojen bağlarının kopmasına sebep olmaktadır. Ardından kitosanın hidrofobik kısımları bir araya gelme eğilimi göstermektedir (Supper vd., 2014; Wang vd., 2013).

Kitosan biyo-yapışkan özelliği oldukça yüksek viskoziteli bir çözelti oluşturmaktadır. Buruna uygulandığı zaman jel haline geçmesinin de etkisiyle güçlü bir tutunma göstermektedir. Dolayısıyla siliaların temizleyici hareketine direnerek formülasyonun uzun süre burunda kalmasını ve biyoyararlanımın artmasını sağlamaktadır. Artı yüklü amin grupları ile mukoza içerisindeki eksi yüklü yapıların etkileşimi de etkin maddenin emilimini arttırmaktadır (Wang vd., 2013).

Çizelge 2.1. *In situ* jeller ile yapılan çalışmalar

Kullanılan Polimer	Uygulama Yeri	Etkin madde	Amaç	Kaynak
Kitosan ve Poloxamer® 407	Subkütan	Tramadol	Kontrollü salım sağlamak	(Barati vd., 2018)
Kitosan ve Poloxamer® 407	Ağız içi	Metronidazol, Levofloksasin	Kontrollü salım sağlamak	(Bansal vd., 2018)
Kitosan	Nazal	Traneksamik asit	Epistaksis tedavisi	(Gholizadeh vd., 2019)
Poloxamer® 407, Carbopol® 974P	Nazal	Buspiron hidroklorür	Anksiyete tedavisi	(Abdelnabi vd., 2019)
Poloxamer® 407	Nazal	Donepezil	Alzheimer tedavisi	(Patil vd., 2019)
Poloxamer® 188 Carbopol® 934	Nazal	Flutikazon propiyonat	Alerjik rinit tedavisi	(Saudagar ve Khandbahale, 2017)
Pluronic® F 127, Hidroksi propil metil selüloz (HPMC)	Nazal	Ropinirol	Parkinson Tedavisi	(Rao vd., 2017)
Poloxamer® 407	Nazal	Midazolam	Nöbet durumlarında ani salım sağlamak	(Parhizkar vd., 2017)
Poloxamer® 407, Carbopol® 934P	Nazal	Opiorfin	Analjezik etki ve beyine geçiş sağlamak	(Mura vd., 2018)
Poloxamer® 407, Poloxamer® 188	Nazal	Geniposit	Kontrollü salım ile nöroprotektif etki oluşturmak	(Wang vd., 2017)
Poloxamer® 407, CMC, Sodyum Aljinat, Carbopol® 974P	Nazal	Almotriptan	Migren tedavisi için nazal geçişi arttırmak	(Youssef vd., 2018)
Poloxamer® 407 HPMC	Nazal	Timolol Maleat	Kontrollü salım sağlamak	(Jagdale vd., 2016)
Poloxamer® 407, Poloxamer® 188	Nazal	Ketiapin Fumarat	Sıçanlarda beyine ilaç geçişinin incelenmesi	(Li vd., 2015)
Poloxamer® 407, PVP K30	Nazal	Asenapin maleat	Nazal biyoyararlanımı arttırmak	(Kulkarni ve Avachat, 2017)
Lutrol® F127 (Poloxamer® 407), PVP K30, Carbopol® 934, HPMC K4M	Nazal	Venlafaksin Hidroklorür	Nazal biyoyararlanımı arttırmak ve beyine ilaç geçişi sağlamak	(Bhandwalkar ve Avachat, 2013)
Ksiloglukan	Nazal	Ondansetron hidroklorür	Nazal biyoyararlanımı arttırmak	(Mahajan vd., 2012)

Yapılan bir çalışmada, kitosan-gliserofosfat ısı duyarlı jelleşen sistem içerisine doksepin yüklenerek nazal biyoyararlanımın artırılması ve depresyon tedavisinde kullanılmak üzere yeni bir ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Formülasyonlar, reolojik özellikler, mukozal geçiş ve etkin madde salımı gibi farklı yönlerden değerlendirilmiştir. Hazırlanan iki farklı formülasyonda da yedi saat içinde %50'nin üzerinde etkin maddenin salındığı tespit edilmiştir (Naik ve Nair, 2014).

Ksiloglukan, çift çenekli bitkilerde, hücre duvarının yapısında yer alan yarı-selüloz bir doğal polimerdir. Yer yer (1-2)- β -D-galaktozil bağı (1-6)- α -D-ksiloz ile dallanmış (1-4)- β -D-glukan zincirlerinden oluşmaktadır. Demirhindi tohumundan elde edilen ksiloglukan en çok kullanılan türüdür. Doğal ksiloglukan su içinde ısıya duyarlı jel olarak kullanılmaz ancak β -galaktozidaz ile kısmen parçalandığında elde edilen ürün ısıtıldığında geri dönüşlü olarak jel haline geçmektedir. 27-28 °C civarında jelleştiği ve nazal uygulamalarda erken jelleşme göstereceği için pek tercih edilmemektedir (Wang vd., 2013).

Bir çalışmada ksiloglukan jel içine ondansetron hidroklorür yüklenmiş ve biyoyararlanım tavşanlar üzerinde incelenmiştir. Ondansetron hidroklorür için oral biyoyararlanım %28,64 iken, nazal biyoyararlanım %52,79 olarak kaydedilmiştir (Mahajan vd., 2012).

Poloxamer[®] 1950'li yıllardan beri formülasyonların içinde yer almaktadır. Amerikan ve Avrupa farmakopelerinde de mevcuttur. Yapısında etilen oksit (EO) ve propilen oksit (PO) içerir ve EO_x-PO_y-EO_x şeklinde üç bloktan oluştuğu için blok kopolimer olarak isimlendirilmektedir. Kimyasal yapısı, HO[CH₂-CH₂-O]_x [CH-(CH₃)-CH₂O]_y [CH₂-CH₂-O]_xOH şeklindedir ve y 14'ten büyüktür. Pluronic[®], Synperonic[®] ve Tetronic[®] gibi ticari markaları mevcuttur ve sıvı, pat ve katı halde farklı zincir uzunluğuna sahip polimerler piyasadadır. Poloksamerler, potasyum hidroksit ya da sodyum hidroksit gibi bir alkali baz varlığında EO ve PO monomerlerinin tepkime vermesiyle oluşmaktadır. Kimyasal yapısında yer alan x ve y, HLB (hidrofil-lipofil denge) değeri üzerine etkilidir. Yani yapıda yer alan EO ve PO sayısına göre polimer hidrofil ya da lipofil yapı kazanmaktadır (Dumortier vd., 2006). Poloksamer 407'nin molekül ağırlığı ortalama (9840-14600) 12600 daldır. EO ve PO 2:1 oranında polimer yapısında yer almaktadır. Ağırlığın yaklaşık %70'i etilenoksittir ve polimere hidrofilik özellik kazandırmaktadır (Matanović vd., 2014).

Poloxamer[®] 407'nin sulu çözeltileri ısıya duyarlılık göstermekte ve belirli bir sıcaklığın üstünde jelleşmektedir. Bu duyarlılık, ilaç formülasyonları için oldukça kullanışlı bir özelliktir. Isıyla jelleşme çözelti-jel geçiş sıcaklığı ile nitelenen bir özelliktir. Polimerin farklı parçalarının etkileşimleri sonucunda jel oluşmaktadır. Sıcaklık arttıkça, önce miselleşme sonra da jel oluşumu gözlenmektedir. Ayrıca carbopol, etanol, poloksamer 188, polietilen glikol (PEG) gibi maddelerin ilavesiyle jelleşme sıcaklığı üzerinde değişiklikler yapılabilmekte ve formülasyon ona göre tasarlanabilmektedir (Dumortier vd., 2006).

Migren tedavisinde etkili olan sumatriptanın düşük oral biyoyararlanımı Poloxamer[®] 407 ve Carbopol[®] 934P kullanılarak hazırlanan 23,9-29,0 °C arasında jelleşme özelliğine sahip *in situ* jel formülasyonları ile nazal uygulama sonrasında biyoyararlanım, çözelti şekline kıyasla önemli ölçüde artmıştır (Karavasili ve Fatouros, 2016).

Bir başka çalışmada Parkinson tedavisinde kullanılan ropinirol için Pluronic[®] F127 ve HPMC ile *in situ* jelleşen sistemler geliştirilmiştir. Reoloji, jelleşme sıcaklığı ve etkin madde salımı açısından (*ex vivo*) değerlendirilen formülasyonlar, altı saat içinde %50-90 arasında değişen oranda salım gerçekleştirmiştir. Ayrıca *in vivo* yapılan çalışmalarda parenteral uygulama ile beyinde elde edilen etkin madde derişimi 40 ng.mL⁻¹ bulunurken, nazal uygulamada elde edilen derişim 70 ng.mL⁻¹ olmuştur (Rao vd., 2017).

Ketiapin fumarat, katı lipit nanopartiküllere yüklenerek Poloxamer[®] 407 ve Poloxamer[®] 188'den oluşan *in situ* jelleşen sistemler halinde formüle edilmiştir. Nazal uygulanan jel formülasyon oral ve parenteral uygulama kadar etkili olmuş ve etkin madde ilk geçiş etkisine uğramamıştır (Li vd., 2015).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

<u>Madde adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Asetik asit	Sigma, Almanya
Asetonitril	Merck, Almanya
Diyaliz membran	Sigma, Almanya
Döteryum oksit	Merck, Almanya
Dötero-Dimetil sülfoksit	Merck, Almanya
Eudragit® RL 100	Röhm, Almanya
Eudragit® RS 100	Röhm, Almanya
Eudragit® S 100	Röhm, Almanya
Fosfat tampon tuz tableti	Biomatik, ABD
Gliserin (%87)	Riedel-de Haën, Almanya
Hidroksi propil gama siklodekstrin	Sigma, Almanya
İzopropil miristat (IPM)	Merck, Almanya
Lakozamid	Santa-Farma İlaç
Orto fosforik asit	Merck, Almanya
Poli etilen glikol (PEG) 400	Merk, Almanya
Polisiloksan	Zhermark S.P.A, İtalya
Polivinil piroolidon	Sigma, Almanya
Poloxamer® 407	Sigma, Almanya
Sodyum aljinat	Sigma, Almanya
Yüksek viskoziteli kitosan	Fluka BioChemika, İsviçre

3.2. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
Diferansiyel taramalı kalorimetre	Shimadzu DSC-60, Japonya
Distile su cihazı	MiliQ Milipore, Fransa
Diyaliz membran	Sigma, Almanya (MWCO:14000)
Etüv	Nüve, Türkiye
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi	Shimadzu, Japonya
Hassas terazi	Mettler Toledo, ABD
Manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Mikropipet seti	Eppendorf, Almanya
Nükleer manyetik rezonans spektrofotometresi	Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Almanya
pH metre	Mettler Toledo, ABD
Reometre	Brookfield, Amerika
Santrifüj	Nüve, Türkiye
Su banyosu	GFL, Almanya
Taramalı elektron mikroskobu	Carl Zeiss SUPRA 50VP, Almanya
Termometre	Ebro, Almanya
Ultrasonik banyo	Wisd Laboratory Instruments, Kore
Vorteks	Jeoitech, Kore
Yatay çalkalayıcı	THYS, Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Shimadzu, Japonya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografi kolonu	Agilent, ABD

4. YÖNTEM

4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

Etkin madde miktar tayini gerektiren çalışmalar için Shimadzu marka yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) cihazı kullanılmıştır. Analiz çalışmaları için kullanılan YBSK yönteminin analiz koşulları Çizelge 4.1’de mevcuttur (Sreenivasulu vd., 2011).

Çizelge 4.1. YBSK çalışma koşulları

Cihaz	Shimadzu-20A
Kolon	Agilent 250x4.6 mm, 5µm
Fırın Sıcaklığı	40 °C
Mobil Faz	Asetonitril/Distile Su/O-fosforik asit (40/59/1; h/h)-pH: 2
Dedektör	Shimadzu Fotodiyot Dizisi
Dalga Boyu	210 nm
Akış hızı	1 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

4.1.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması

Analitik yöntem validasyonunun amacı, kullanılan yöntemin uygulanabilirliğini kanıtlamaktır. Kullanılan yöntemin doğruluk ve güvenilirlik parametreleri verilerle kanıtlanarak gösterilmektedir. Miktar tayini analitik yöntem validasyonunda doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada Uluslararası Harmonizasyon Kongresi’nin “Analitik İşlem Validasyon Yöntemi” kullanılmıştır (ICH, 2005).

4.1.1.1. Doğrusallık

Doğrusallık çalışması, numunede yer alan etkin madde miktarındaki artışa bağlı olarak analitik yöntemden elde edilen sonucun doğru orantılı bir biçimde arttığını göstermek amacıyla yapılmaktadır. Analizi yapılan maddenin farklı derişimlerdeki örneklerinin pik alanı ile belirli derişim aralığındaki değerler doğru orantılı olmalıdır. Doğrusallığın belirlenmesi için en az 5 farklı derişim ile çalışılmalıdır (ICH, 2005).

Çalışmamızda YBSK yönteminde kullanılacak olan lakozamide ait standart eğrinin bulunması için 100 µg.mL⁻¹ derişime sahip stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle 5-100 µg.mL⁻¹ arasında derişimlere sahip yedi farklı numune elde edilmiştir.

Analiz sonucunda yedi nokta için lakozamid derişimine karşılık gelen alan değeri belirlenmiştir. Her test altı kez tekrar edilmiştir.

4.1.1.2. Kesinlik

Analitik yöntemde kesinlik, öngörülen koşullar altında, aynı numunenin çoklu örneklemesinden elde edilen bir dizi ölçüm arasında dağılma derecesini ifade eder. Tekrar-İanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile belirlenir (ICH, 2005).

Tekrarlanabilirlik, kesinlik parametresini kısa bir zaman aralığında aynı çalışma koşulları altında ifade eder. Tekrarlanabilirliği tespit etmek için, aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin alan ölçümü tekrarlanır. Bu işlem 3 farklı konsantrasyonun altışar kez ölçümü ile gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin kesinlik çalışmasında, tekrarlanabilirliğin gösterilmesi için kalibrasyon aralığına karşılık gelen 3 farklı konsantrasyonda ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) lakozamid çözeltisi hazırlanmış ve 3 farklı günde 6 örnekle tekrarlanmıştır.

4.1.1.3. Doğruluk

Analitik validasyonda doğruluk parametresi, analitik yöntemin gerçek değer veya kabul edilmiş olan referans değere yakınlığını olarak belirtilir. Analitik yöntemde, belirtilen aralık boyunca doğruluk oluşturulmalıdır. Genel olarak belirlenen aralığın içinde yer alan üç farklı derişim, en az üçer örnek olmak üzere ölçüm yapılır. Sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak hesaplanmaktadır (ICH, 2005).

Yapılan çalışmada doğruluğun belirlenebilmesi için 3 farklı derişimde ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) lakozamid içeren çözelti hazırlanmıştır. Her bir çözelti için 6 kez ölçüm yapılmıştır.

4.1.1.4. Duyarlılık

Analitik yöntemlerde duyarlılık, numunede tespit edilebilen ancak kesin bir değer olarak verilemeyen en düşük analit miktarıdır. Tespit sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) hesaplanarak değerlendirilmektedir.

LOD, standart madde sinyalinin gürültüden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük madde derişimi olarak tanımlanmaktadır. Analitik yöntemde kullanılan cihaza bağılı

olarak değerin belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler arasında görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve elde edilen cevap ile eğimin standart sapması bulunmaktadır (ICH, 2005).

LOD değeri ICH klavuzunda yer alan denklem (4.1)'e göre hesaplanır.

$$LOD = \frac{3,3 \times \sigma}{m} \quad (4.1)$$

Denklem (4.1)'deki σ , y eksenini kesim noktasının standart sapmasını, m ise korelasyon denkleminin eğimini gösterir (ICH, 2005).

LOQ, analitik yöntemde standart maddenin miktarının güvenilir bir şekilde belirlenebildiği en düşük değeri ifade eder. LOD değerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler, LOQ için de uygulanabilir.

LOQ, uygun doğruluk ve kesinlik ile niceliksel olarak belirlenebilir. Bu değer ICH klavuzunda yer alan denklem (4.2) ile hesaplanabilir.

$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{m} \quad (4.2)$$

Denklem (4.2)'de yer alan σ y eksenini kesim noktasının standart sapmasını ve m değeri de korelasyon eşitliğinin eğimidir (ICH, 2005).

4.1.1.5. Seçicilik

Seçicilik analitik yöntemin sadece amaçlanan maddeyi tespit edebilme yeteneğidir. Analiz, ortamda bulunan diğer maddelerden kaynaklanabilecek olan girişimden etkilenmemelidir. Bileşiminde çok fazla maddenin yer aldığı numunelerin analizi sırasında istenilen maddenin eksiksiz tespit edilmesi gerekir (ICH, 2005).

Yapılan çalışmada yöntem seçiciliği için etkin maddesiz boş formülasyonlar (plasebo), miktar tayininde kullanılan çözücüler ve formülasyon geliştirmek için kullanılan bütün maddeler kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlardan formülasyonlardaki diğer bileşenlerin girişiminin lakozamidin seçiciliğine etkisi incelenmiştir.

4.2. Ön Formülasyon Çalışmaları

4.2.1. Lakozamid ile yapılan analizler

4.2.1.1. Termal analiz

Lakozamid'in (5 mg) termal analizi Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Cihazı (DSC-60, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MI, ABD) kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10 °C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300 °C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve etkin maddenin termogramı elde edilmiştir. Elde edilen termogram etkin maddenin formülasyon basamaklarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi amacı ile sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Lakozamid'in Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FT-IR) Analizi (IR Prestige- 21 Shimadzu, Tokyo, Japonya) 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrum etkin maddenin formülasyon basamaklarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi amacı ile sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

Lakozamid'in yapısal özellikleri, Nükleer Manyetik Rezonans (¹H-NMR) Analiz cihazında (Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Bruker, Rheinstetten, Almanya) 25 °C'de, çözücü olarak döteryumoksit ve dötoro-dimetilsülfoksit (D-DMSO) kullanılarak araştırılmıştır. Saf maddeye ait ¹H-NMR spektrumu etkin maddenin formülasyon basamaklarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi amacı ile sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2. Polimerler ile yapılan çalışmalar

4.2.2.1. Eudragit® S 100'e ait analizler

4.2.2.1.1. Termal analiz

Eudragit® S 100'ün (5 mg) termal analizi basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10 °C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300 °C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve polimere ait termogram DSC

analiz cihazı ile elde edilmiştir. Eudragit® S 100'e ait termogram sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Eudragit® S 100'ün FT-IR analizi, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Eudragit® S 100'e ait FT-IR spektrumu sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

Eudragit® S 100'ün yapısal özellikleri ¹H-NMR analiz yöntemi ile, 25 °C'de, çözücü olarak D-DMSO kullanılarak araştırılmıştır. Saf polimere ait ¹H-NMR analiz spektrumu sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.2. Karboksi metil selüloza ait analizler

4.2.2.2.1. Termal analiz

CMC'nin (5 mg) termal analizi DSC analiz cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10 °C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300 °C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve etkin maddenin termogramı elde edilmiştir. Saf polimere ait termogram sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.2.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

CMC'nin FT-IR analizi, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiş ve CMC'ye ait spektrum sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.2.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

CMC'nin yapısal özellikleri, 25 °C'de, çözücü olarak D-DMSO kullanılarak araştırılmış ve saf polimere ait ¹H-NMR spektrumu sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.3. Sodyum aljinata ait analizler

4.2.2.3.1. Termal analiz

Sodyum aljinat'ın (5 mg) termal analizi basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10 °C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300 °C

aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve etkin maddenin termogramı elde edilmiştir ve saf polimere ait termogram sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.3.2. *Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi*

Sodyum aljinat'ın FT-IR analizi, 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrum sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.3.3. *Nükleer manyetik rezonans analizi*

Sodyum aljinat'ın yapısal özellikleri, 25 °C'de, çözücü olarak döteryum oksit kullanılarak araştırılmıştır. Saf polimere ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.4. *Poloxamer® 407'ye ait analizler*

4.2.2.4.1. *Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi*

Poloxamer® 407'nin FT-IR analizi, 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Poloxamer® 407'ye ait spektrum sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.2.2.4.2. *Nükleer manyetik rezonans analizi*

Poloxamer® 407'nin yapısal özellikleri, 25 °C'de, çözücü olarak döteryum oksit kullanılarak araştırılmıştır. Saf polimere ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu sonraki analizlerde referans olarak kullanılmıştır.

4.3. Mikroigne formülasyonları ile ilgili çalışmalar

4.3.1. Mikrodöküm yöntemi ve kalıpların hazırlanışı

Mikroigne formülasyonlarının hazırlanmasında en çok tercih edilen yöntem olan "Mikrodöküm Yöntemi" kullanılmıştır. Mikrodöküm yöntemi kısaca formülasyonun çözelti halinde hazırlanmasının ardından uygun mikroigne kalıbına dökülerek kurutulması esasına dayanmaktadır (Şekil 2.7) (Larrañeta vd., 2016; Mogusala vd., 2015).

Tez çalışmamızda mikroignelerin oluşturulacağı kalıpların hazırlanmasında 25 yıldan uzun süredir diş hekimliği uygulamalarında, diş kalıplarının alınmasında güvenle

kullanılan polisiloksan ve katalizör maddeden oluşan “Zetaplus C Silicone Kit” kullanılmıştır ([http-1](#)).

Kit’in ana bileşeni olan polisiloksan çalışma aşamasında kolay işlenebilen ve sertleşmenin ardından yüksek sağlamlık gösteren bir yapı oluşturmaktadır ([http-1](#)).

Mikrodöküm yönteminde cilt uygulamalarında sıklıkla kullanılan 0,2 mm uzunluğa sahip titanyum Dermapen iğneleri, polimerler ile oluşturulacak mikro iğneler için pozitif kalıp (erkek kalıp; model iğne) olarak kullanılmıştır (Görsel 4.1) ([http-2](#)).



Görsel 4.1. Pozitif kalıp olarak kullanılan Dermapen iğneleri

Mikrodöküm yönteminde kısaca polisiloksan yapıları kit kullanılarak sabit oranlarda (polisiloksan:aktivatör, [10:1]; ağırlık/ağırlık a/a) homojen karışım hazırlanmış ve yüzeyinin düzgün hale getirilmesinin ardından iğneler ile birleştirilmiştir. Kalıpların sertleşmesi tamamlanmaya kadar 30 dk süre ile 25 ± 2 °C oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra titanyum iğneler kalıptan çıkarılmış ve negatif kalıplar (dişi kalıp) elde edilmiştir (Şekil 2.7) (Wang vd., 2017).

Tez çalışmamızda mikro iğne kalıplarının hazırlanmasında elastik bir polimer olan polisiloksan kullanılmıştır. Sabit miktarlarda alınan polisiloksan, sertleştirici özelliğe sahip madde ile homojen bir görünüm elde edilinceye kadar karıştırılmakta ve metal

mikroiğneler ile bir araya getirilerek sertleşme esnasında mikrooyukların oluşması sağlanmaktadır.

Hazırlanan kalıplara formülasyonu oluşturacak çözeltilerden 500 µL eklenmiş ve formülasyonların kalıp içindeki oyuklara tamamen yerleşmesini sağlamak amacı ile 4100 rpm'de on dakika süre ile dört kez santrifüj edilerek basınca maruz bırakılmıştır. Çözelti dolu kalıplar 50±2 °C sıcaklığında etüvde tutularak (~1-2 gün) çözücünün buharlaşması sağlanmıştır. Kuruyan mikroiğneler kalıplardan dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve analiz edilinceye kadar sıkı kapalı kaplarda nem çekmeyecek şekilde saklanmıştır.

4.3.2. Formülasyon geliştirme çalışmaları

Formülasyon geliştirme aşamasında, farklı araştırmacılar tarafından mikroiğne formülasyonlarının geliştirilmesi amacı ile yapılmış çalışmalar detaylı olarak araştırılmış ve çalışmamızda kullanılacak aday polimerler belirlenmiştir. Seçilen polimerlerin uygun çözücülerde farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiler tek başlarına ya da karışım halinde mikroiğne kalıplarına dökülerek oluşturdukları mikroiğneler açısından değerlendirilmiştir.

Tez çalışmamız kapsamında CMC, Eudragit® RL 100, Eudragit® RS 100, Eudragit® RL PM, Eudragit® RL PO, Eudragit® RS PM ve Eudragit® RS PO, Eudragit® S 100, PVP, sodyum aljinat polimerleri kullanılarak mikroiğne formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1. Eudragit® S 100 ile mikroiğne formülasyon çalışmaları

Eudragit® S 100, metakrilik asit ve metil metakrilat (1:2) karışımından oluşan anyonik bir polimerdir. Asidik ortamlarda ve suda çözünmezken, pH değeri 7 ve daha yüksek değerlerde çözünür özellik kazanmaktadır (Ansari vd., 2017).

Eudragit® S 100 ile hazırlanan formülasyonlarda çözücü olarak metanol kullanılmıştır. İzopropil miristat (IPM) ve PEG 400 gibi plastize edici maddelerin metanoldeki çözeltileri hazırlanmış ve polimer çözeltilerine farklı oranlarda eklenerek elde edilen mikroiğnelerin yapısal özellikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen mikroiğneler fiziksel olarak incelenmiş ve uygun formülasyonlar etkin madde yüklenmek üzere seçilmiştir.

4.3.2.2. Karboksi metil selüloz ile mikroğne formülasyon çalışmaları

CMC, genellikle sodyum tuzu şeklinde kullanılan selüloz türevi yarı sentetik bir polimerdir. Suda çözünebilir ve anyonik yapıda olan CMC çözeltileri viskoz bir yapıya sahiptir (Lopez vd., 2015).

Çalışmamızda CMC'nin sudaki çözeltisi %7,5 (g.mL-1) oranında hazırlanmış ve farklı yardımcı maddeler [Mannitol, maltoz, hidroksi propil-γ-siklodekstrin (HPCD), gliserin] ile oluşturulan polimer karışımları kullanılarak mikroğnelere hazırlanmıştır. Elde edilen mikroğnelere fiziksel olarak incelenmiş ve uygun formülasyonlar etkin madde yüklenmek üzere seçilmiştir.

4.3.2.3. Sodyum aljinat ile mikroğne formülasyon çalışmaları

Sodyum aljinat, kahverengi alglerden bazik ekstraksiyonlarla elde edilen doğal bir polimerdir. Yapısında mannuronik asit ve guluronik asit yer almaktadır. Sulu çözeltisi Ca^{++} iyonlarının varlığında hidrojel oluşturabilmektedir. Sulu çözeltisi oldukça viskoz bir yapıya sahiptir (Lee ve Mooney, 2012; Masuelli ve Illanes, 2014).

Çalışmamızda sodyum aljinatın distile suda farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmış ve farklı yardımcı maddeler ile mikroğnelere hazırlanmıştır. Elde edilen mikroğnelere fiziksel olarak incelenmiş ve uygun formülasyonlar etkin madde yüklenmek üzere seçilmiştir.

4.3.3. Uygun formülasyonların seçimi ve etkin madde içeren formülasyonların hazırlanması

Mikroğnelerin etkili bir biçimde ilaç salımını yapabilmesi için uygulanan bölgeden kırılmadan ve eğilmeden vücuda girmesi gerekmektedir (Serrano-Castañeda vd., 2018). Ayrıca özellikle mikrodöküm yönteminde yeterli esnekliğe sahip olması kalıplardan iğnelerin hasarsız çıkması ve uygulama sonrasındaki mikroğne bütünlüğünü koruması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle hazırlanan mikroğnelerin karakteristik özellikleri değerlendirilmiş ve yalnızca CMC, Eudragit® S 100 ve sodyum aljinat ile hazırlanan formülasyonlar nazal uygulama açısından kabul edilebilir sonuçlar ortaya koymuştur. Etkin madde, seçilen formülasyonlara üç farklı konsantrasyonda eklenmiş ve hazırlanan formülasyonlar üzerinde SEM, DSC, FT-IR, NMR, miktar tayini ve *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.3.4. Mikroïğnelerin karakterizasyon çalışmaları

4.3.4.1. Morfolojik İnceleme

Mikroïğnelerin morfolojik özelliklerinin ve iğne şekillerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM, Carl Zeiss SUPRA 50VP, Oberkochen, Almanya) kullanılmıştır.

4.3.4.2. Termal Analiz

Formülasyonların (5 mg) termal analizi DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10 °C.dk⁻¹ sıcaklık artışı ile 30-300 °C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve termogramları elde edilmiştir.

4.3.4.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Formülasyonların FT-IR analizi, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin FT-IR spektrumları, analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.3.4.4. Nükleer manyetik rezonans analizleri

Formülasyonların yapısal özellikleri, moleküller arası veya molekül içi olası değişimleri, ¹H-NMR analizi ile, 25±2 °C'de, formülasyonların çözünürlüğüne göre, çözücü olarak D-DMSO veya döteryum oksit kullanılarak analiz edilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin ¹H-NMR spektrumları, analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.3.4.5. Miktar tayini

Mikroïğnelere yüklenen lakozamid miktarı Çizelge 4.1'de yer alan analiz şartlarında YBSK yöntemi ile belirlenmiştir. Mikroïğne formülasyonları uygun çözücüler içinde çözüldürülmüş ve gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra analizler gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyon için işlem üç kez tekrar edilmiştir.

4.3.4.6. İn vitro salım çalışması

Mikroïğnelerin salım çalışması, salım ortamı olarak pH değeri 6,4 olan fosfat tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Abdelnabi vd., 2019). Salım çalışmaları

yapılacak mikroiğneler, sink koşul sağlanacak şekilde, 50 mL tampon çözeltisi içeren erlenin iç çeperine bir mıknatıs yardımıyla tutturulmuş ve manyetik karıştırıcı kullanılarak 37 ± 1 °C’de, 150 rpm karıştırma hızı altında salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir (n=3). Önceden belirlenen zaman aralıklarında (5 dk., 10 dk., 15 dk., 30 dk., 45 dk., 1sa., 1,25 sa., 1,5 sa., 2 sa., 4 sa., 6 sa., 9 sa., 12 sa., 24 sa., 48 sa., 72 sa., 96 sa.) 1 mL örnek alınmış ve gerekli seyreltmeler yapılarak etkin madde miktarları YBSK yöntemi ile belirlenmiştir.

4.4. *In situ* Jel Formülasyon Çalışmaları

4.4.1. Ön formülasyon çalışmaları

In situ jel formülasyonlarını oluşturmak üzere Poloxamer® 407 polimer olarak seçilmiştir. Poloxamer® 407’nin sulu çözeltileri konsantrasyonlarına göre değişen sıcaklıkta jel oluşturmaktadır (Dumortier vd., 2006). Jel formülasyonlarının hazırlanmasında iki farklı yöntem kullanılabilir; “Sıcakta Hazırlama Yöntemi” ve “Soğukta Hazırlama Yöntemi” (Güven, 2016). Tez kapsamında *in situ* jelleşen sistemlerin hazırlanmasında “Soğukta Hazırlama Yöntemi” kullanılmıştır. Poloxamer® 407’nin farklı konsantrasyonlara sahip çözeltileri 250 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcı üzerinde, 25 ± 2 °C oda sıcaklığında 6 saat süre ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Elde edilen çözeltiler 5 ± 3 °C’de 24 saat süre ile bekletilerek çözünmemiş madde varlığı olasılığı ortadan kaldırılmıştır.

Hazırlanan çözeltilerin jelleşme sıcaklıkları, nazal bölgenin $24,5\pm 2,5$ °C - $34\pm 2,5$ °C aralığında değişen sıcaklığı göz önünde tutularak 25 ± 1 °C - 37 ± 1 °C aralığında değerlendirilmiştir (Keck vd., 2000).

4.4.2. *In situ* jel formülasyonlarının hazırlanışı

Jelleşme sıcaklıkları belirlenmiş Poloxamer® 407 çözeltileri arasından en uygun jelleşme sıcaklığına ve en düşük Poloxamer® 407 konsantrasyonuna sahip çözelti seçilmiştir. Seçilen formülasyona lakozamid farklı konsantrasyonlarda eklenmiş ve oluşan karışımlar 250 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcı üzerinde 25 ± 2 °C oda sıcaklığında 6 saat süre ile karıştırılarak *in situ* jel formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar 5 ± 3 °C’de buzdolabında sıkı kapalı kaplarda saklanmıştır.

4.4.3. *İn Situ* jel formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları

Hazırlanan *in situ* jel formülasyonlarının karakteristik özellikleri fiziksel görünüş ve saydamlık, jelleşme kapasitesi ve şişme kapasitesinin belirlenmesi, pH, reolojik özellikler, FT-IR, ¹H-NMR, miktar tayini ve *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilerek değerlendirilmiştir.

4.4.3.1. *Fiziksel görünüş ve saydamlık*

Hazırlanan *in situ* jel formülasyonlarının fiziksel görünüşleri ve saydamlık özellikleri gün ışığı altında siyah zemin üzerinde görsel olarak incelenmiştir.

4.4.3.2. *Jelleşme kapasitesinin belirlenmesi*

Etkin madde yüklenen formülasyonların jelleşme kapasitelerini belirlemek amacı ile 30±1 °C'ye ısıtılmış 2 mL fosfat tamponu (pH: 6,4) içeren tüpe bir damla formülasyon damlatılmış ve jelleşme süresi belirlenmiştir. Hazırlanan formülasyonların jelleşme kapasiteleri Çizelge 4.2'de sunulan parametreler kullanılarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. *Jelleşme kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılan parametreler* (Güven, 2016)

Gözlem	Kod
Jelleşme oluşmadı	-
Jelleşme birkaç dakika içinde oluştu ve birkaç saat sürdü	+
Jelleşme hemen oluştu ve birkaç saat sürdü	++
Jelleşme hemen oluştu ve uzun süre sürdü	+++
Çok yoğun jel oluştu	++++

4.4.3.3. *Şişme kapasitesinin belirlenmesi*

İn situ jel formülasyonunun şişme çalışmasında 37±1 °C sıcaklıkta fosfat tamponu (pH: 6,4) kullanılmıştır. 1 mL formülasyon diyaliz membranına konup sızdırmayacak şekilde kapatılmış ve tampon çözeltisi içine yerleştirilmiştir. Tampon çözeltiye konulmadan önce ve belirli aralıklarla (30dk., 1s., 2s., 3s., 5s., 7s., 10s. ve 24s.) jel ağırlığındaki değişim belirlenmiş ve ağırlık değişimlerine bağlı olarak Denklem 4.3 kullanılarak *in situ* jel formülasyonlarının şişme yüzdesi hesaplanmıştır.

$$\% \text{şişme} = \frac{\text{jel ağırlığı}(t) - \text{jel ağırlığı}(t_0) \times 100}{\text{jel ağırlığı}(t_0)}$$

(4.3)

4.4.3.4. *pH analizleri*

Hazırlanan formülasyonların pH değerleri 4±1 °C, 10±1 °C 25±1 °C’de analiz edilmiştir (n=3).

4.4.3.5. *Reolojik analizler*

Hazırlanan formülasyonların reolojik özellikleri 5±1 °C ve 35±1 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta analiz edilmiştir. İki sıcaklıktaki viskozite değişimi kaydedilmiştir.

4.4.3.6. *Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi*

Formülasyonların FT-IR analizi, 4000-400 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin FT-IR spektrumları, analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.4.3.7. *Nükleer manyetik rezonans analizleri*

Formülasyonların yapısal özellikleri, moleküller arası veya molekül içi olası değişimleri, ¹H-NMR analizi ile, 25 °C±2 °C’de, formülasyonların çözünürlüğü dikkate alınarak, çözücü olarak döteryum oksit kullanılarak analiz edilmiştir. Saf maddenin ve polimerlerin ¹H-NMR spektrumları, analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

4.4.3.8. *Miktar tayini*

Jel formülasyonlara yüklenen lakozamid miktarı Çizelge 4.1’de yer alan analiz şartlarında YBSK yöntemi ile belirlenmiştir. Jel formülasyonları gerekli seyreltmeler yapıldıktan sonra analizler gerçekleştirilmiştir. Her bir formülasyon için işlem üç kez tekrar edilmiştir.

4.4.3.9. *İn vitro salım çalışması*

In situ jel formülasyonların salım çalışması diyaliz membran ile yapılmıştır (D’Souza, 2014). Gerçekleştirilen salım çalışmalarında pH değeri 6,4 olan fosfat tamponu, sink koşulu sağlayacak miktarda (50 mL), salım ortamı olarak kullanılmıştır.

Diyaliz membranlarına 1 mL formülasyon konmuş ve iki ucu sıkıca kapatılmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerinde (150 rpm) 37 ± 1 °C’de yapılan çalışmada önceden belirlenen zaman aralıklarında (15 dk., 30 dk., 45 dk., 1 sa., 2 sa., 4 sa., 6 sa., 8 sa., 10 sa., 24 sa., 48 sa., 72 sa.) 1 mL örnek alınmış ve gerekli seyreltmeler yapılarak etkin madde miktarları YBSK yöntemi ile belirlenmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

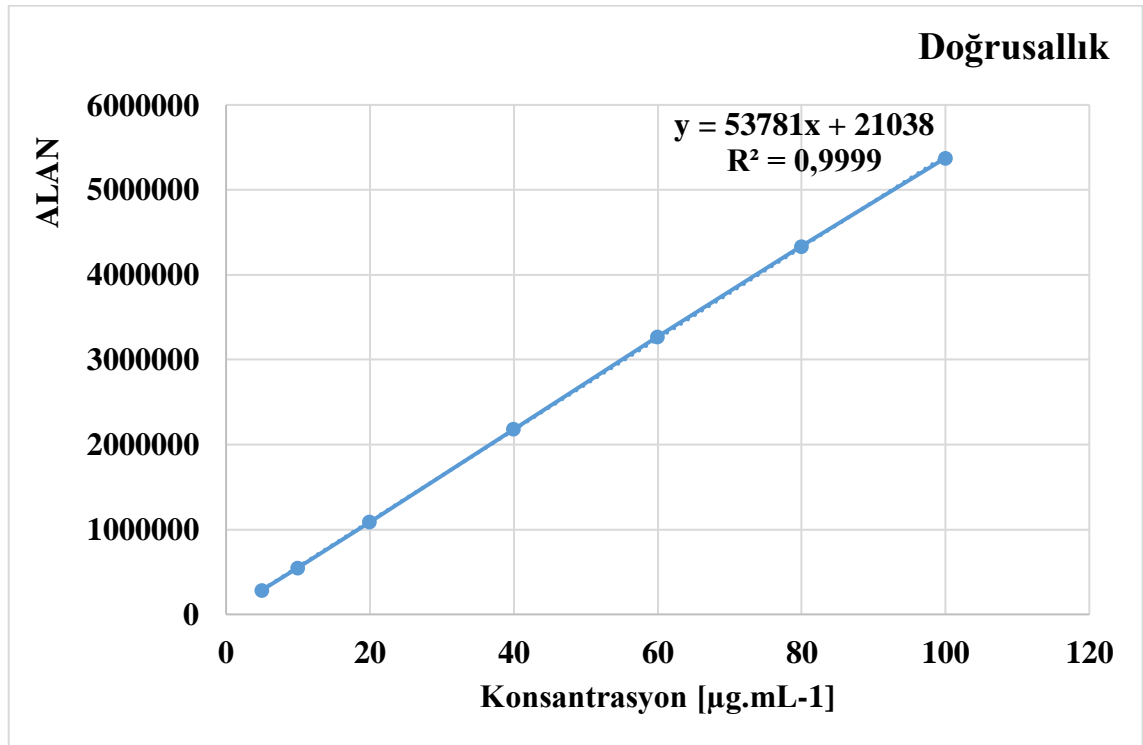
Lakozamid'in miktar tayini için Sreenivasulu vd., (2011) tarafından kullanılan YBSK yönteminde değişiklik yapılarak, en uygun pik morfolojisine ve seçicilik sonuçlarına ulaşılan parametreler belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

5.1.1. Analitik miktar tayini için validasyon çalışması

Etkin madde miktar tayini, *in vitro* salım çalışması gibi analitik tayin gerektiren deneysel aşamalarda kullanılacak YBSK için gerekli validasyon aşamaları aşağıda yer alan başlıklar altında değerlendirilmiştir.

5.1.1.1. Doğrusallık

Lakozamid'in asetonitrilde hazırlanan 5-100 µg.mL⁻¹ konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğru denklemi Şekil 5.1'de sunulmuştur (n=6).



Şekil 5.1. Lakozamide ait doğrusallık grafiği($\bar{x} \pm SH$, n=6)

5.1.1.2. Kesinlik

Etkin maddenin 5, 40, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişimde 3 farklı çözeltilisi asetonitril kullanılarak hazırlanmıştır. Üç farklı günde her derişim için 6 analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen eşitlik kullanılarak konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Konsantrasyonlara ait varyasyon katsayılarının belirlenmesiyle yöntemin kesinliği araştırılmıştır. Kesinlik çalışmasında elde edilen bulgular Çizelge 5.1’de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. Kesinlik çalışması bulguları

Derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1. Gün	2. Gün	3. Gün
5	4,986	4,964	5,044
	5,074	5,113	5,027
	5,094	5,084	5,056
	5,100	5,090	5,073
	5,046	5,098	5,073
	5,164	5,073	4,961
Ortalama	5,077	5,070	5,039
Standart Sapma	0,054	0,049	0,038
Varyasyon Katsayısı	1,068	0,970	0,759
%95 Güven Aralığı	0,043	0,039	0,030
40	40,523	40,639	40,055
	40,618	40,707	40,146
	40,438	40,729	40,167
	40,614	40,525	40,187
	40,448	40,558	40,228
	40,603	40,714	40,222
Ortalama	40,541	40,645	40,167
Standart Sapma	0,076	0,079	0,057
Varyasyon Katsayısı	0,187	0,194	0,144
%95 Güven Aralığı	0,060	0,063	0,046
100	100,710	100,442	99,157
	100,582	100,452	99,138
	100,620	100,462	99,280
	100,408	100,463	99,232
	100,403	100,592	99,091
	100,522	100,530	99,118
Ortalama	100,541	100,490	99,170
Standart Sapma	0,111	0,053	0,066
Varyasyon Katsayısı	0,109	0,053	0,066
%95 Güven Aralığı	0,088	0,042	0,052

Kesinlik çalışmalarında kabul edilebilir sınır varyasyon katsayısının %2'den düşük olmasıdır (Güven, 2016; ICH, 2005). Analiz sonuçları değerlendirildiğinde her konsantrasyon için elde edilen kesinlik değerlerinin kabul edilebilir sınırlar içerisinde olması yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır (Çizelge 5.1).

5.1.1.3. Doğruluk

Etkin maddenin 5, 40, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olacak şekilde bilinen üç farklı derişimde çözültisi asetonitril kullanılarak hazırlanıp her derişim için analiz, 6 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmalarında elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve teorik derişimler ile karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu %geri kazanım olarak hesaplanmıştır. Bulgular Çizelge 5.2'de sunulmuştur.

Çizelge 5.2. Doğruluk çalışması için hazırlanan seriler ve % geri kazanım bulguları

Derişim ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	5	40	100
Bulunan derişimler	5,046	40,448	100,403
	5,100	40,603	100,522
	5,098	40,558	100,592
	5,073	40,714	99,232
	5,073	40,187	99,280
	4,961	40,228	100,530
% Geri Kazanım	100,924	101,121	100,403
	102,012	101,508	100,522
	101,962	101,395	100,592
	101,478	101,785	99,232
	101,467	100,469	99,280
	99,239	100,570	100,530
Ortalama	101,393	101,141	100,093
Standart Sapma	1,209	0,481	0,594
Varyasyon Katsayısı	1,192	0,476	0,594
%95 Güven Aralığı	0,967	0,385	0,475

Doğruluk çalışmalarında % geri kazanım değerlerinin kabul aralığı $\% \pm 2$ olarak belirtilmektedir (Güven, 2016; ICH, 2005). Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde çalışmamızda yöntemin geri kazanım değerlerinin tümü $\% \pm 2$ kabul aralığı arasında değerler almış ve yöntemin doğruluğu uygun bulunmuştur (Çizelge 5.2).

5.1.1.4. Duyarluluk

LOD ve LOQ değerleri “4.1.1.4. Duyarluluk” bölümünde belirtilen Denklem (4.1) ve Denklem (4.2) ile hesaplanmış ve elde edilen veriler Çizelge 5.3’te sunulmuştur.

Çizelge 5.3. Duyarluluk çalışması bulguları

Denklem	Kesim noktası	Eğim (m)
1	15208	54196
2	22365	53974
3	25541	54172
Ortalama	21038	53780,667
Standart Sapma	4321,528	439,831
Standart Hata	2495,109	253,944
LOD	0,265 µg.mL⁻¹	
LOQ	0,803 µg.mL⁻¹	

Analitik yöntemin validasyon çalışmalarında kullanılan en düşük lakozamid konsantrasyonu 5 µg.mL⁻¹’dir. Hesaplanan LOD ve LOQ değerlerinin (sırası ile 0,265 ve 0,803 µg.mL⁻¹) 5 µg.mL⁻¹’den daha küçük değerler alması yöntemin duyarlılığının uygunluğunu kanıtlamaktadır.

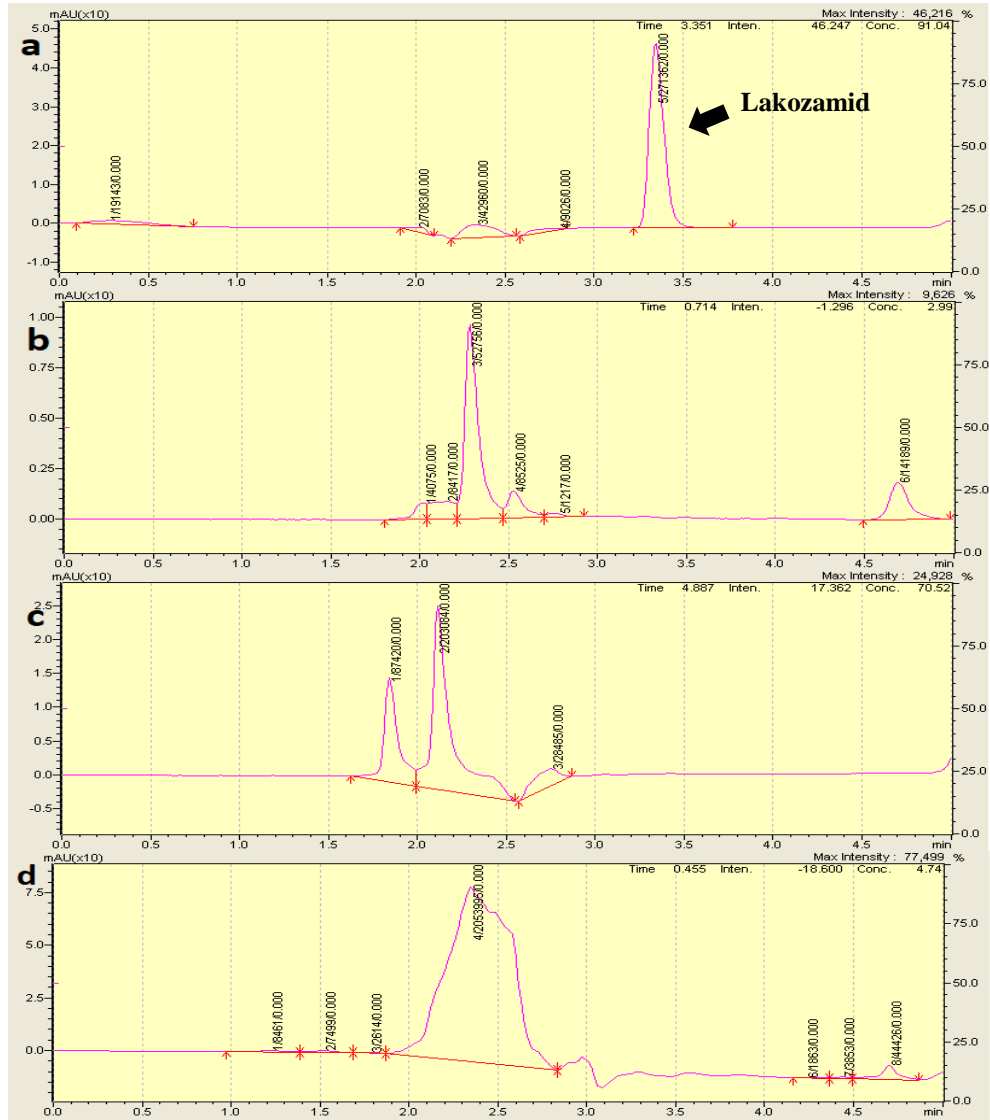
5.1.1.5. Seçicilik

Etkin madde ile formülasyon çalışmalarında kullanılan diğer bileşenlerin 210 nm’de YBSK çalışmalarında elde edilen sinyallerinin birbiri ile çakışma olasılıkları yöntemin seçicilik özelliğinin belirlenmesi amacı ile incelenmiştir (Şekil 5.2-5.6).

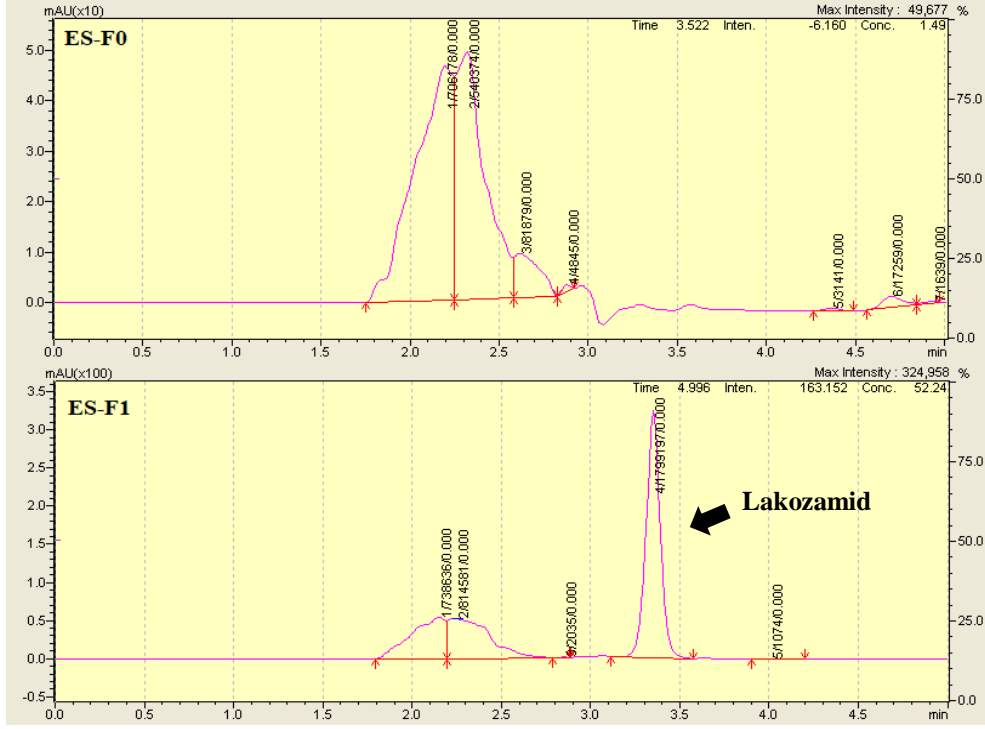
Formülasyon çalışmaları kapsamında CMC, Eudragit® RL 100, Eudragit® RS 100, Eudragit® RL PM, Eudragit® RL PO, Eudragit® RS PM ve Eudragit® RS PO, Eudragit® S 100, PVP, sodyum aljinat polimerleri kullanılarak mikroigne formülasyon çalışmaları ve Poloxamer® 407 ile *in situ* jelleşen sistemler hazırlanmış ancak ön değerlendirmeler sonucunda elde edilen veriler doğrultusunda çalışmalara Eudragit® S 100, CMC, sodyum aljinat ve Poloxamer® 407 ile hazırlanan sistemler ile devam edilmiştir. Bu nedenle tezde yalnızca seçilen polimerlere ait seçicilik analiz sonuçlarına yer verilmiştir (Şekil 5.2-5.6).

Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde etkin madde sinyalinin tüm formülasyon bileşenlerinin sinyallerinden uygun şekilde ayrıldığı belirlenmiştir (ok ile

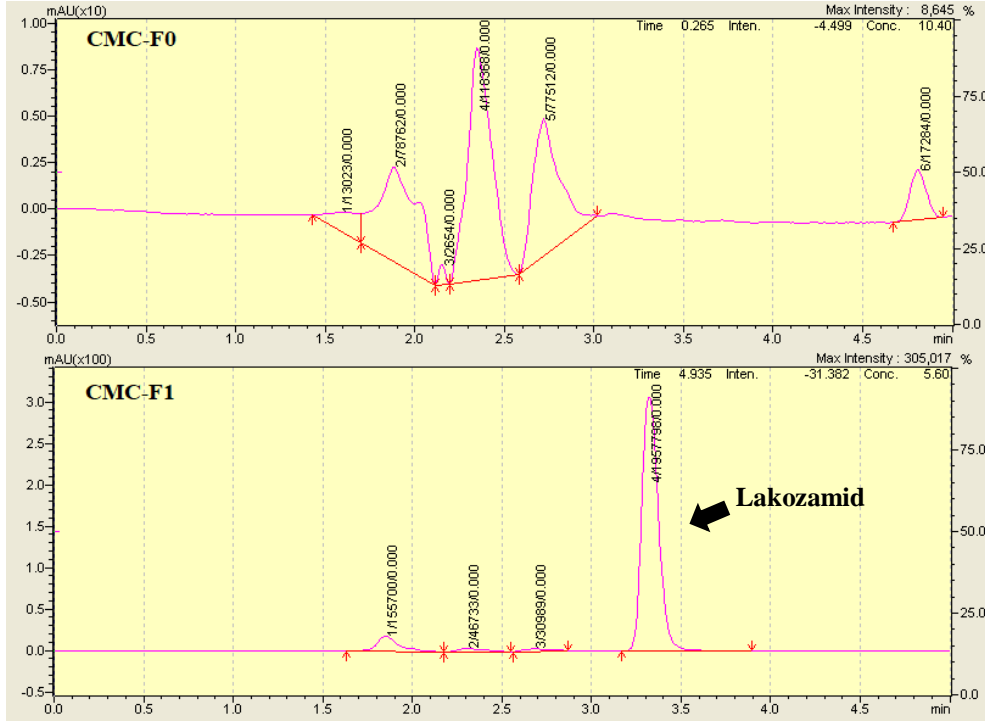
işaretle; Şekil 5.2-5.6). Analiz sonuçları dikkate alınarak kullanılan yöntemin Lakozamid'in YBSK ile gerçekleştirilecek kantitatif analizlerinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Şekil 5.2-5.6).



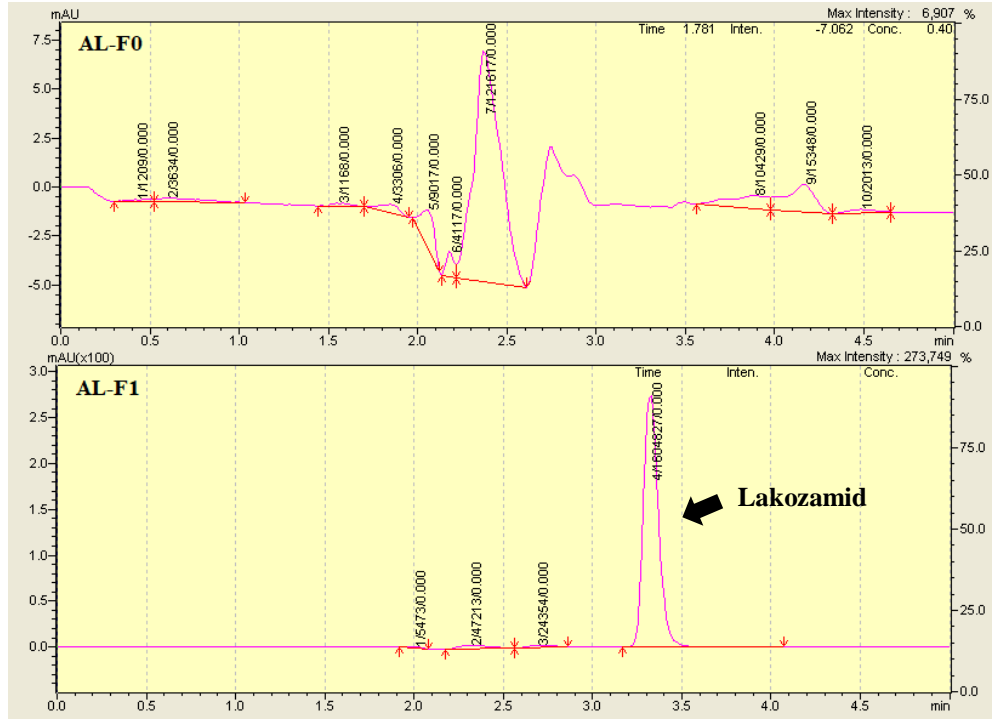
Şekil 5.2. Lakozamid (a), Mobil faz (b), Fosfat tampon (pH:6,4)(c) ve metanole (d) ait referans kromatogramlar



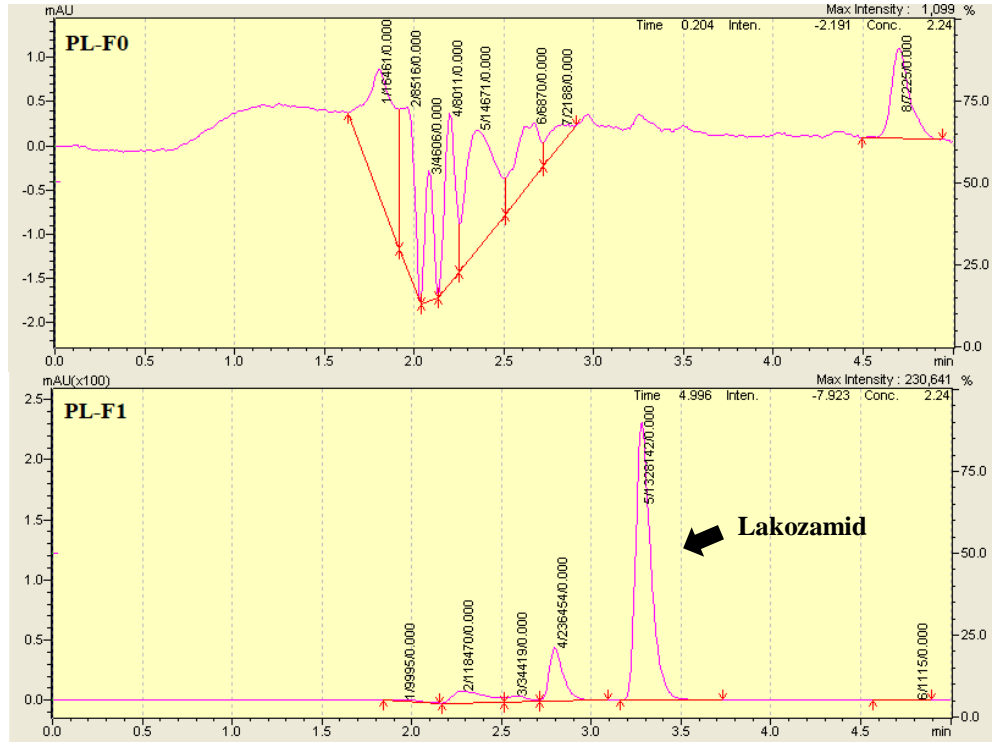
Şekil 5.3. Eudragit® S 100 ile hazırlanan formülasyonlara ait seçicilik kromatogramları;



Şekil 5.4. CMC ile hazırlanan formülasyonlara ait seçicilik kromatogramları



Şekil 5.5. Sodyum aljinat ile hazırlanan formülasyonlara ait seçicilik kromatogramları



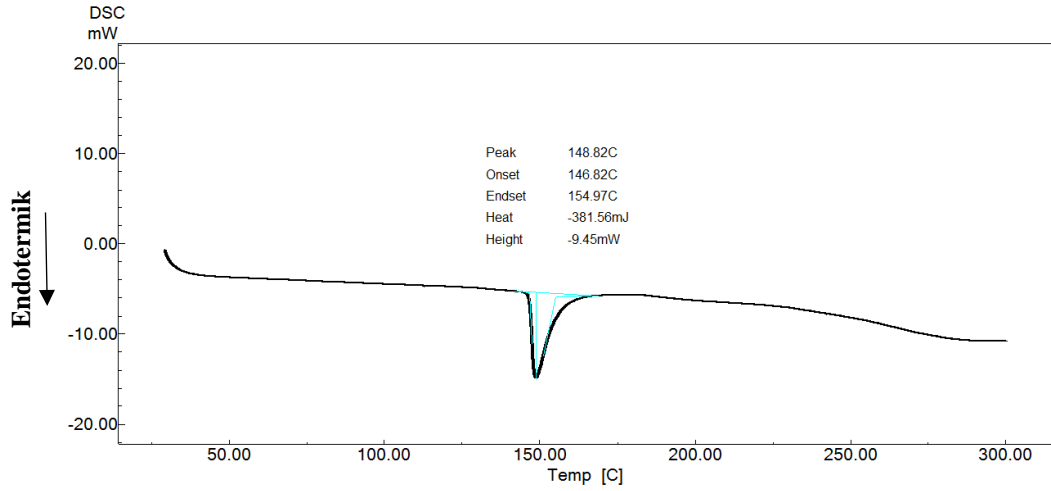
Şekil 5.6. Poloxamer® 407 ile hazırlanan formülasyonlara ait seçicilik kromatogramları

5.2. Ön Formülasyon Çalışmaları

5.2.1. Lakozamid ile yapılan analizler

5.2.1.1. Termal analiz

Lakozamid'in, DSC analiz cihazı ile 30-300 °C aralığında gerçekleştirilen termal analize ait DSC termogramı Şekil 5.7'de sunulmuştur.



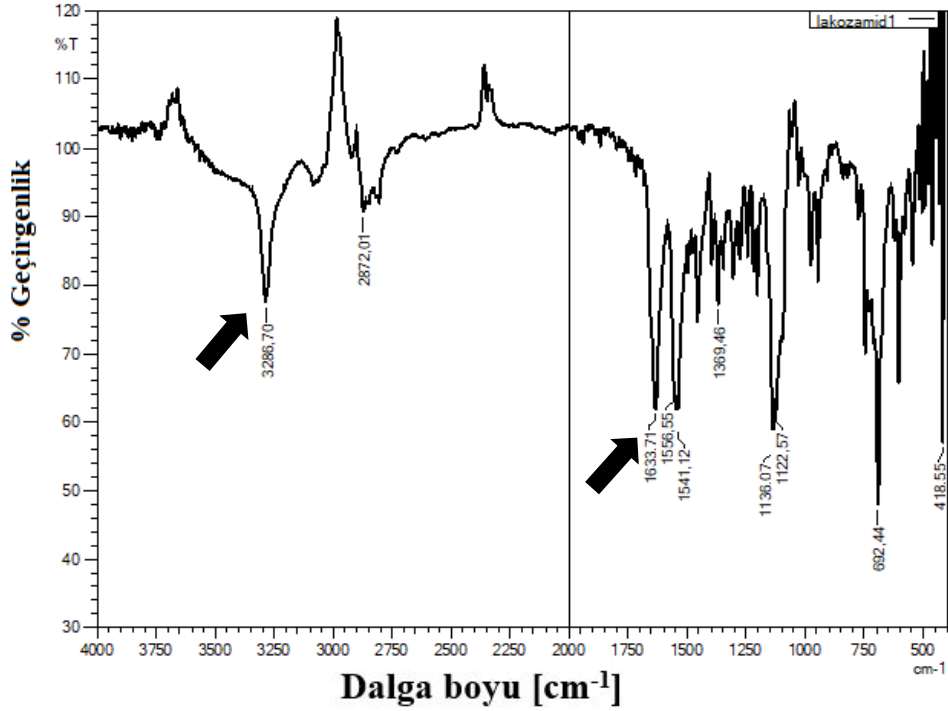
Şekil 5.7. Lakozamide ait DSC termogramı

Çalışmamızda, Lakozamide'e ait erime sıcaklığı 148,82 °C olarak bulunmuştur. Farklı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen analiz sonuçları ile karşılaştırıldığında paralel sonuçların elde edildiği gözlenmiş ve maddenin kristal yapıda olduğu termogramında endotermik erime pikinin gözlenmesi sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.7) (Han vd., 2019).

Çalışmalarda elde edilen saf maddeye ait termogram olası değişimlerin belirlenmesi amacı ile referans olarak kullanılmıştır.

5.2.1.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Lakozamid'e ait FT-IR spektrumu Şekil 5.8'de sunulmuştur.



Şekil 5.8. Lakozamide ait FT-IR spektrumu

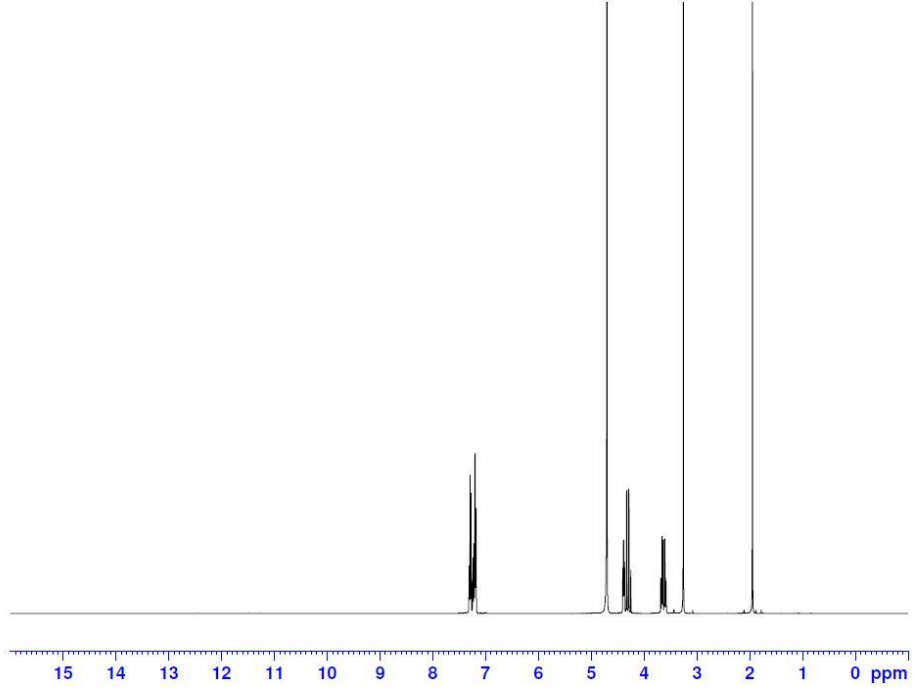
FT-IR spektroskopisi moleküler yapıyı ve moleküler etkileşimleri yansıtan önemli bir analizdir (Duygu vd., 2009). Çalışmamızda etkin maddenin formülasyon basamaklarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi ve olası yeni kimyasal bileşiklerin oluşumlarının değerlendirilebilmesi amacı ile elde edilen spektrum referans olarak kullanılarak FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.8) (Han vd., 2019).

1633 cm^{-1} 'de gözlenen keton (C=O) yapısına ait ve 3286 cm^{-1} 'de gözlenen amin (N-H) yapısına ait pikler lakozamide özgü pikler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5.8) (Han vd., 2019).

5.2.1.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

Lakozamide ait ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.9'te sunulmuştur.

Tez kapsamında hazırlanan, lakozamid içeren yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde meydana gelebilecek olası moleküler düzeydeki etkileşimleri belirlemek amacıyla ^1H -NMR analizleri gerçekleştirilmiştir (S.-J. Park ve Kim, 2011). Çalışmalarda elde edilen saf madde ve polimerlere ait spektrumlar formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır (Şekil 5.9).



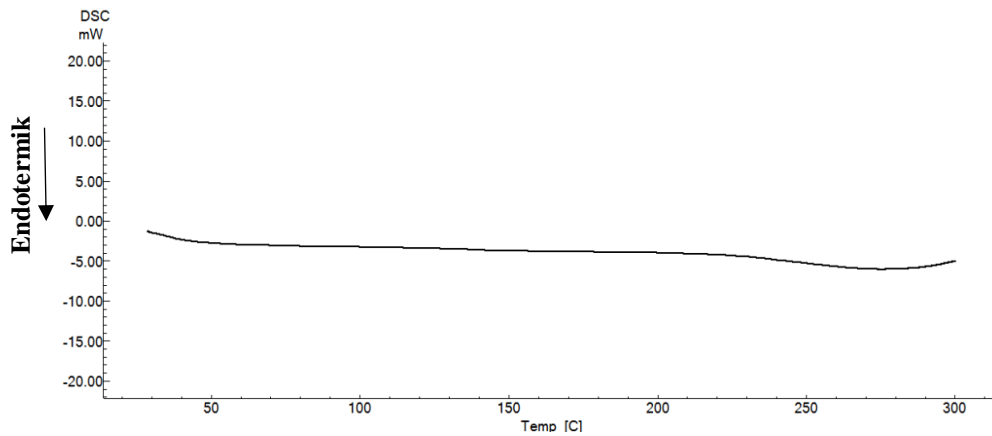
Şekil 5.9. Lakoamide ait 1H -NMR spektrumu

5.2.2. Polimerler ile yapılan çalışmalar

5.2.2.1. Eudragit® S 100'e ait analizler

5.2.2.1.1. Termal analiz

Eudragit® S 100'ün DSC ile 30-300 °C aralığında yapılan termal analizine ait termogram Şekil 5.10'da sunulmuştur.



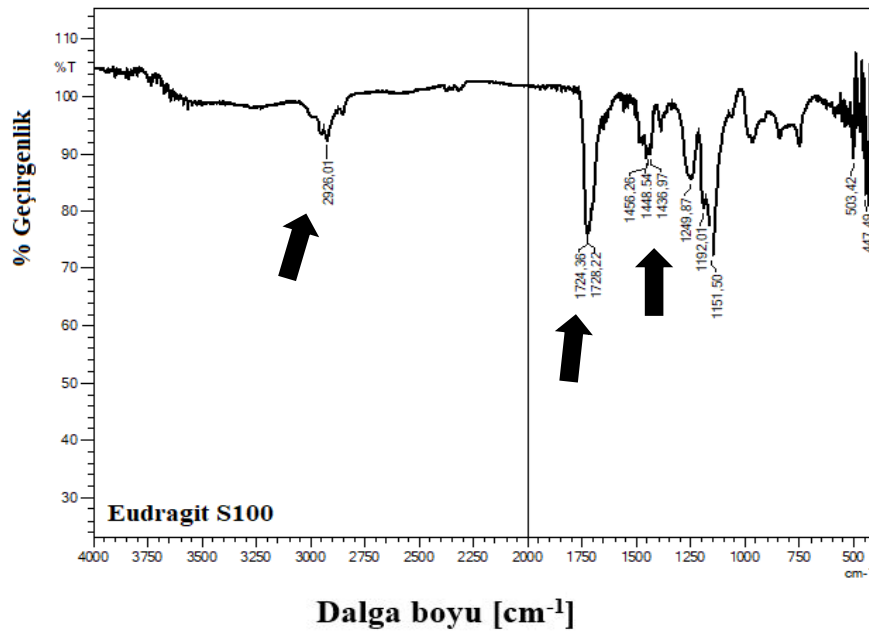
Şekil 5.10. Eudragit® S 100'e ait DSC termogramı

DSC analizi sonucunda elde edilen termogram incelendiğinde herhangi bir erime piki gözlenmemiş ve polimerin amorf yapıda olduğu diğer araştırmacılar tarafından

gerçekleştirilen çalışma sonuçlarını doğrulamaktadır (Şekil 5.10) (Manikandan vd., 2013; Öztürk vd., 2019). Ayrıca saf polimere ait elde edilen termogram polimerde oluşabilecek değişimlerin belirlenmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.1.2. *Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi*

Eudragit® S 100'e ait FT-IR spektrumu Şekil 5.11'de sunulmuştur.

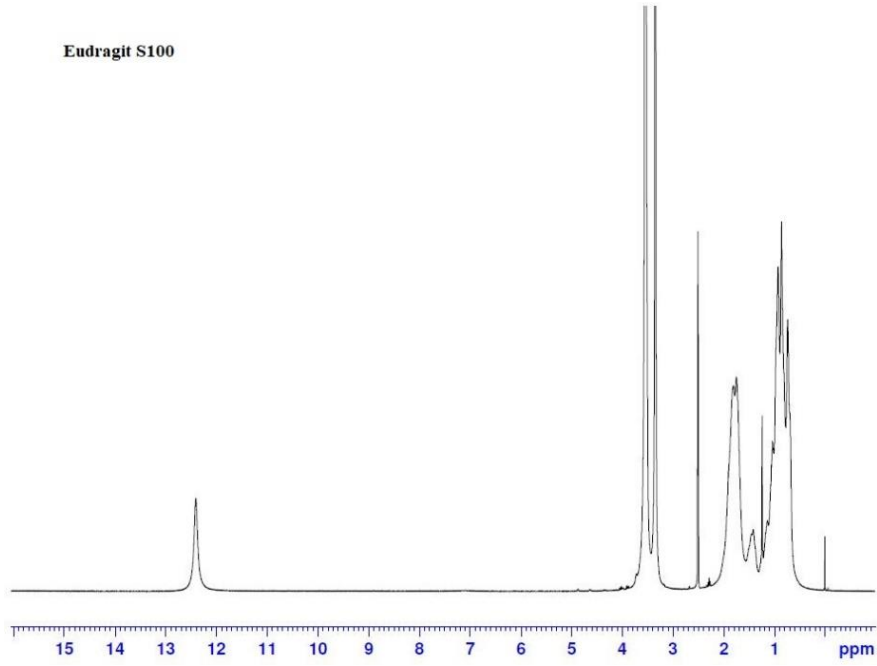


Şekil 5.11. Eudragit® S 100'e ait FT-IR spektrumu

Spektrum incelendiğinde $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$ 'de O-H, $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ 'de CH_3 ve $\sim 1724 \text{ cm}^{-1}$ 'de C=O gruplarına ait sinyaller kaydedilmiş ve analiz sonuçlarının daha önce gerçekleştirilmiş çalışmalar ile paralel sonuçlar oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 5.11) (Mehta vd., 2013). Ayrıca saf polimere ait elde edilen spektrum formülasyonlara ait analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.1.3. *Nükleer manyetik rezonans analizi*

Eudragit® S 100'e ait ^1H -NMR spektrumu Şekil 5.12'de sunulmuştur.



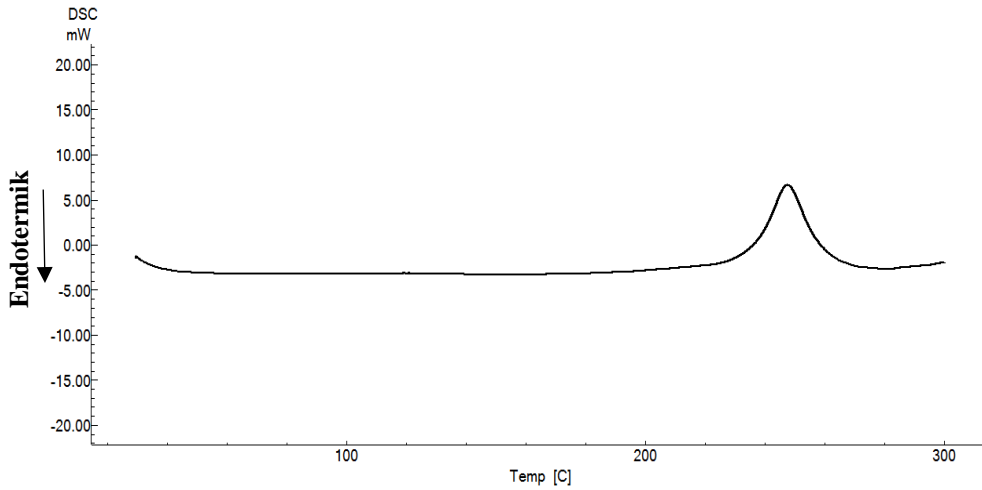
Şekil 5.12. Eudragit® S 100'e ait ¹H-NMR spektrumu

Çalışmalarda Eudragit® S 100'e ait ¹H-NMR analizi polimerin yapısal özelliklerinin detaylı olarak incelenebilmesi amacı ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen spektrum formülasyonların analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır (Şekil 5.12) (Park ve Kim, 2011).

5.2.2.2. Karboksi metil selüloza ait analizler

5.2.2.2.1. Termal analiz

CMC'nin DSC ile 30-300 °C aralığında yapılan termal analizine ait termogram Şekil 5.13'te sunulmuştur.



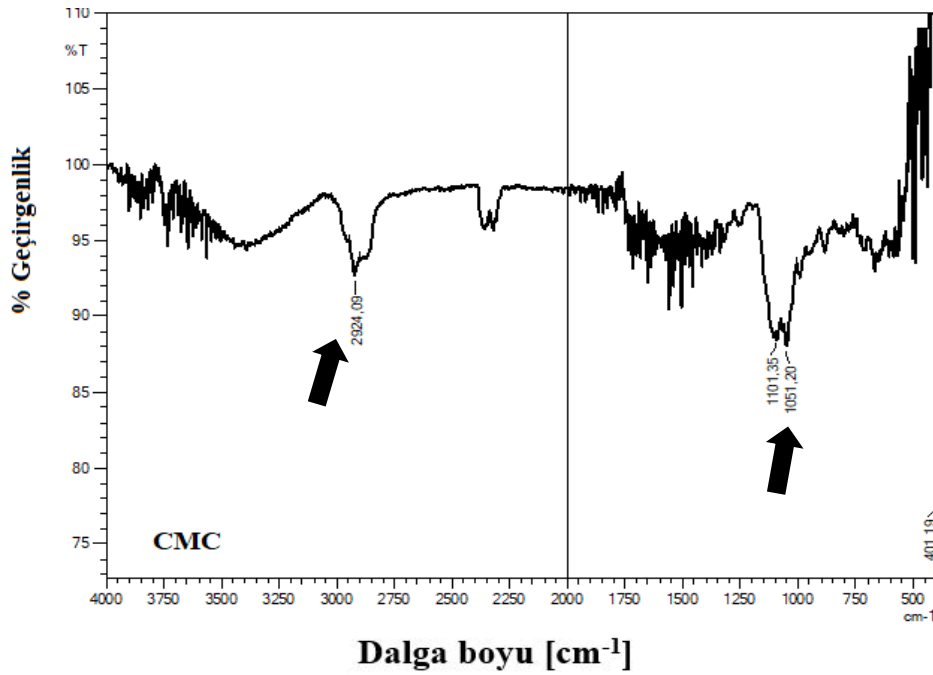
Şekil 5.13. CMC'ye ait DSC termogramı

Elde edilen termogram değerlendirildiğinde diğer pek çok polimerde olduğu gibi polimerin amorf yapısından dolayı herhangi bir endotermik erime piki gözlenmemiştir. Ancak termogramda ~ 260 °C’de ekzotermik bir pik belirlenmiştir (Şekil 5.13). CMC ile yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde yüksek sıcaklığa bağlı olarak maddenin dekompoze olmasının neticesi olarak bu pikin ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır (El-Sayed vd., 2011; Mali vd., 2018).

Formülasyon basamaklarında uygulanan en yüksek sıcaklığın 50 ± 1 °C olması nedeni ile meydana gelen bu bozunmanın formülasyonlar için sorun oluşturmayacağı açıktır.

5.2.2.2.2. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

CMC’ye ait FT-IR spektrumu Şekil 5.14’da sunulmuştur.



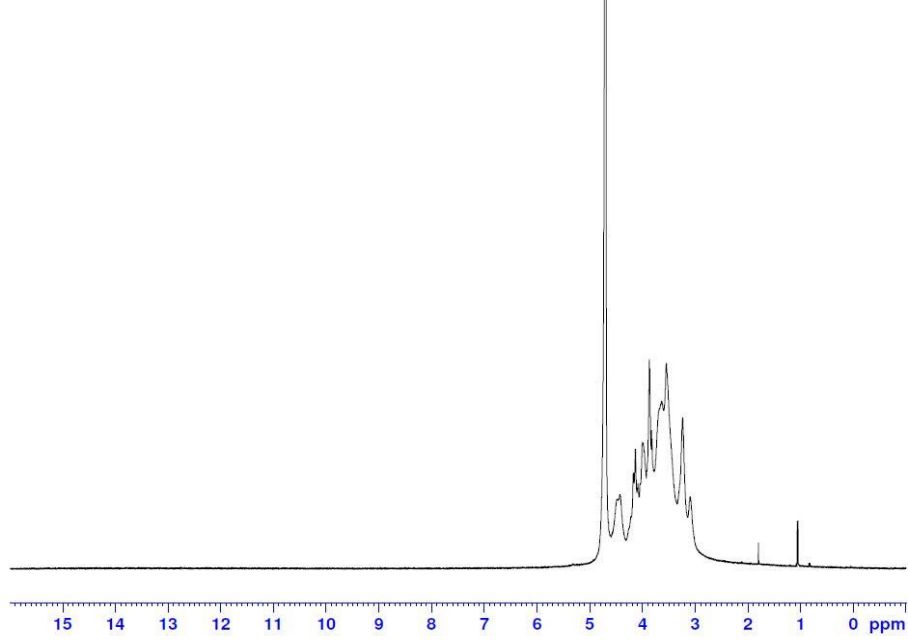
Şekil 5.14. CMC’ye ait FT-IR spektrumu

CMC’nin yapısında bulunan CH gruplarına ait pik 2924 cm^{-1} ’de, primer alkol grubuna ait pik ise 1051 cm^{-1} ’de gözlenmektedir (Şekil 5.14) (Malik vd., 2017; Tufan vd., 2016).

Elde edilen spektrum formülasyonların analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.2.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

CMC'ye ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 5.15'te sunulmuştur.



Şekil 5.15. CMC'ye ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

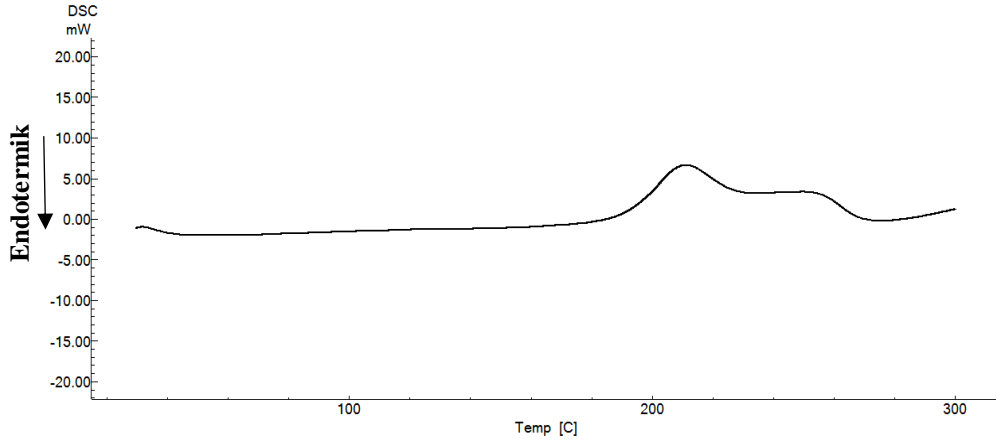
CMC, selülozun 2-, 3-, ve 6-pozisyonundaki hidroksil gruplarının etere dönüştürülmesi ile oluşturulmuş; çözünürlük ve viskozite gibi özellikleri selüloz zincirlerinin yanı sıra ester'e dönüşüm derecesine bağlı olarak değişkenlik gösterebilen bir polimerdir. Bu nedenle CMC'nin yapısal özelliklerinin belirlenmesi sonuç formülasyonların salım özellikleri açısından büyük önem taşımaktadır (Kono vd., 2016).

Çalışmada kullanılan CMC'nin $^1\text{H-NMR}$ analizleri gerçekleştirilmiş ve maddenin yapısal özellikleri belirlenmiştir (Şekil 5.15). Polimere ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.3. Sodyum aljinata ait analizler

5.2.2.3.1. Termal analiz

Sodyum aljinatın DSC ile 30-300 °C aralığında yapılan termal analizine ait termogram Şekil 5.16'da sunulmuştur.

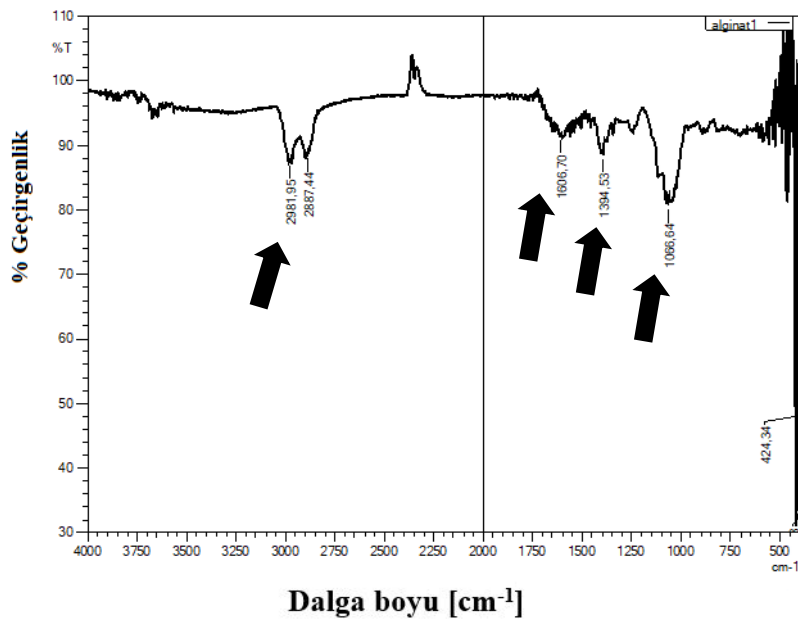


Şekil 5.16. Sodyum aljinata ait DSC termogramı

Gerçekleştirilen analiz sonucunda polimerin amorf yapısından dolayı herhangi bir erime piki gözlenmemiştir (Şekil 5.16) (Öztürk vd., 2019). Ancak sodyum aljinata ait dekompozisyon piki 200-220 °C aralığında geniş egzotermik pik ile belirlenmiştir (Şekil 5.16) (Helmiyata ve Aprilliza, 2017). Formülasyon basamaklarında uygulanan en yüksek sıcaklığın 50 ± 1 °C olması nedeni ile meydana gelen bu bozunmanın formülasyonlar için sorun oluşturmayacağı açıktır. Çalışmalarda elde edilen sodyum aljinata ait DSC termogramı formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.3.2. Fourier dönüştümlü kızıl ötesi analizi

Sodyum aljinata ait FT-IR spektrumu Şekil 5.17’de sunulmuştur.



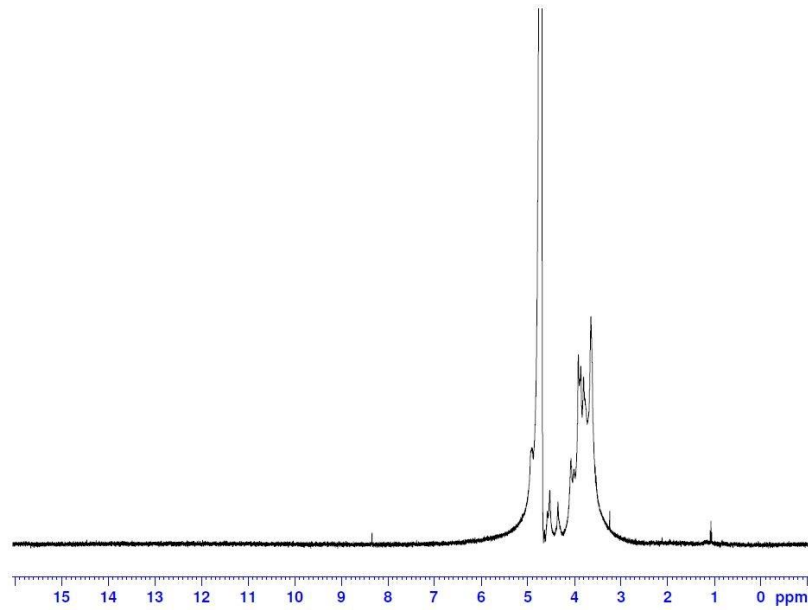
Şekil 5.17. Sodyum aljinata ait FT-IR spektrumu

Spektrum incelendiğinde $\sim 1000-1100\text{ cm}^{-1}$ 'de gelen pikler polisakkarit yapıdaki (C-O-C) glikozit bağlarının, $\sim 1394\text{ cm}^{-1}$ 'de ve $\sim 1606\text{ cm}^{-1}$ 'de gelen pikler ise karboksilat tuz (-COONa) gruplarının, $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ civarında oluşan iki pik de $-\text{CH}_2$ gruplarının varlığına işaret etmektedir (Şekil 5.17) (Kuzmanović vd., 2017).

Çalışmalarda elde edilen sodyum aljinata ait FT-IR spektrumu formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.3.3. Nükleer manyetik rezonans analizi

Sodyum aljinata ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 5.18'de sunulmuştur.



Şekil 5.18. Sodyum aljinata ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

$^1\text{H-NMR}$ spektroskopisi, sodyum aljinatın yapısal özelliklerinin belirlenmesinde en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (Fenoradosoa vd., 2010).

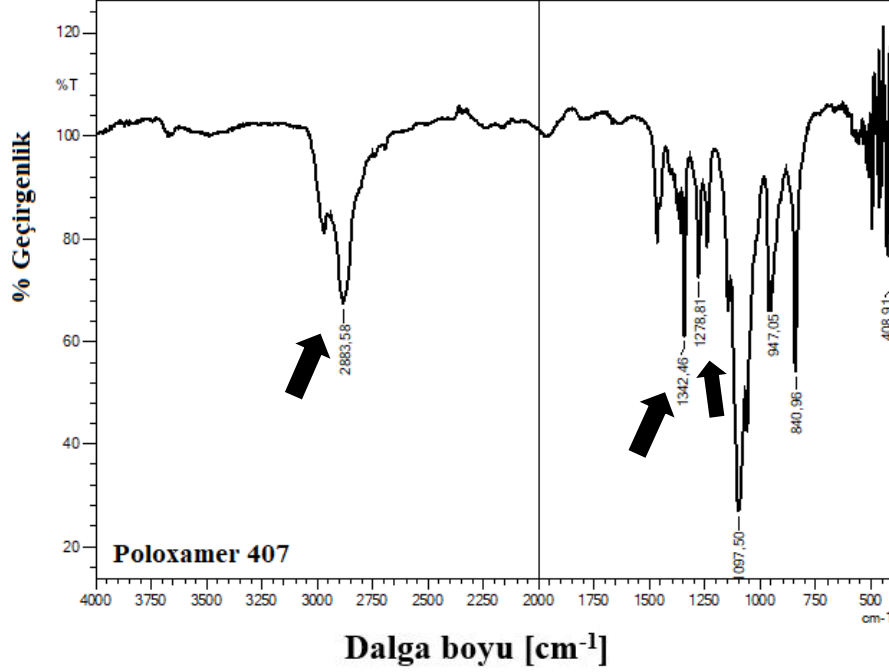
Çalışmalarda elde edilen sodyum aljinata ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.4. Poloxamer® 407'ye ait analizler

Tez çalışmalarında Poloxamer® 407 yalnızca *in situ* jel formülasyonların hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu nedenle bu bölümde Poloxamer® 407'ye ait analizlerden yalnızca *in situ* jel formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarında yer alacak analizlere yer verilmiştir.

5.2.2.4.1. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizi

Poloxamer® 407'ye ait FT-IR analizine ait spektrumu Şekil 5.19'da verilmiştir.



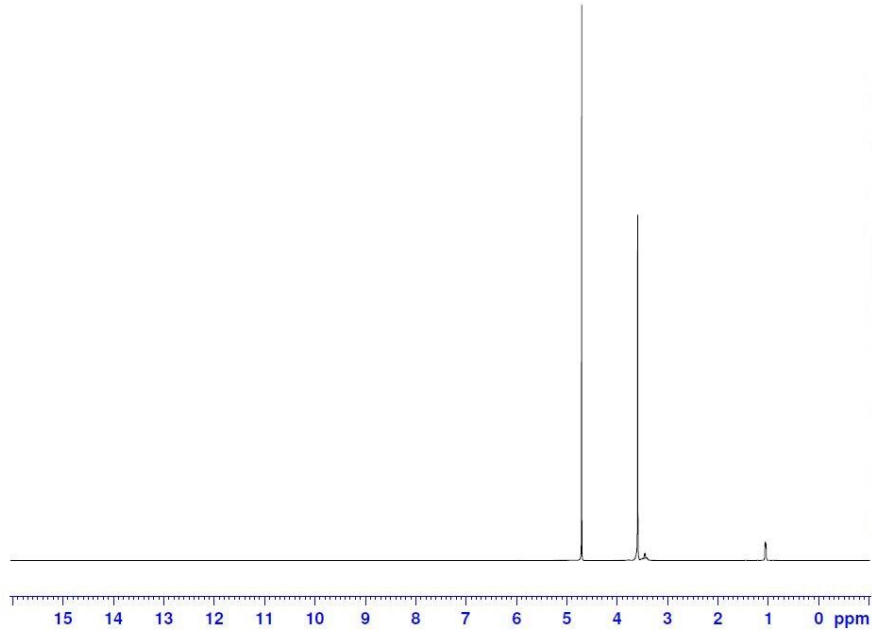
Şekil 5.19. Poloxamer® 407'ye ait FT-IR spektrumu

Poloxamer® 407'ye ait FT-IR analizinin spektrumu incelendiğinde başlıca ~ 2883 cm^{-1} (C-H alifatik gerilme), ~ 1342 cm^{-1} (O-H eğilme) ve ~ 1278 cm^{-1} (C-O gerilme) dalga boylarında karakteristik sinyaller elde edilmiştir (Şekil 5.19) (Garala vd., 2013; Vyas vd., 2009).

Çalışmalarda elde edilen Poloxamer® 407'ye ait FT-IR spektrumu formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.2.2.4.2. Nükleer manyetik rezonans analizi

Hazırlanacak formülasyonlarda polimer ile etkin madde arasındaki olası etkileşimlerin belirlenmesinde en önemli analiz NMR analizleri olarak tanımlanmaktadır (Moura vd., 2020). Bu nedenle saf madde ve polimerlerin ^1H -NMR analizleri gerçekleştirilerek formülasyon oluşum basamaklarının etkin madde ve polimer üzerindeki etkisi daha net ortaya konmaktadır (Ur-Rehman vd., 2010). Poloxamer® 407'ye ait ^1H -NMR analizine ait spektrum Şekil 5.20'de verilmiştir.



Şekil 5.20. Poloxamer® 407'ye ait ¹H-NMR spektrumu

Pluronic® F127 olarak da bilinen Poloxamer 407, iki hidrofilik polietileneoksit blokları arasında bir hidrofobik polipropilenoksit bloğu şeklinde sentezlenmiş 30'dan fazla blok kopolimerinden oluşan bir polimerdir (Ur-Rehman vd., 2010).

Elde edilen spektrumda polietileneoksit bloğunun metilen grubuna ait kısım 3,7 ppm'de keskin bir pik oluştururken, döteryum oksite ait keskin sinyal 4.7 ppm'de tek ve keskin pik şeklinde gözlenmiştir (Şekil 5.20) (Ur-Rehman vd., 2010).

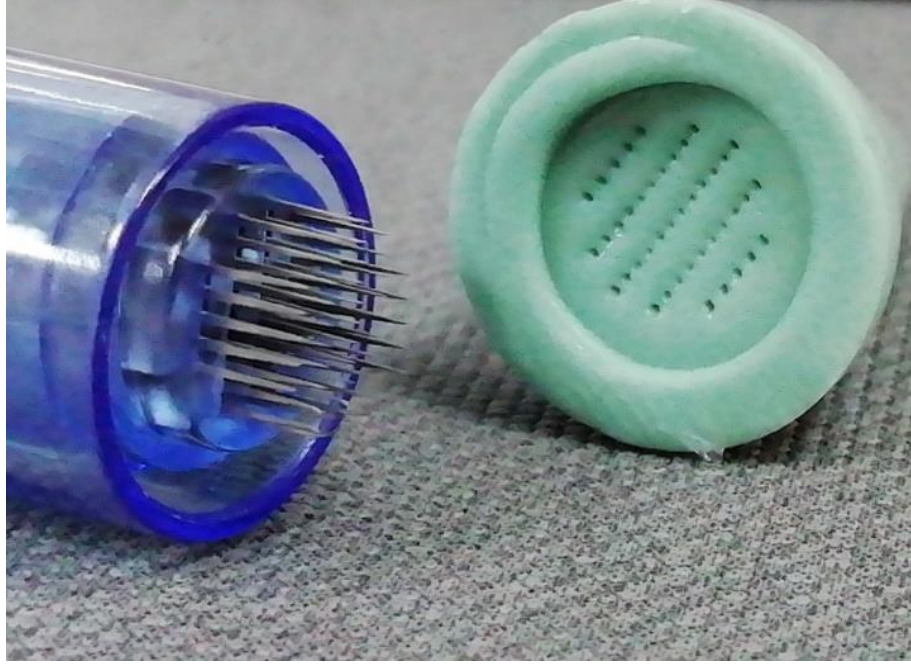
Çalışmalarda elde edilen Poloxamer® 407'ye ait ¹H-NMR spektrumu formülasyon analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

5.3. Mikroigne formülasyonları ile ilgili çalışmalar

5.3.1. Mikrodöküm yöntemi ve kalıpların hazırlanışı

Tez çalışmamızda mikroignelerin oluşturulacağı kalıpların hazırlanmasında diş hekimleri tarafından diş kalıplarının alınmasında uzun yıllardır güvenle kullanılan silikon bazlı Zetaplus C Silicone Kit kullanılmıştır ([http-1](#)).

Çalışmamızda mikroigne kalıpları 9 mm çapında ve 42 adet mikroigne içerecek şekilde hazırlanmış ve elde edilen kalıplara ait görsel Görsel 5.1'de sunulmuştur.



Görsel 5.1. Pozitif (sol) ve negatif (sağ) mikroığne kalıpları

5.3.2. Formülasyon geliştirme çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında CMC, Eudragit® RL 100, Eudragit® RS 100, Eudragit® RL PM, Eudragit® RL PO, Eudragit® RS PM ve Eudragit® RS PO, Eudragit® S 100, poli vinil piroidon, sodyum aljinat polimerleri kullanılarak mikroığne formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve hazırlanan formülasyonlar Çizelge 5.4’te sunulan kriterler doğrultusunda, kalıptan çıkma ve sertlik dereceleri açısından değerlendirilmiş ve hazırlanan formülasyonların içerikleri ile birlikte değerlendirme sonuçları Çizelge 5.5 – 5.9’de sunulmuştur.

Çizelge 5.4. Hazırlanan mikroığnelerin sertlik derecelerinin ve kalıptan çıkabilme özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan parametreler

Gözlem	Kod
Çok fazla esnek	-
Esnek	+
Sert	++
Yeterince sert	+++
Çok sert	++++
Kırılgan	+++++
Kalıptan çıkmadı	-
Kalıptan çıktı	+

Çizelge 5.5. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroiğne formülasyonları

Kod	Polimer (g.mL ⁻¹)	Yardımcı madde (h/h)	Karışım oranı	Kalıptan çıkma	Sertlik
ES1	Eudragit® S 100 (%4)	-	-	-	+++++
ES2	Eudragit® S 100 (%4)	IPM (%1)	2:1	-	++++
ES3	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%2)	1:1	-	+++++
ES4	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%2)	2:1	+	++++
ES5	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%2)	3:1	-	+++++
ES6	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%4)	1:1	+	+++++
ES7	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%4)	2:1	-	+++++
ES8	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%4)	3:1	-	+++++
ES9	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%8)	2:1	+	++++
ES10	Eudragit® S 100 (%8)	IPM (%8)	3:1	-	+++++
ES11	Eudragit® S 100 (%10)	PEG 400 (%2)	1:1	+	+
ES12	Eudragit® S 100 (%10)	PEG 400 (%2)	2:1	+	+
ES13	Eudragit® S 100 (%10)	PEG 400 (%2)	3:1	+	+++
ES14	Eudragit® S 100 (%10)	PEG 400 (%2)	4:1	+	++++

Çizelge 5.6. Karboksi metil selüloz ile hazırlanan mikroiğne formülasyonları

Kod	Polimer (g.mL ⁻¹)	Yardımcı madde 1 (g.mL ⁻¹)	Yardımcı madde 2 (h/h)	Karışım oranı	Kalıptan çıkma	Sertlik
CL1	CMC (%7,5)	-	-	-	+	++
CL2	CMC (%7,5)	HPCD (%10)	-	3:1	+	++++
CL3	CMC (%7,5)	HPCD (%10)	-	4:1	+	+++
CL4	CMC (%7,5)	HPCD (%10)	-	5:1	+	+
CL5	CMC (%7,5)	Mannitol (%5)	-	1:1	-	+++++
CL6	CMC (%7,5)	Mannitol (%5)	-	2:1	-	+++++
CL7	CMC (%7,5)	Mannitol (%5)	-	3:1	-	+++++
CL8	CMC (%7,5)	Maltoz (%10)	-	1:1	-	+++++
CL9	CMC (%7,5)	Maltoz (%10)	-	2:1	+	++++
CL10	CMC (%7,5)	Maltoz (%10)	-	3:1	+	++++
CL11	CMC (%7,5)	Maltoz (%10)	Gliserin (%2)	2:2:1	+	++++
CL12	CMC (%7,5)	Maltoz (%10)	Gliserin (%2)	4:2:1	+	+++++
CL13	CMC (%7,5)	Maltoz (%10)	Gliserin (%2)	6:2:1	+	+++++
CL14	CMC (%7,5)	-	Gliserin (%2)	1:1	+	++++
CL15	CMC (%7,5)	-	Gliserin (%2)	2:1	+	++++
CL16	CMC (%7,5)	-	Gliserin (%2)	3:1	+	++++

Çizelge 5.7. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğne formülasyonları

Kod	Polimer (g.mL ⁻¹)	Yardımcı madde	Yardımcı madde 2	Karıştırma oranı	Kalıptan çıkma	Sertlik
SA1	Sodyum aljinat (%5)	HPCD (%10)	-	3:1	+	++++
SA2	Sodyum aljinat (%5)	HPCD (%10)	-	3:2	-	+++++
SA3	Sodyum aljinat (%5)	Gliserin (%2)	-	1:1	+	+
SA4	Sodyum aljinat (%5)	Gliserin (%2)	-	2:1	+	+
SA5	Sodyum aljinat (%5)	Gliserin (%2)	-	3:1	+	+++
SA6	Sodyum aljinat (%5)	Gliserin (%2)	Tween® 80 (%1)	3:1	+	+++

Çizelge 5.8. Eudragit® sınıfına ait farklı polimerler ile hazırlanan mikroïğne formülasyonları

Kod	Polimer (g.mL ⁻¹)	Yardımcı madde (h/h)	Karışım oranı	Kalıptan çıkma	Sertlik
E1	Eudragit® RL100 (%10)	IPM (%12)	1:1	-	+++++
E2	Eudragit® RL100 (%10)	IPM (%12)	2:1	-	+++++
E3	Eudragit® RL100 (%10)	IPM (%12)	3:1	-	+++++
E4	Eudragit® RL100 (%12)	IPM (%15)	1:1	-	+++++
E5	Eudragit® RL100 (%12)	IPM (%15)	2:1	-	+++++
E6	Eudragit® RL100 (%12)	IPM (%15)	3:1	-	+++++
E7	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%5)	1:1	+	+
E8	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%5)	2:1	+	+
E9	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%5)	3:1	+	+
E10	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%0,5)	1:1	-	++++
E11	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%0,5)	2:1	-	++++
E12	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%0,5)	3:1	-	++++
E13	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%1)	1:1	-	++++
E14	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%1)	2:1	-	++++
E15	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%1)	3:1	-	++++
E16	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%1,5)	1:1	+	++++
E17	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%1,5)	2:1	+	++++
E18	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%1,5)	3:1	+	++++
E19	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%2)	1:1	+	++++
E20	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%2)	2:1	+	++++
E21	Eudragit® RL100 (%12)	PEG 400 (%2)	3:1	+	++++
E22	Eudragit® RLPM (%4)	-	-	-	+++++
E23	Eudragit® RLPM (%10)	IPM (%12)	1:1	-	+++++
E24	Eudragit® RLPM (%10)	IPM (%12)	2:1	-	+++++
E25	Eudragit® RLPM (%10)	IPM (%12)	3:1	-	+++++
E26	Eudragit® RLPM (%12)	IPM (%15)	1:1	-	+++++

E27	Eudragit® RLPM (%12)	IPM (%15)	2:1	-	+++++
E28	Eudragit® RLPM (%12)	IPM (%15)	3:1	-	+++++
E29	Eudragit® RLPO (%12)	IPM (%15)	1:1	-	+++++
E30	Eudragit® RLPO (%12)	IPM (%15)	2:1	-	+++++
E31	Eudragit® RLPO (%12)	IPM (%15)	3:1	-	+++++
E32	Eudragit® RS100 (%4)	-	-	-	+++++
E33	Eudragit® RS100 (%10)	IPM (%12)	1:1	-	+++++
E34	Eudragit® RS100 (%10)	IPM (%12)	2:1	-	+++++
E35	Eudragit® RS100 (%10)	IPM (%12)	3:1	-	+++++
E36	Eudragit® RS100 (%12)	IPM (%15)	1:1	-	+++++
E37	Eudragit® RS100 (%12)	IPM (%15)	2:1	-	+++++
E38	Eudragit® RS100 (%12)	IPM (%15)	3:1	-	+++++
E39	Eudragit® RSPM (%4)	-	-	-	+++++
E40	Eudragit® RSPM (%10)	IPM (%12)	1:1	-	+++++
E41	Eudragit® RSPM (%10)	IPM (%12)	2:1	-	+++++
E42	Eudragit® RSPM (%10)	IPM (%12)	3:1	-	+++++
E43	Eudragit® RSPM (%12)	IPM (%15)	1:1	-	+++++
E44	Eudragit® RSPM (%12)	IPM (%15)	2:1	-	+++++
E45	Eudragit® RSPM (%12)	IPM (%15)	3:1	-	+++++
E46	Eudragit® RSPO (%4)	-	-	-	+++++
E47	Eudragit® RSPO (%12)	IPM (%15)	1:1	-	+++++
E48	Eudragit® RSPO (%12)	IPM (%15)	2:1	-	+++++
E49	Eudragit® RSPO (%12)	IPM (%15)	3:1	-	+++++

Çizelge 5.9. PVP ile hazırlanan mikroigne formülasyonları

Kod	Polimer (g.mL⁻¹)	Yardımcı madde (h/h)	Karışım oranı	Kalıptan çıkma	Sertlik
E50	PVP (%10)	PEG 400 (%2)	1:1	-	+++++
E51	PVP (%10)	PEG 400 (%3)	1:1	-	+++++
E52	PVP (%10)	PEG 400 (%4)	1:1	-	+++++
E53	PVP (%20)	PEG 400 (%2)	1:1	-	+++++
E54	PVP (%20)	PEG 400 (%3)	1:1	-	+++++
E55	PVP (%20)	PEG 400 (%4)	1:1	-	+++++
E56	PVP (%30)	PEG 400 (%2)	1:1	-	+++++
E57	PVP (%30)	PEG 400 (%3)	1:1	-	+++++
E58	PVP (%30)	PEG 400 (%4)	1:1	-	+++++

Mikroigne formülasyonları için kullanılacak polimer seçilirken film yapıcı özelliğinin olmasına dikkat edilmiştir (Kathe ve Kathpalia, 2017). Bu özellik polimerin

esnekliğini belirlemekte ve mikroïğne oluşturma olasılığını göz önüne koymaktadır. Eudragit® polimerleri çok kırılğan bir film oluşturduğu için, mikroïğne formülasyonları hazırlanırken elastikleştirici bir başka polimere ihtiyaç duyulmuştur. HPCD ise mikroïğne yapısına dayanıklılık kazandırması için formülasyonlara eklenmiştir (Chen vd., 2014). Hazırlanan formülasyonlardan üç tanesinin etkin madde yüklemek için elverişli olduğu tespit edilmiştir.

5.3.3. Uygun formülasyonların seçimi ve etkin madde içeren formülasyonların hazırlanması

Hazırlanan mikroïğnelerin değerlendirilmesi sonucunda etkin madde yüklenmek üzere SA6, CL3 ve ES13 numaralı formülasyonlar ideal formülasyonlar olarak seçilmiş ve seçilen formülasyonlardan hareketle hazırlanan mikroïğne formülasyonlarının içerikleri Çizelge 5.10’da sunulmuştur.

Çizelge 5.10. Hazırlanan mikroïğne formülasyonlarının içerikleri

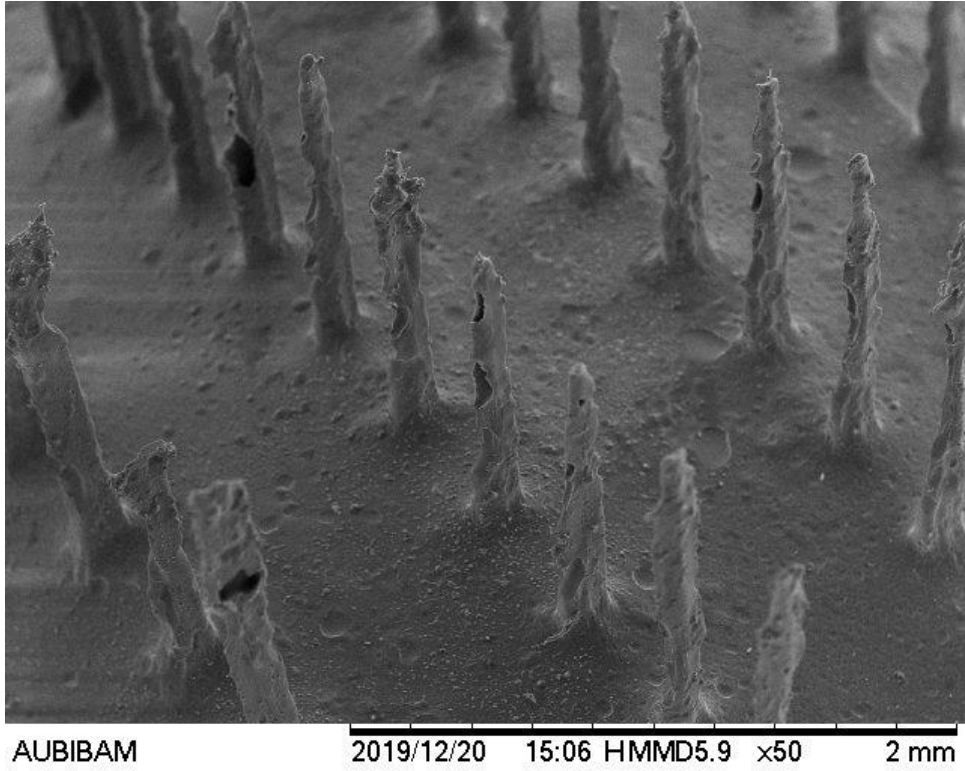
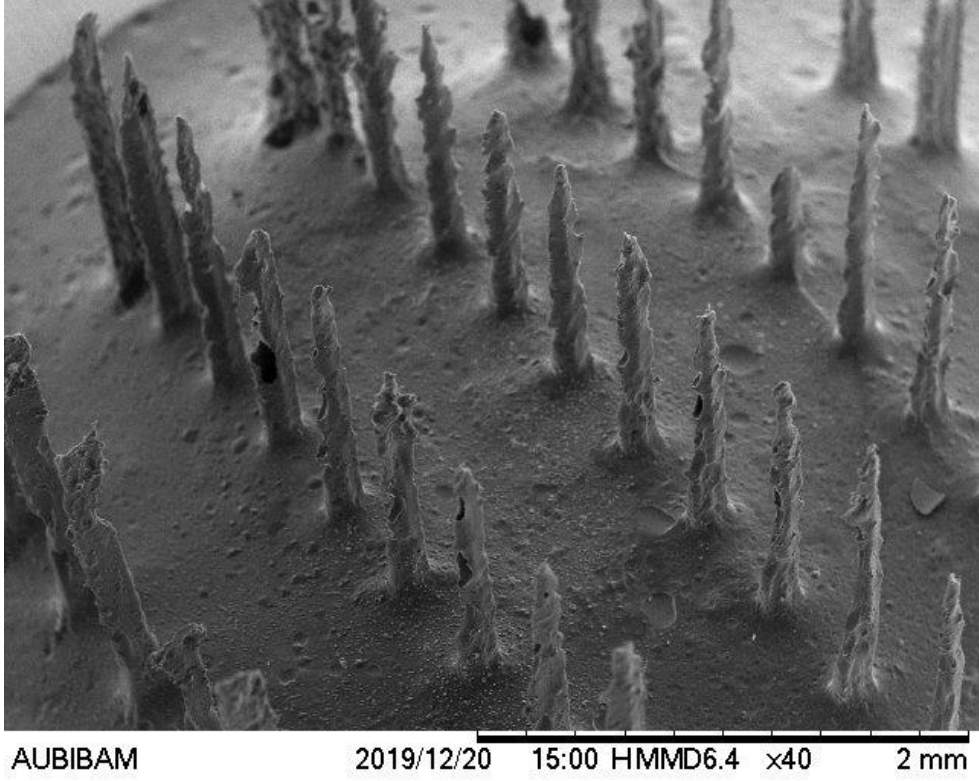
Kod	Sodyum Aljinat (g.mL ⁻¹)	Gliserin (h/h)	Tween® 80 (h/h)	CMC (g.mL ⁻¹)	HPCD (g.mL ⁻¹)	Eudragit S100 (g.mL ⁻¹)	PEG 400 (h/h)	Lakozamid (g.mL ⁻¹)
ES-F0	-	-	-	-	-	%7,5	%0,5	-
ES-F1	-	-	-	-	-	%7,5	%0,5	%0,5
ES-F2	-	-	-	-	-	%7,5	%0,5	%1,0
ES-F3	-	-	-	-	-	%7,5	%0,5	%1,5
CMC-F0	-	-	-	%6	%2	-	-	-
CMC-F1	-	-	-	%6	%2	-	-	%0,5
CMC-F2	-	-	-	%6	%2	-	-	%1,0
CMC-F3	-	-	-	%6	%2	-	-	%1,5
AL-F0	%4	%0,5	%1	-	-	-	-	-
AL-F1	%4	%0,5	%1	-	-	-	-	%0,5
AL-F2	%4	%0,5	%1	-	-	-	-	%1,0
AL-F3	%4	%0,5	%1	-	-	-	-	%1,5

5.3.4. Mikroïğnelerin karakterizasyon çalışmaları

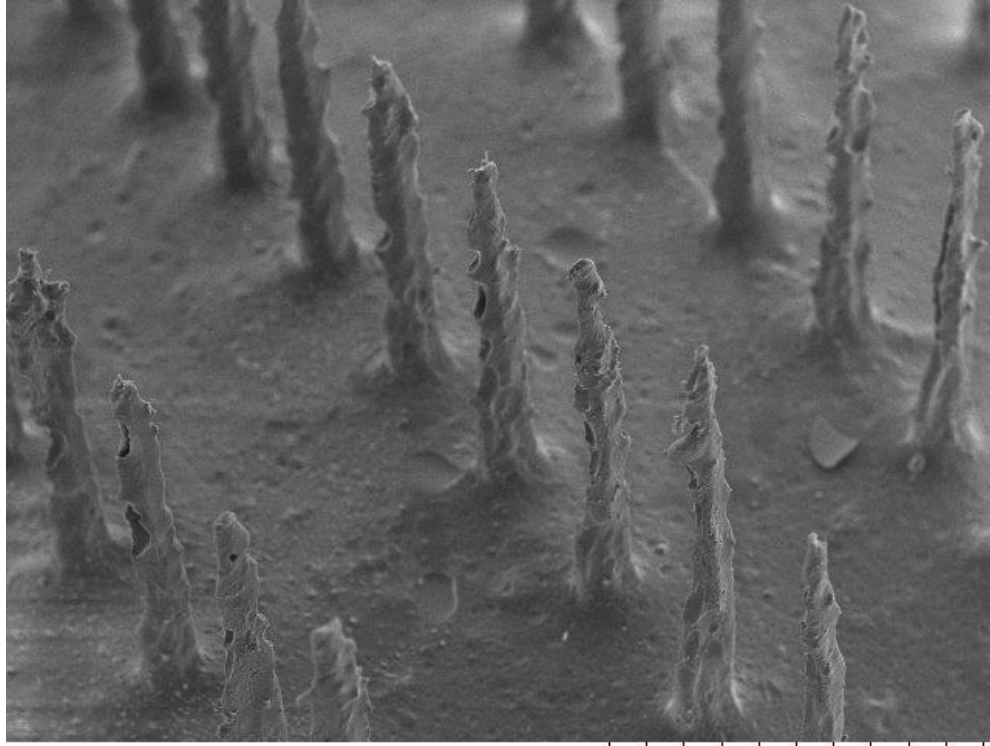
5.3.4.1. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelerin karakterizasyon çalışmaları

5.3.4.1.1. Morfolojik inceleme

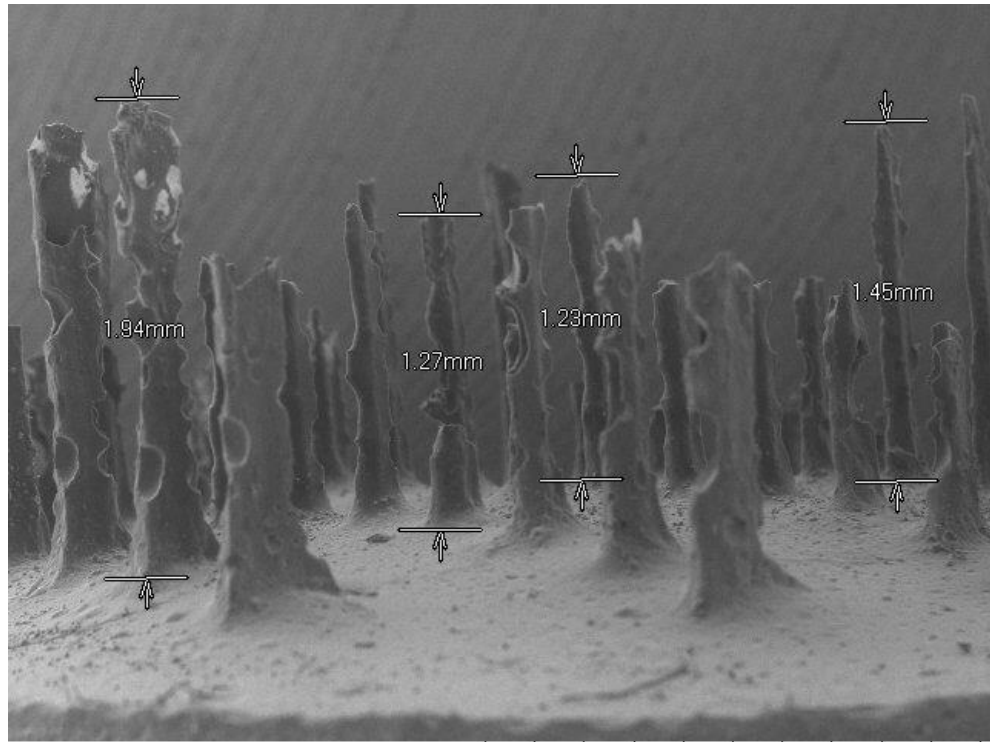
Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroığnelere ait SEM görüntüleri Şekil 5.21 - 5.24'de verilmiştir.



Şekil 5.21. ES-F0 mikroığne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

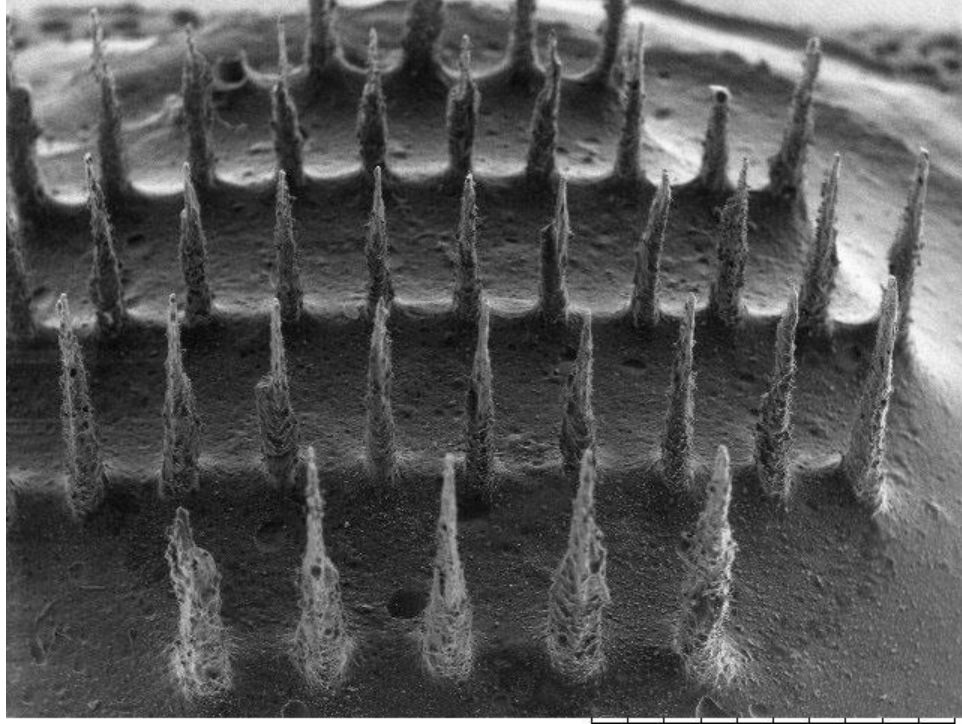


AUBIBAM 2019/12/20 15:09 HMMD5.7 x60 1 mm

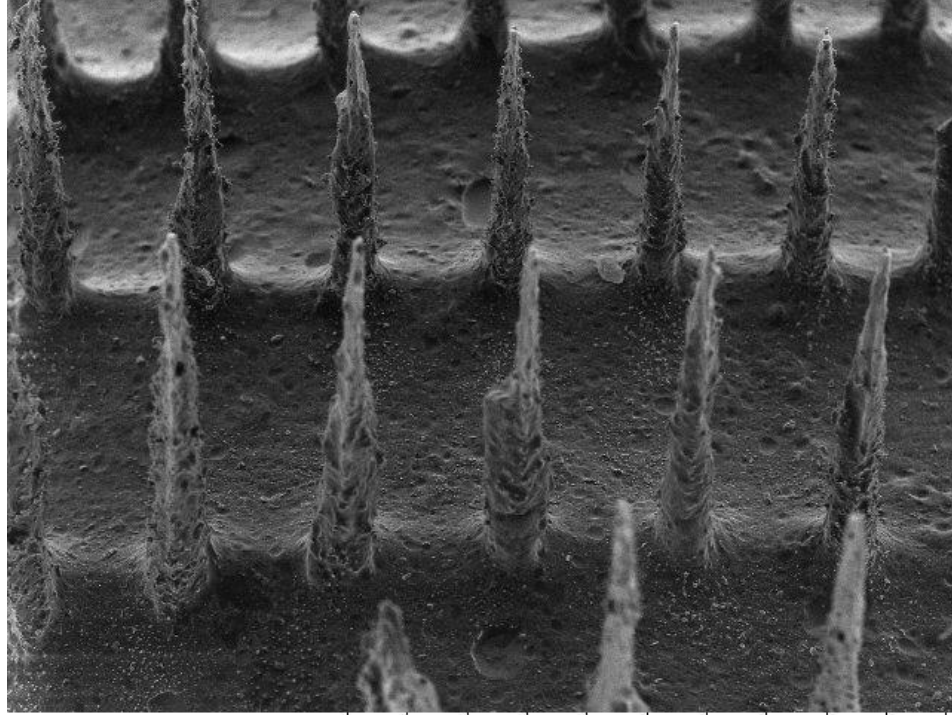


AUBIBAM 2019/12/20 15:15 HMMD9.0 x40 2 mm

Şekil 5.21. (Devam) ES-F0 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

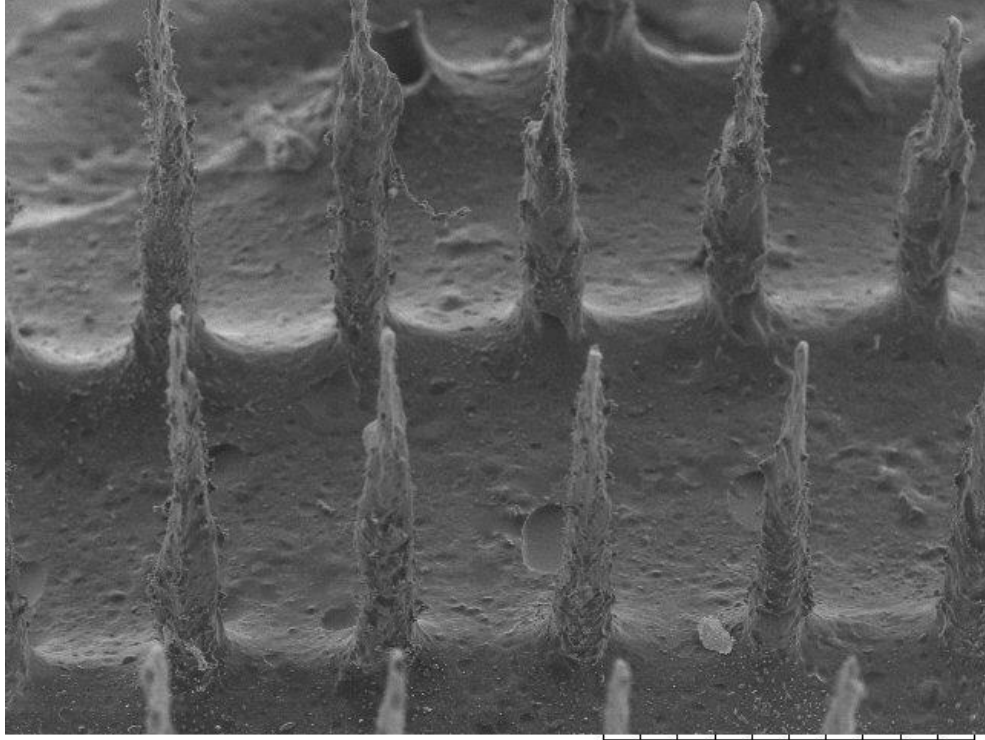


AUBIBAM 2019/10/08 15:41 HMMD7.1 x30 2 mm

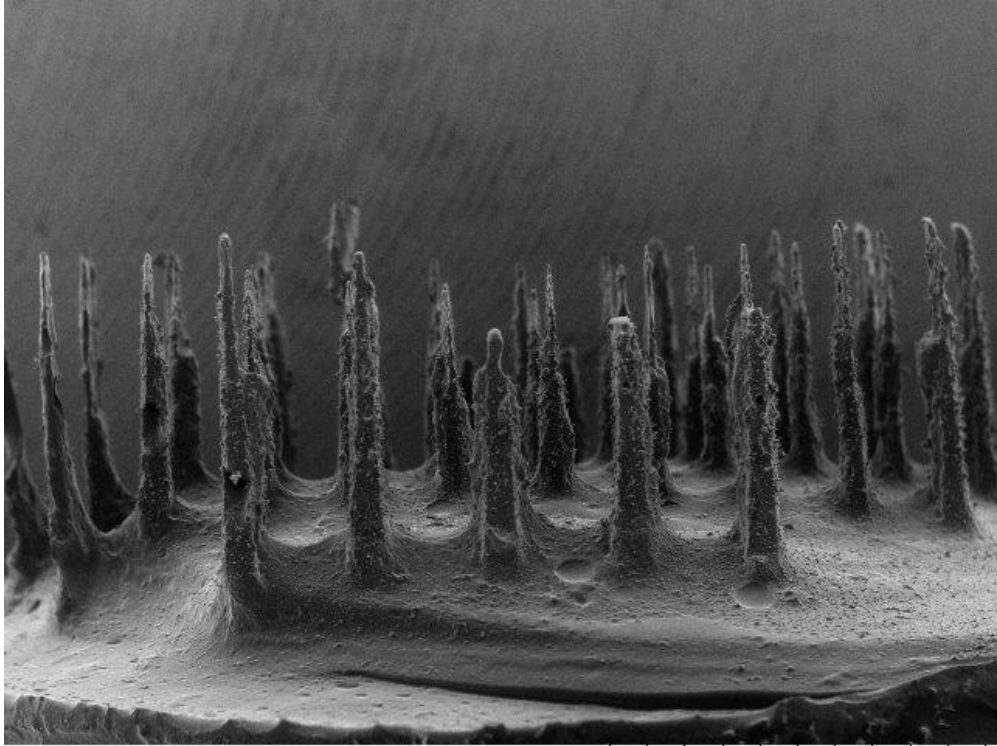


AUBIBAM 2019/10/08 15:42 HMMD7.5 x50 2 mm

Şekil 5.22. ES-F1 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

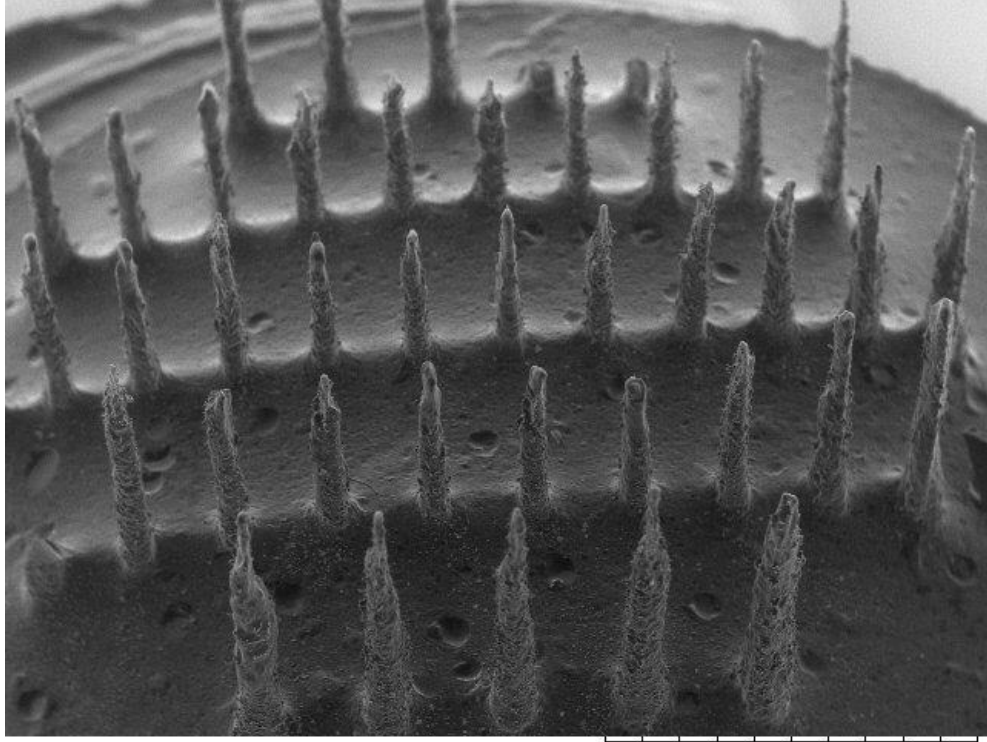


AUBIBAM 2019/10/08 15:44 HMMD8.0 x60 1 mm

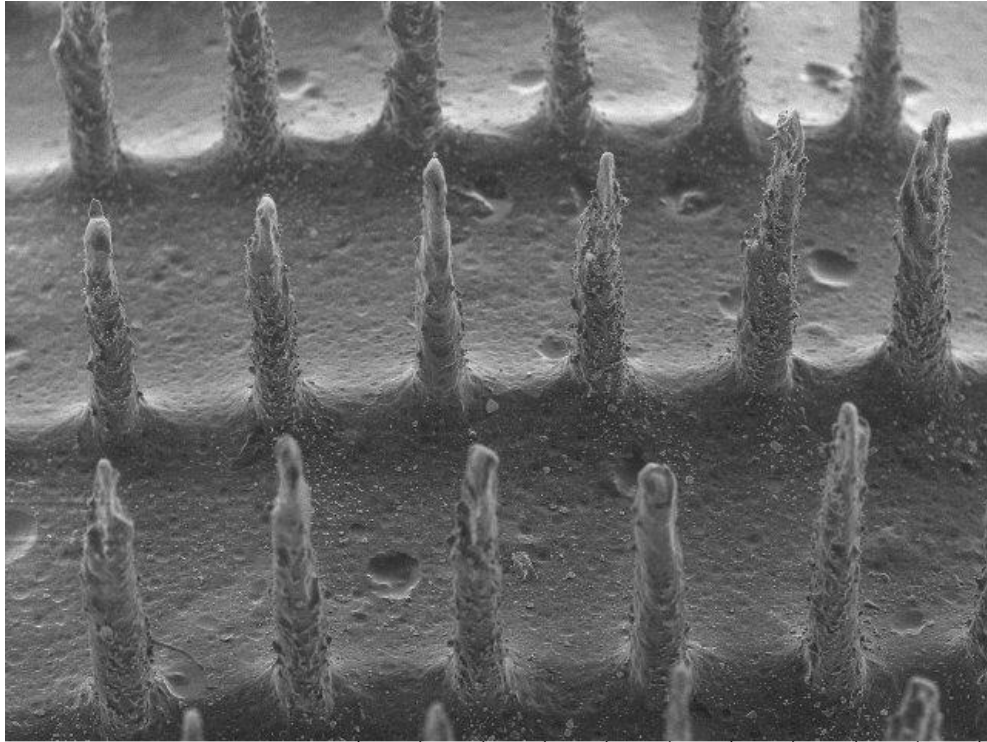


AUBIBAM 2019/10/08 15:38 HMMD9.1 x30 2 mm

Şekil 5.22. (Devam) ES-F1 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

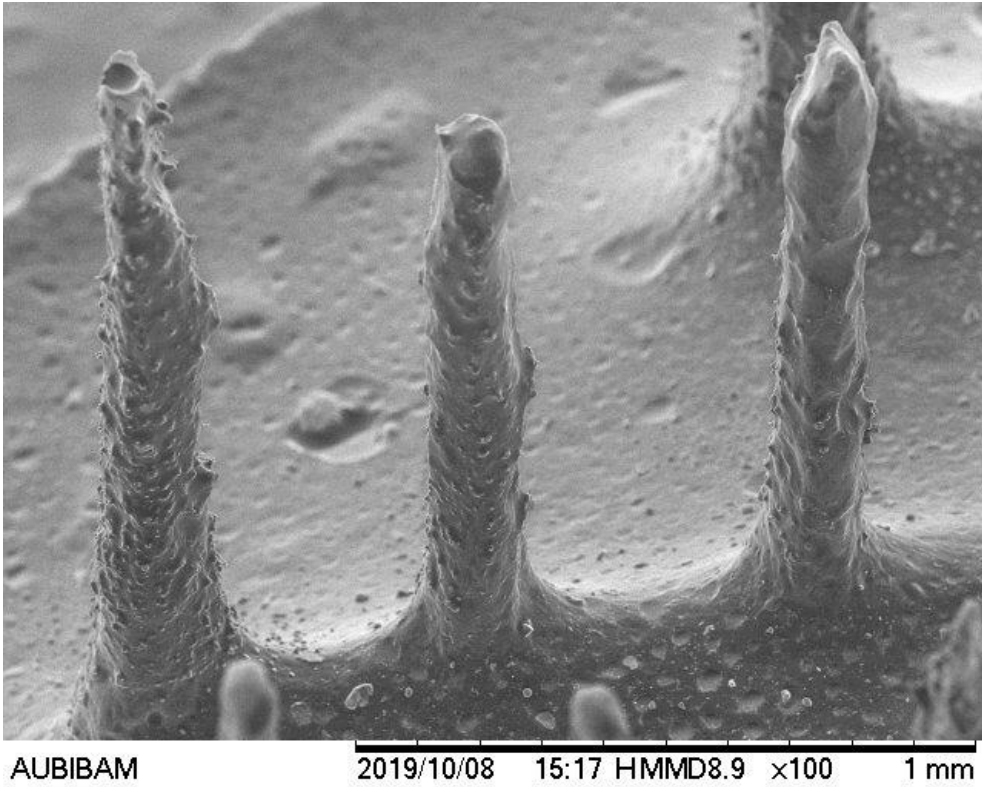
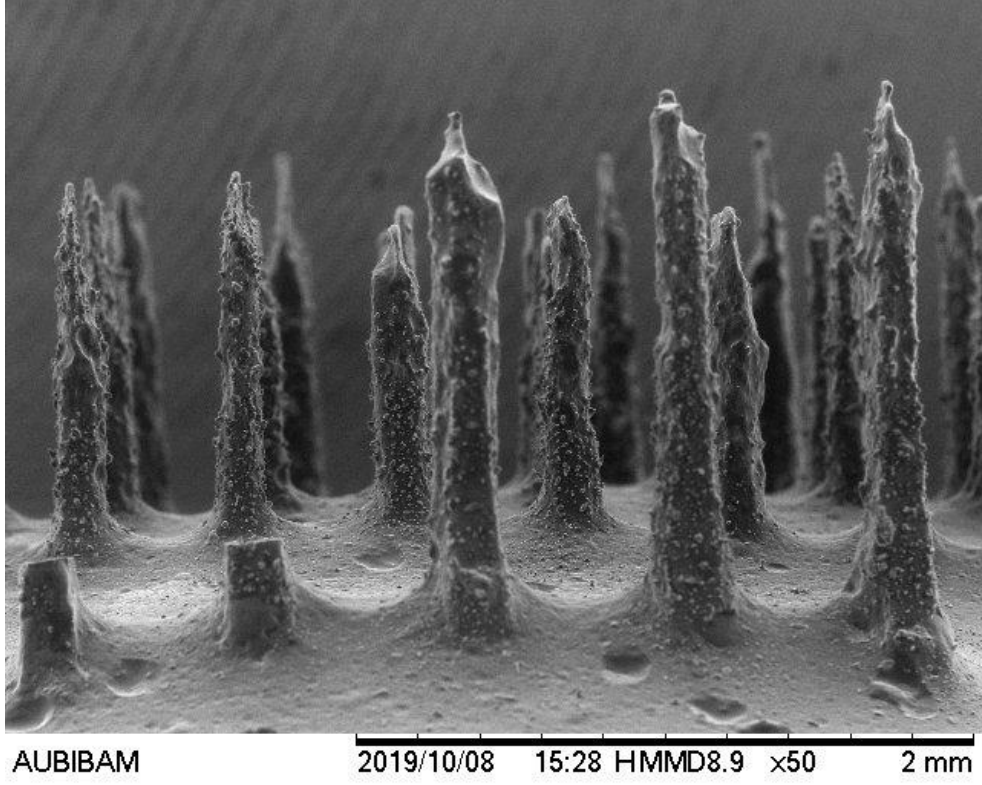


AUBIBAM 2019/10/08 15:12 HMMD7.2 x30 2 mm

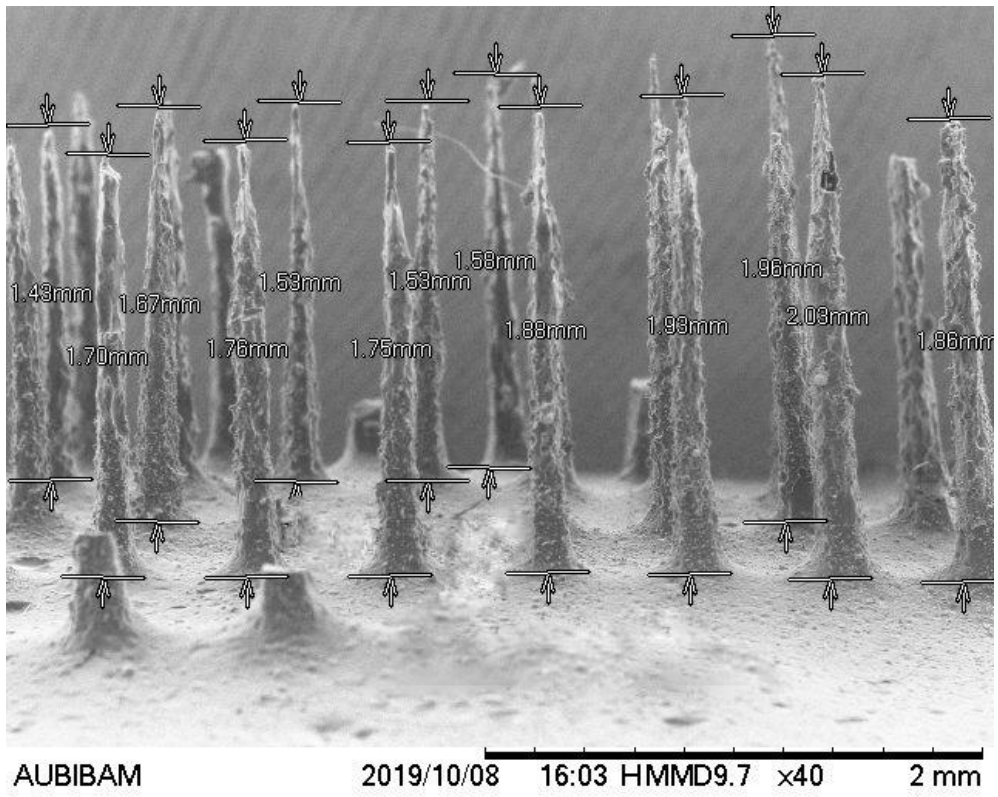
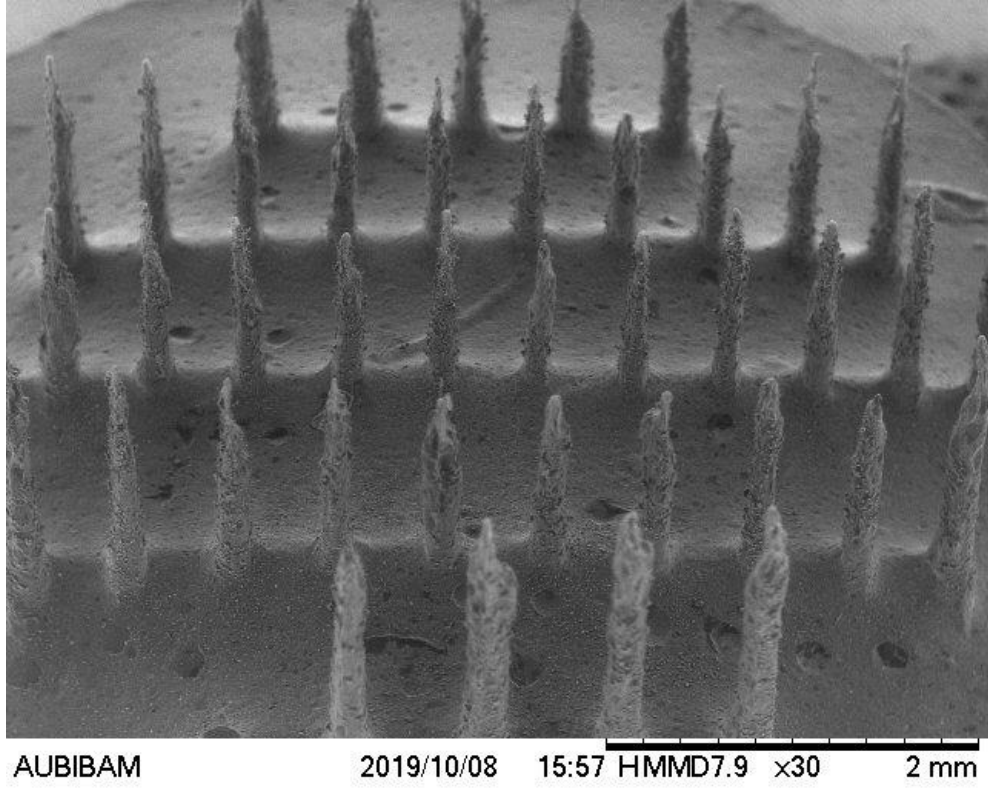


AUBIBAM 2019/10/08 15:18 HMMD8.0 x50 2 mm

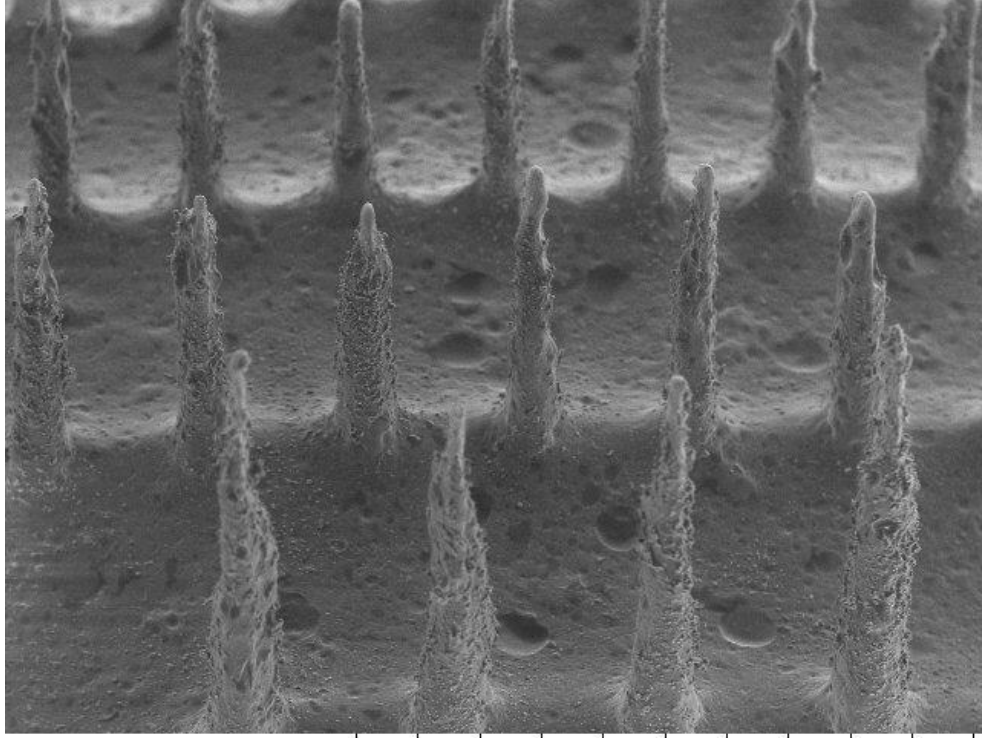
Şekil 5.23. ES-F2 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



Şekil 5.23. (Devam) ES-F2 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

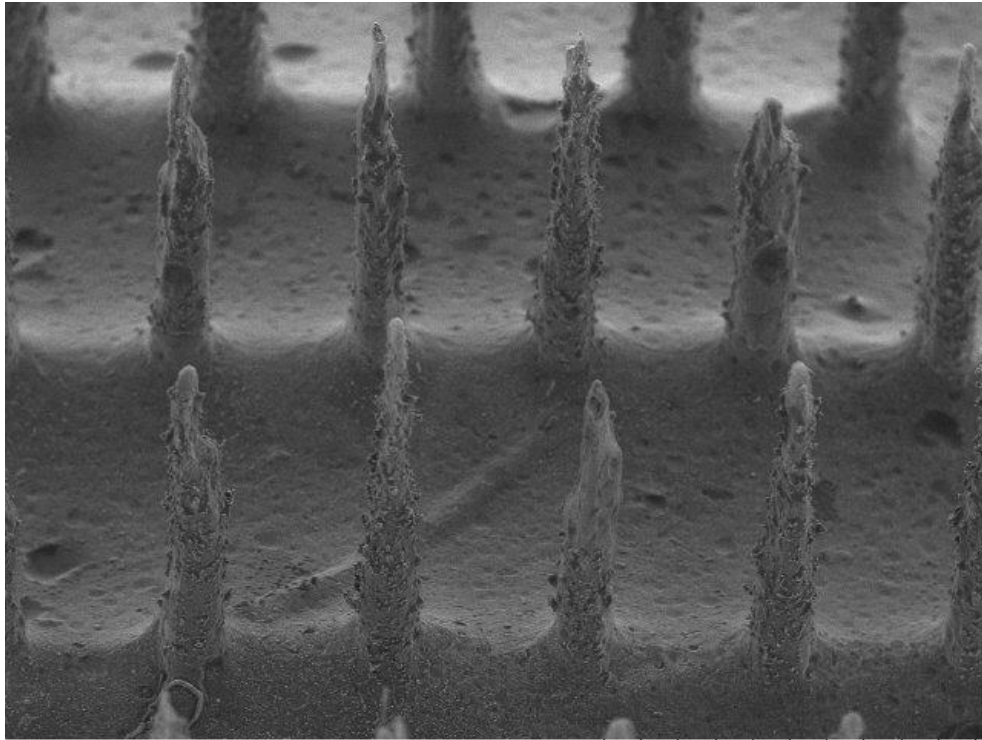


Şekil 5.24. ES-F3 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



AUBIBAM

2019/10/08 16:02 HMMD8.4 x50 2 mm



AUBIBAM

2019/10/08 15:58 HMMD8.5 x60 1 mm

Şekil 5.24. (Devam) ES-F3 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

Tez çalışmamızda hazırlanan mikroïğnelerin iğne uzunluğu, iğne şekli ve iğne tabanı genişliği gibi önemli karakteristik özelliklerinin belirlenmesinde SEM analizleri gerçekleştirilmiştir (Li vd., 2019). Farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmış ve yapı detaylı olarak analiz edilmiştir. Eudragit® S 100 ile hazırlanan formülasyonların 1,27 - 2 mm aralığında uzunluğa ve 0,25 - 0,3 mm taban çapına sahip sağlam yapılı iğneler oluşturduğu SEM analizleri sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.21 - 5.24).

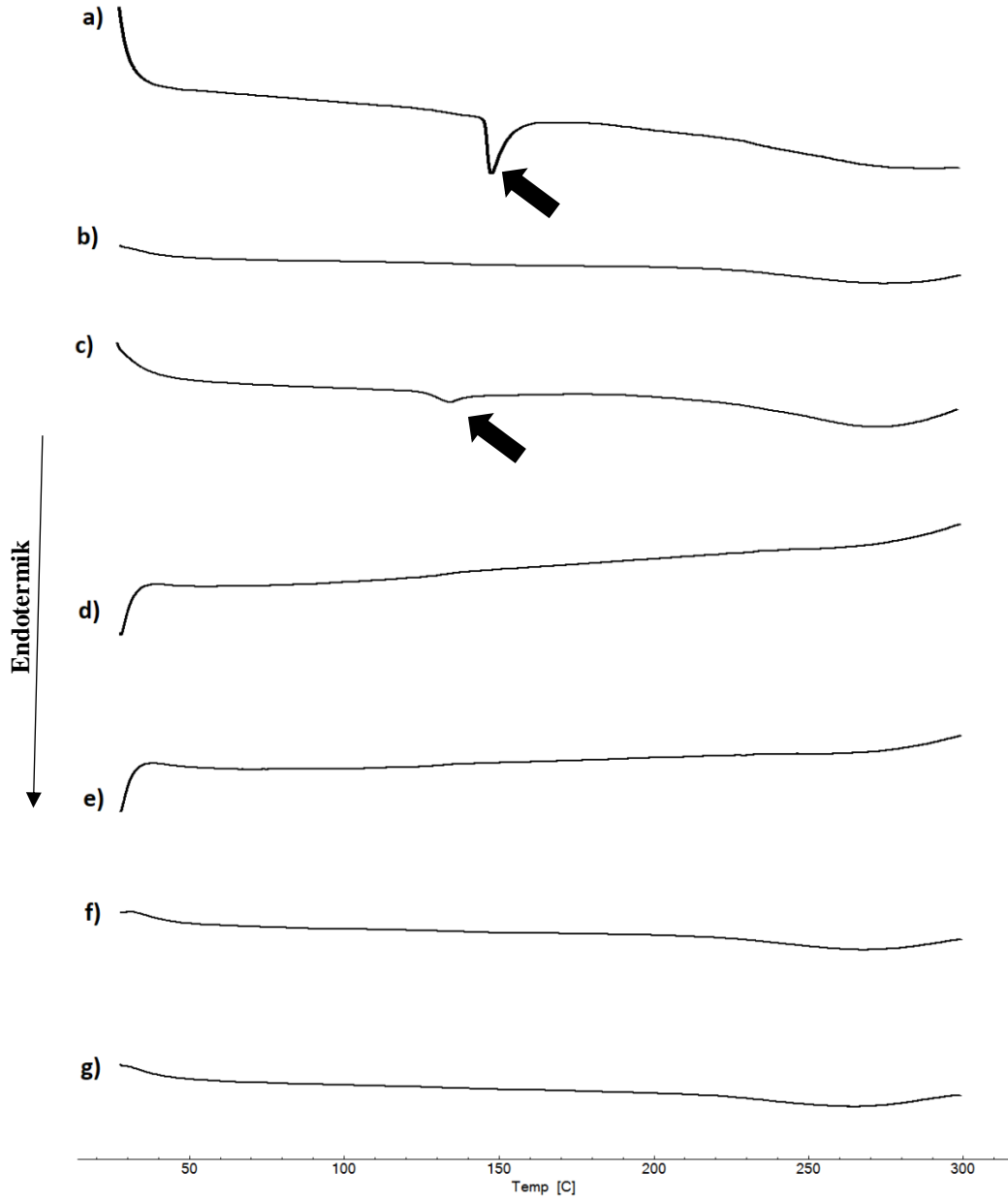
Hazırlanan mikroïğnelerin düzgün yapıya sahip oldukları ve sivri uç kısımları sayesinde lakozamidin etkin bir şekilde nazal mukozadan geçişini sağlayacak özellikte oldukları görülmektedir (Şekil 5.21 - 5.24) (Seon-Woo vd., 2019).

5.3.4.1.2. Termal Analiz

Hazırlanan Eudragit® S 100 mikroïğnelere ve bileşenlerine ait DSC termogramları Şekil 5.25'te sunulmuştur.

Yapılan ön formülasyon çalışmalarında etkin maddenin erime pikinin yaklaşık 149 °C ortaya çıktığı ve maddenin kristal yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.7 ve Şekil 5.25a). Saf polimerin ise amorf yapıda olduğu termogramında herhangi bir erime pikinin gözlenmemesi ile belirlenmiştir (Şekil 5.10 ve Şekil 5.25b). Polimer ile etkin madde arasındaki olası geçimsizliklerin ve çözünürlük özelliklerinin belirlenmesi amacı ile lakozamid ve Eudragit® S 100'e ait fiziksel karışım hazırlanmış ve etkin madde ile polimer arasında herhangi bir etkileşimin olmadığı elde edilen termogramda lakozamide ait erime pikinin gözlenmesi sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.25c) (Rojek ve Wesolowski, 2019).

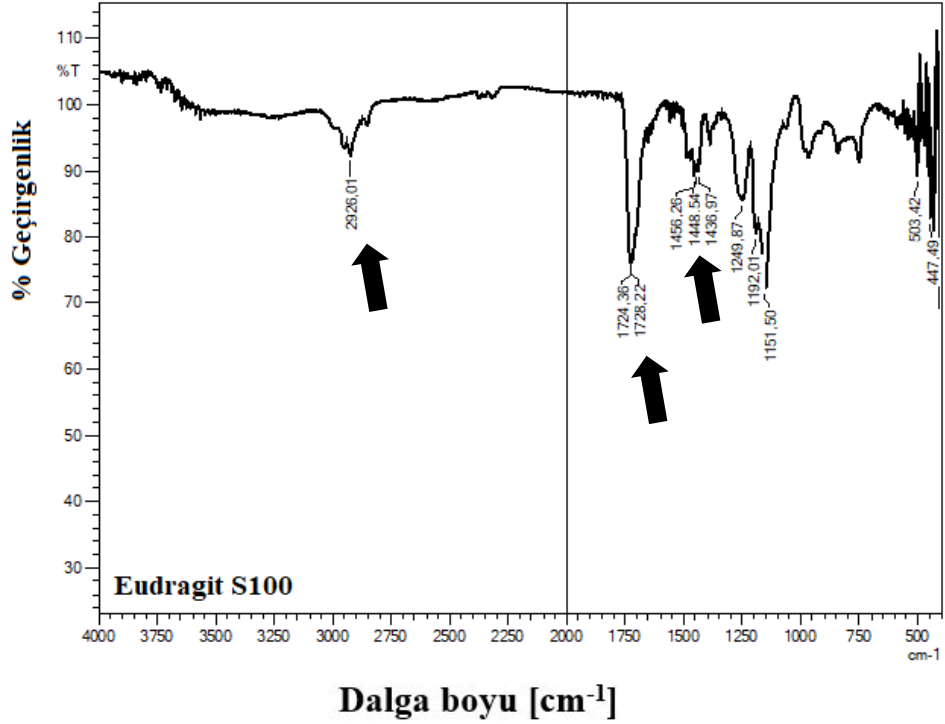
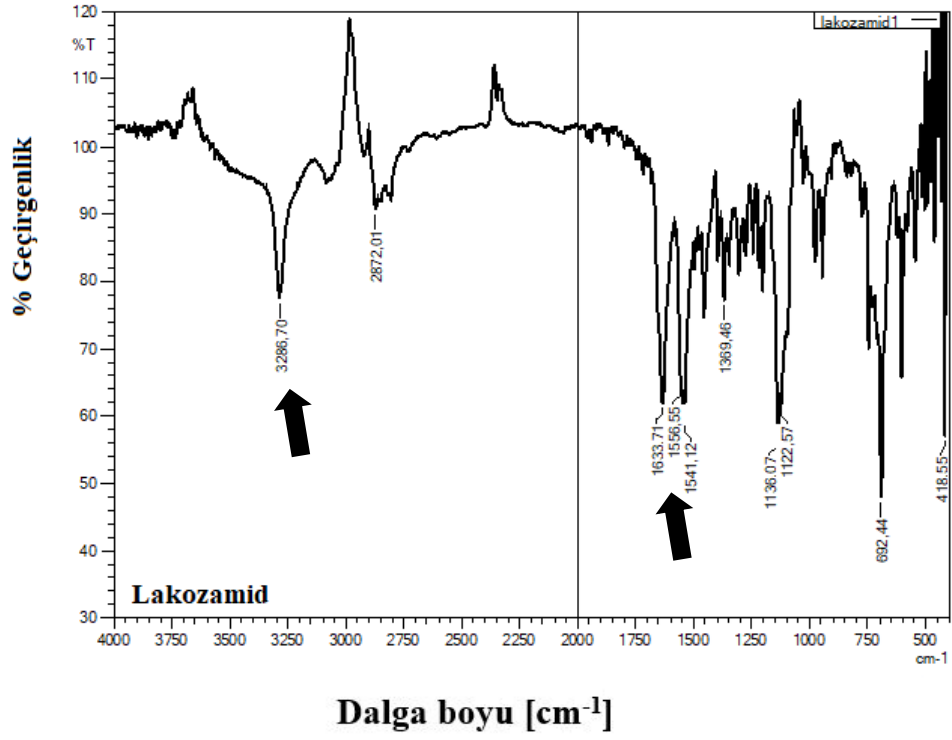
Hazırlanan plasebo ve lakozamid yüklenmiş formülasyonların DSC termogramları incelendiğinde saf polimer ile benzer şekilde amorf yapıda oldukları ve yüklenen lakozamidin polimerik yapı içinde moleküler olarak dağılması sonucunda formülasyonlarda amorf yapıda bulunduğu formülasyonlara ait termogramlarda herhangi bir pikin ortaya çıkmaması sonucunda belirlenmiştir (sırası ile Şekil 5.25d ve Şekil 5.25e-5.25g) (Gamal vd., 2016; Rojek ve Wesolowski, 2019).



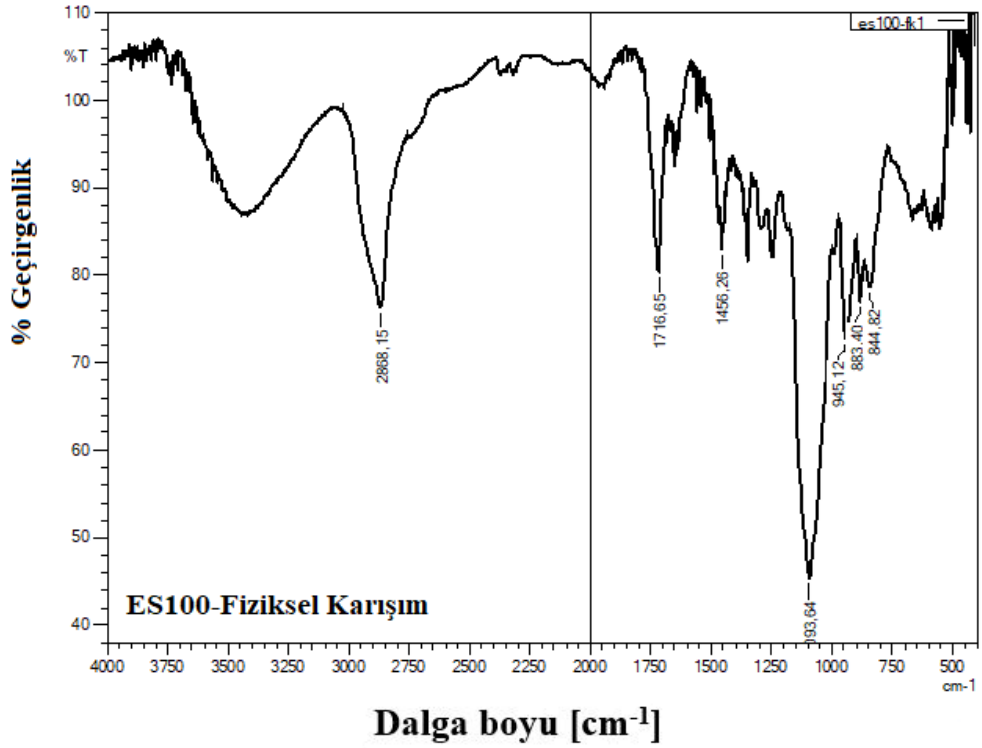
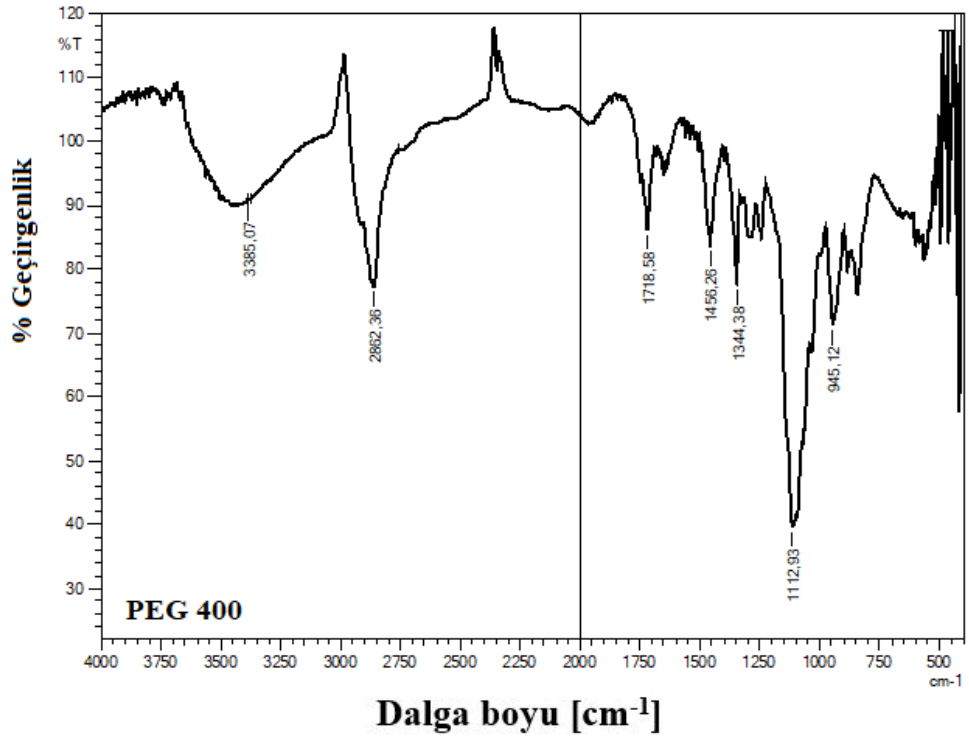
Şekil 5.25. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlerine ait DSC termogramları a) Lakozamid, b) Eudragit® S 100, c) Fiziksel karışım, d) ES-F0, e) ES-F1, f) ES-F2, g) ES-F3

5.3.4.1.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri

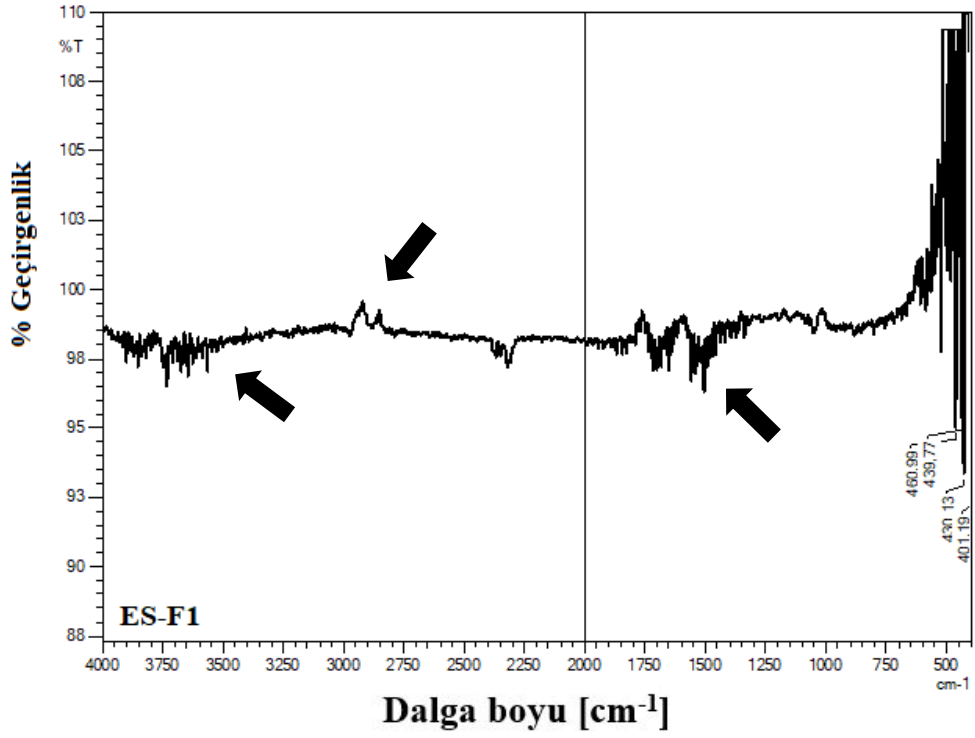
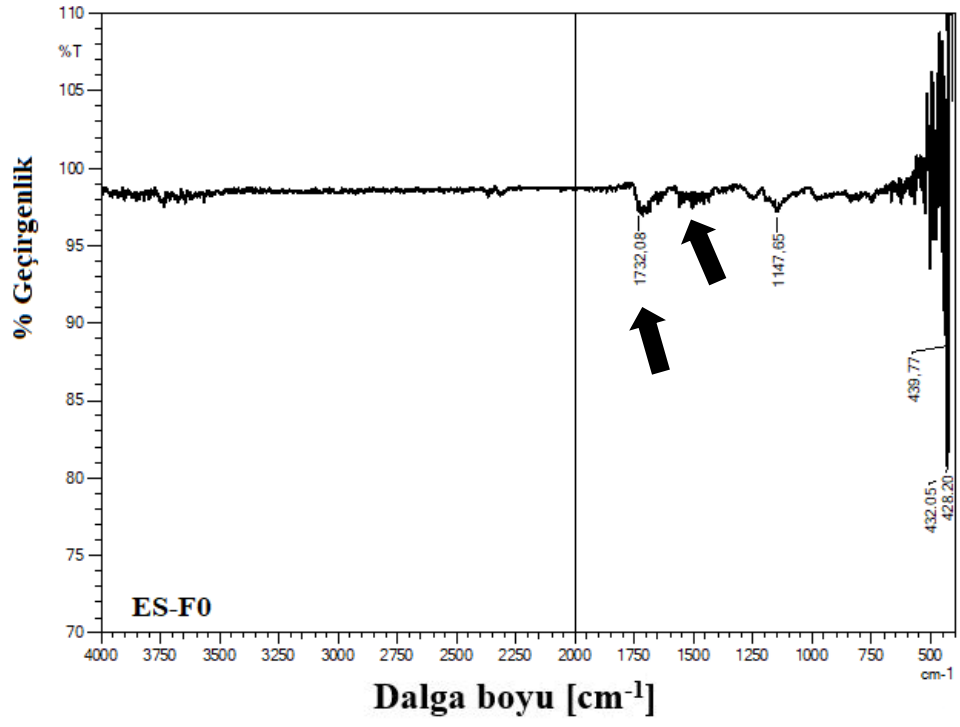
Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlerine ait FT-IR sonuçları Şekil 5.26’da verilmiştir.



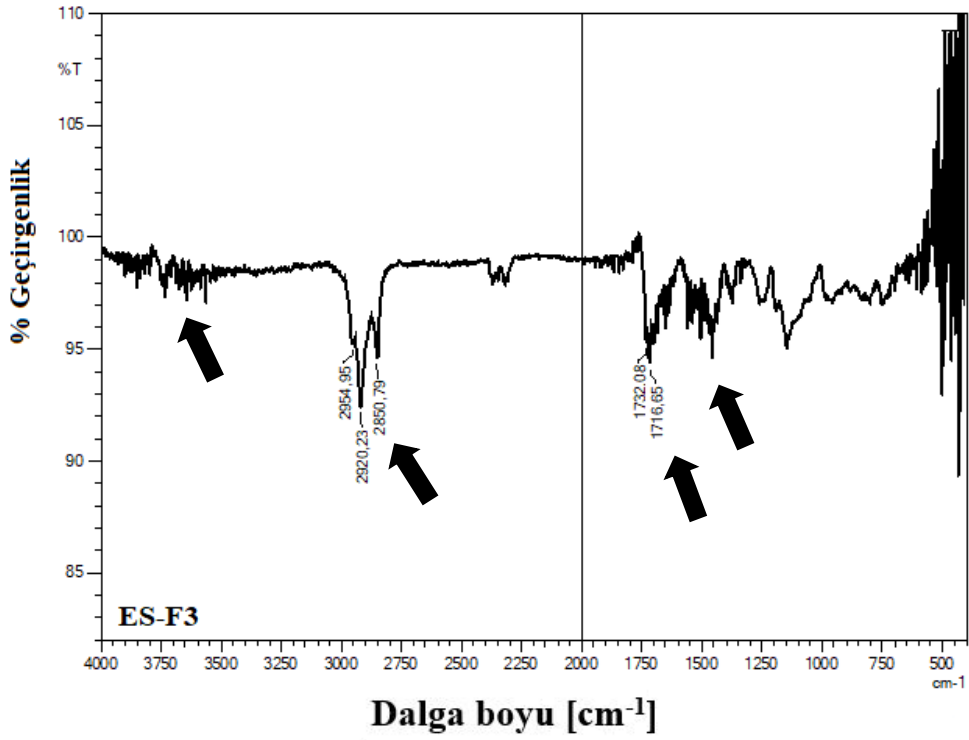
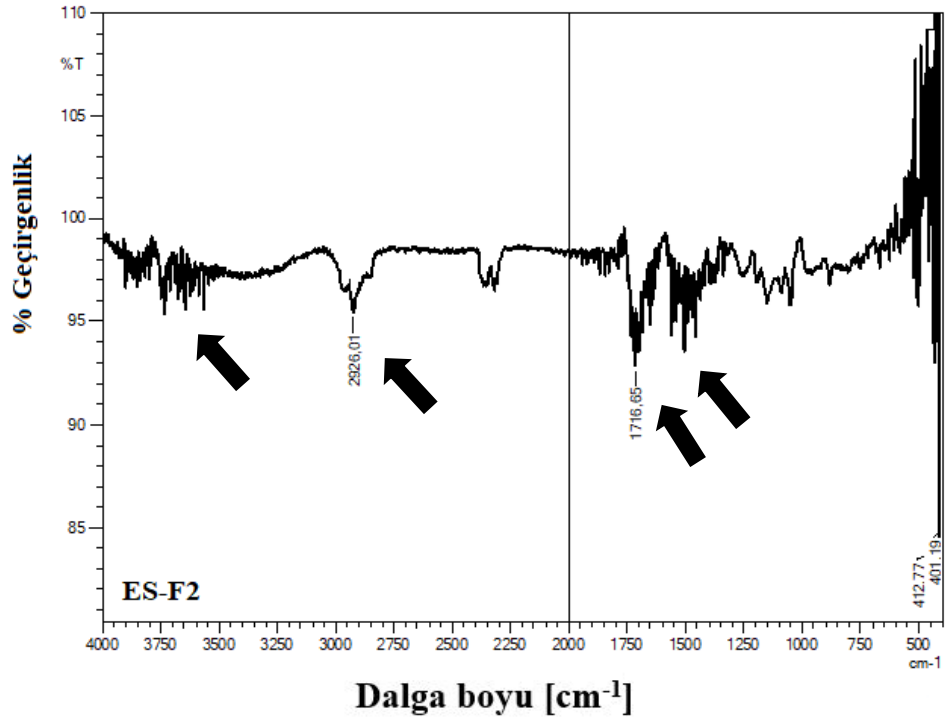
Şekil 5.26. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR spektrumları



Şekil 5.26. (Devam) Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR spektrumları



Şekil 5.26. (Devam) Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroöğnelere ve bileşenlere ait FT-IR spektrumları



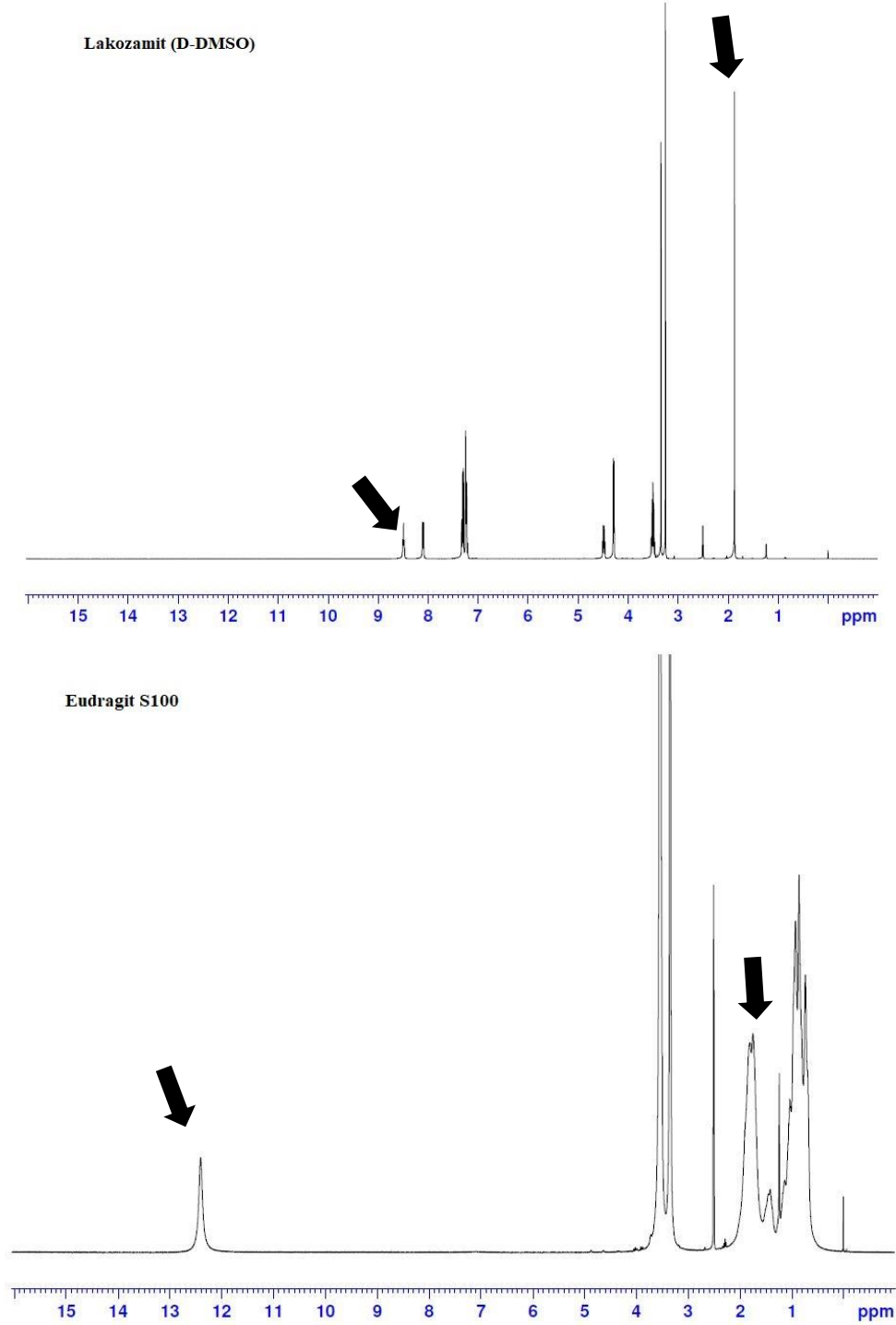
Şekil 5.26. (Devam) Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroöğnelere ve bileşenlere FT-IR spektrumları

Spektrum incelendiğinde, Eudragit® S 100'ün $\sim 2926 \text{ cm}^{-1}$ 'de O-H, $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ 'de CH_3 , ve $\sim 1724 \text{ cm}^{-1}$ 'de C=O gruplarına ait sinyaller, formülasyonlara ait spektrumlarında

da kaydedilmiş ancak lakozamide ait sinyaller formülasyonlarda yer almamaktadır. Elde edilen sonuçlar DSC analizlerini desteklemektedir.

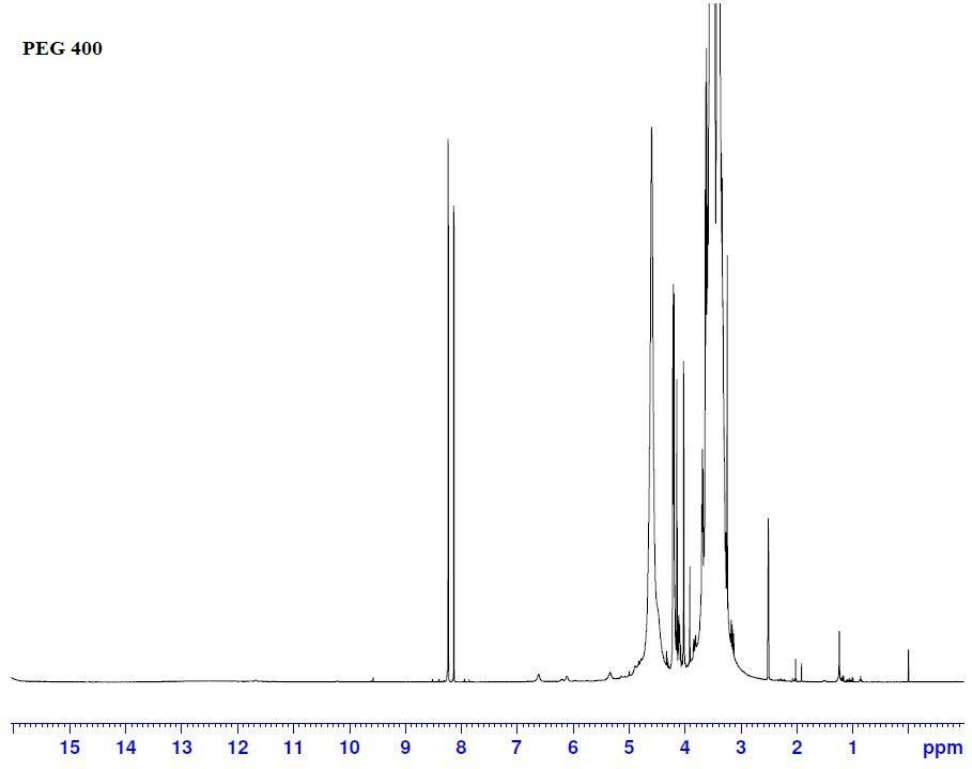
5.3.4.1.4. Nükleer manyetik rezonans analizleri

Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlerine ait ^1H -NMR analiz spektrumu Şekil 5.27’de verilmiştir.

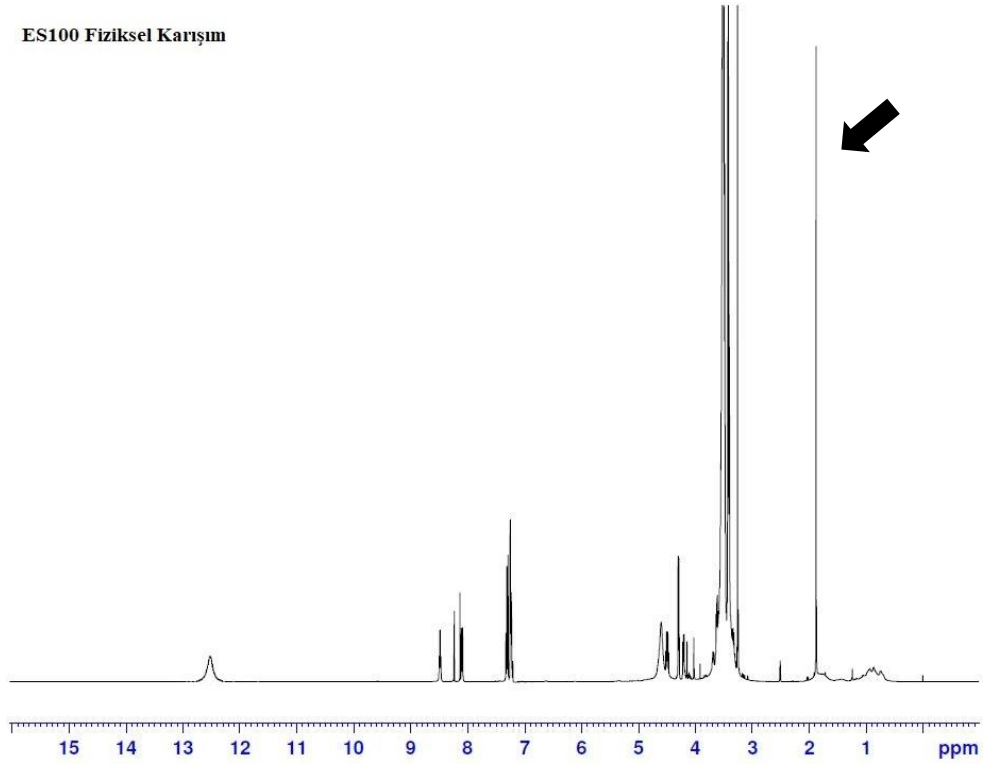


Şekil 5.27. Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait ^1H -NMR spektrumları

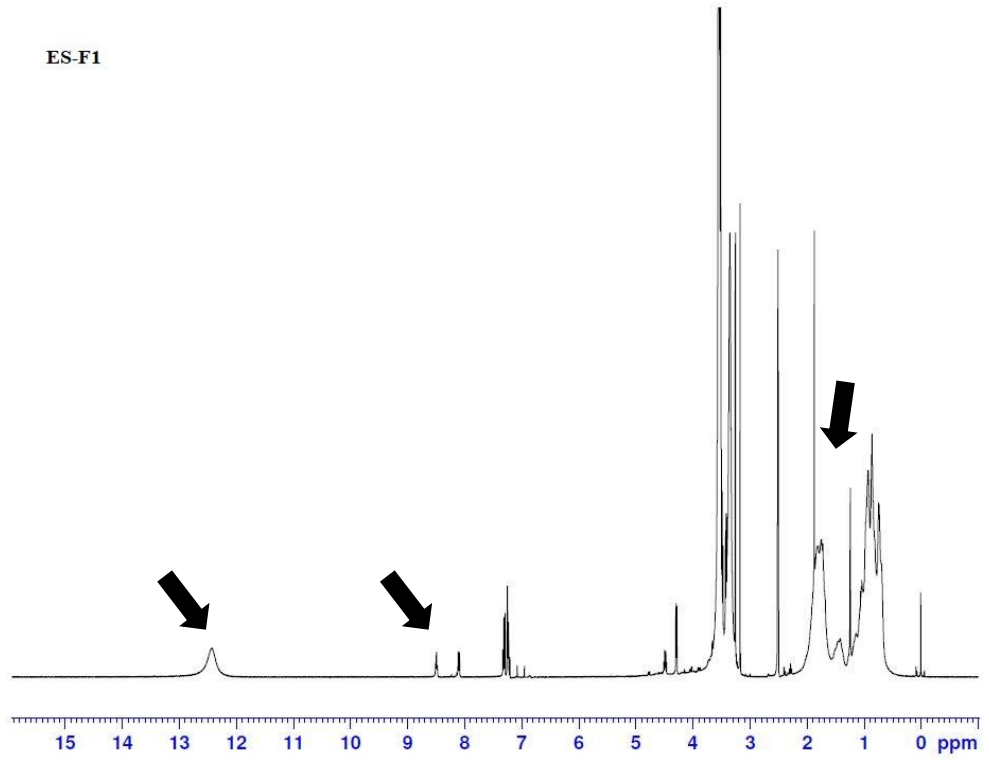
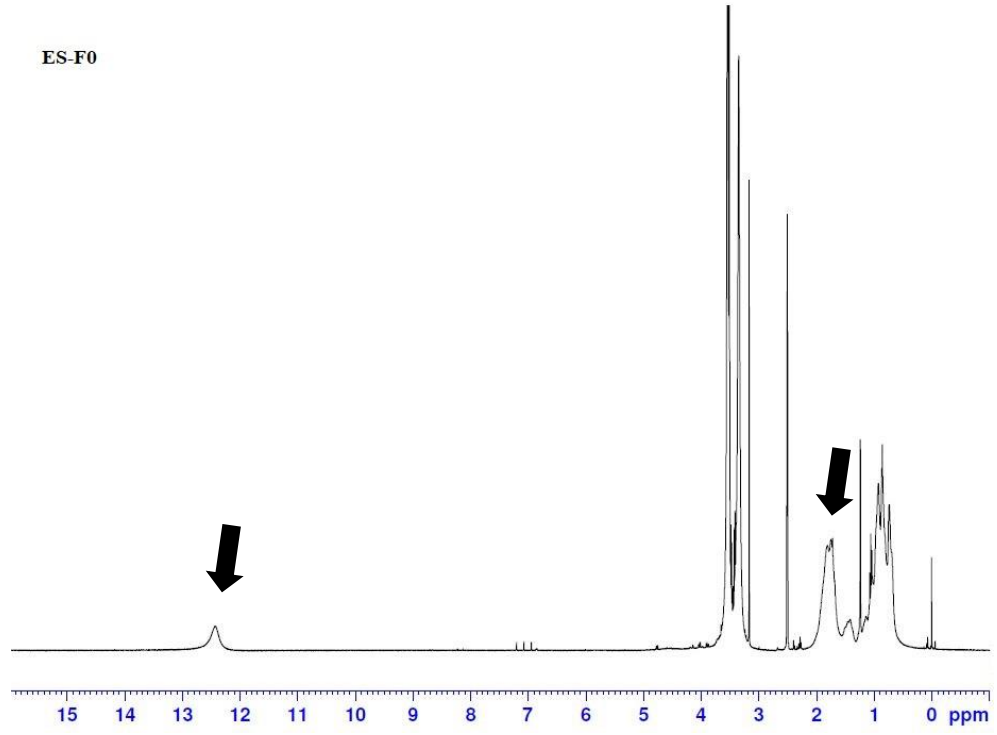
PEG 400



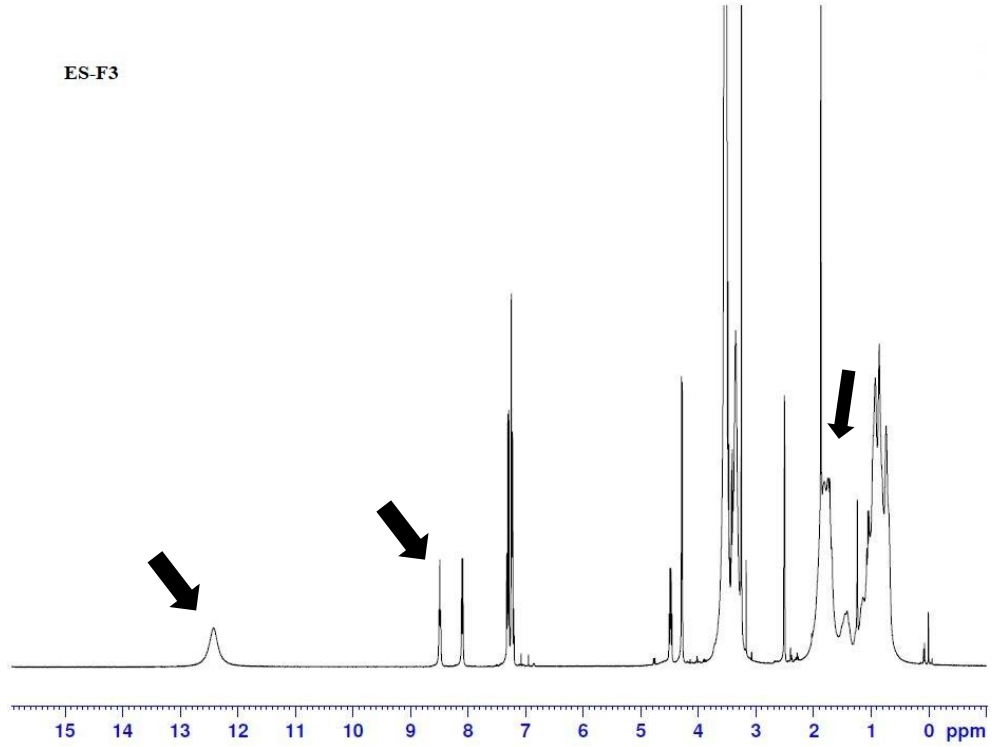
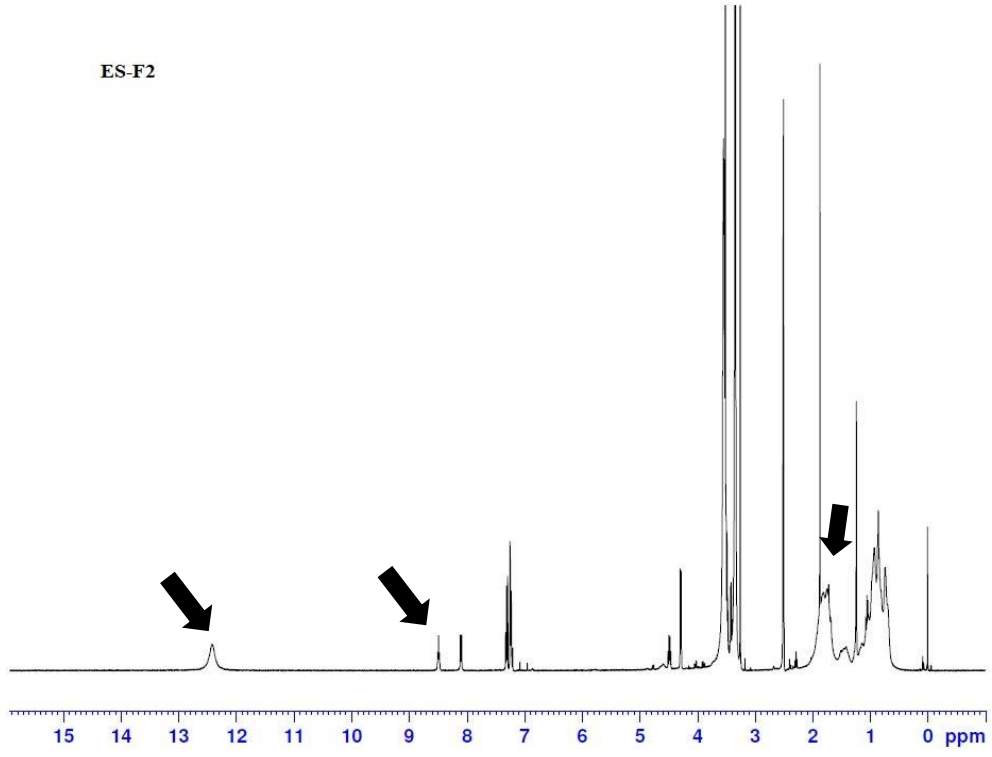
ES100 Fiziksel Karışım



Şekil 5.27. (Devam) Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroğnelere ve bileşenlere ait ¹H-NMR spektrumları



Şekil 5.27. (Devam) Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroiğnelere ve bileşenlere ait ¹H-NMR spektrumları



Şekil 5.27. (Devam) Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait ¹H-NMR spektrumları

Hazırlanan mikroïğne formülasyonlarının ¹H-NMR spektrumları incelendiğinde Eudragit® S 100'e ve lakozamide özgü pikler belirgin bir şekilde görülmektedir. Saf maddelerin spektrumlarından yola çıkılarak 12-13 ppm arasında yer alan yayvan pik

Eudragit® S 100'e, ~8,5 ppm'de yer alan pikin lakozamide ait olduğu belirlenmiştir. ~2 ppm'de gözlenen iki farklı pik ise lakozamid ile Eudragit® S 100 ile lakozamiden gelen piklerin çakışması sonucunda oluşmuştur (Şekil 5.27). Bu durumun Eudragit® S 100 içinde moleküler düzeyde dağılan lakozamidin yapısını korumasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

5.3.4.1.5. Miktar tayini

Etkin madde miktar tayini sonuçları Çizelge 5.11'da verilmiştir.

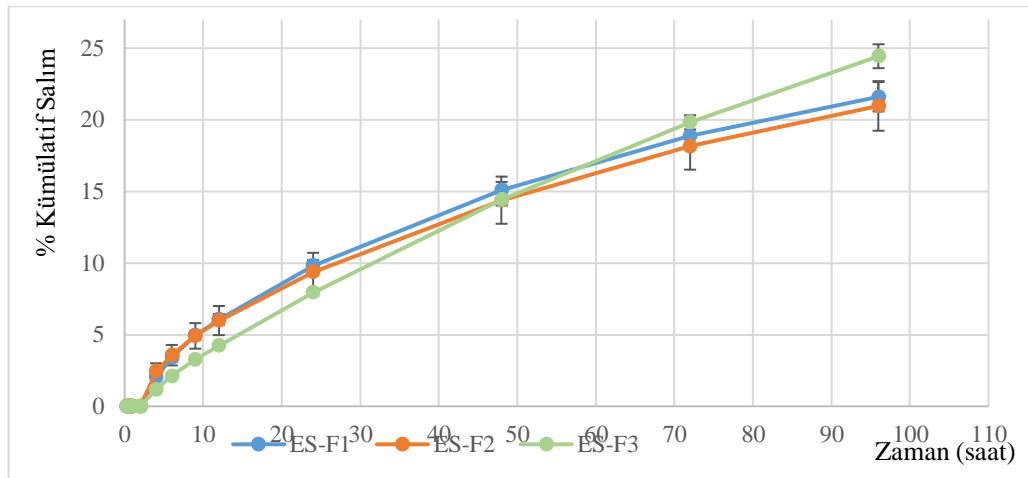
Çizelge 5.11. ES-FX kodlu formülasyonların miktar tayini sonuçları

Formülasyon Kodu	Etkin Madde Miktarı (%(a/a) ±SH, n=3)
ES-F1	6,1085±0,0125
ES-F2	10,6932±0,3775
ES-F3	15,2626±0,03064

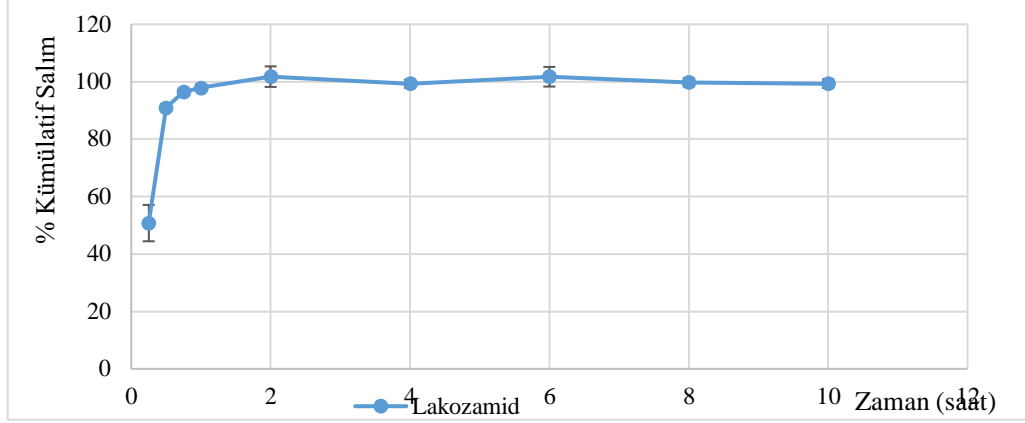
Miktar tayini çalışması sonucunda istenilen miktarda etkin maddenin mikroïğnelere yüklendiği tespit edilmiştir. Daha yüksek oranda etkin madde içeren formülasyonlarla hazırlanan mikroïğnelerin yapısının daha da sertleştiği kaydedilmiştir.

5.3.4.1.6. İn vitro salım çalışması

Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïgne formülasyonlarının salım profilleri Şekil 5.28'de verilmiş, salım modelleri Çizelge 5.13'de belirtilmiştir.



Şekil 5.28. Fosfat tamponunda (pH:6,4) Eudragit® S 100 mikroïğnelерinden lakozamid ve saf lakozamid salım grafiği ($\bar{x} \pm SH$, n=3)



Şekil 5.28. Fosfat tamponunda (pH:6,4) Eudragit® S 100 mikroïğnelerinden lakozamid ve saf lakozamid salım grafiği ($\bar{x} \pm SH$, n=3)

Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğneler, 96 saat sonunda ancak ~%20-25 oranında etkin madde salımı gerçekleştirmiştir (Şekil 5.28). Eudragit® S 100, asidik pH değerinde çözünmemektedir. Buna bağlı olarak etkin madde salımı oldukça yavaş gerçekleşmiştir (Yin vd., 2016).

Çizelge 5.12. ES-FX kodlu formüasyonların benzerlik ve fark faktörleri

Formüasyon	(f ₁) fark faktörü	(f ₂) benzerlik faktörü
ES-F1 ve ES-F2	3,90	98,57
ES-F1 ve ES-F3	14,65	87,97
ES-F2 ve ES-F3	15,95	89,42

Hazırlanan formüasyonların kendi aralarında kıyaslanması sonucunda elde edilen benzerlik ve fark faktörleri Çizelge 5.12’de sunulmuştur. Benzerlik ve fark faktörleri kıyaslandığında hazırlanan formüasyonların benzer salım profile çizdiği tespit edilmiştir. Salım profilleri açısından ES-F3 kodlu formüasyonun ES-F1 ve ES-F2’ye göre biraz daha farklı bir salım profile çizdiği gözlenmektedir (Costa ve Lobo, 2001).

Eudragit® S 100 ile hazırlanan mikroïğnelerin salım modellemesi “DD Solver” programı kullanılarak hazırlanmıştır (Zuo vd., 2014). Modelleme için en çok tercih edilen parametreler Akaike bilgi kriteri (AIC), model seçim kriteri (MSC) ve determinasyon katsayısı (r^2)’dır. Çizelge 5.13’de elde edilen sonuçlara göre ES-F1 ve ES-F2 formüasyonlarının salım modeli Korsmeyer-Peppas iken ES-F3 formüasyonunun ise birinci derece ve Korsmeyer-Peppas salım modeline uyduğu tespit edilmiştir. Formüasyonların benzerlik ve fark faktörleri de bu sonucu doğrulamaktadır.

Çizelge 5.13. ES-FX kodlu formülasyonların etkin madde salım modelleri

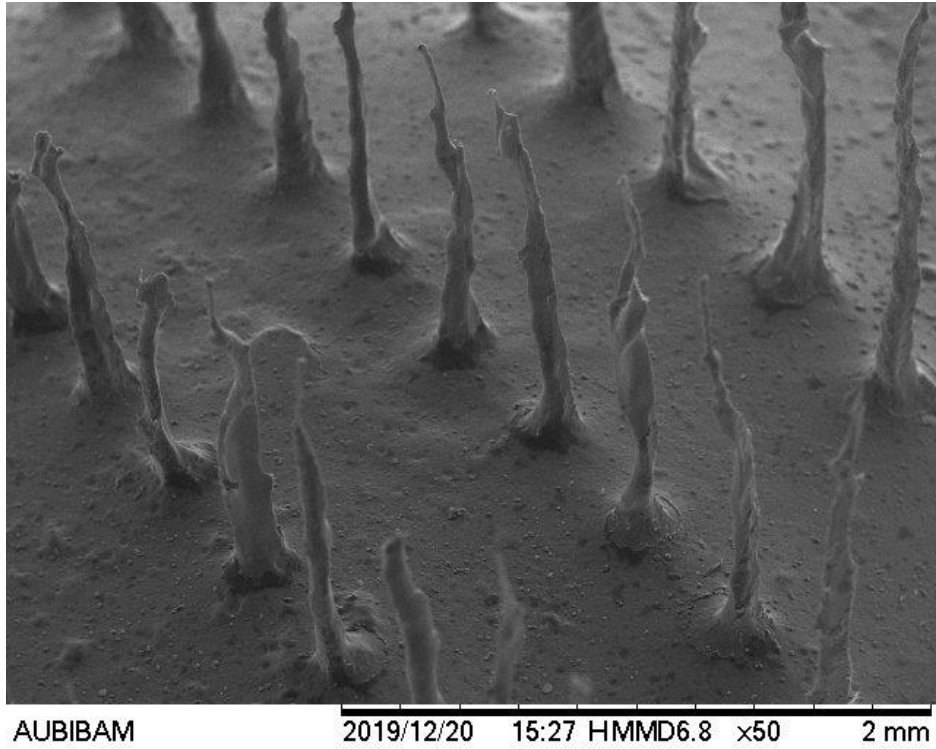
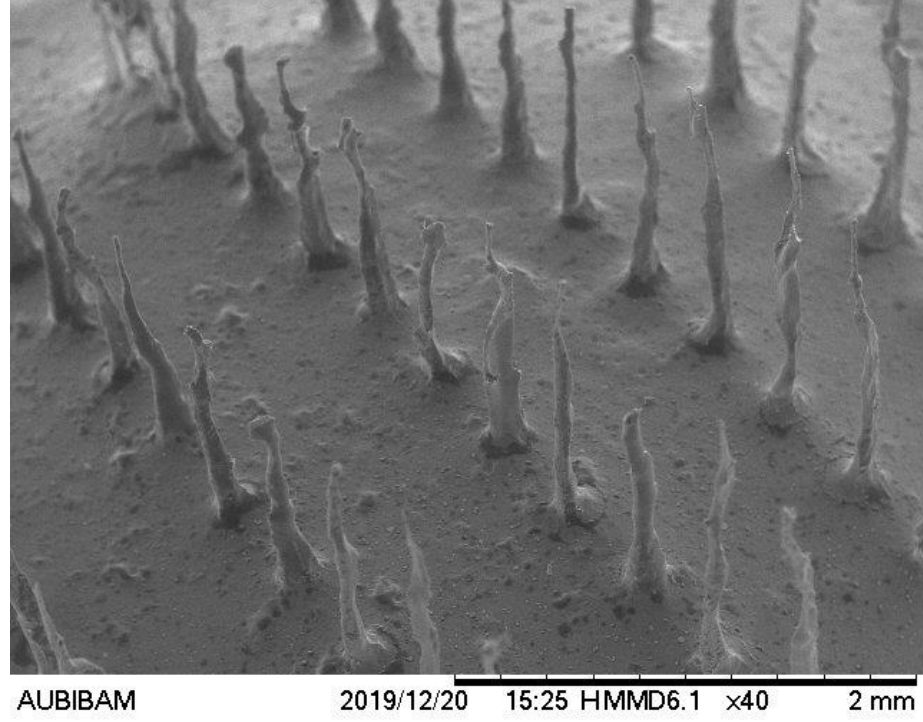
Formülasyon	Parametre	Salım Modelleri					
		Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Higuchi	Hixon-Crowell	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas
ES-F1	k	0,2585	0,0029	2,1138	0,0009	0,0009	0,9329
	r ²	0,9278	0,9459	0,9524	0,9403	0,9403	0,9826
	AIC	53,1711	49,419	47,7414	50,6956	52,6956	36,6726
	MSC	2,1459	2,4345	2,5636	2,3363	2,1825	3,4150
	n	-	-	-	-	-	0,712
ES-F2	k	0,2496	0,0028	2,0451	0,0009	0,0009	1,0861
	r ²	0,9248	0,9424	0,9567	0,9370	0,9370	0,9876
	AIC	52,6143	49,160	45,4418	50,3309	52,3309	31,2372
	MSC	2,0939	2,3596	2,6457	2,2696	2,1157	3,7383
	n	-	-	-	-	-	0,662
ES-F3	k	0,2708	0,0030	2,1349	0,0010	0,0010	0,3896
	r ²	0,9892	0,9955	0,9026	0,9938	0,9938	0,9914
	AIC	30,6361	19,262	59,1827	23,4438	25,4438	29,5859
	MSC	4,1317	5,0066	1,9358	4,6850	4,5311	4,2125
	n	-	-	-	-	-	0,926
Lakozamid	k	14,564	1,050	44,901	0,164	0,164	83,893
	r ²	-14,728	-2,008	-5,949	-6,238	-5,886	0,381
	AIC	95,659	80,770	88,308	88,674	90,225	68,541
	MSC	-2,978	-1,323	-2,161	-2,202	-2,374	0,035
	n	-	-	-	-	-	0,113

Birinci derece salım modeli genellikle suda çözünen etkin madde içeren porlu sistemlerde görülmektedir (Dash vd., 2010). Polimerik yapılara sahip sistemler de genellikle Korsmeyer-Peppas modeline uygun salım göstermektedir (Costa ve Lobo, 2001). Çizelge 5.13’de yer alan “n” değerlerine göre etkin madde mikroiğne formülasyonlarından Fick yasasına uymayan difüzyon ile serbestleşmektedir (Grassi ve Grassi, 2005). Fick yasasına uygun difüzyon gösteren sistemlerde “n” değerleri 0,45’ten küçüktür. 0,45-0,90 arasında bir değer ise Fick yasasına uymayan difüzyon olarak Kabul edilir. Bu değer 0,90’dan büyük ise sistemde sıfıncı derece kinetiğe uygun salım gözlenir (Dash vd., 2010). Fick yasasına göre difüzyonda ilaç molekülleri yüksek derişimde buldukları alandan düşük derişimde buldukları alana geçmeye meyillidir (Gouda vd., 2017).

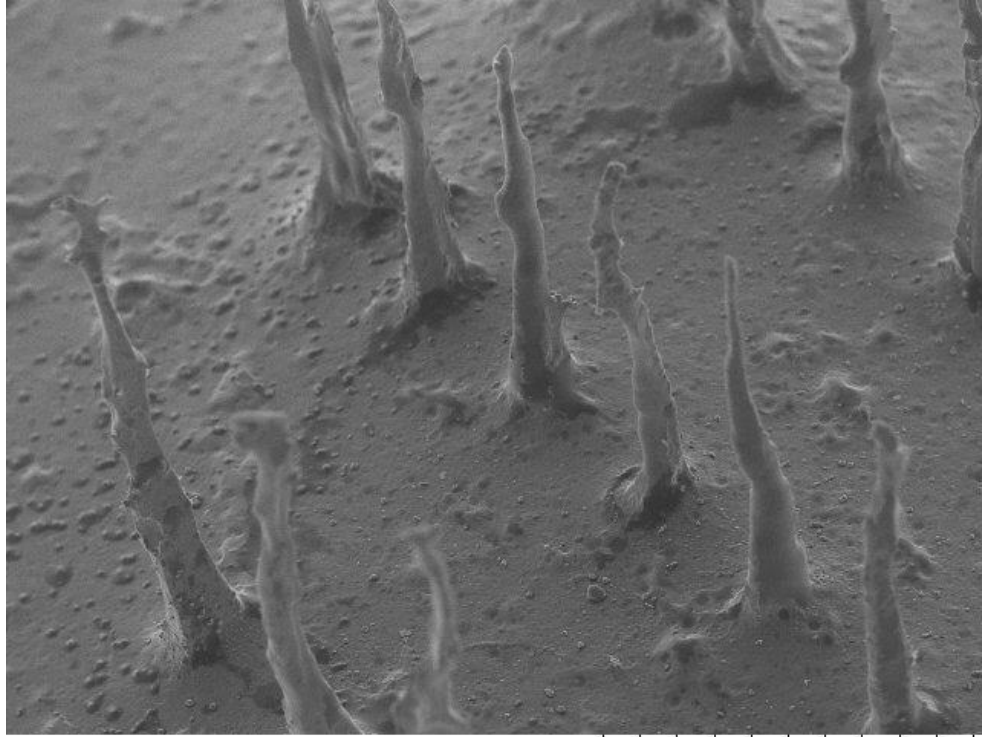
5.3.4.2. Karboksi metil selüloz (CMC) ile hazırlanan mikroığnelerin karakterizasyon çalışmaları

5.3.4.2.1. Morfolojik inceleme

CMC mikroığnelere ait SEM görüntüleri Şekil 5.29-5.32’de verilmiştir.



Şekil 5.29. CMC-F0 mikroığne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



AUBIBAM

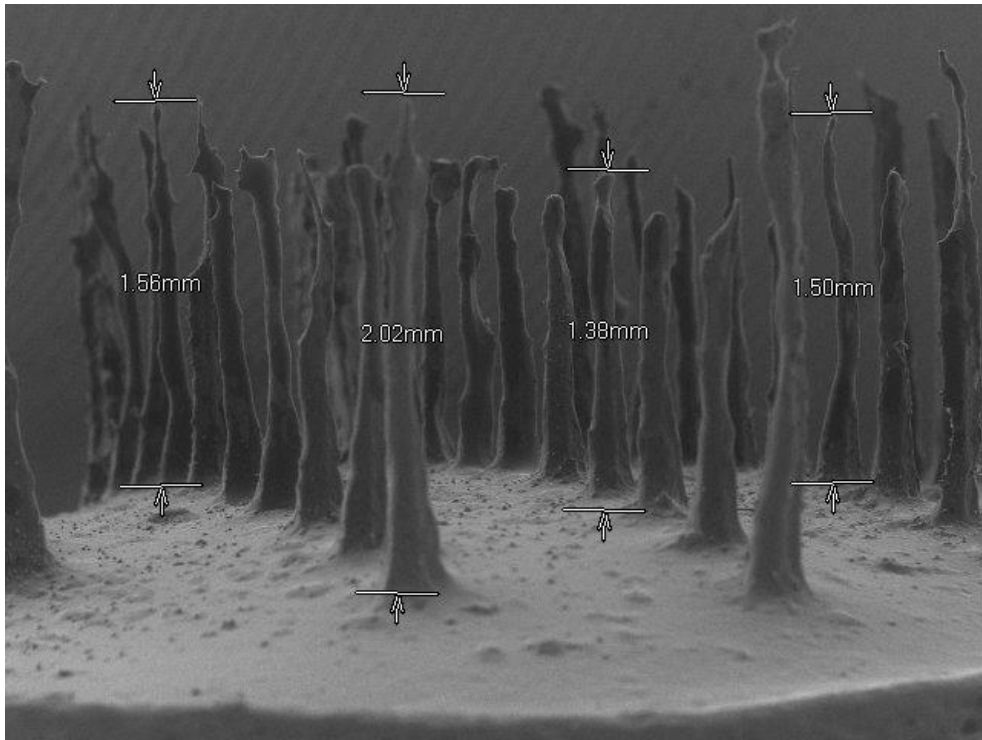
2019/12/20

15:29

HMMD7.2

x60

1 mm



AUBIBAM

2019/12/20

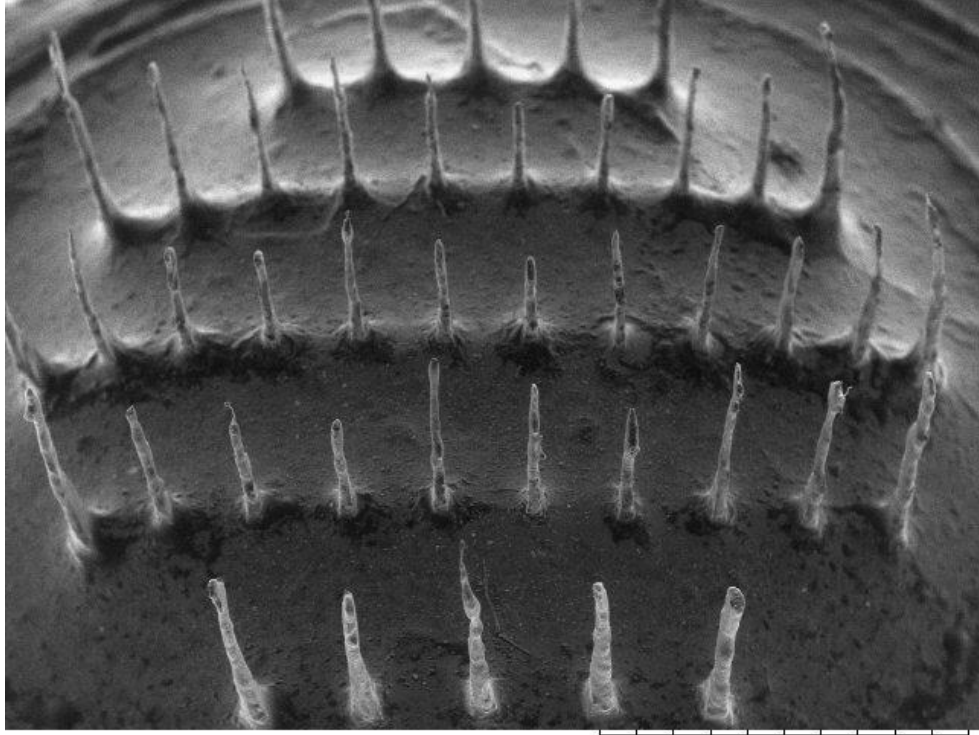
15:21

HMMD8.8

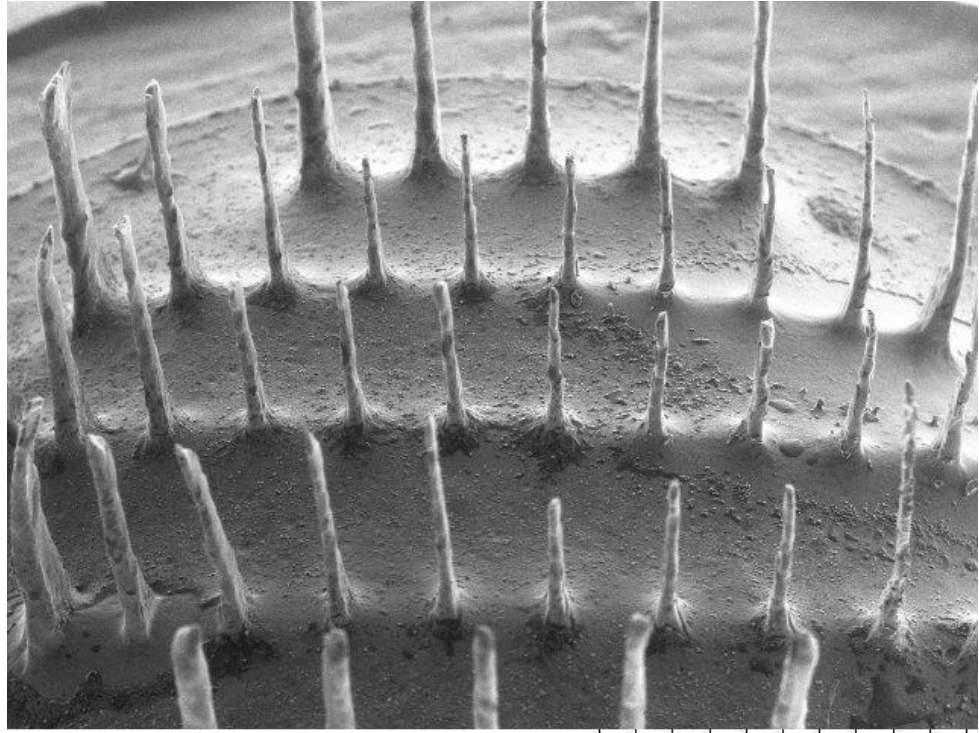
x40

2 mm

Şekil 5.29. (Devam) CMC-F0 mikroiğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

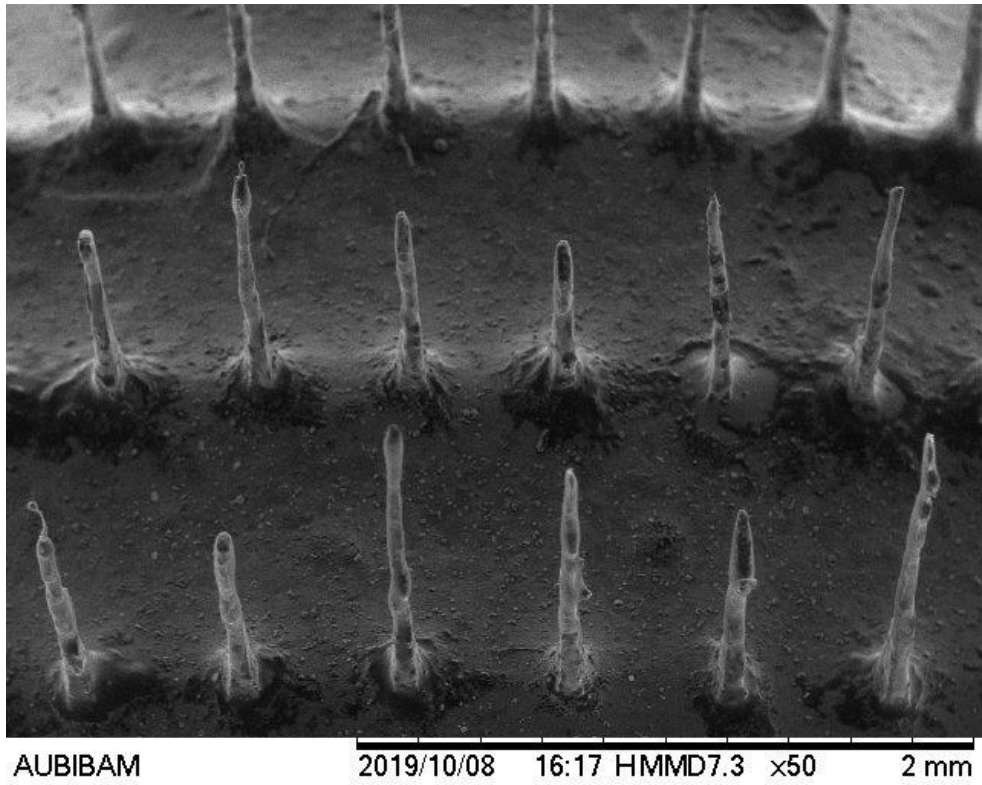
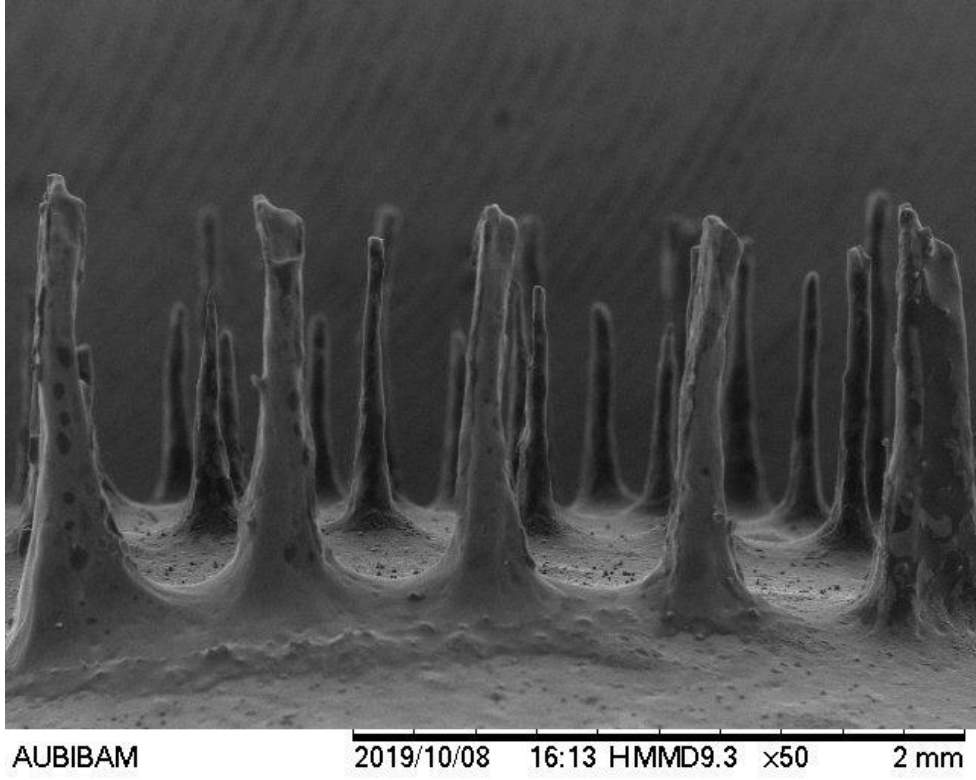


AUBIBAM 2019/10/08 16:16 HMMD6.7 x30 2 mm

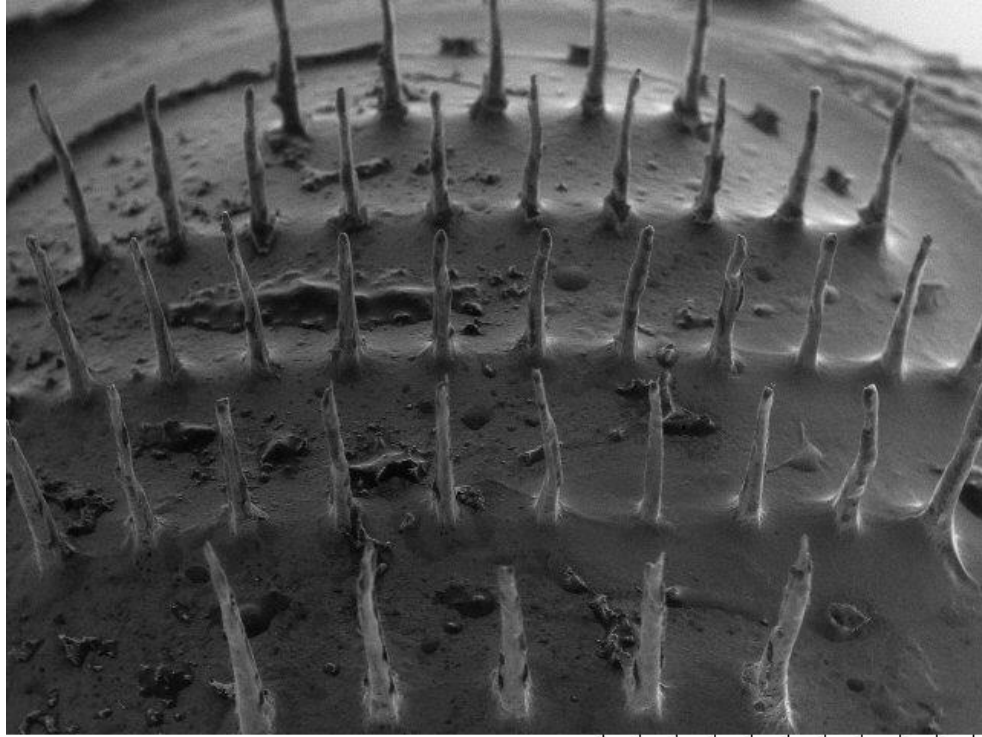


AUBIBAM 2019/10/08 16:19 HMMD9.4 x30 2 mm

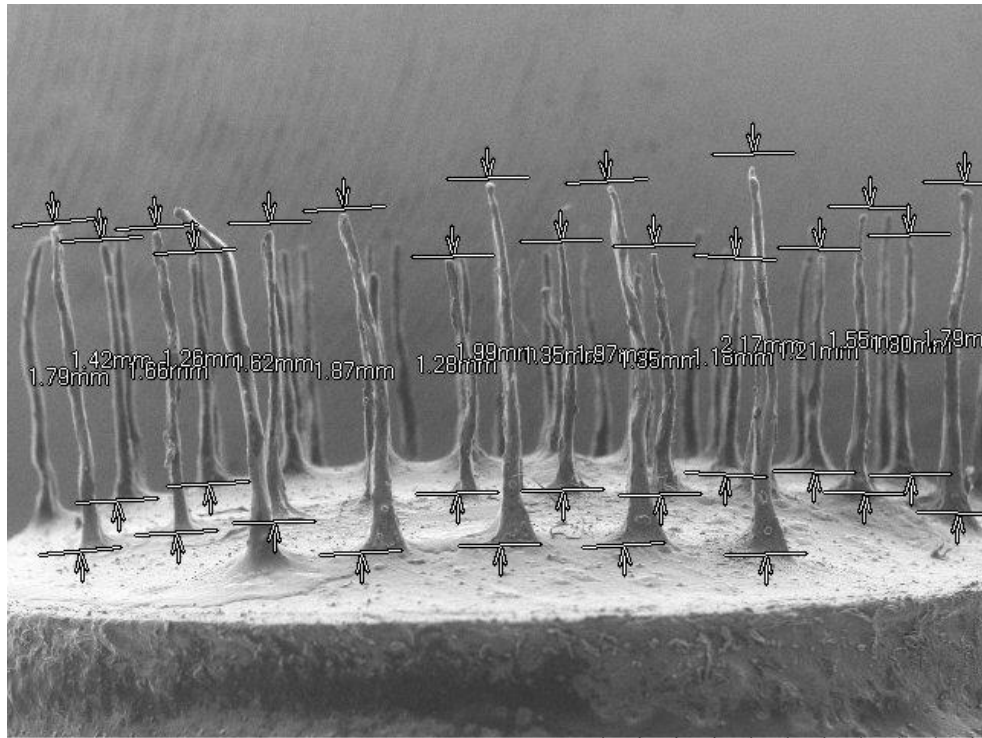
Şekil 5.30. CMC-F1 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



Şekil 5.30. (Devam) CMC-F1 mikroiğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

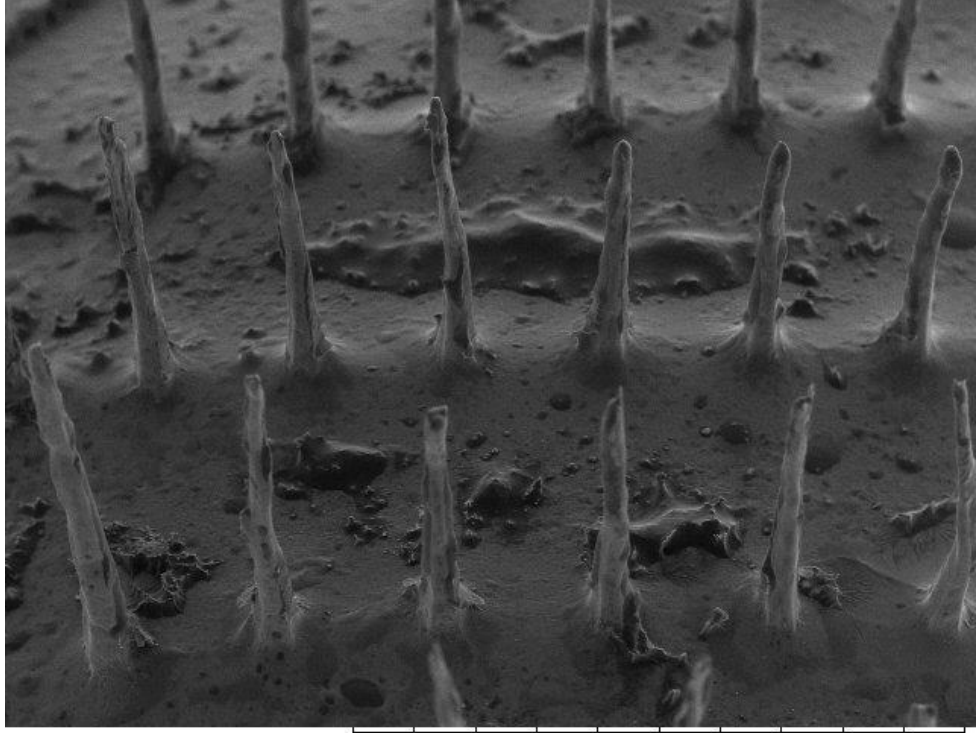


AUBIBAM 2019/10/08 16:30 HMMD7.6 x30 2 mm



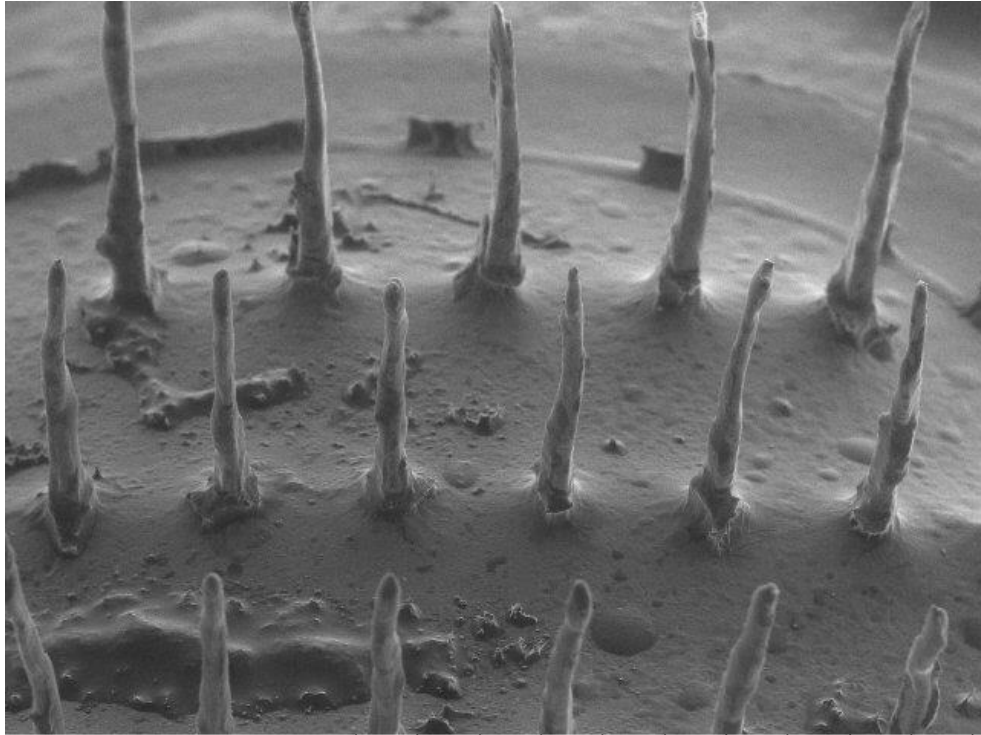
AUBIBAM 2019/10/08 16:38 HMMD8.9 x30 2 mm

Şekil 5.31. CMC-F2 formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



AUBIBAM

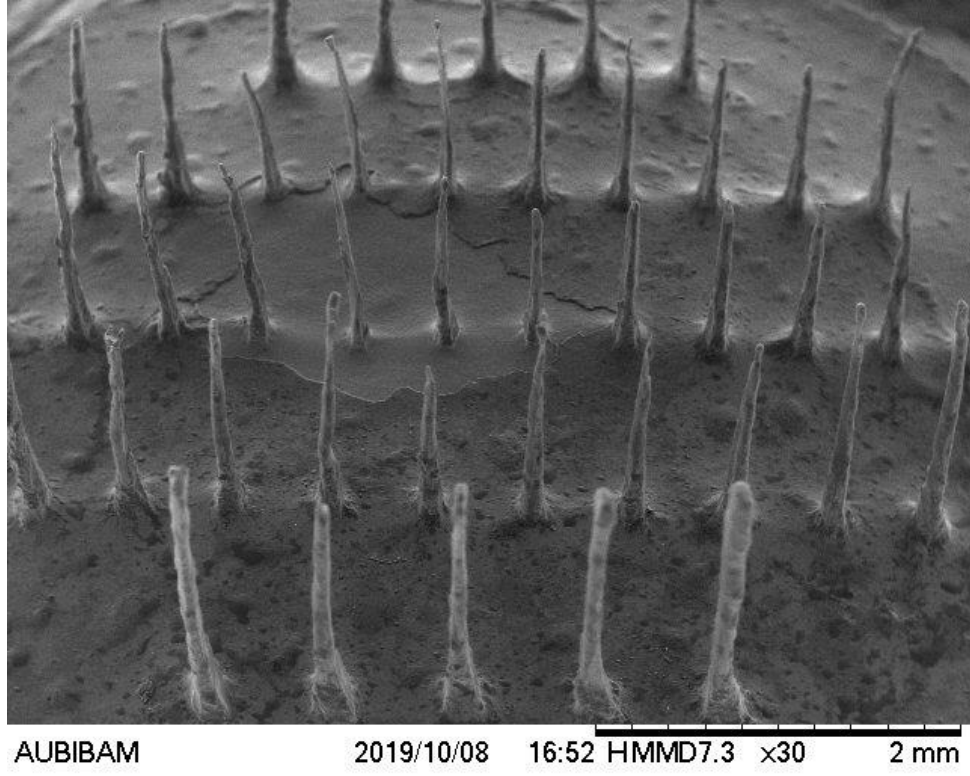
2019/10/08 16:31 HMMD7.7 x50 2 mm



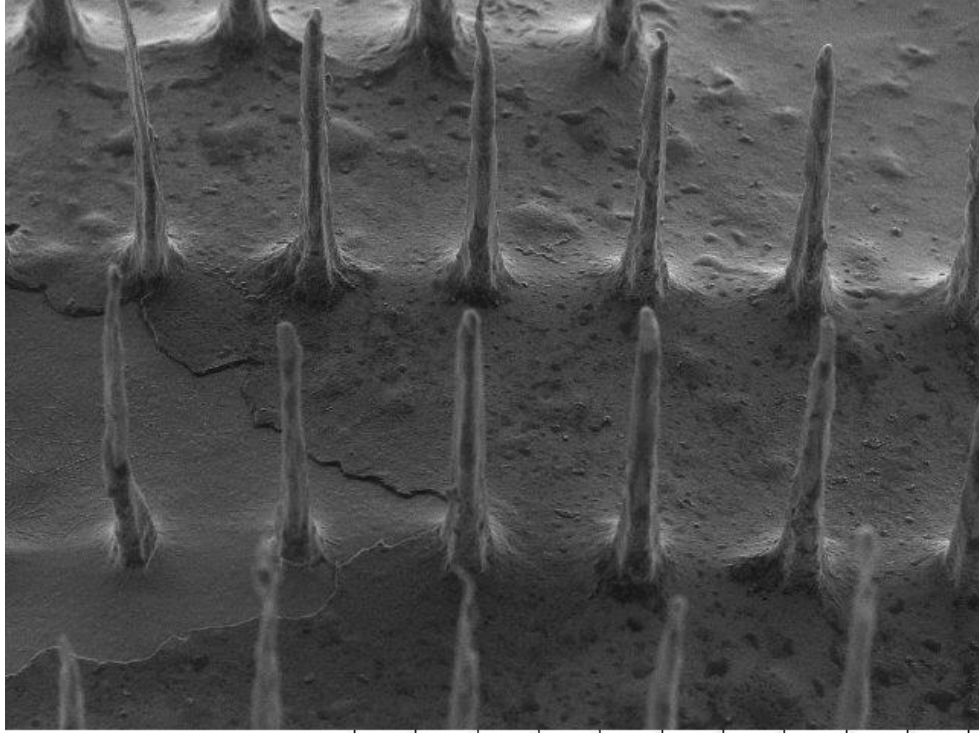
AUBIBAM

2019/10/08 16:36 HMMD8.9 x50 2 mm

Şekil 5.31. (Devam) CMC-F2 mikroiğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

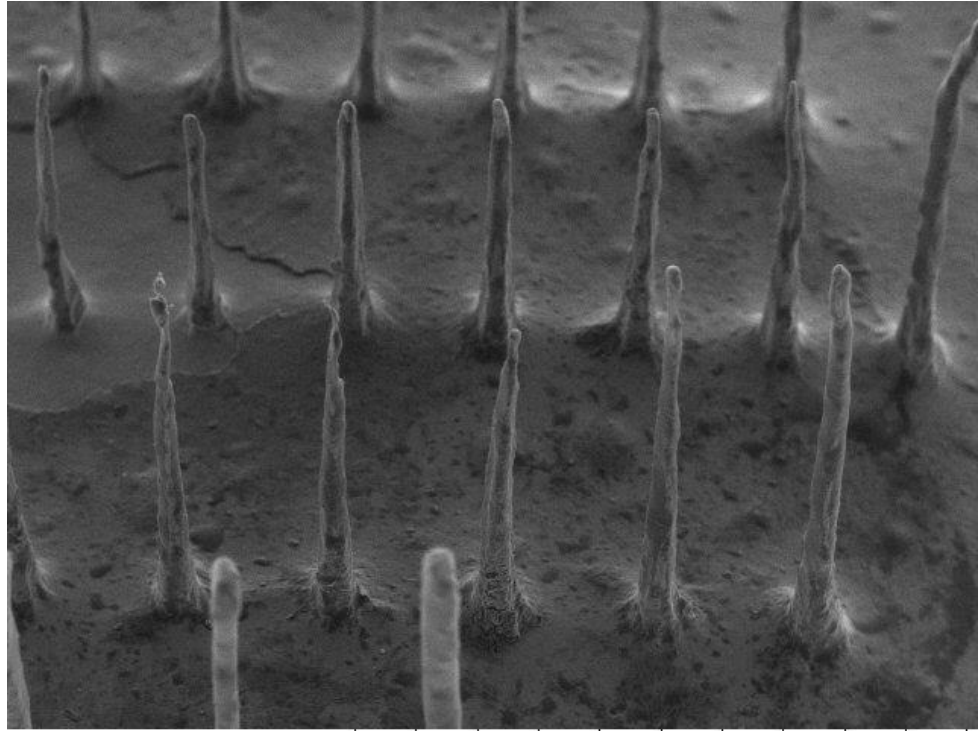


Şekil 5.32. CMC-F3 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



AUBIBAM

2019/10/08 16:53 HMMD8.6 x50 2 mm



AUBIBAM

2019/10/08 16:54 HMMD6.7 x50 2 mm

Şekil 5.32. (Devam) CMC-F3 mikroiğne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

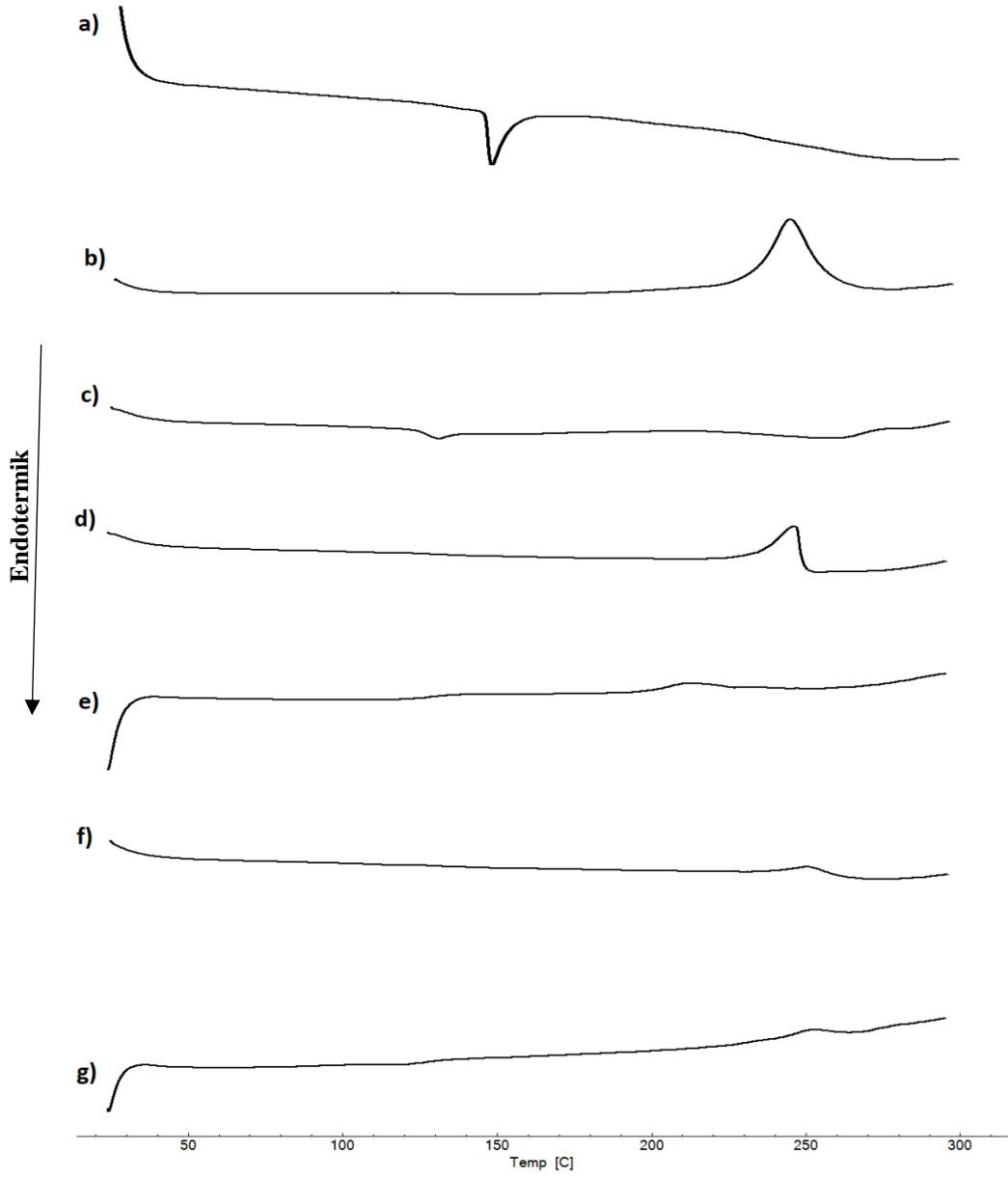
Tez çalışmamızda hazırlanan mikroïğnelerin iğne uzunluğu, iğne şekli ve iğne tabanı genişliği gibi önemli karakteristik özelliklerinin belirlenmesinde SEM analizleri gerçekleştirilmiştir (Li vd., 2019). Farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmış ve yapı detaylı olarak analiz edilmiştir. CMC ile hazırlanan formülasyonların 1,3 - 2 mm aralığında uzunluğa ve 0,1 - 0,25 mm taban çapına sahip sağlam yapılı iğneler oluşturduğu SEM analizleri sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.29 - 5.32).

Hazırlanan mikroïğnelerin düzgün yapıya sahip oldukları ve sivri uç kısımları sayesinde lakozamidin etkin bir şekilde nazal mukozadan geçişini sağlayacak özellikte oldukları görülmektedir (Şekil 5.29 - 5.32) (Seon-Woo vd., 2019).

5.3.4.2.2. Termal Analiz

CMC mikroïğne formülasyonlarına ait DSC termogramları Şekil 5.33'te yer almaktadır. Yapılan ön formülasyon çalışmalarında etkin maddenin erime pikinin yaklaşık 149 °C ortaya çıktığı ve maddenin kristal yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.7 ve Şekil 5.33a). Saf polimerin ise amorf yapıda olduğu termogramında herhangi bir erime pikinin gözlenmemesi ile belirlenmiştir (Şekil 5.13 ve Şekil 5.33b). Polimer ile etkin madde arasındaki olası geçimsizliklerin ve çözünürlük özelliklerinin belirlenmesi amacı ile lakozamid ve CMC'ye ait fiziksel karışım hazırlanmış ve etkin madde ile polimer arasında herhangi bir etkileşimin olmadığı elde edilen termogramda lakozamide ait erime pikinin gözlenmesi sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.33c) (Rojek ve Wesolowski, 2019).

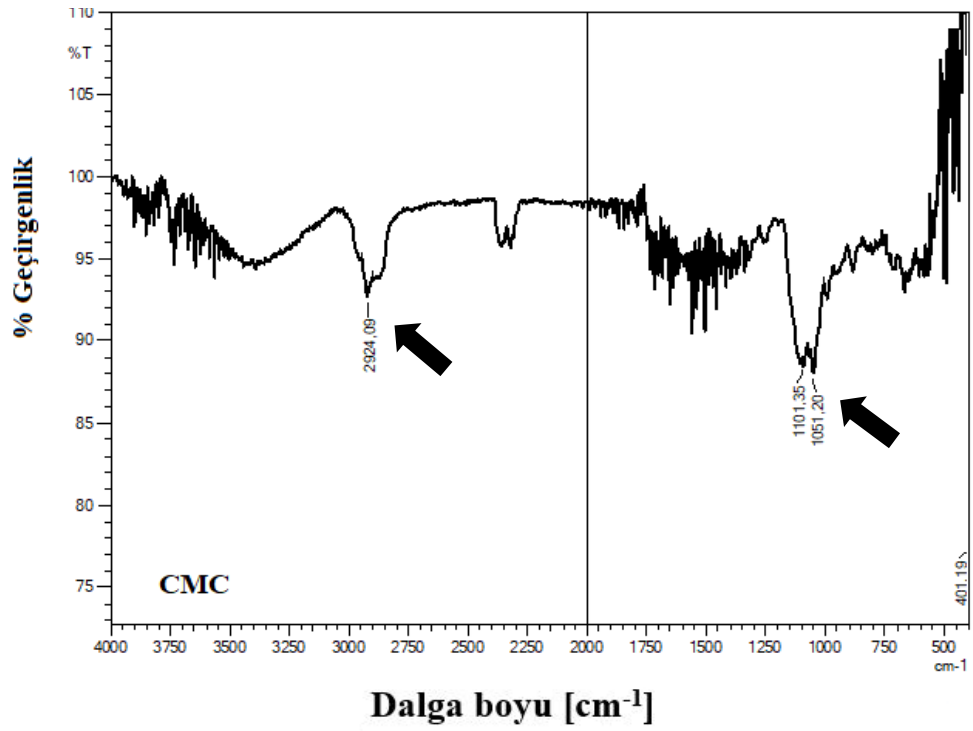
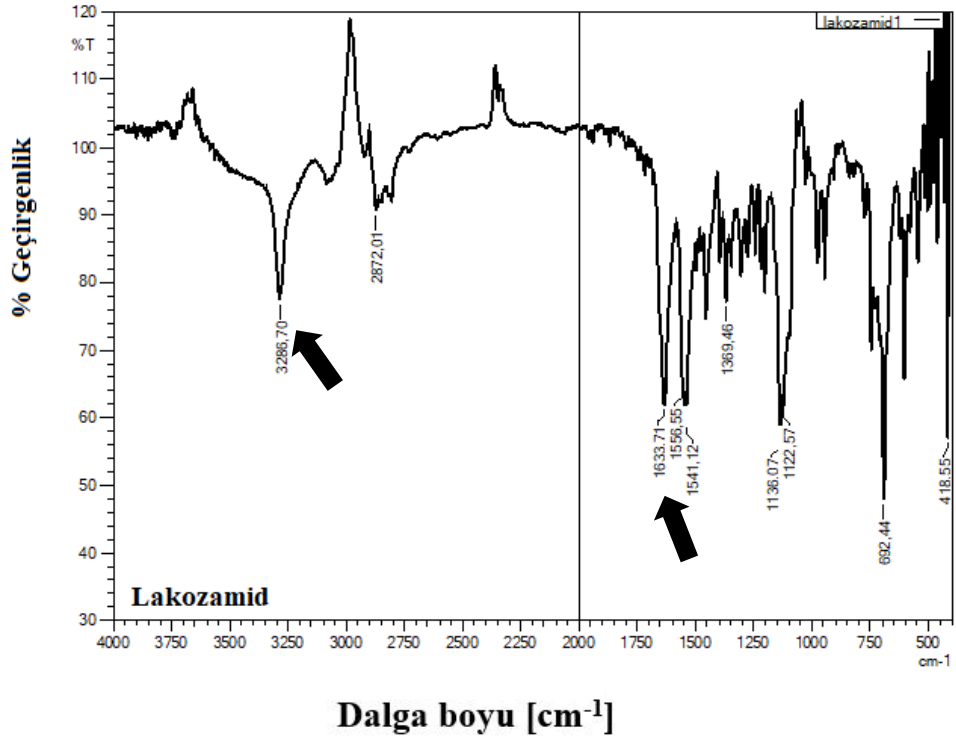
Hazırlanan plasebo ve lakozamid yüklenmiş formülasyonların DSC termogramları incelendiğinde saf polimer ile benzer şekilde amorf yapıda oldukları ve yüklenen lakozamidin polimerik yapı içinde moleküler olarak dağılması sonucunda formülasyonlarda amorf yapıda bulunduğu formülasyonlara ait termogramlarda herhangi bir erime pikinin ortaya çıkmaması sonucunda belirlenmiştir (sırası ile Şekil 5.33d ve Şekil 5.33e-5.33g) (Gamal vd., 2016; Rojek ve Wesolowski, 2019).



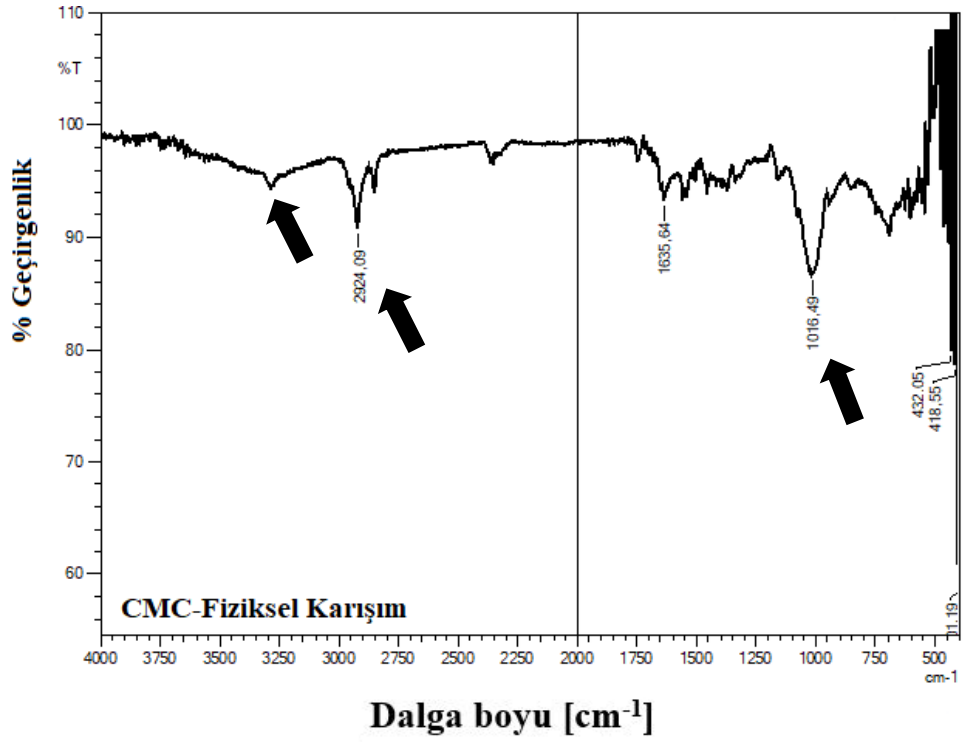
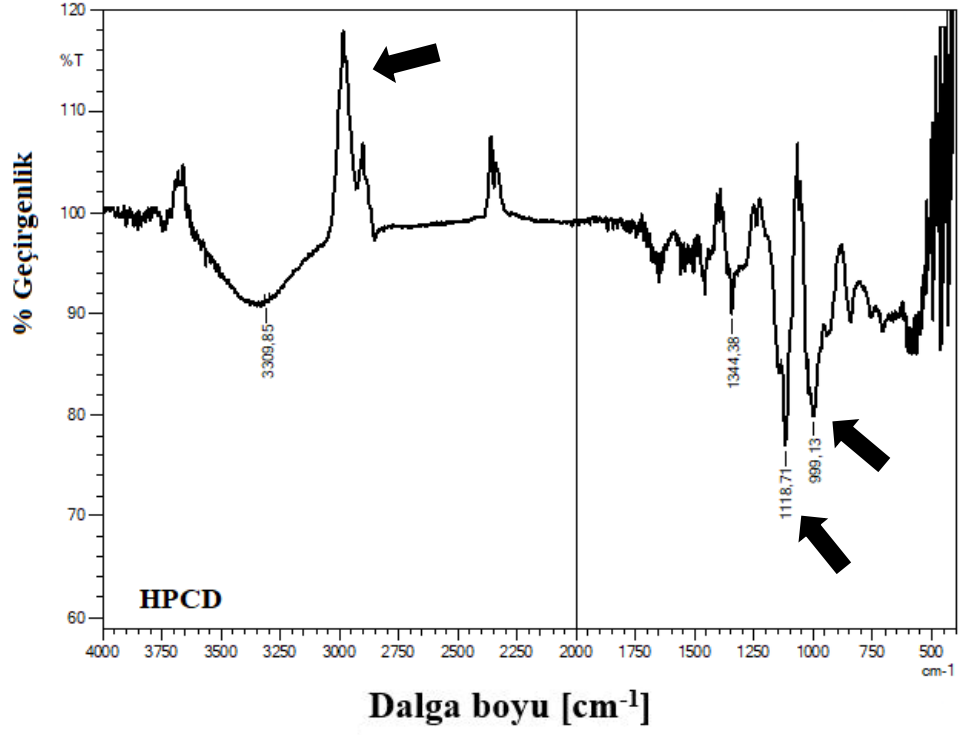
Şekil 5.33. CMC ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait DSC termogramları; a) Lakoamid, b) CMC, c) Fiziksel karışım, d) CMC-F0, e) CMC-F1, f) CMC-F2, g) CMC-F3

5.3.4.2.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri

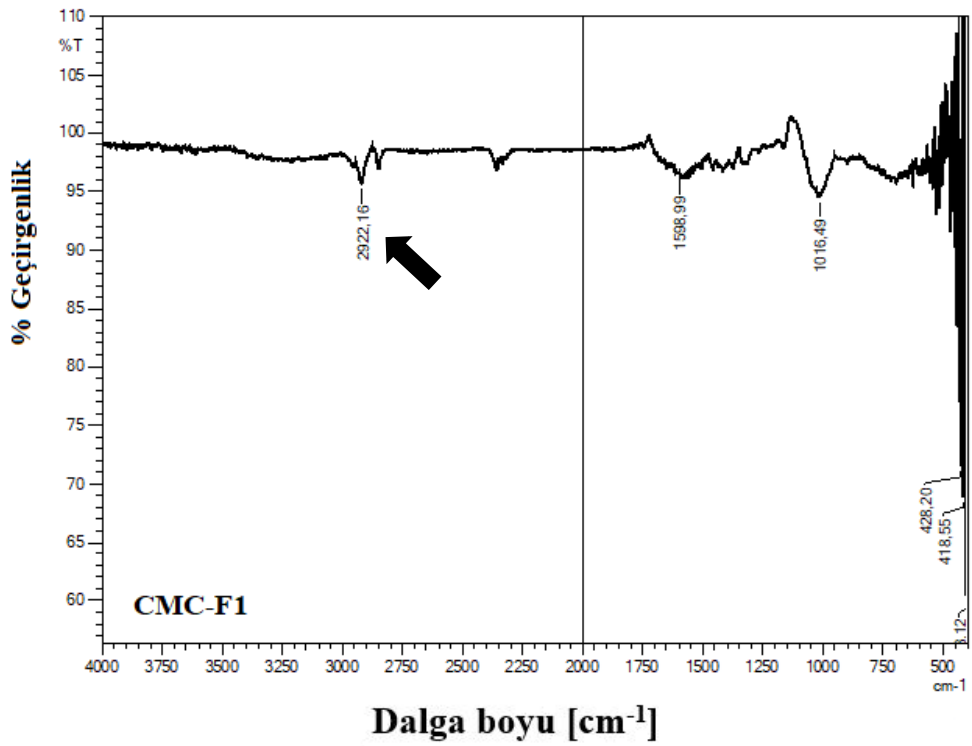
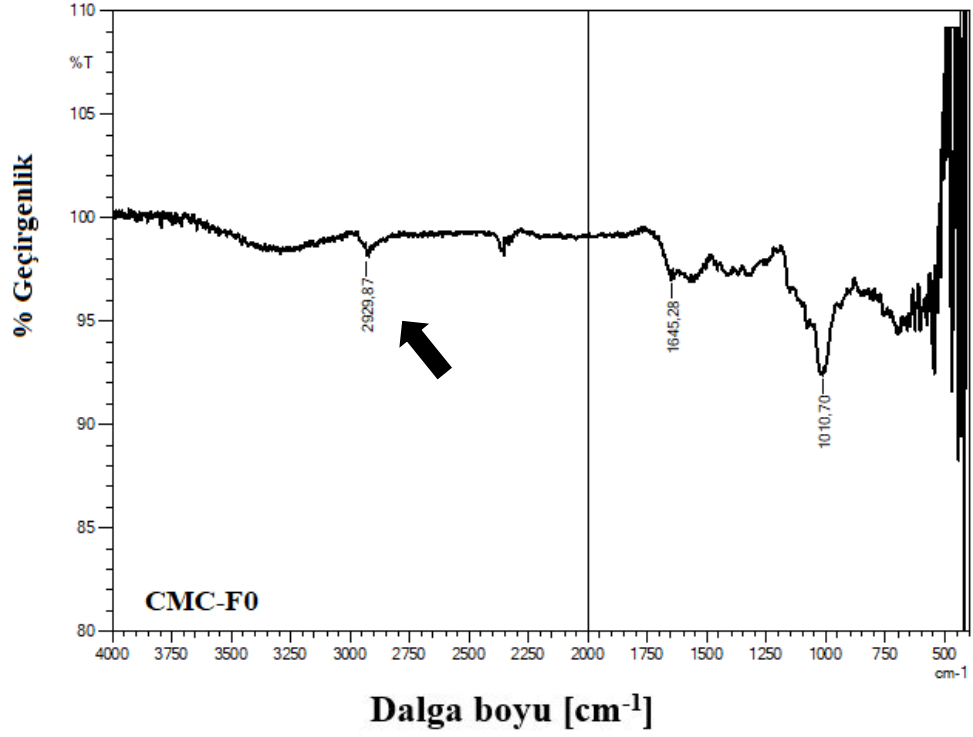
CMC mikroïğne formülasyonlarına ve bileşenlerine ait FT-IR sonuçları Şekil 5.34'te verilmiştir.



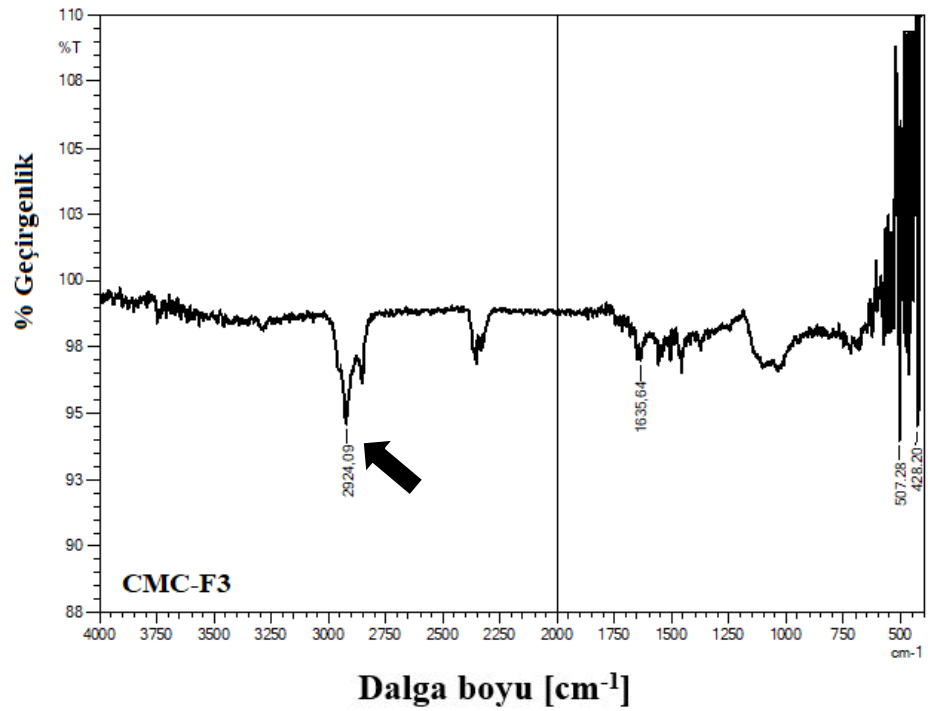
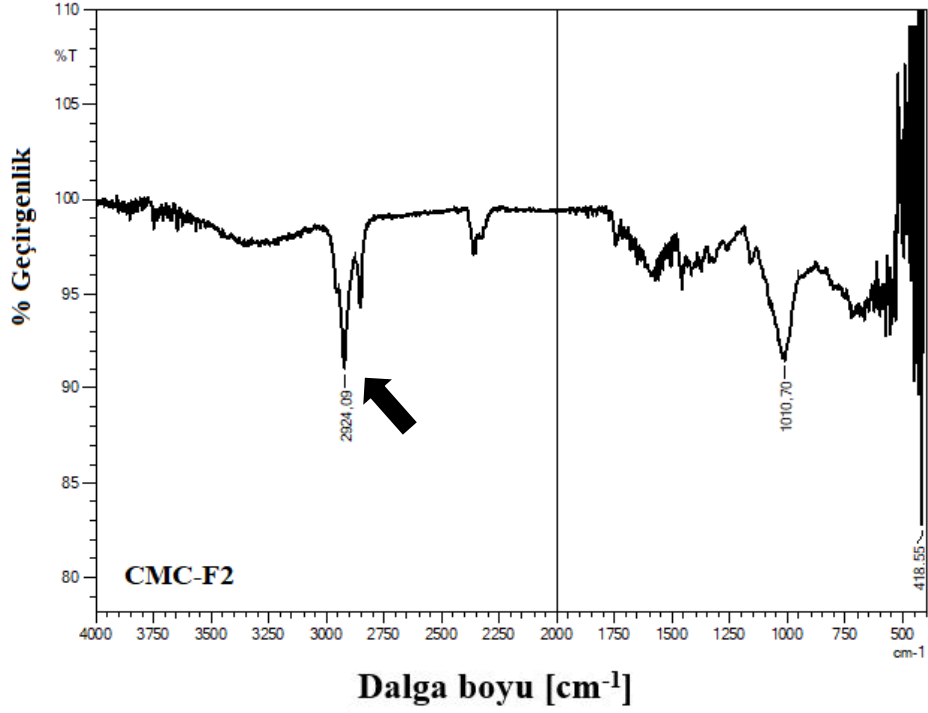
Şekil 5.34. CMC ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları



Şekil 5.34. (Devam) CMC ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları



Şekil 5.34. (Devam) CMC ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları



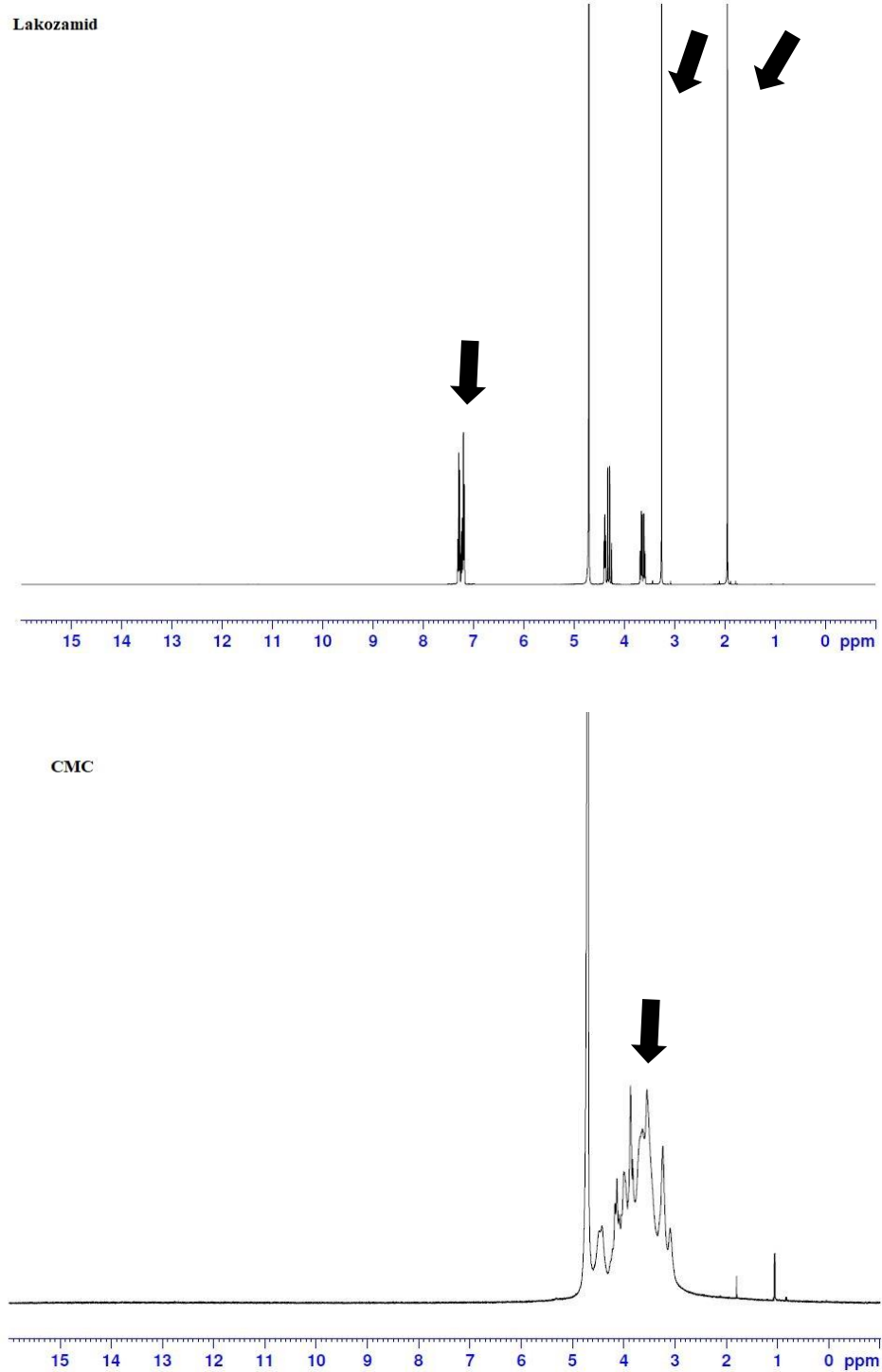
Şekil 5.34. (Devam) CMC ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları

FT-IR spektrumları incelendiğinde kullanılan polimerlerin ve lakozamidin pik verdikleri noktaların birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir (Şekil 5.34). Ancak lakozamidin yapısında bulunan N-H gruplarına ait 3286 cm^{-1} 'de gelen pik fiziksel karışım içinde bariz bir şekilde kendini göstermesine rağmen formülasyonlara ait FT-IR

spektrumları içinde yer almamaktadır. Bu durum lakozamidin polimer içinde moleküler düzeyde dağıldığını göstermekte ve DSC analizlerini desteklemektedir.

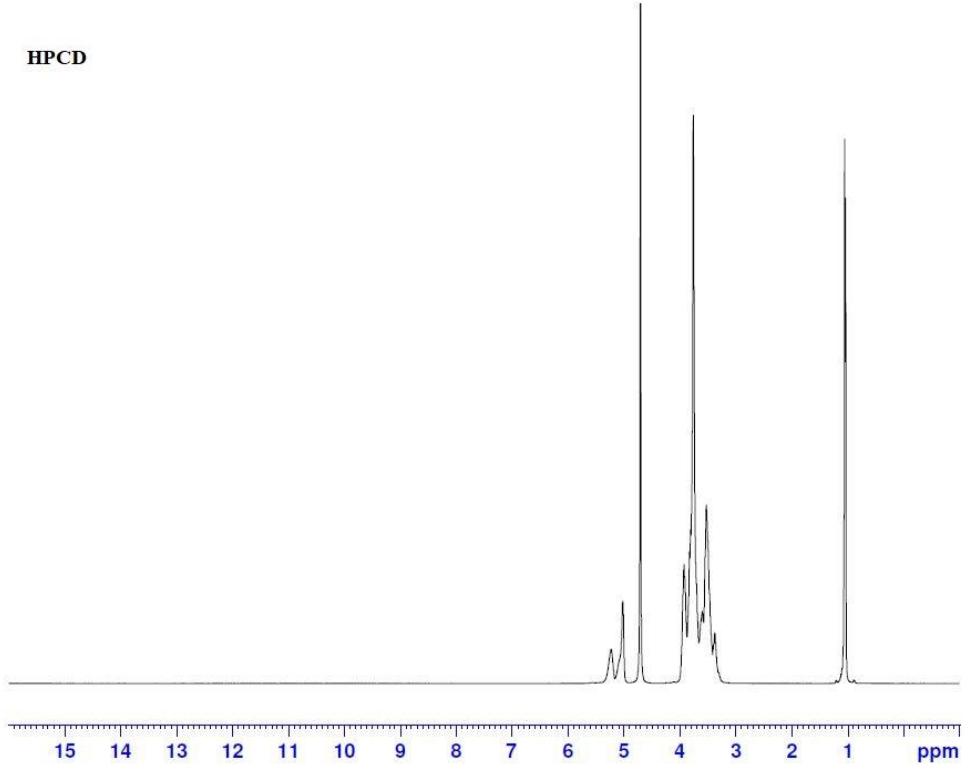
5.3.4.2.4. Nükleer manyetik rezonans analizleri

CMC mikroigne formülasyonlarına ait ^1H -NMR analizi spektrumu Şekil 5.35'te verilmiştir.

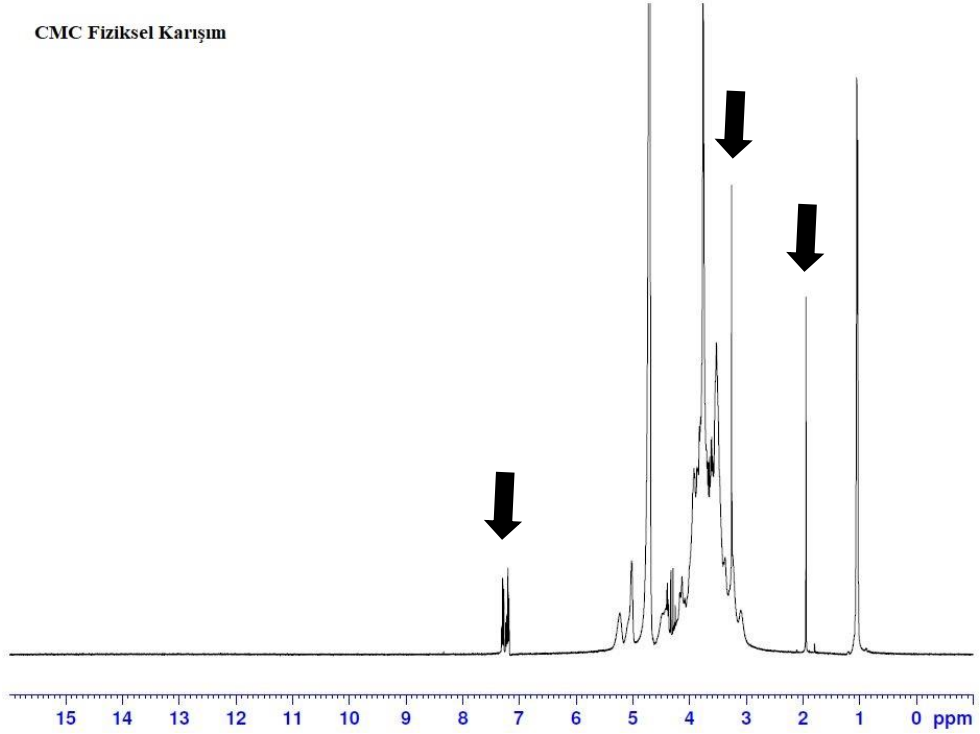


Şekil 5.35. CMC ile hazırlanan mikroignelere ve bileşenlere ait ^1H -NMR sonuçları

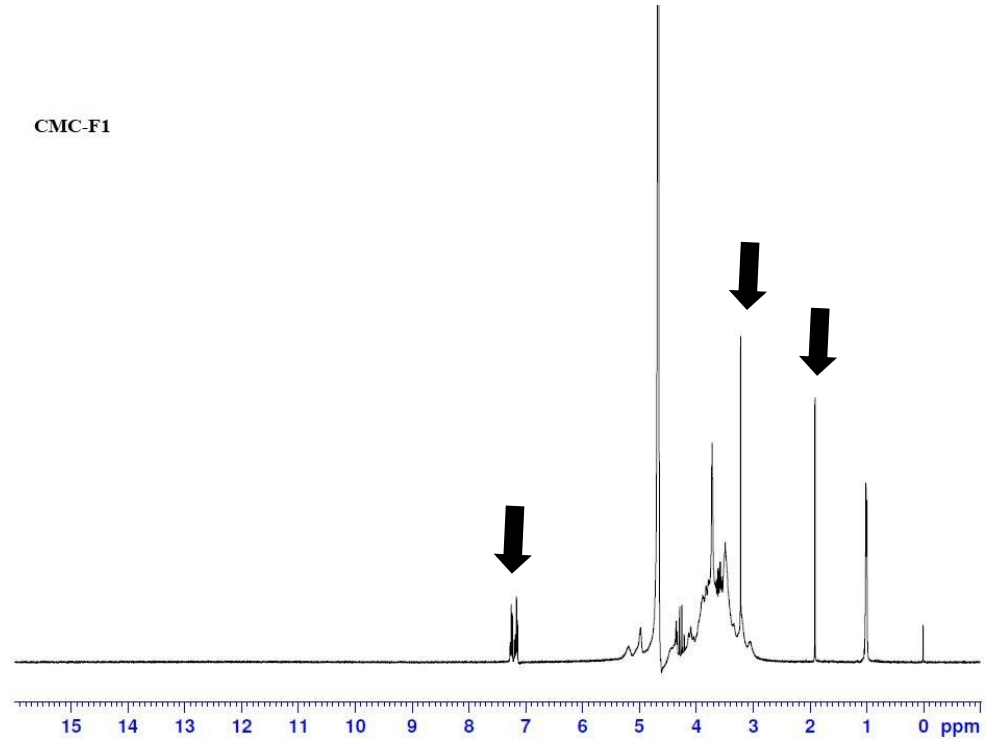
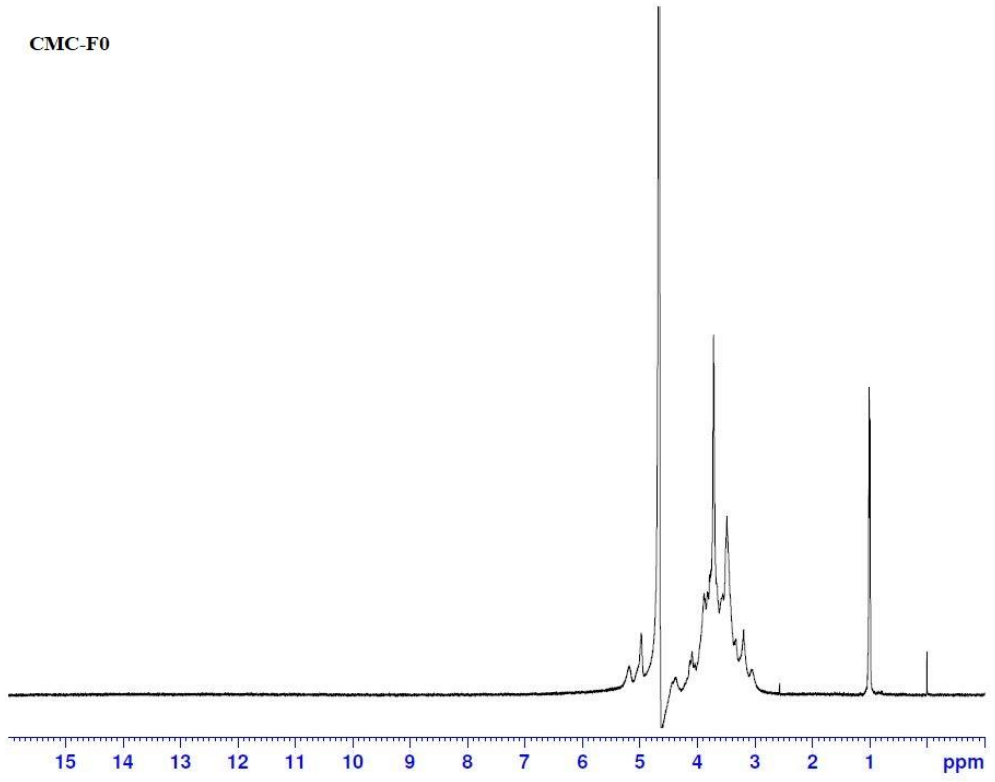
HPCD



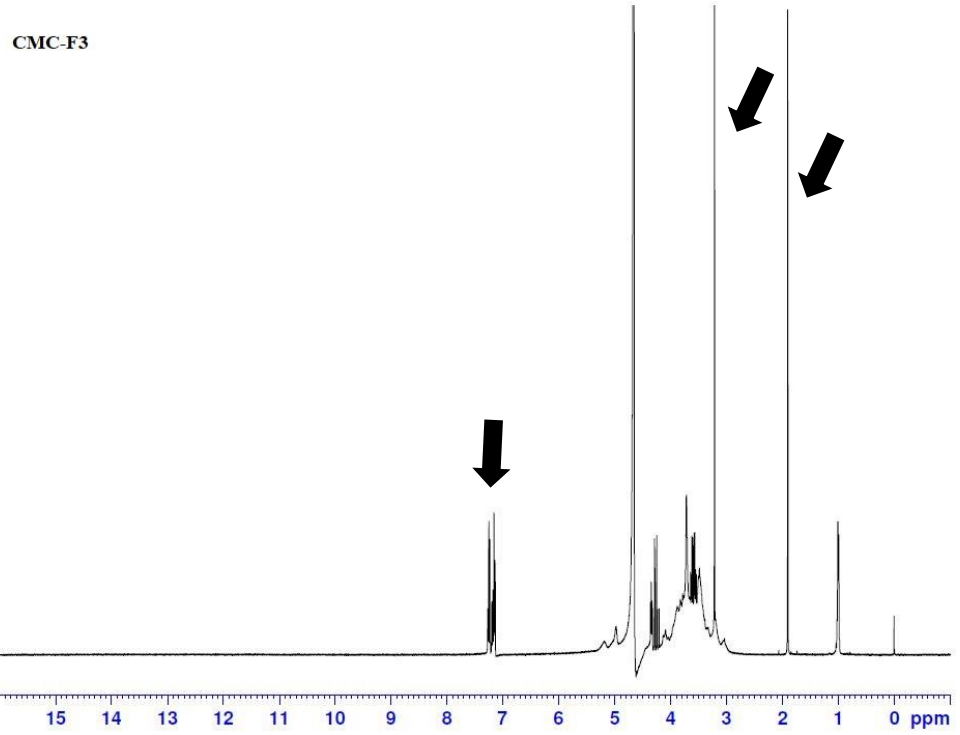
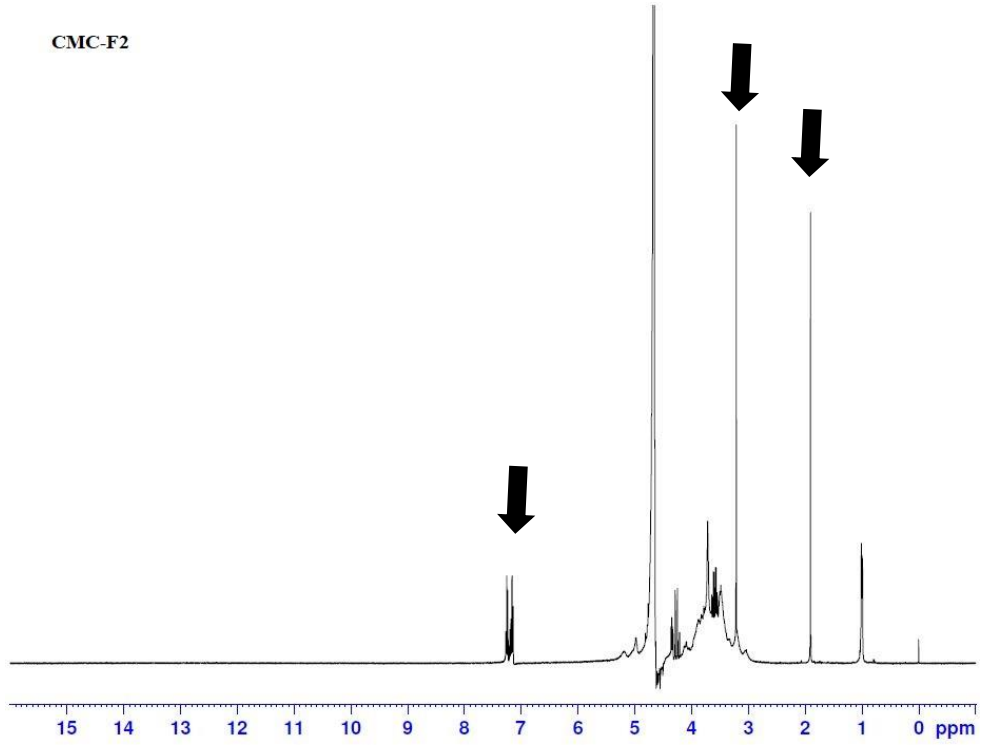
CMC Fiziksel Karışım



Şekil 5.35. (Devam) CMC ile hazırlanan mikroğnelere ve bileşenlere ait ¹H-NMR sonuçları



Şekil 5.35. (Devam) CMC ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait ^1H -NMR sonuçları



Şekil 5.35. (Devam) CMC ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait ¹H-NMR sonuçları

Çözücü olarak döteryum oksit kullanılarak yapılan ¹H-NMR analizleri sonucunda elde edilen spektrumlarda lakozamide özgü pikler, ~1,9 ppm'de, ~3,1 ppm'de ve ~7,2 ppm'de ortaya çıkmıştır. Lakozamide özgü pikler CMC ile hazırlanan mikroïgne

formülasyonların tamamında açık bir şekilde görülmektedir. Bu durum formülasyon içinde bulunan lakozamidin moleküler yapısında herhangi bir değişiklik olmadığını göstermektedir (Şekil 5.35).

5.3.4.2.5. Miktar tayini

Etkin madde miktar tayini sonuçları Çizelge 5.14’de verilmiştir.

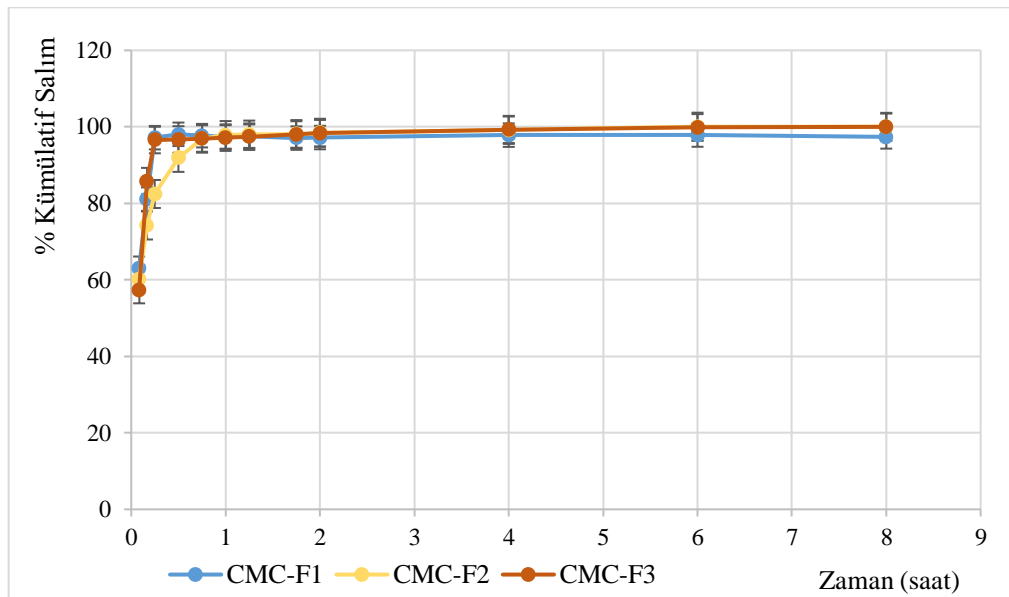
Çizelge 5.14. CMC-FX kodlu formülasyonların miktar tayini sonuçları

Formülasyon Kodu	Etkin Madde Miktarı (% (a/a) \pm SH, n=3)
CMC-F1	5,6552 \pm 0,09036
CMC-F2	10,9945 \pm 0,1500
CMC-F3	15,6390 \pm 0,0786

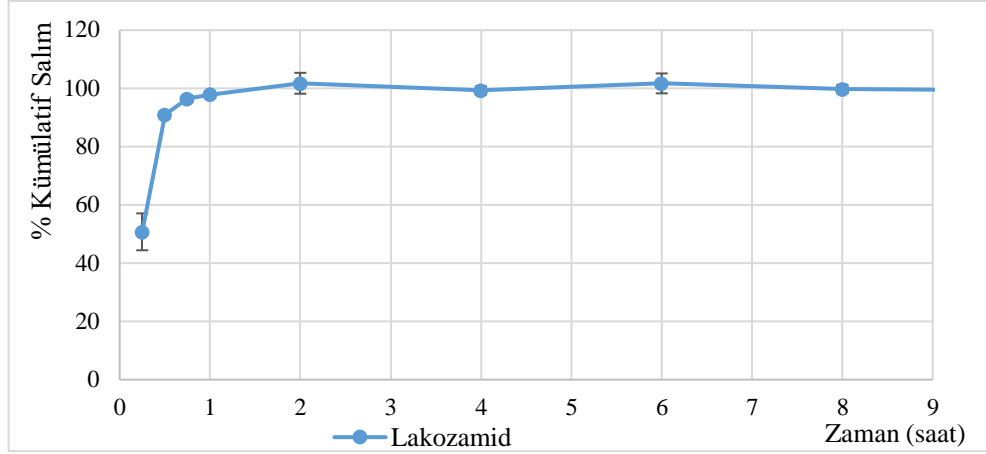
Miktar tayini çalışması sonucunda istenilen miktarda etkin maddenin mikroïğnelere yüklendiği tespit edilmiştir. Daha yüksek oranda etkin madde içeren formülasyonlarla hazırlanan mikroïğnelerin yapısının daha da sertleştiği ve mikroïğne yapısının pürüzsüz ve dayanıklı bir yapı olmaktan çıkıp sertliğini kaybettiği kaydedilmiştir.

5.3.4.2.6. *In vitro* salım çalışması

Mikroïğne formülasyonlarının salım profilleri Şekil 5.36’te verilmiş, salım modellemesi ise Çizelge 5.15’te gösterilmiştir.



Şekil 5.36. Fosfat tamponunda (pH:6,4) CMC mikroïğnelерinden lakozamid ve saf lakozamid salım grafiği ($\bar{x}\pm SH$, n=3)



Şekil 5.36. (Devam) Fosfat tamponunda (pH:6,4) CMC mikroïğnelereinden lakozamid ve saf lakozamid salım grafiği ($\bar{x} \pm SH$, n=3)

Çizelge 5.15. CMC-FX kodlu formülasyonların etkin madde salım modelleri

Formülasyon	Parametre	Salm Modelleri					
		Sıfırncı Derece	Birinci Derece	Higuchi	Hixon-Crowell	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas
CMC-F1	k	0,302	0,017	7,0156	0,0033	0,003	71,457
	r ²	-45,955	-15,12	-20,425	-24,347	-22,355	0,428
	AIC	133,703	120,87	124,288	126,305	127,323	82,814
	MSC	-4,016	-2,946	-3,2312	-3,399	-3,484	0,225
	n	-	-	-	-	-	0,063
CMC-F2	k	0,307	0,045	7,0349	0,0029	0,004	55,891
	r ²	-29,188	-1,584	-11,804	-15,451	-10,450	0,382
	AIC	132,637	103,14	122,346	125,353	123,005	87,975
	MSC	-3,5741	-1,116	-2,7165	-2,967	-2,771	0,148
	n	-	-	-	-	-	0,124
CMC-F3	k	0,3074	0,035	7,0949	0,0028	0,006	65,350
	r ²	-35,485	-4,913	-15,353	-19,599	-10,444	0,382
	AIC	133,601	111,76	123,972	126,742	121,689	86,669
	MSC	-3,764	-1,944	-2,961	-3,192	-2,771	0,148
	n	-	-	-	-	-	0,088
Lakozamid	k	14,564	1,050	44,901	0,164	0,164	83,893
	r ²	-14,728	-2,008	-5,949	-6,238	-5,886	0,381
	AIC	95,659	80,770	88,308	88,674	90,225	68,541
	MSC	-2,978	-1,323	-2,161	-2,202	-2,374	0,035
	n	-	-	-	-	-	0,113

Çizelge 5.16. CMC-FX kodlu formülasyonların benzerlik ve fark faktörleri

Formülasyon	(f ₁) fark faktörü	(f ₂) benzerlik faktörü
CMC-F1 ve CMC-F2	3,64	63,71
CMC-F1 ve CMC-F3	1,92	78,81
CMC-F2 ve CMC-F3	3,19	62,55

CMC ile hazırlanan mikroïgnelerin *in vitro* salım çalışması sonucunda bütün formülasyonlardan bir saat içinde etkin maddenin tamamının salındığı yapılan analizler sonucunda tespit edilmiştir (Şekil 5.36). Nazal uygulanan formülasyonlar, kısa sürede burundan uzaklaştırılmaktadır (Jaiswal vd., 2017). Hazırlanan formülasyonlardan bir saat içinde etkin maddenin tamamının serbestleşmesi terapötik dozda etkin madde uygulamak için bir üstünlük sağlamaktadır.

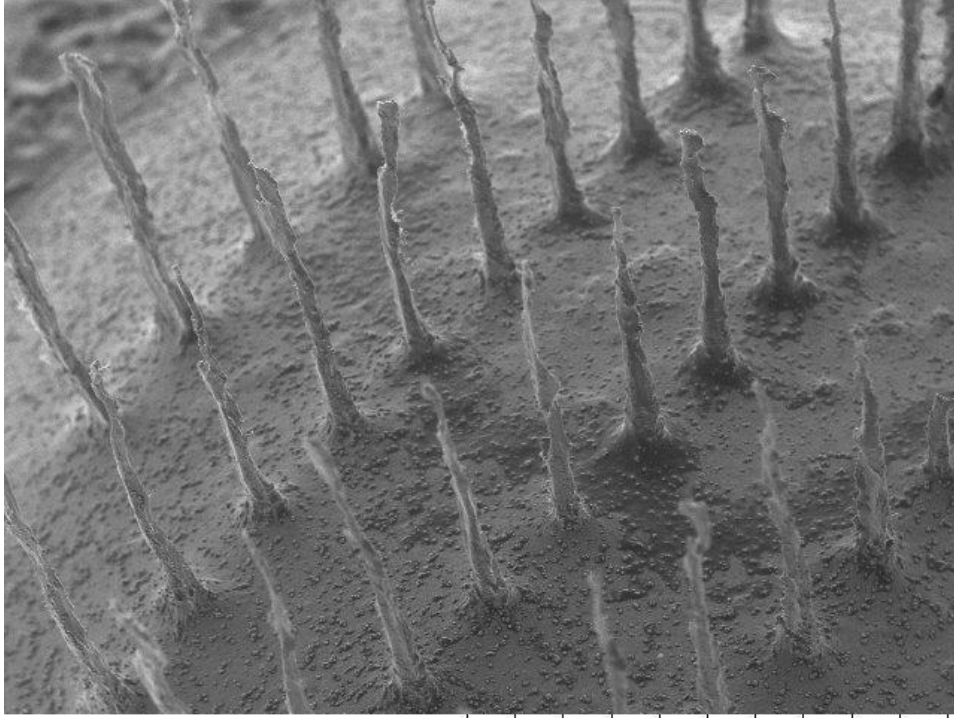
CMC ile hazırlanan mikroïgnelerin salım modellemesi sonucunda elde edilen AIC, MSC ve determinasyon katsayısı (r^2) parametreleri (Çizelge 5.15) her üç formülasyon için de geçerli salım modelinin Korsmeyer-Peppas olduğunu göstermektedir (Zuo vd., 2014). Polimerik yapılaraya sahip sistemler genellikle Korsmeyer-Peppas modeline uygun salım göstermektedir (Costa ve Lobo, 2001). Çizelge 5.15'te yer alan "n" değerlerine göre etkin madde mikroïgne formülasyonlarından Fick yasasına uygun difüzyon ile serbestleşmektedir (Grassi ve Grassi, 2005). Fick yasasına uygun difüzyon gösteren sistemlerde "n" değerleri 0,45'ten küçüktür. 0,45-0,90 arasında bir değer ise Fick yasasına uymayan difüzyon olarak Kabul edilir. Bu değer 0,90'dan büyük ise sistemde sıfırıncı derece kinetiğe uygun salım gözlenir (Dash vd., 2010). Fick yasasına göre difüzyonda ilaç molekülleri yüksek derişimde buldukları alandan düşük derişimde buldukları alana geçmeye meyillidir (Gouda vd., 2017).

Hazırlanan formülasyonların kendi aralarında kıyaslanması sonucunda elde edilen benzerlik ve fark faktörleri Çizelge 5.16'da sunulmuştur. Benzerlik ve fark faktörleri kıyaslandığında hazırlanan formülasyonların benzer salım profile çizdiği tespit edilmiştir (Costa ve Lobo, 2001).

5.3.4.3. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïgnelerin karakterizasyon çalışmaları

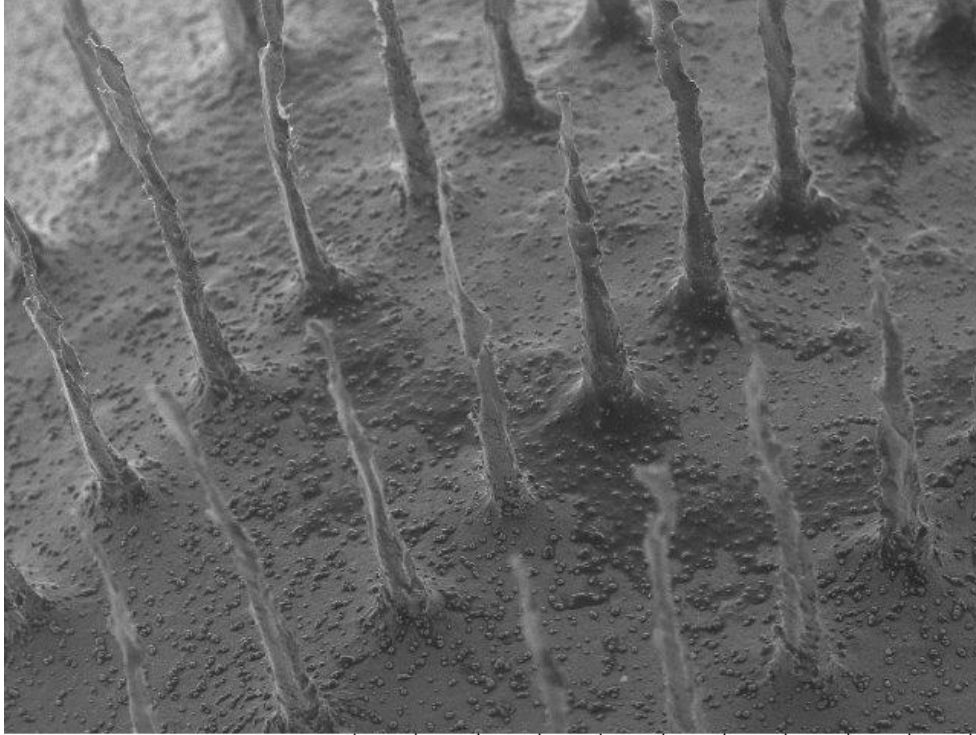
5.3.4.3.1. Morfolojik inceleme

Sodyum aljinat mikroïgnelere ait SEM görüntüleri Şekil 5.37-5.40'ta verilmiştir.



AUBIBAM

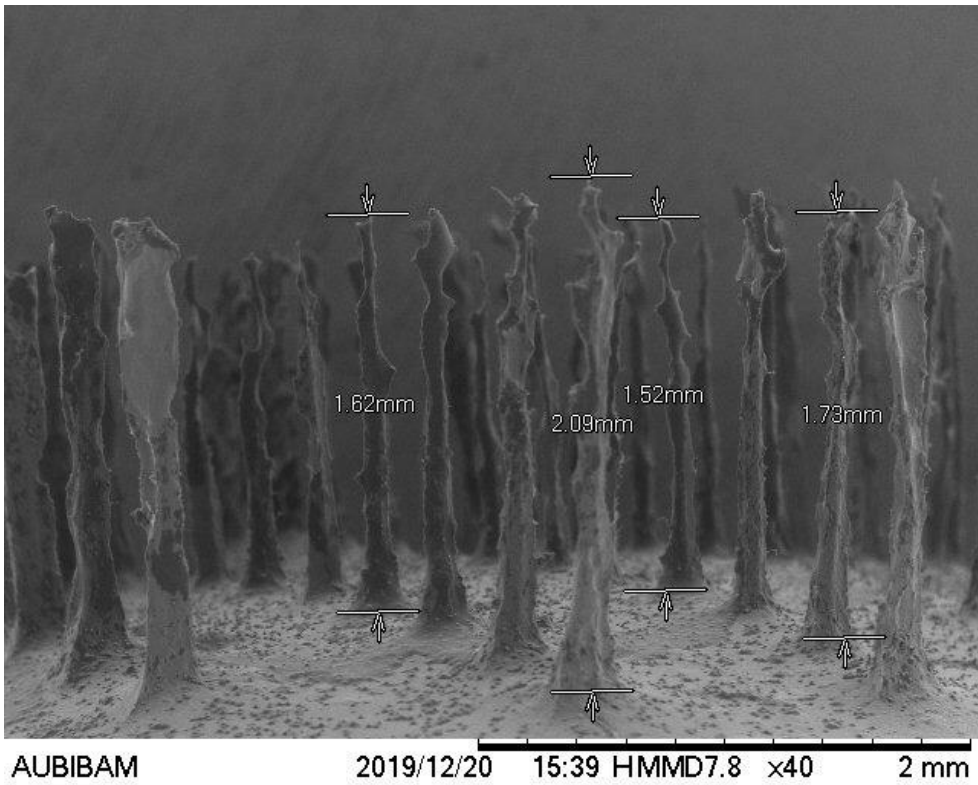
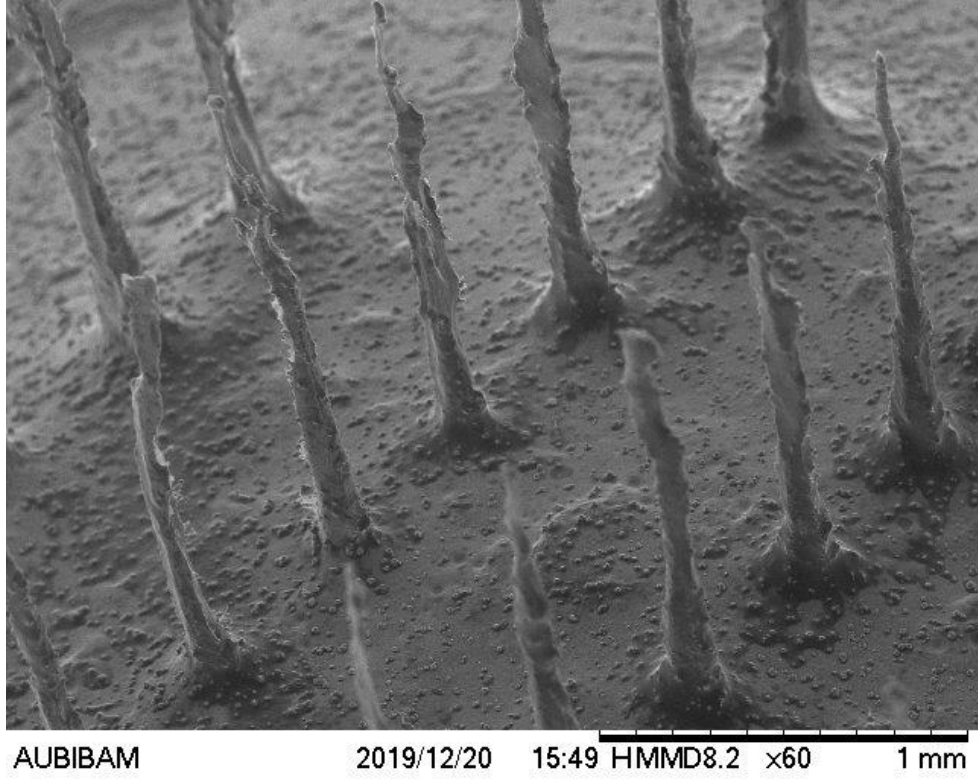
2019/12/20 15:43 HMMD7.2 x40 2 mm



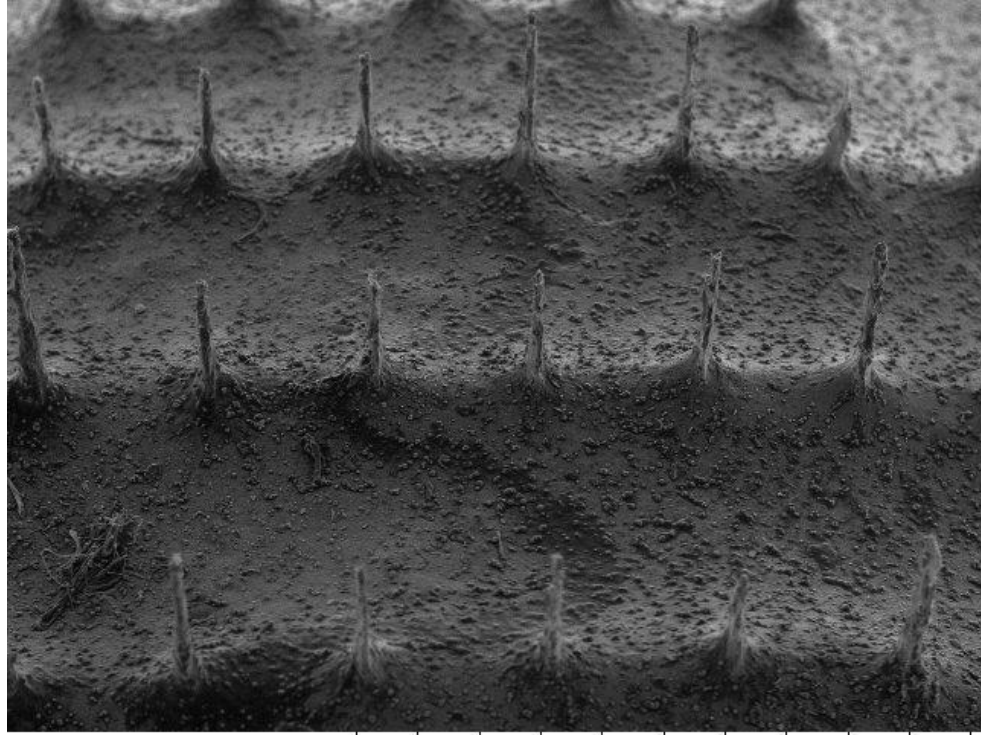
AUBIBAM

2019/12/20 15:45 HMMD7.4 x50 2 mm

Şekil 5.37. AL-F0 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

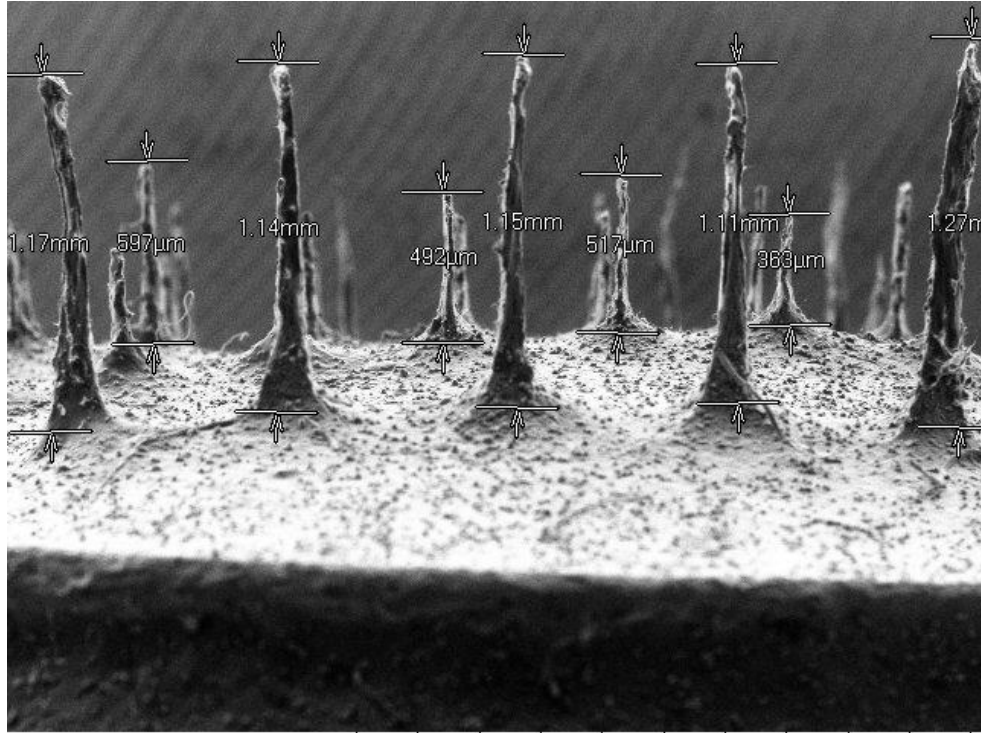


Şekil 5.37. (Devam) AL-F0 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



AUBIBAM

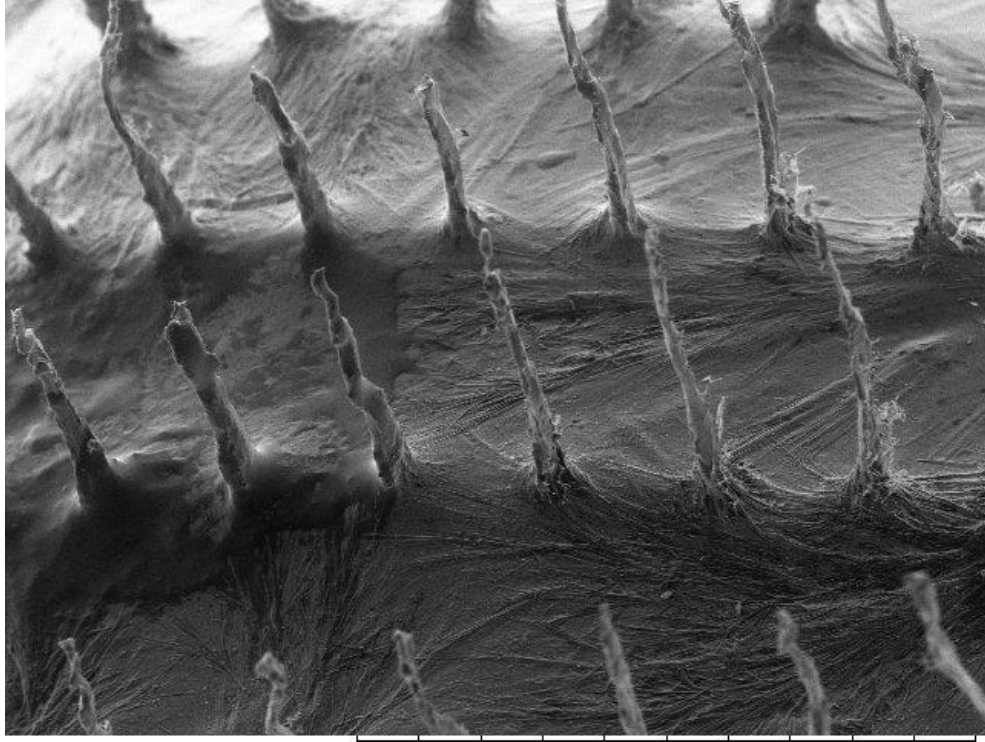
2019/10/08 17:07 HMMD8.2 x50 2 mm



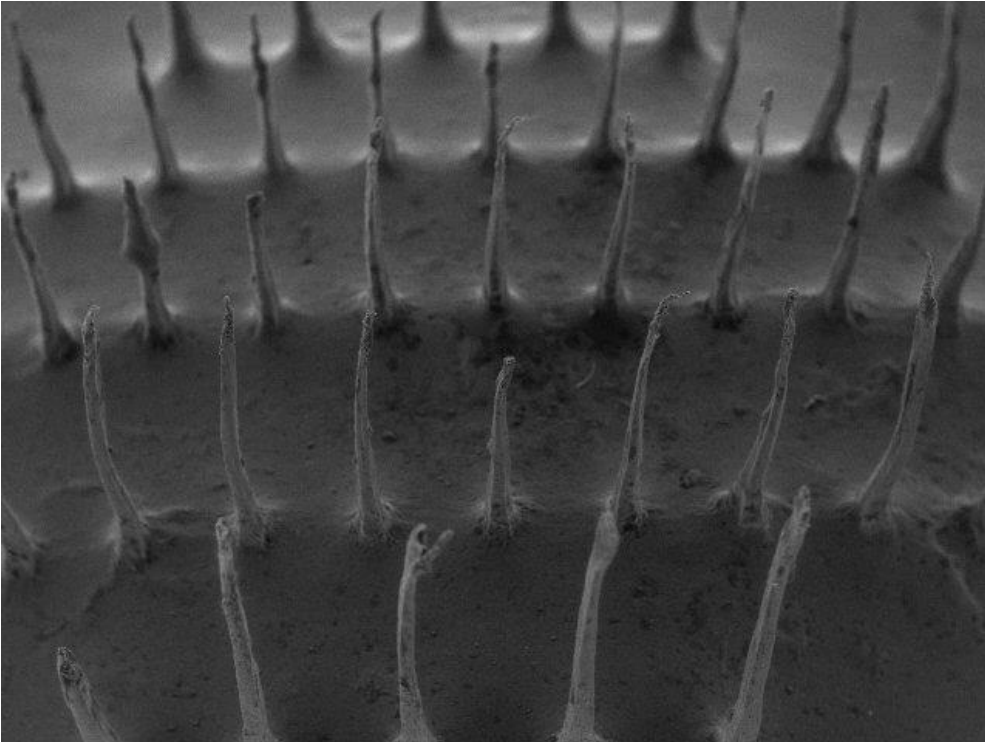
AUBIBAM

2019/10/08 17:20 HMMD9.0 x50 2 mm

Şekil 5.38. AL-F1 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

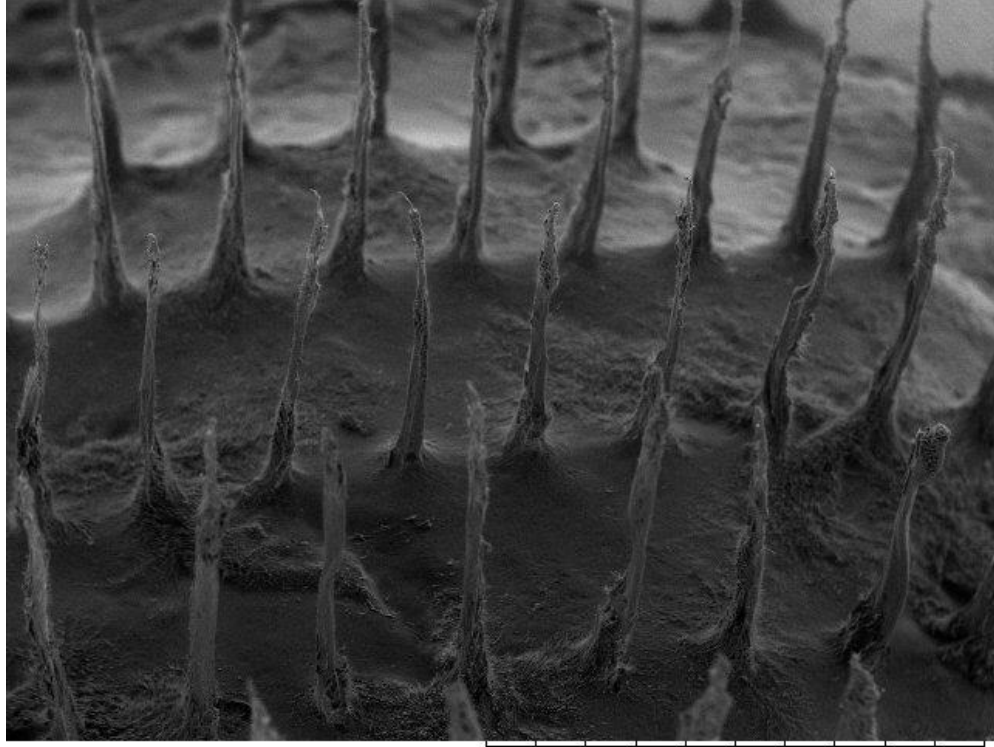


AUBIBAM 2019/10/08 17:16 HMMD9.5 x50 2 mm

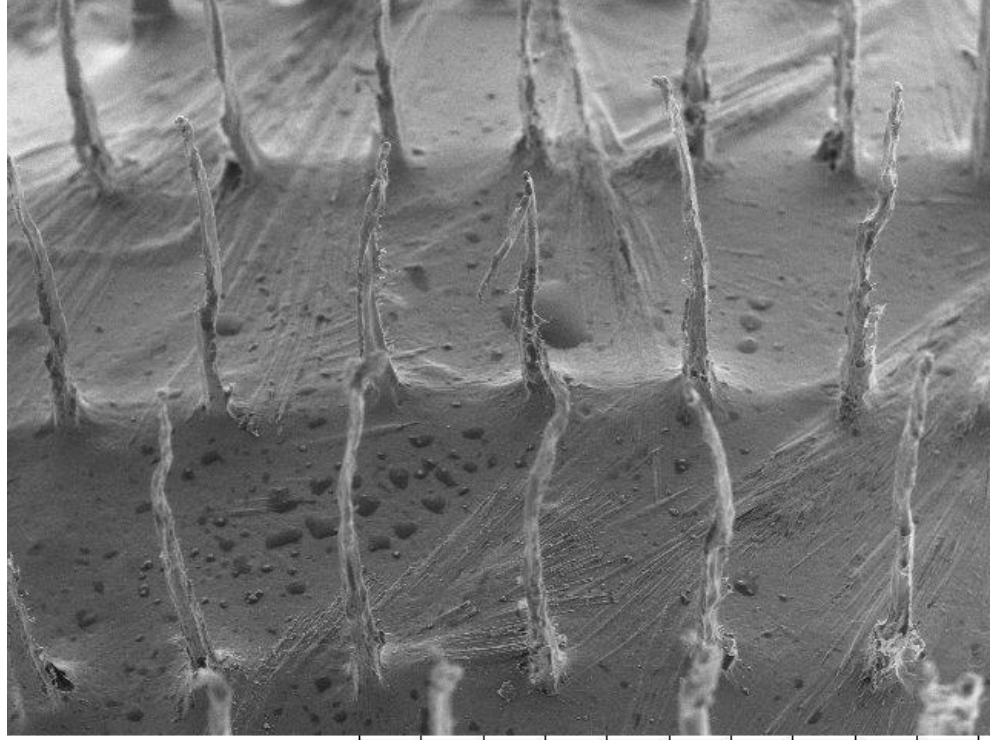


AUBIBAM 2019/11/13 14:19 HMMD5.2 x40 2 mm

Şekil 5.39. AL-F2 formülasyonlarına ait SEM görüntüleri



AUBIBAM 2019/11/13 14:15 HMMD6.2 x40 2 mm



AUBIBAM 2019/10/08 17:35 HMMD7.9 x50 2 mm

Şekil 5.40. AL-F3 mikroigne formülasyonlarına ait SEM görüntüleri

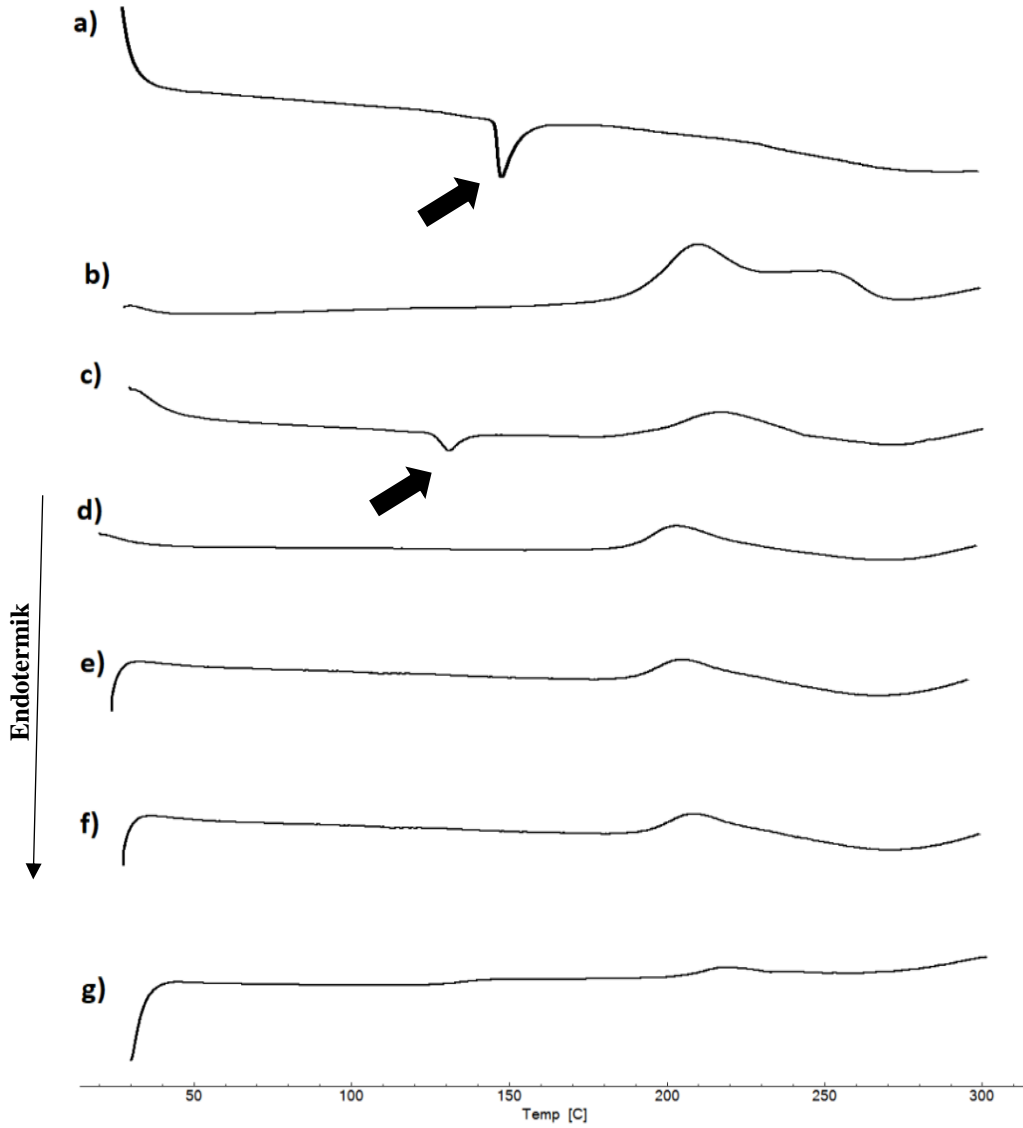
Tez çalışmamızda hazırlanan mikroignelerin iğne uzunluğu, iğne şekli ve iğne tabanı genişliği gibi önemli karakteristik özelliklerinin belirlenmesinde SEM analizleri

gerçekleştirilmiştir (Li vd., 2019). Farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmış ve yapı detaylı olarak analiz edilmiştir. Sodyum aljinat ile hazırlanan formülasyonların 0,3 – 1,17 mm aralığında uzunluğa ve ~0,1 mm taban çapına sahip sağlam yapılı iğneler oluşturduğu SEM analizleri sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.37 - 5.40).

Hazırlanan mikroïgnelerin yüzey özellikleri yüklenen etkin madde miktarı arttıkça kararsız bir yapıya dönüşmüştür. AL-F1 formülasyonu pürüzsüz ve düzgün bir yapıya sahipken AL-F2 ve AL-F3 formülasyonlarının kararsız bir yapıya sahip oldukları tespit edilmiştir. AL-F1 formülasyonu nazal mukozadan geçişi sağlayacak özellikte iken AL-F2 ve AL-F3 mikroïgnelerin kararsız yapılarından dolayı nazal mukozadan geçiş için uygun olmadıkları görülmektedir (Şekil 5.37 - 5.40) (Seon-Woo vd., 2019).

5.3.4.3.2. Termal Analiz

Sodyum aljinat mikroïgne formülasyonlarına ait DSC termogramları Şekil 5.41 'de belirtilmiştir.



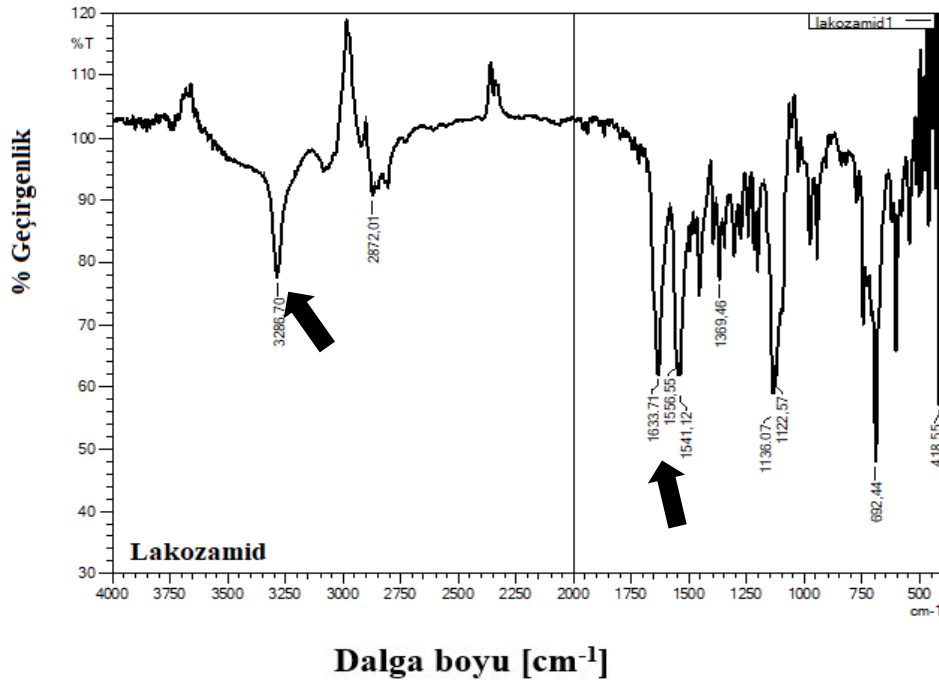
Şekil 5.41. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroiğnelere ve bileşenlere ait DSC termogramları; a) Lakozamid, b) Sodyum aljinat, c) Fiziksel karışım, d) AL-F0, e) AL-F1, f) AL-F2, g) AL-F3

Yapılan ön formülasyon çalışmalarında etkin maddenin erime pikinin yaklaşık 149 °C ortaya çıktığı ve maddenin kristal yapıda olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.7 ve Şekil 5.41a). Saf polimerin ise amorf yapıda olduğu termogramında herhangi bir erime pikinin gözlenmemesi ile belirlenmiştir (Şekil 5.13 ve Şekil 5.41b). Polimer ile etkin madde arasındaki olası geçimsizliklerin ve çözünürlük özelliklerinin belirlenmesi amacı ile lakozamid ve sodyum aljinata ait fiziksel karışım hazırlanmış ve etkin madde ile polimer arasında herhangi bir etkileşimin olmadığı elde edilen termogramda lakozamide ait erime pikinin gözlenmesi sonucunda belirlenmiştir (Şekil 5.41c) (Rojek ve Wesolowski, 2019).

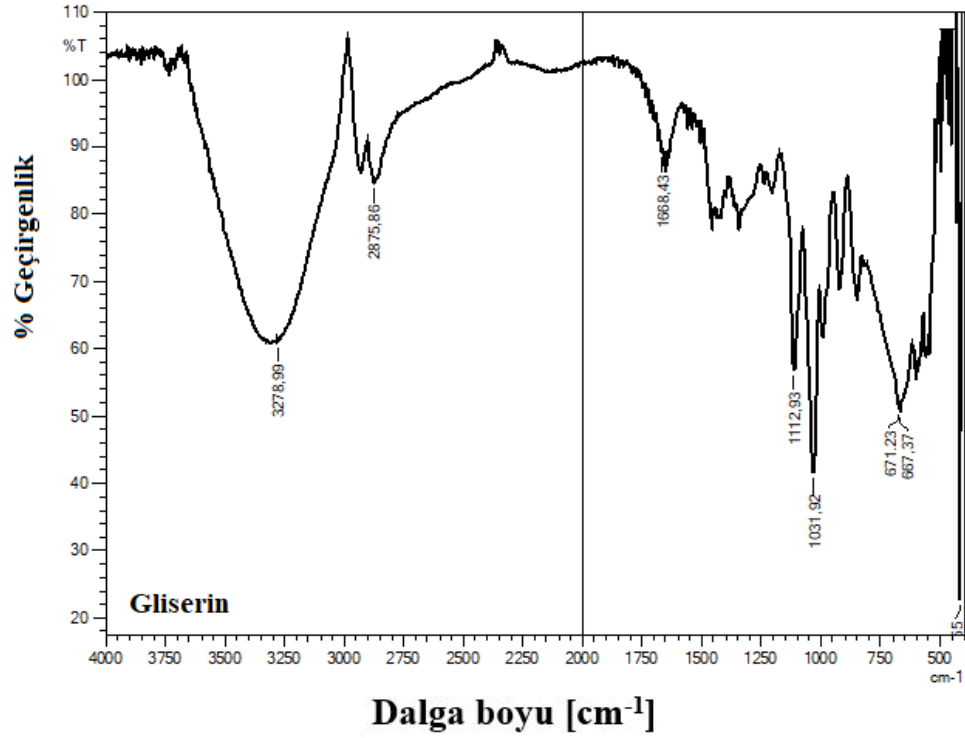
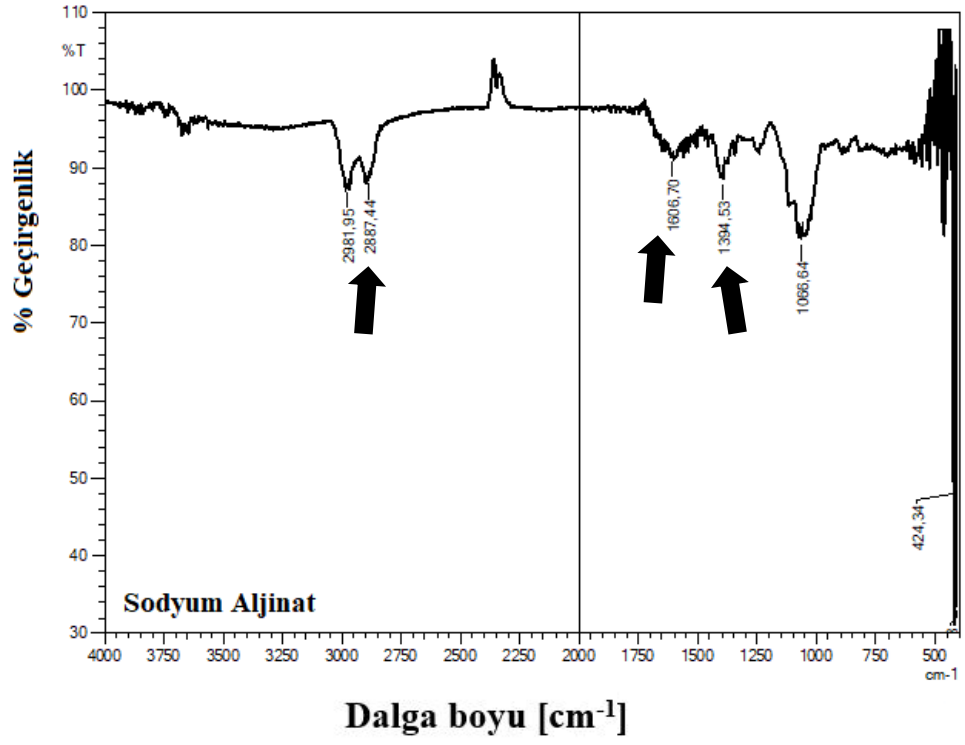
Hazırlanan formülasyonların DSC termogramları incelendiğinde saf polimer ile benzer şekilde amorf yapıda oldukları ve yüklenen lakozamidin formülasyonlarda amorf yapıda bulunduğu formülasyonlara ait termogramlarda herhangi bir erime pikinin ortaya çıkmaması sonucunda belirlenmiştir (sırası ile Şekil 5.41d ve Şekil 5.41e-5.41g) (Gamal vd., 2016; Rojek ve Wesolowski, 2019).

5.3.4.3.3. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri

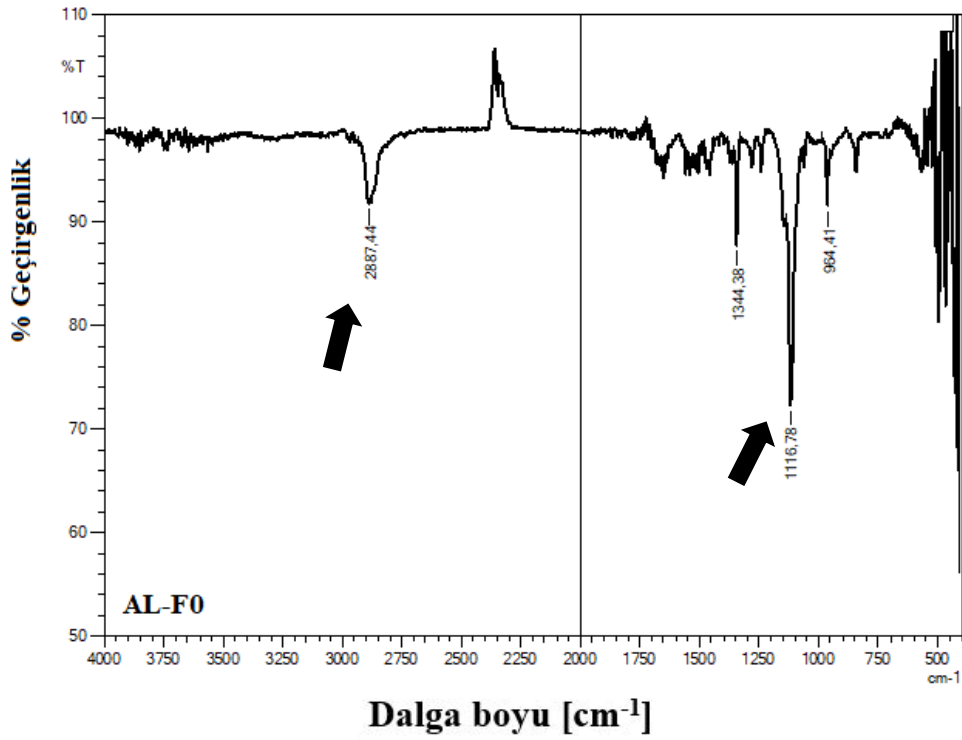
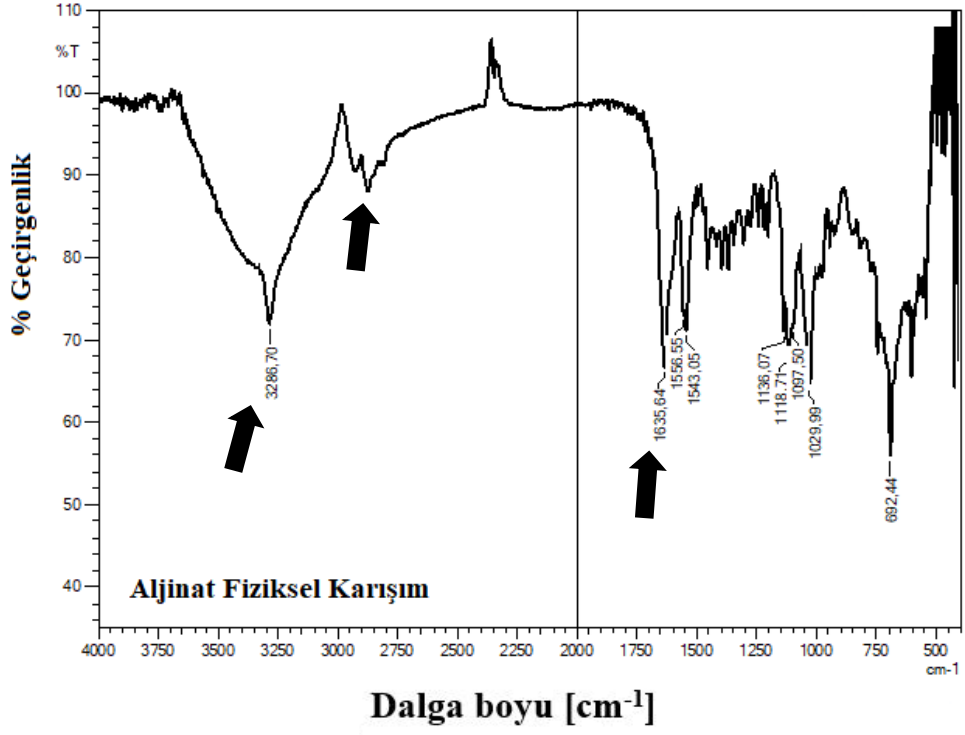
Mikroiğne formülasyonlarına ve bileşenlerine ait FT-IR sonuçları Şekil 5.42’de verilmiştir.



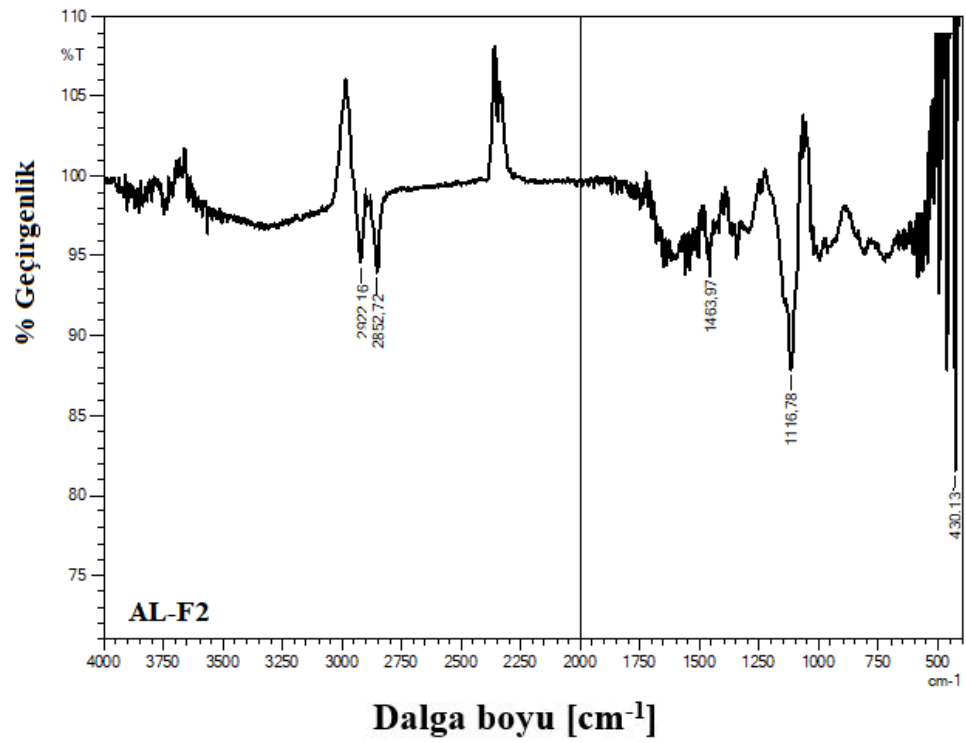
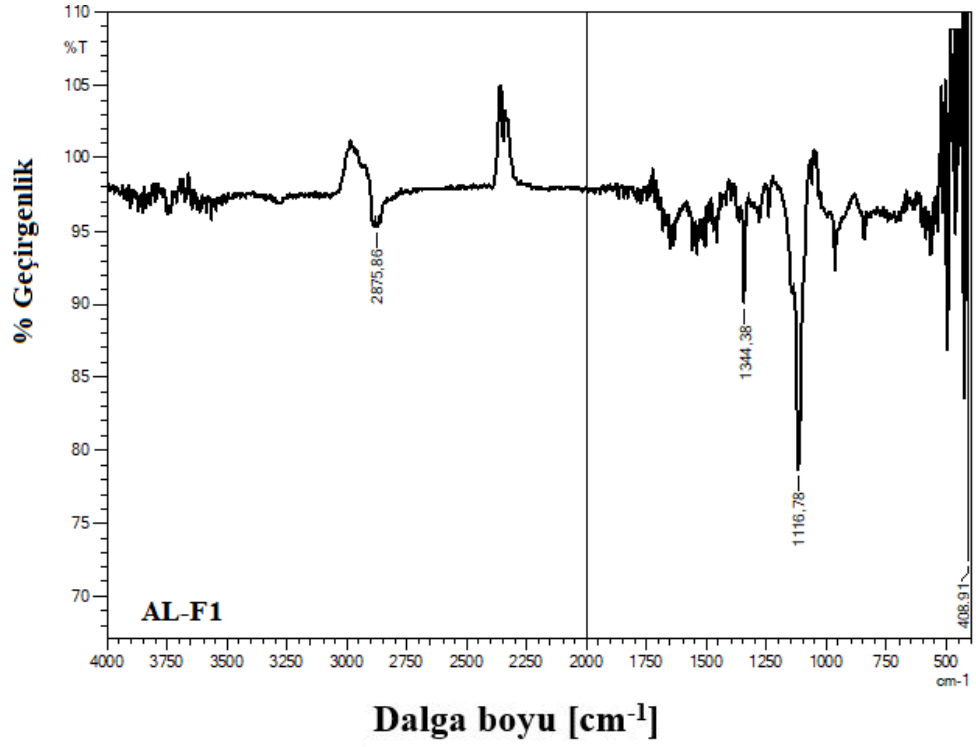
Şekil 5.42. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroiğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları



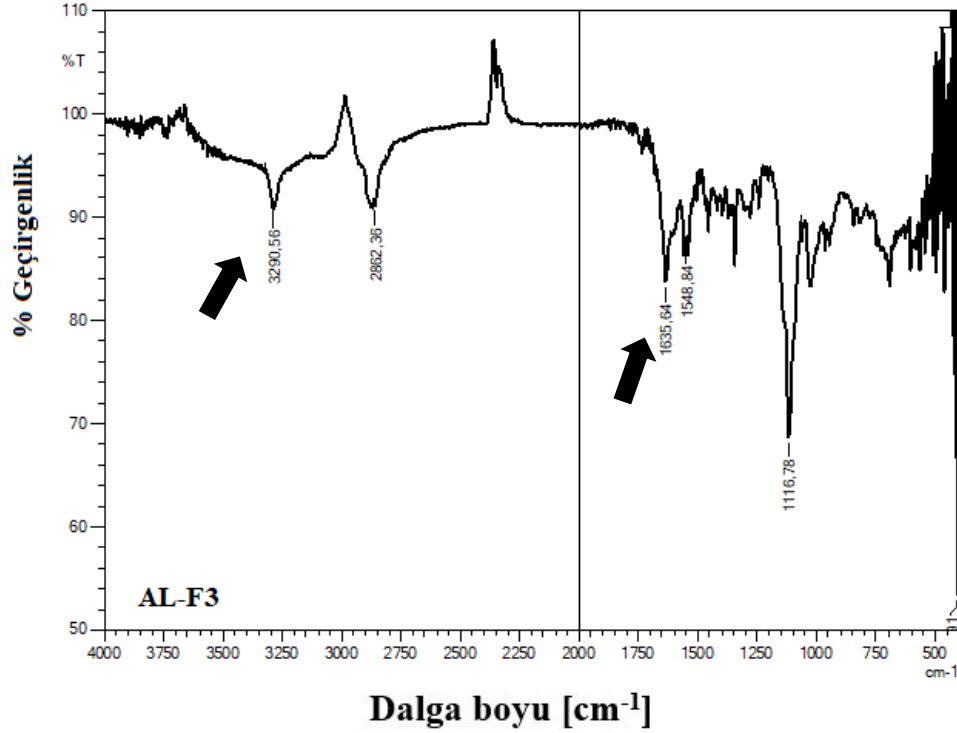
Şekil 5.42. (Devam) Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları



Şekil 5.42. (Devam) Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları



Şekil 5.42. (Devam) Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları



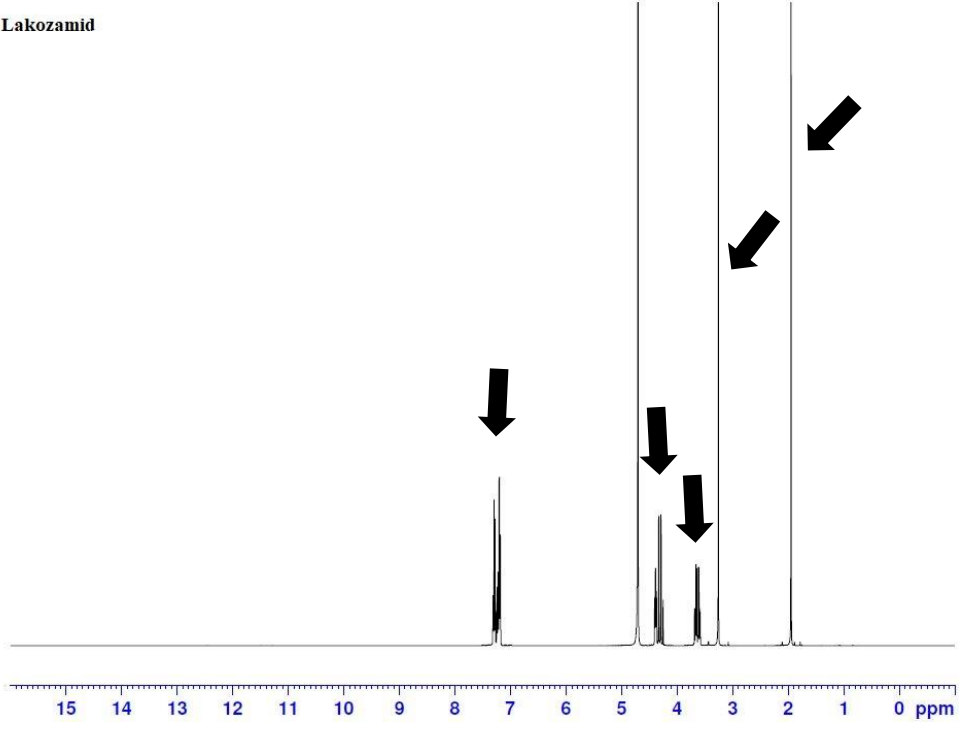
Şekil 5.42. (Devam) Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait FT-IR sonuçları

Formülasyonların FT-IR spektrumları incelendiğinde AL-F1 ve AL-F2 formülasyonlarında etkin maddeye ait pikler gözlenmemekle birlikte, AL-F3 formülasyonlarında etkin maddeye özgü pikler açıkça gözlenmektedir (Şekil 5.42). AL-F3 formülasyonunun DSC termogramları göz önüne alınarak yapılan değerlendirme sonucunda formülasyonlar hazırlanırken uygulanan fiziksel işlemler etkin maddenin kristal yapısını değiştirdiği ancak etkin maddenin polimer yapısını da etkilemesi sonucunda moleküler düzeyde bir dağılımın meydana gelmediği düşünülmüştür. AL-F1 ve AL-F2 formülasyonlarında da etkin madde ile formülasyonlar arasında kimyasal bir bağ oluşumu gözlenmemiş ve moleküler düzeyde dağılımın başarıyla gerçekleştiği tespit edilmiştir.

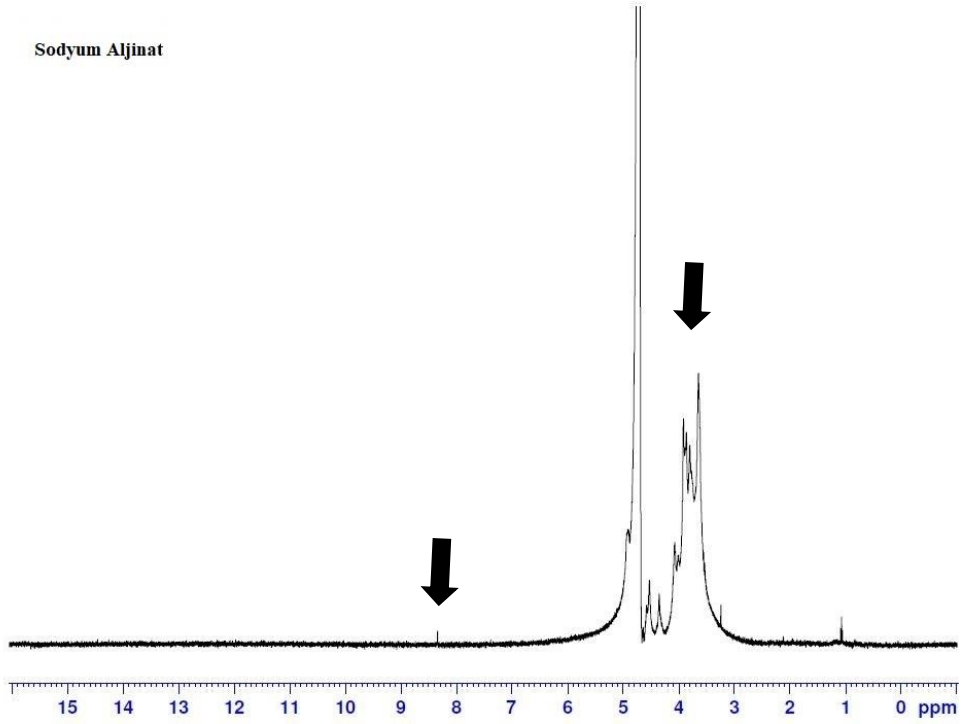
5.3.4.3.4. Nükleer manyetik rezonans analizleri

Sodyum aljinat mikroïğne formülasyonlarına ait ¹H-NMR analizi spektrumu Şekil 5.43'te verilmiştir.

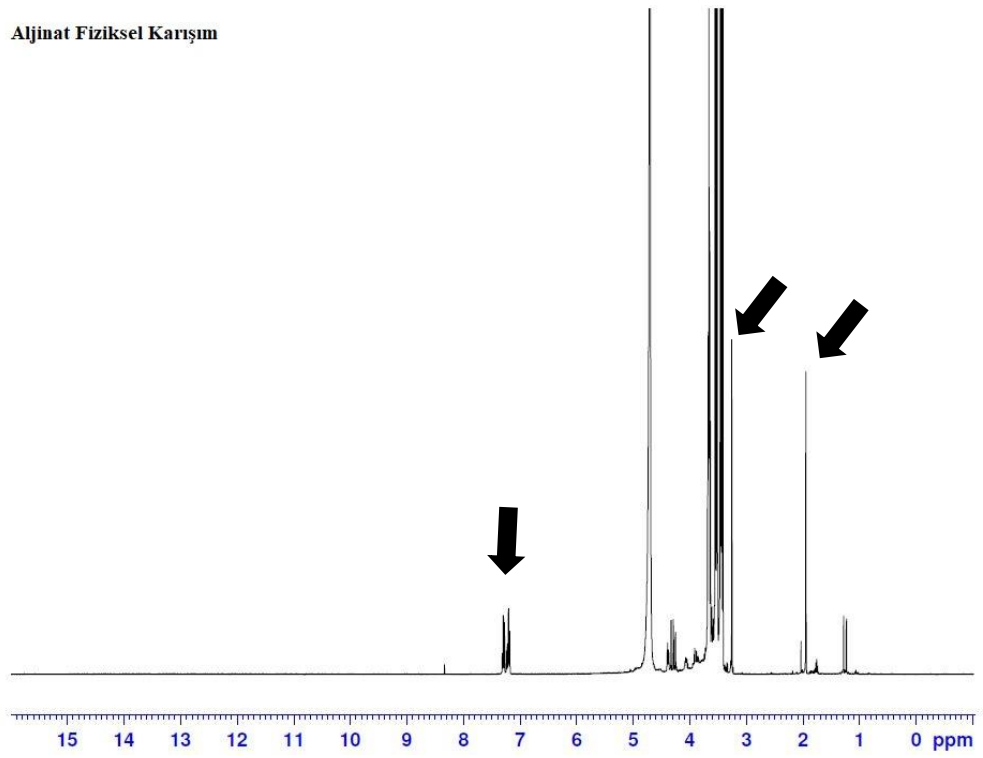
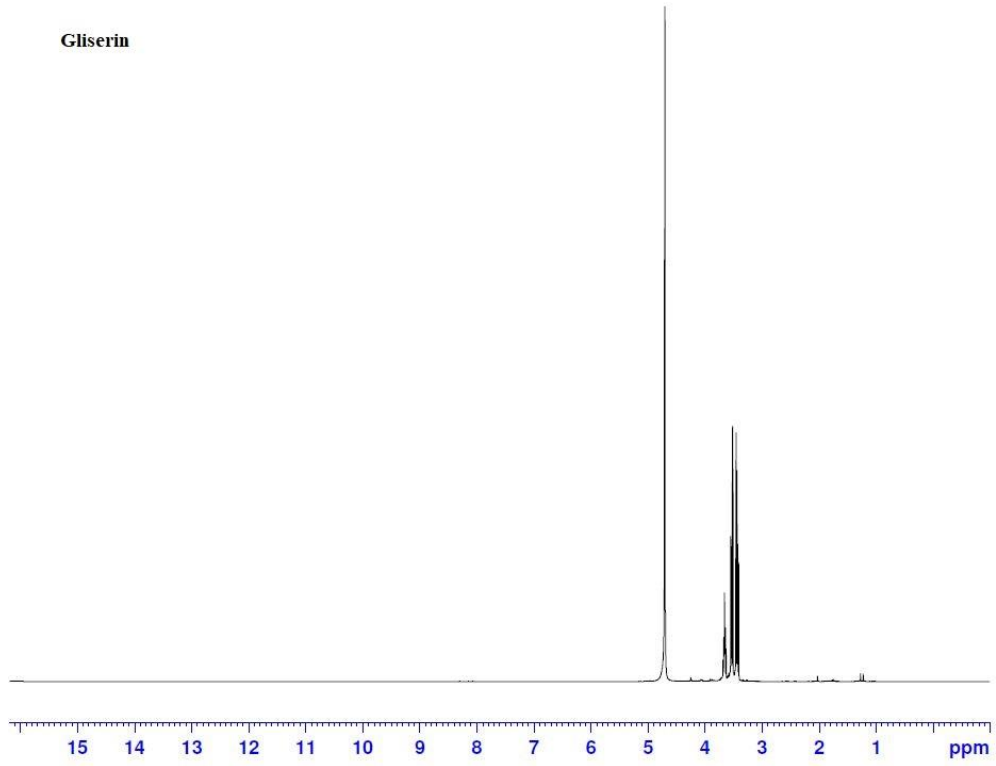
Lakozamid



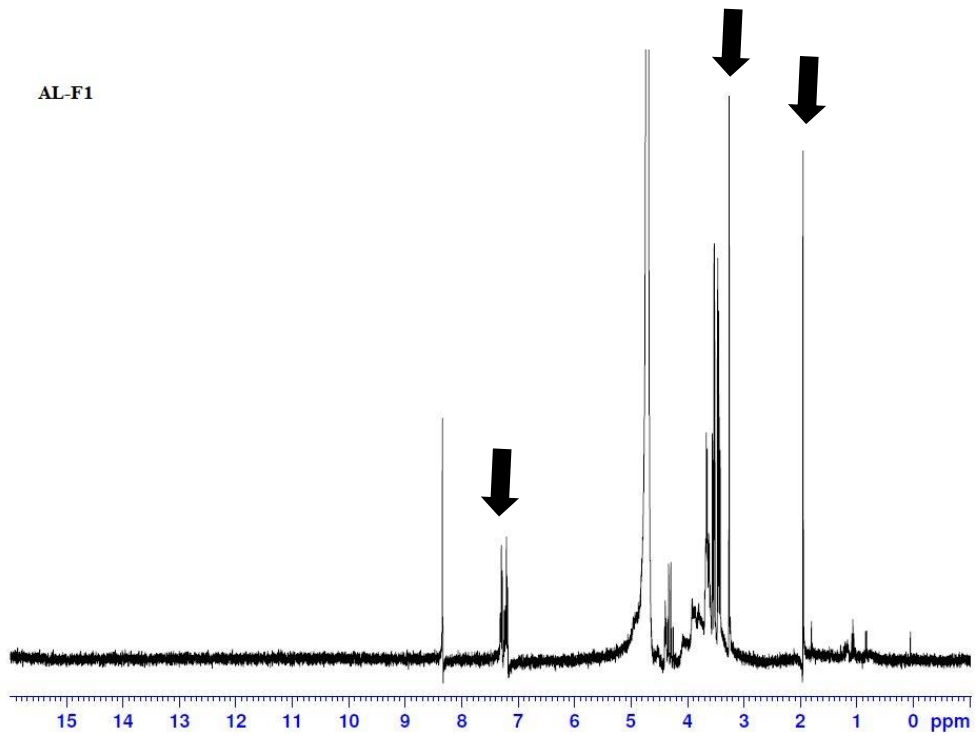
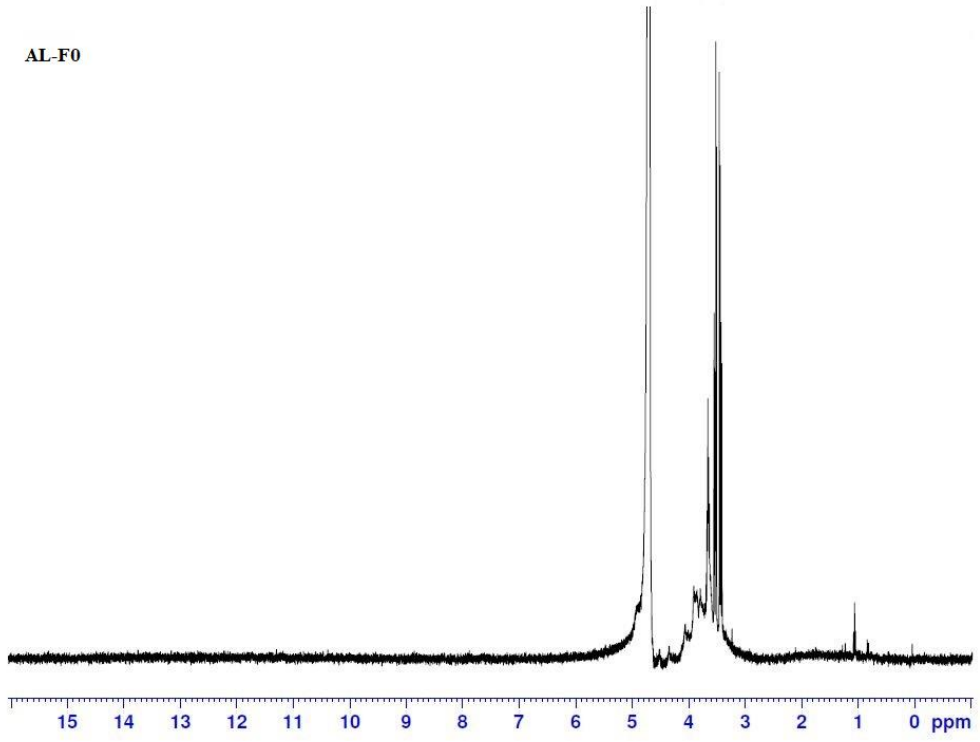
Sodyum Aljinat



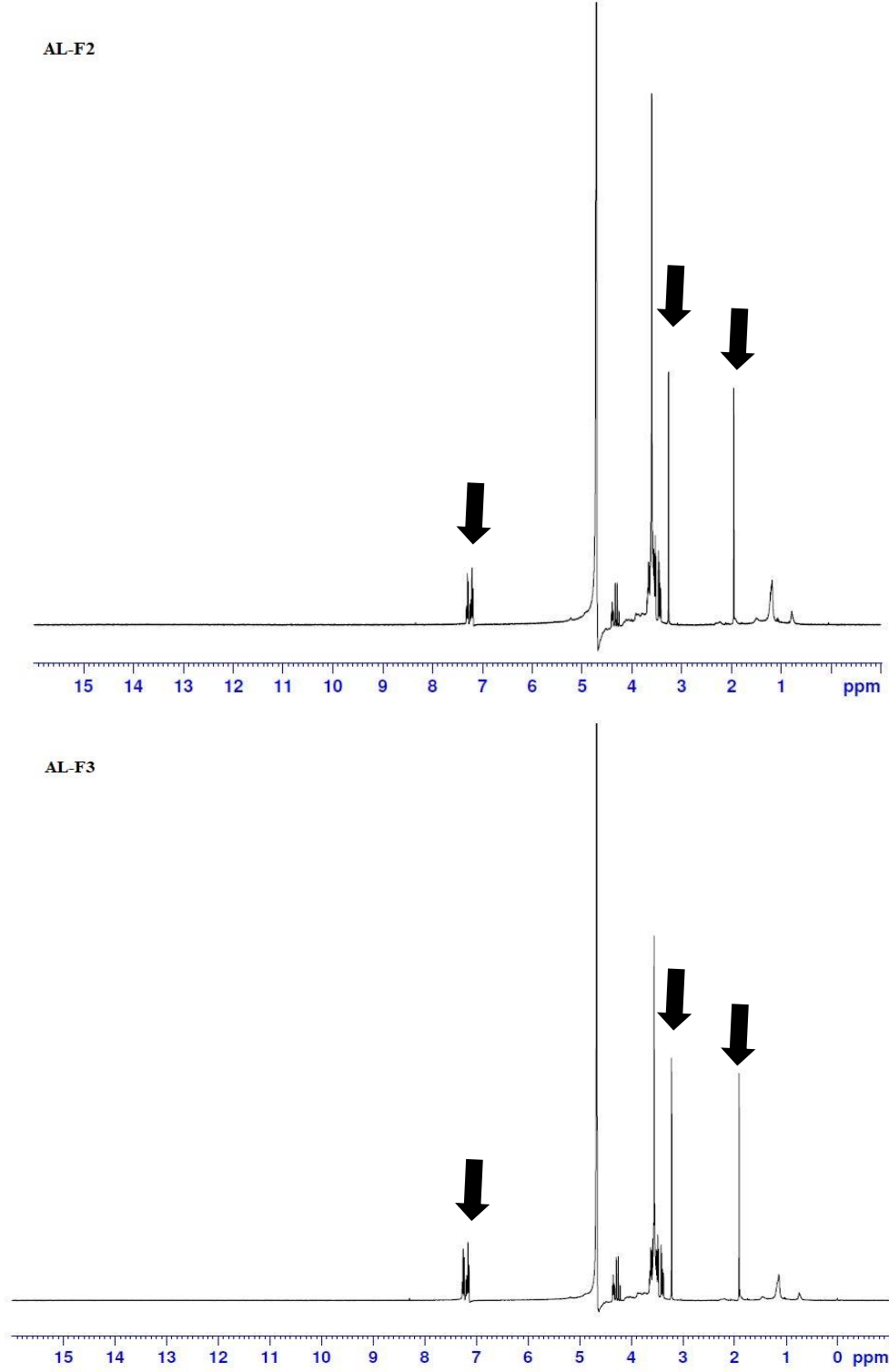
Şekil 5.43. Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait ¹H-NMR sonuçları



Şekil 5.43. (Devam) Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait $^1\text{H-NMR}$ sonuçları



Şekil 5.43. (Devam) Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait $^1\text{H-NMR}$ sonuçları



Şekil 5.43. (Devam) Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïğnelere ve bileşenlere ait ¹H-NMR sonuçları

Çözücü olarak döteryum oksit kullanılarak yapılan ¹H-NMR analizleri sonucunda elde edilen spektrumlarda lakozamide özgü pikler, ~1,9 ppm'de, ~3,1 ppm'de ve ~7,2 ppm'de ortaya çıkmıştır. Lakozamide özgü pikler, sodyum aljinat ile hazırlanan mikroïgne formülasyonlarının tamamında açık bir şekilde görölmektedir. Bu durum

formülasyon içinde bulunan lakozamidin moleküler yapısında herhangi bir değişiklik olmadığını göstermektedir (Şekil 5.43).

5.3.4.3.5. Miktar tayini

Etkin madde miktar tayini sonuçları Çizelge 5.17’de verilmiştir.

Çizelge 5.17. AL-FX kodlu formülasyonların miktar tayini sonuçları

Formülasyon Kodu	Etkin Madde Miktarı (% (a/a) ±SH, n=3)
AL-F1	8,417±0,118
AL-F2	13,833±0,098
AL-F3	19,301±0,336

Çizelge 5.17’de belirtilen oranlarda etkin madde formülasyonlara yüklenmiştir. Yükleme oranı arttıkça polimerin yapı bütünlüğünde bozulmalar meydana geldiği morfolojik inceleme ve FT-IR analizleri sonucunda tespit edilmiştir.

5.3.4.3.6. İn vitro salım çalışması

Sodyum aljinat ile hazırlanan mikroignelerin etkin madde miktarının artışına bağlı olarak polimerin amorf yapısından uzaklaşıp etkin maddenin kristal yapısına yaklaşması sonucunda formülasyonun film yapında gözlenen bozunma sebebiyle salım çalışması yapılmamıştır.

5.4. İn Situ Jel Formülasyonları İle İlgili Çalışmalar

5.4.1. Ön formülasyon çalışmaları

Nazal mukozada jel oluşumunu sağlayabilecek uygun derişimi belirlemek amacı ile Poloxamer® 407’nin farklı derişimlerde sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin jelleşme sıcaklıkları ve jelleşme kapasiteleri Çizelge 5.18’de verilmiştir.

Çizelge 5.18. Farklı Poloxamer® 407 derişimlerine ait jel sıcaklıkları ve jelleşme kapasiteleri

Formülasyon Numarası	Poloxamer® 407 (a/a)	Jelleşme Sıcaklığı (°C)	Jelleşme Kapasitesi
P1	%16	30	++
P2	%17	30	++
P3	%18	30	++
P4	%19	30	++
P5	%20	30	++
P6	%21	30	++

Uygun formülasyon seçilirken en uygun jelleşme sıcaklığına sahip ve en düşük konsantrasyonda polimer içeren formülasyon tercih edilmiştir. Hazırlanan formülasyonların jelleşme sıcaklığı 30 °C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 5.18). Burun içi sıcaklık (28-34 °C) göz önüne alındığında, formülasyonun burun içinde jelleşmesi açısından uygun olduğu tespit edilmiştir (Keck vd., 2000).

Yapılan çalışmalarda Poloxamer® derişiminin jelleşme sıcaklığına etkisi araştırılmış ve artan konsantrasyonlara göre jelleşme sıcaklığının azaldığı tespit edilmiş ve her çalışmada farklı sonuçlar kaydedilmiştir (Galgatte ve Chaudhari, 2014; Pereira vd., 2013; Xu vd., 2014). Çalışmamızda ise altı farklı derişimde yapılan değerlendirmelerde jelleşme sıcaklığı değişmemiştir (Çizelge 5.18).

5.4.2. *In situ* jel formülasyonların hazırlanışı

Jelleşme sıcaklığı göz önüne alınarak %16 [ağırlık/ağırlık (a/a)] Poloxamer® 407 içeren formülasyonun nazal yol için en uygun formülasyon olduğuna karar verilmiştir. Etkin madde içeren formülasyonlar %16 (a/a) Poloxamer® 407 içeren sulu çözeltiye üç farklı derişimde eklenerek elde edilmiştir. Hazırlanan formülasyonlar Çizelge 5.19'da belirtilmiştir.

Çizelge 5.19. *In situ* jel formülasyonları

Formülasyon Kodu	Poloxamer® 407 (a/a)	Lakozamid (g.mL ⁻¹)
PL0	% 16	-
PL1	% 16	% 1
PL2	% 16	% 1,5
PL3	% 16	% 2

5.4.3. *In situ* jel formülasyonların karakterizasyonu

5.4.3.1. Fiziksel görünüş ve saydamlık

Hazırlanan jel formülasyonların tümünün şeffaf bir görünüşe sahip olduğu gözlenmiştir.

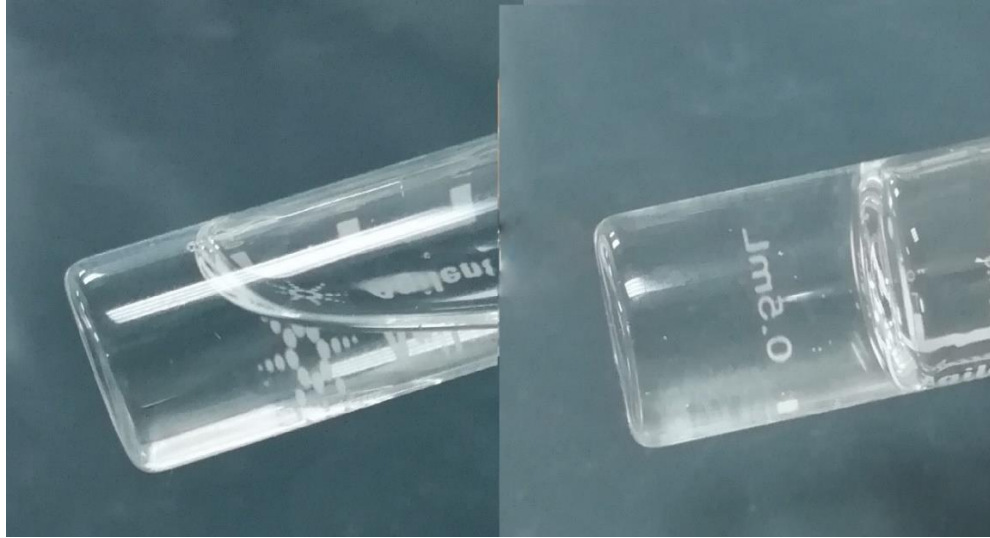
5.4.3.2. Jelleşme kapasitesinin belirlenmesi

In situ jel formülasyonların jelleşme kapasiteleri Çizelge 5.20'de verilmiştir.

Çizelge 5.20. *İn situ* jel formülasyonların jelleşme kapasiteleri

Formülasyon Kodu	Jelleşme Kapasitesi	Jelleşme Sıcaklığı
PL0	++	30 °C
PL1	++	30 °C
PL2	++	30 °C
PL3	++	30 °C

Jelleşme kapasitesi *in situ* jel formülasyonlar için önemli bir değerlendirme parametresidir (Balasingam vd., 2017). Hazırlanan formülasyonların jelleşme kapasiteleri Çizelge 4.2’de yer alan kriterlere göre değerlendirilmiş ve hazırlanan formülasyonların uygun sıcaklıkta hemen jelleştiği ve jel yapısını birkaç saat boyunca koruduğu tespit edilmiştir (Görsel 5.2). Formülasyonların jel yapısını birkaç saat boyunca koruması burun içinde formülasyonun uzun süre tutunmasını sağlamak ve etkin madde salımını kolaylaştırmaktadır.



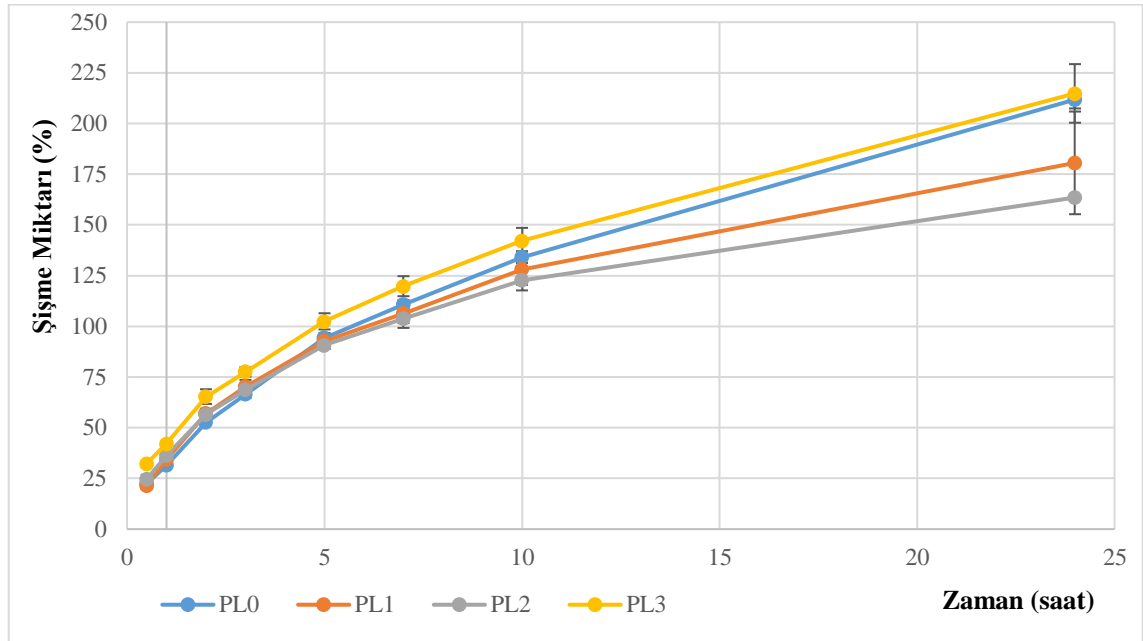
Görsel 5.2. *Sıcaklığa bağlı faz değişimi*

5.4.3.3. Şişme kapasitesinin belirlenmesi

Şişme kapasitesi çalışmasının sonuçları Çizelge 5.21’de ve Şekil 5.44’de verilmiştir. Hazırlanan *in situ* jel formülasyonların ağırlığı 24 saat içinde %150’den fazla artış göstermiştir. Şişme kapasitesinin yüksek olması, formülasyonların esnekliğini ve etkin maddenin salımını etkileyen bir özelliktir (Diniz vd., 2015). Formülasyonların burunda kalış süreleri değerlendirildiğinde 2 saat içinde +%50 oranında meydana gelen ağırlık artışı etkin madde salımının kolaylaşmasını sağlamaktadır.

Çizelge 5.21. Şişme kapasitesi çalışma sonuçları

Zaman (saat)	Şişme (% (a/a)±SH, n=3)			
	PL0	PL1	PL2	PL3
0,5	22,371±0,268	21,630±1,890	24,732±2,048	32,306±0,672
1	31,462±0,881	34,331±2,822	36,301±0,516	42,046±1,448
2	52,606±0,657	57,042±2,319	56,546±2,194	65,356±3,620
3	66,493±1,908	70,360±3,249	68,701±1,399	77,575±2,338
5	94,398±2,172	92,786±3,796	90,677±1,690	102,463±3,992
7	110,757±2,238	106,352±4,794	103,873±4,648	119,795±4,939
10	134,167±2,908	128,128±4,794	122,741±5,032	142,141±6,414
24	211,844±4,397	180,606±7,644	163,519±0,980	214,858±14,421



Şekil 5.44. Şişme kapasitesi çalışma bulguları

5.4.3.4. pH analizleri

Hazırlanan formülasyonların farklı sıcaklıklara ait pH değerleri Çizelge 5.22’de belirtilmiştir.

Çizelge 5.22. İn situ jel formülasyonlara ait pH sonuçları (\bar{x} ±SH, n=3)

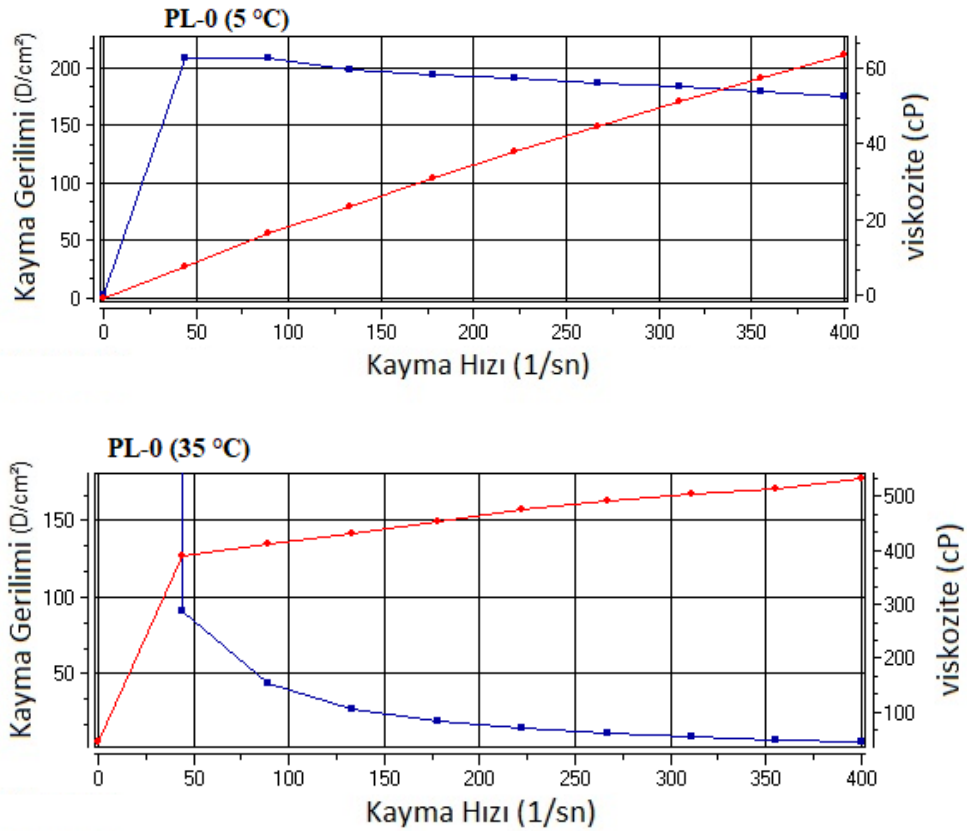
Formülasyon Kodu	4 °C	13 °C	25 °C
PL0	7,87±0,00	7,85±0,00	7,81±0,00
PL1	7,74±0,00	7,76±0,00	7,71±0,00
PL2	7,85±0,00	7,84±0,00	7,81±0,00
PL3	7,90±0,00	7,87±0,00	7,84±0,00

Hazırlanan *in situ* jel formülasyonlarının pH değeri sıcaklıkla çok fazla değişim göstermemektedir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre formülasyonların pH değerinin nötral değere çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Formülasyonların pH değeri nazal mukozada iritasyona sebep olmaması açısından önemlidir (Washington vd., 2000).

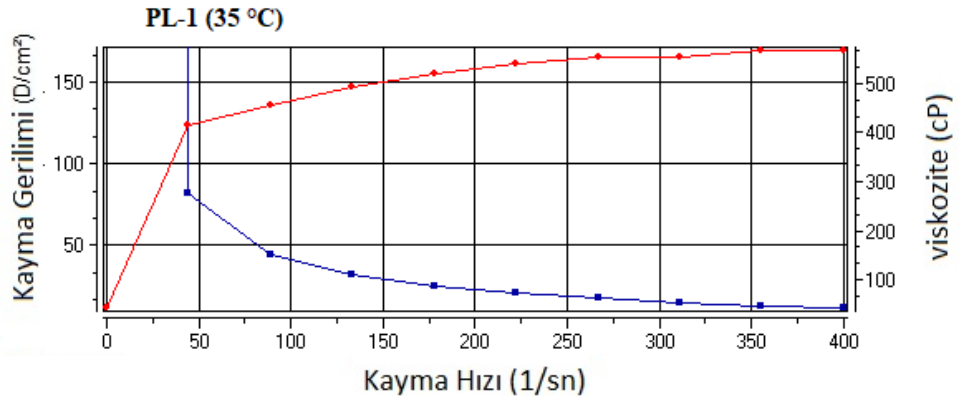
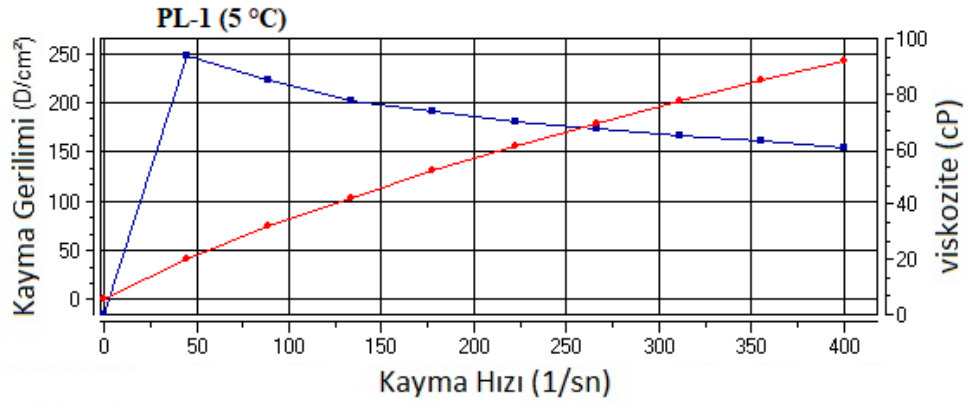
Nazal mukozanın pH değeri 5,5-6,5 arasında değişmekle duyu durumu ve hastalıklara bağlı olarak 8'e kadar yükselebilmektedir (Bertram ve Bodmeier, 2006). Washington vd. tarafından yapılan bir çalışmada buruna uygulanan çeşitli tampon çözeltilerin mukoza pH'sını değiştirdiği tespit edilmiştir (Washington vd., 2000). Çalışmamızda hazırlanan *in situ* jel sistemlerin pH değerleri nazal mukozanın olası pH değeri olabileceği ve nazal mukozanın tolere edebileceği bir seviyede olduğu düşünülmektedir.

5.4.3.5. Reolojik özellikler

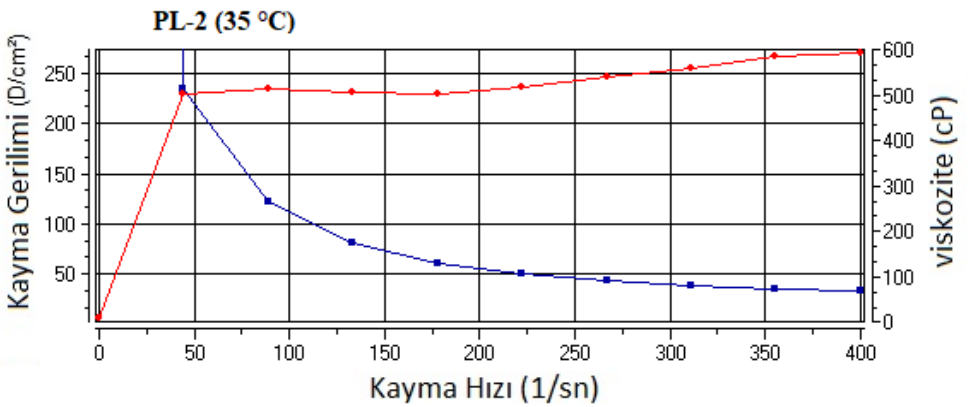
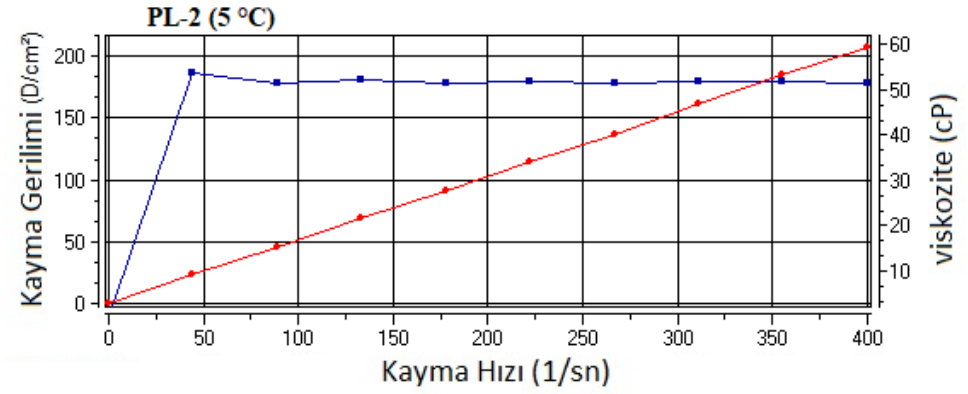
Akış özelliklerini gösteren reogramlar Şekil 5.45-5.48'da verilmiştir.



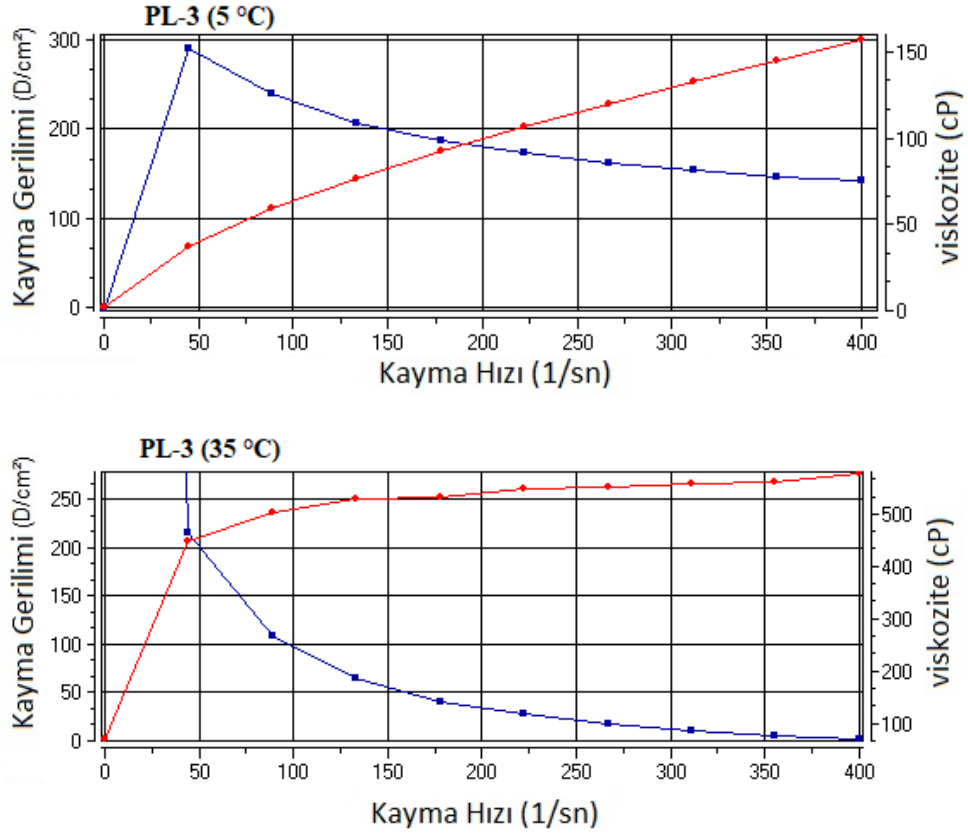
Şekil 5.45. PLO *in situ* jel formülasyonlara ait reogramlar



Şekil 5.46. PL1 in situ jel formülasyonlara ait reogramlar



Şekil 5.47. PL2 in situ jel formülasyonlara ait reogramlar



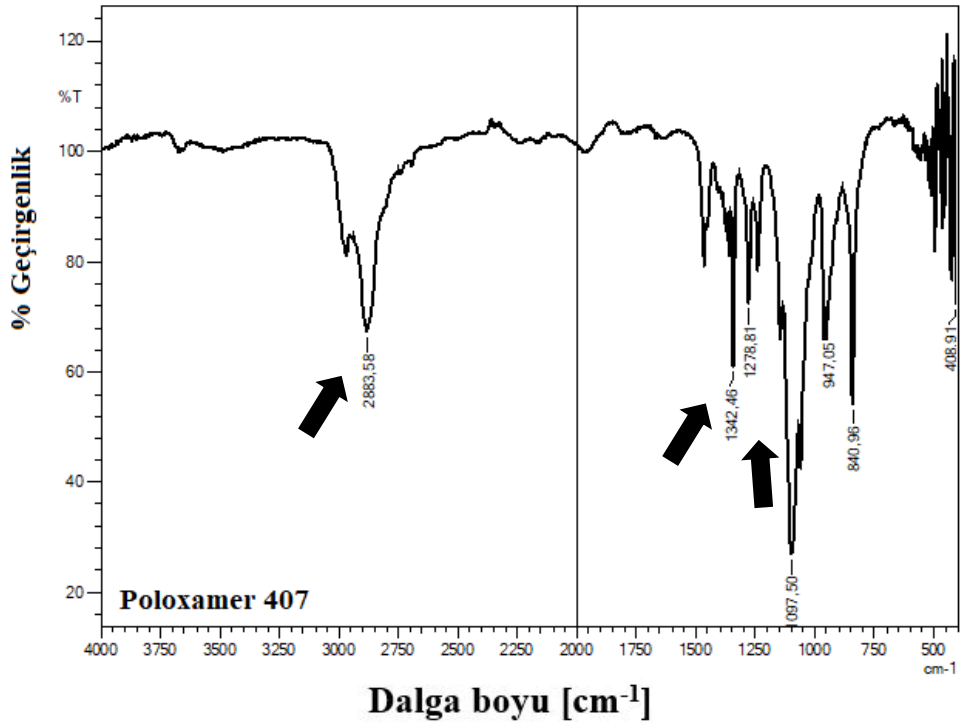
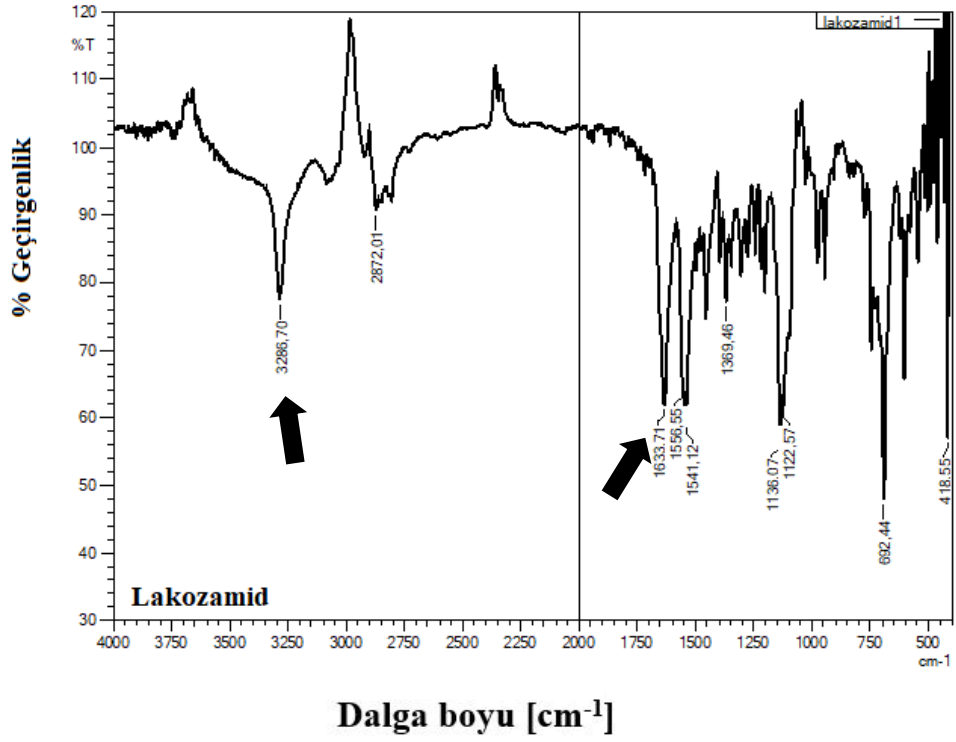
Şekil 5.48. PL3 *in situ* jel formülasyonlara ait reogramlar

In situ jel formülasyonların reolojik özellikleri sıvı-jel faz değişimini gösterecek biçimde iki farklı sıcaklıkta analiz edilmiştir. Eklenen etkin madde miktarı jel formülasyonların reolojik özelliklerinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır.

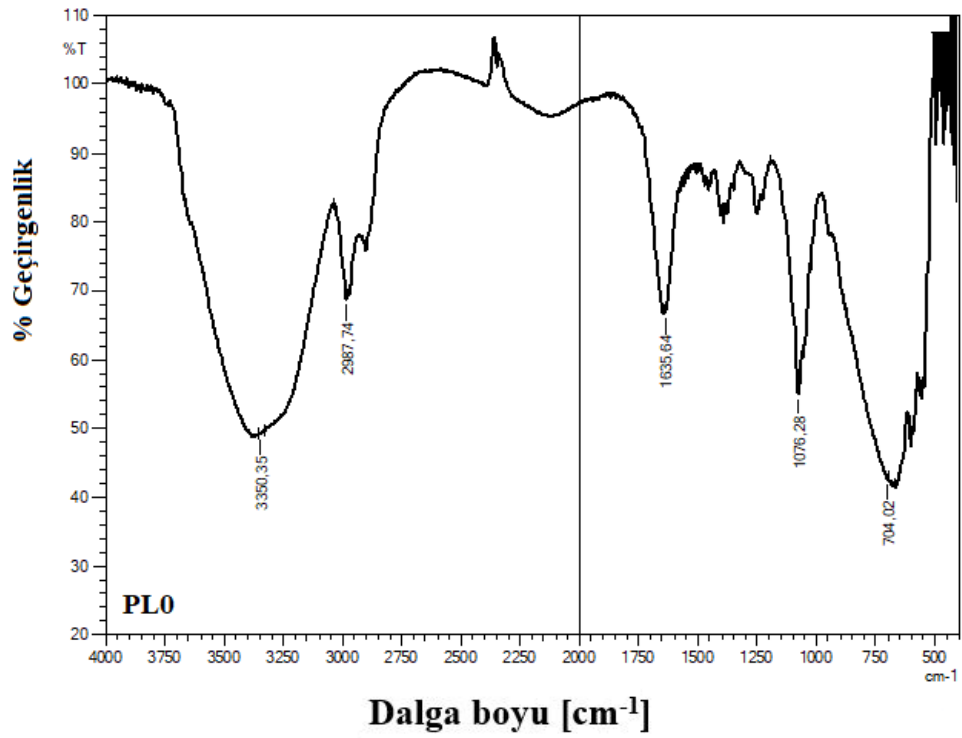
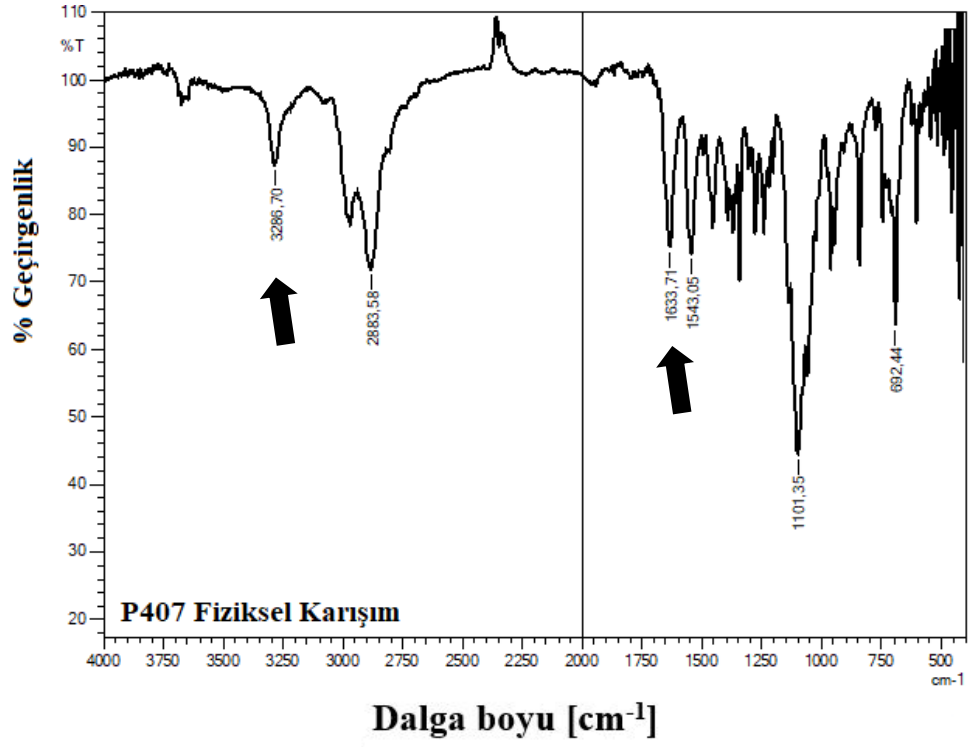
Çalışmamız kapsamında hazırlanan formülasyonlar jelleşme sıcaklığının altında Newton akış göstermekte iken, jel haline geçen formülasyonlar Newton olmayan (psödoplastik) akış göstermektedir (Park ve Song, 2011). Formülasyonlar sıvı fazda iken kayma gerilimi arttıkça kayma hızı da artmaktadır. Formülasyonlar jel fazına geçtiğinde ise kayma gerilimi arttıkça viskozite azalmaktadır ve kayma hızı artmaktadır. Psödoplastik özellik gösteren akışkanlarda da kayma gerilimi arttıkça viskozite azalmakta ve kayma hızı artmaktadır (Dumortier vd., 2006; Sochi, 2010).

5.4.3.6. Fourier dönüşümlü kızıl ötesi analizleri

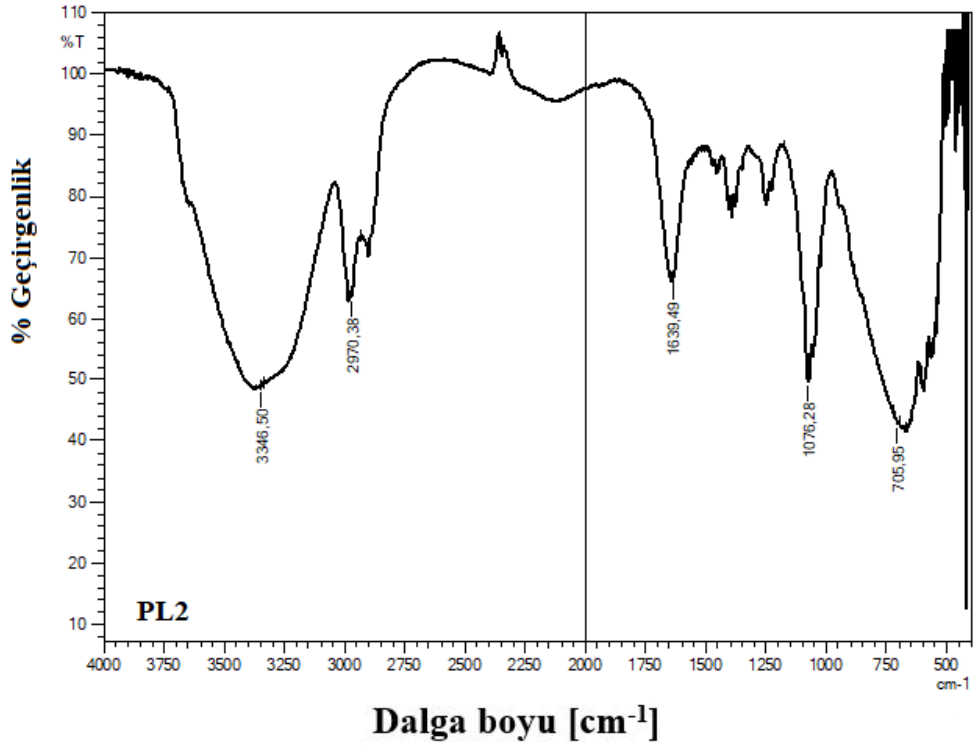
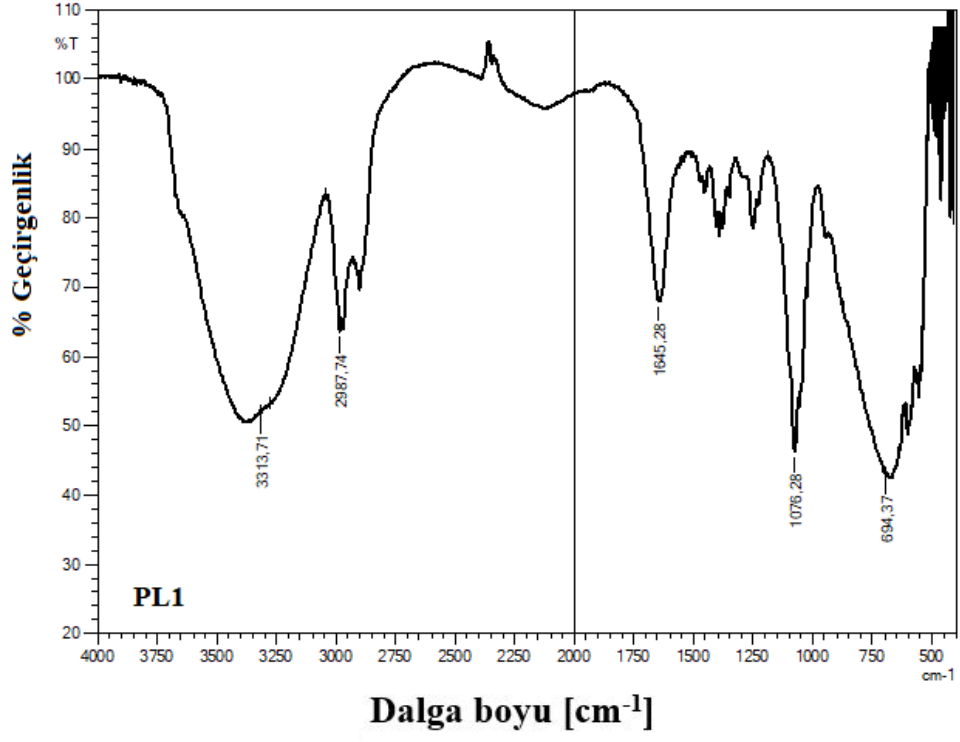
In situ jel formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları Şekil 5.49'da verilmiştir.



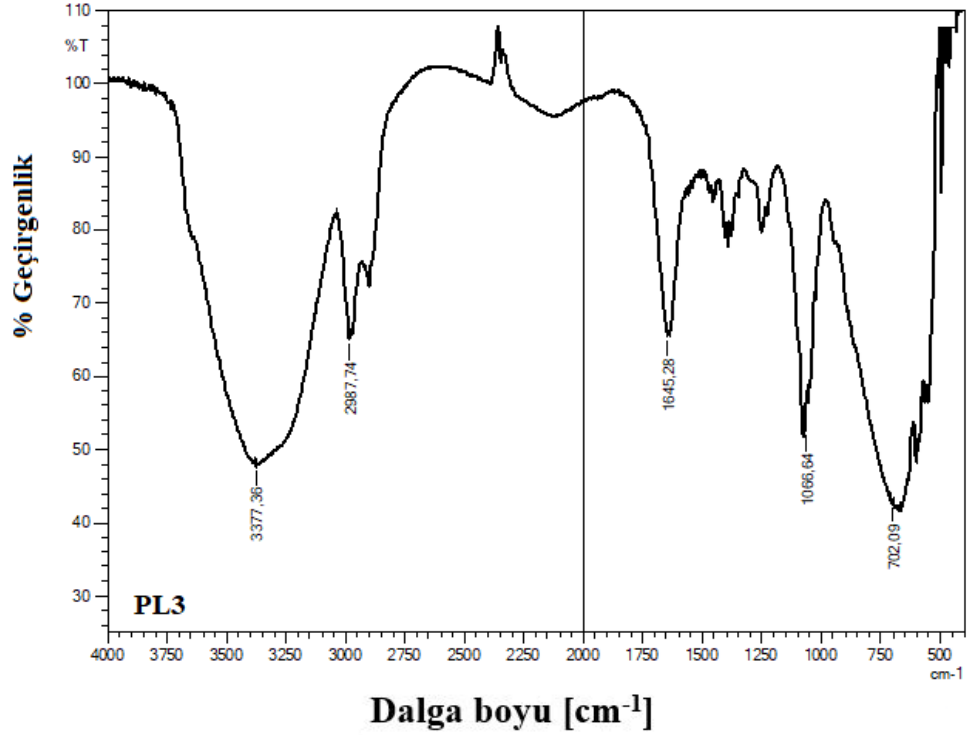
Şekil 5.49. Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait FT-IR sonuçları



Şekil 5.49. (Devam) Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait FT-IR sonuçları



Şekil 5.49. (Devam) Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait FT-IR sonuçları



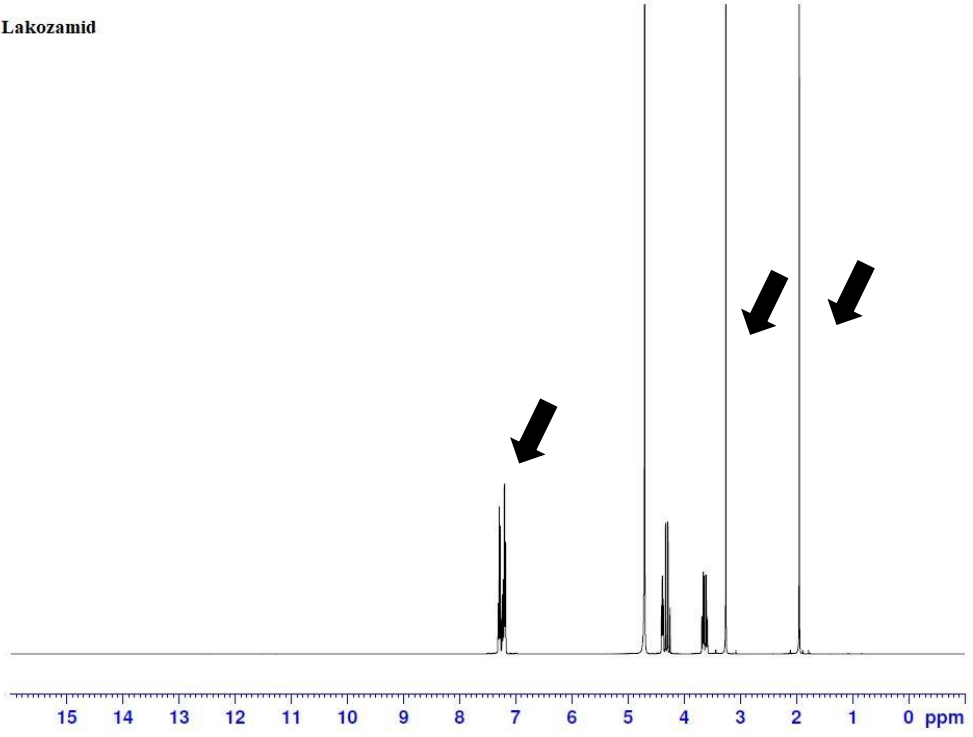
Şekil 5.49. (Devam) Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait FT-IR sonuçları

FT-IR analizleri sonucunda, Poloxamer[®] 407 ve lakozamidin fiziksel karışımının spektrumu (Şekil 5.49) incelendiğinde polimer ile etkin madde arasında bir geçimsizlik olmadığı etkin madde ve polimere ait özgün piklerden anlaşılmaktadır. Formülasyonlara ait FT-IR sonuçları kıyaslandığında ise spektrumların hemen hemen bütün formülasyonlarda benzer olduğu ve katı halde analizi yapılan lakozamid, Poloxamer[®] 407 ve fiziksel karışımdan farklı bir yapıda olduğu anlaşılmaktadır. Hazırlanan formülasyonların FT-IR spektrumları birbirine çok yakın sonuçlara sahip olduğu için formülasyonların moleküler yapılarının değerlendirilmesinde ¹H-NMR sonuçlarına başvurulmuştur.

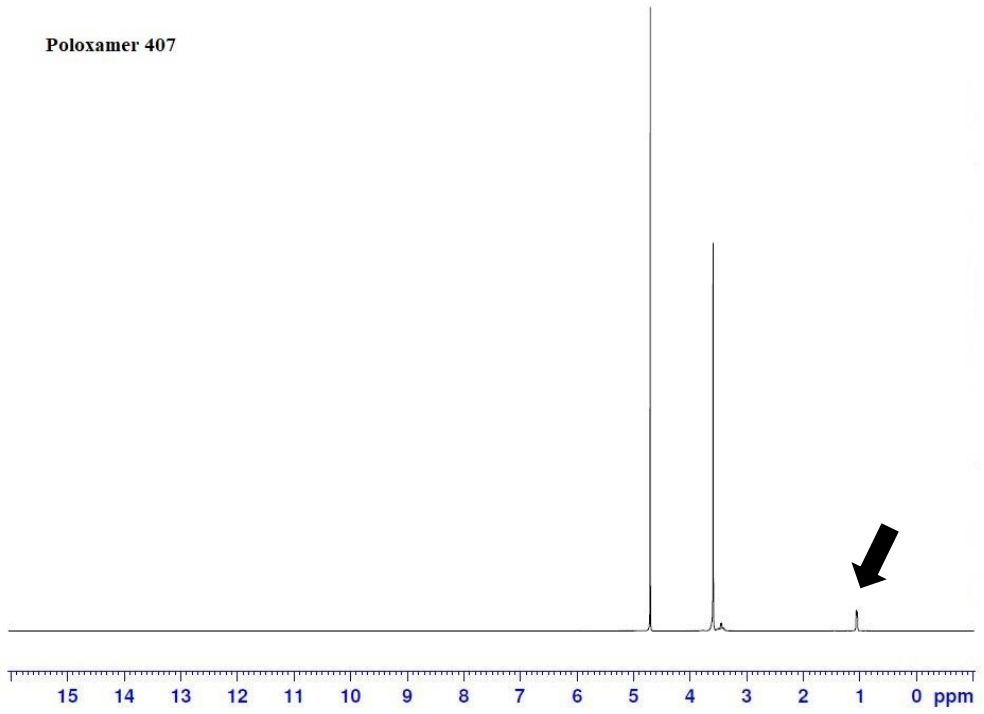
5.4.3.7. Nükleer manyetik rezonans analizleri

In situ jel formülasyonlarına ait ¹H-NMR spektrumları Şekil 5.50’de sunulmuştur.

Lakozamid

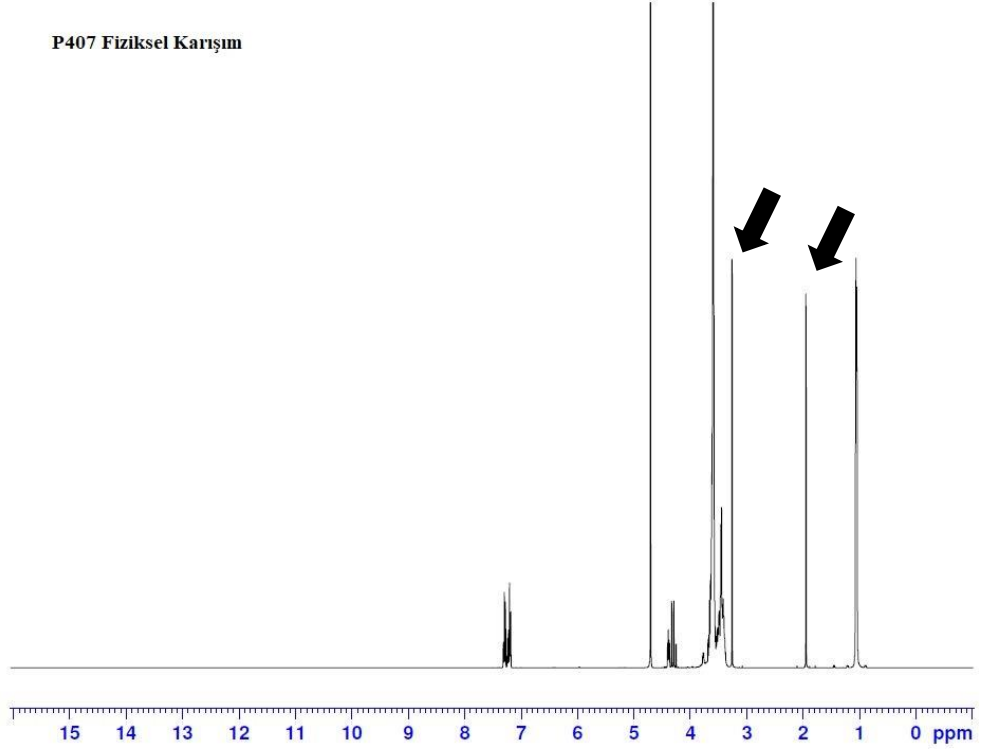


Poloxamer 407

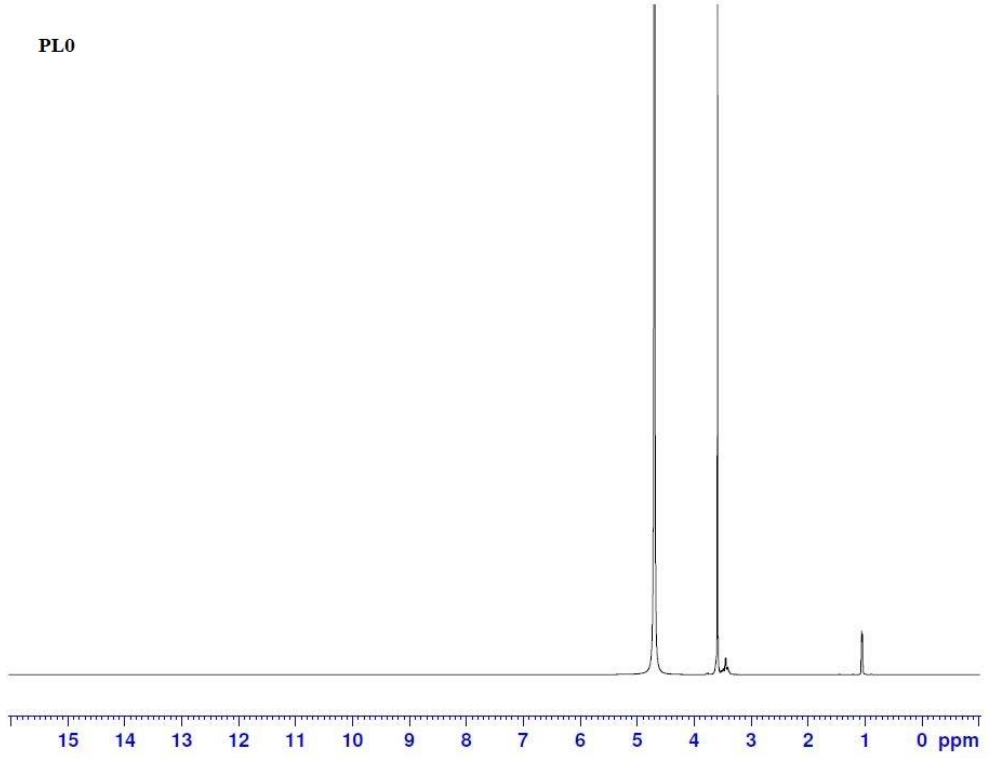


Şekil 5.50. Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait ¹H-NMR sonuçları

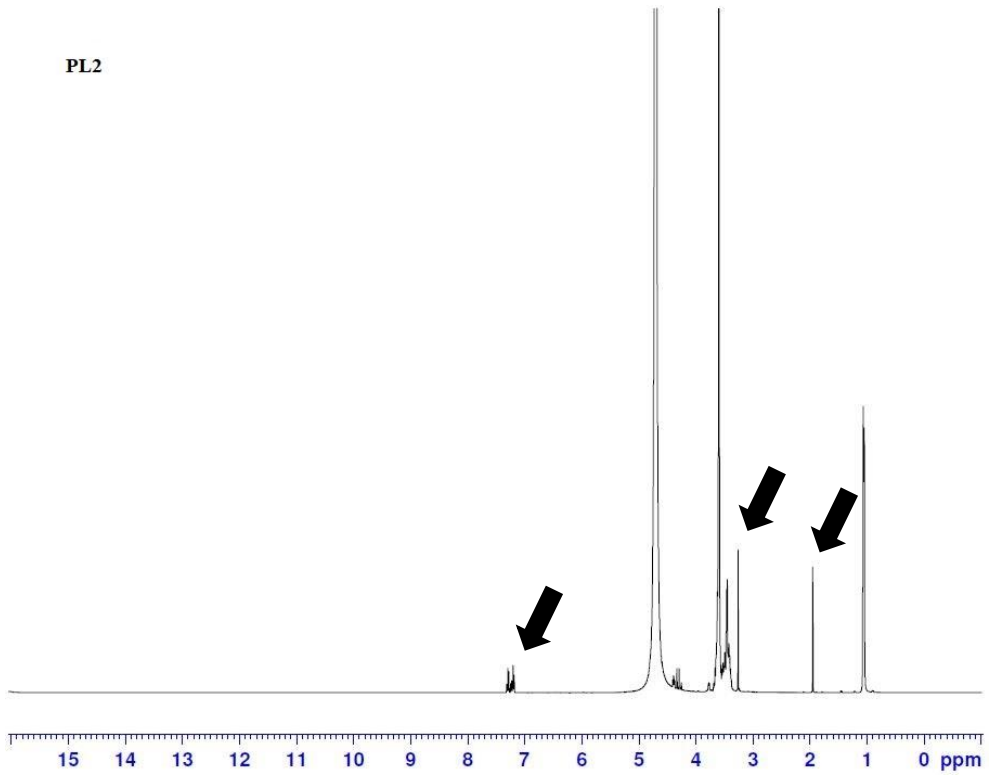
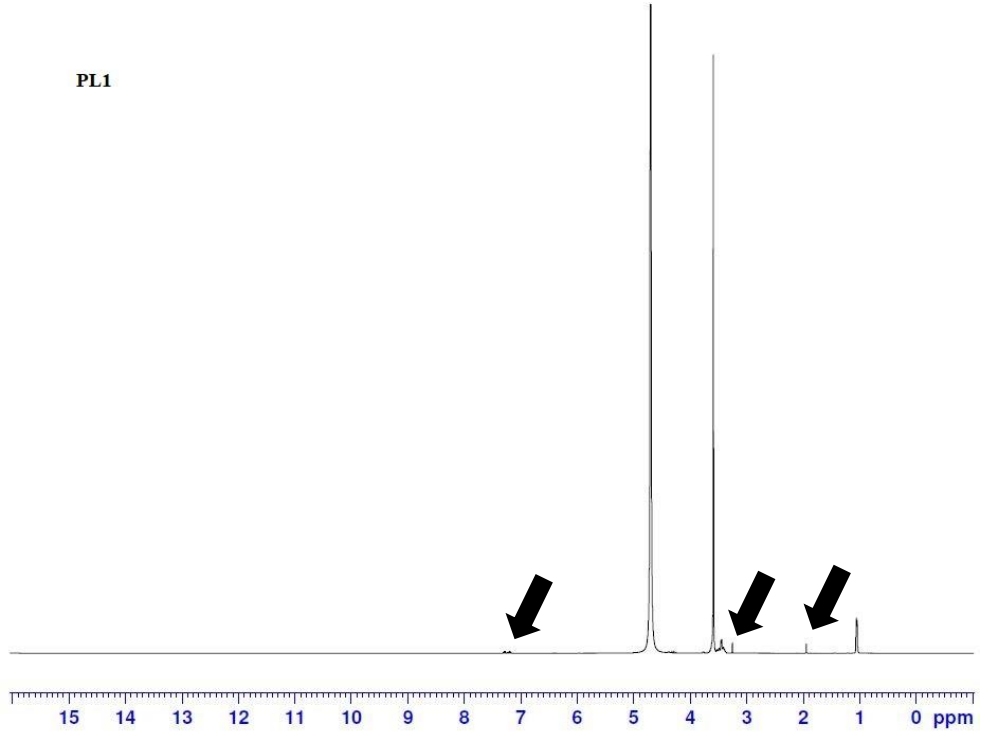
P407 Fiziksel Karışım



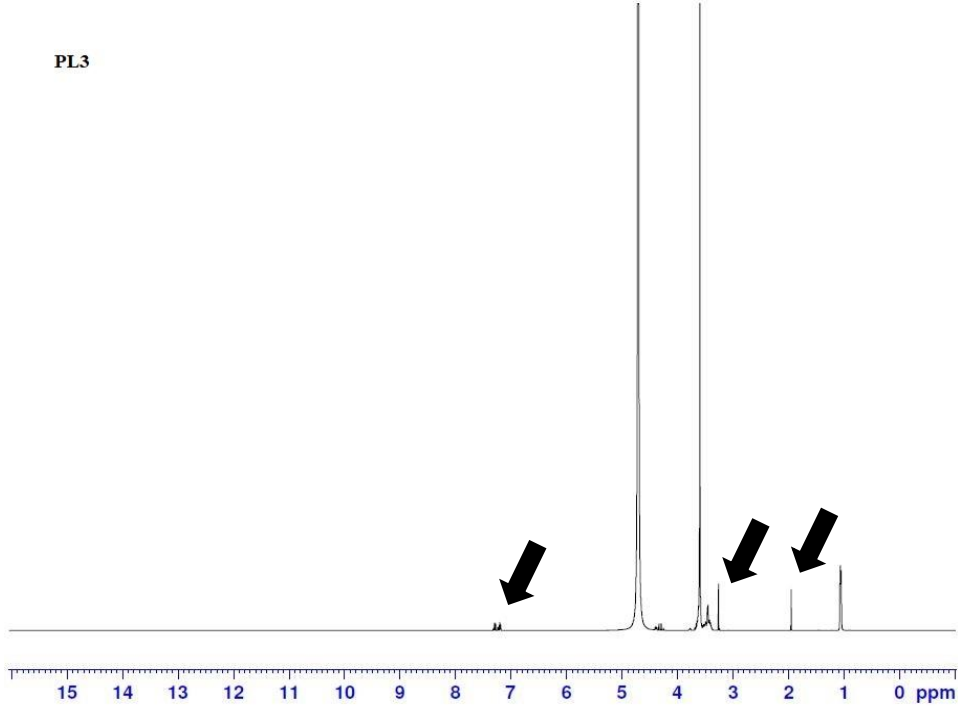
PL0



Şekil 5.50. (Devam) Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait ¹H-NMR sonuçları



Şekil 5.50. (Devam) Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait ¹H-NMR sonuçları



Şekil 5.50. (Devam) Jel formülasyonlarına ve bileşenlerine ait $^1\text{H-NMR}$ sonuçları

Hazırlanan jel formülasyonların ve bileşenlerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde etkin madde ve Poloxamer[®] 407'ye ait pikler fiziksel karışımda ve etkin madde yüklü formülasyonların tamamında açıkça görülmektedir. Analiz sonuçları, etkin maddenin jel formülasyonların içinde kararlı yapısını koruduğunu, lakozamid ile Poloxamer[®] 407 arasındaki etkileşimin fiziksel olduğunu ve yeni bir kimyasal bağın oluşmadığını göstermektedir.

5.4.3.8. Miktar tayini

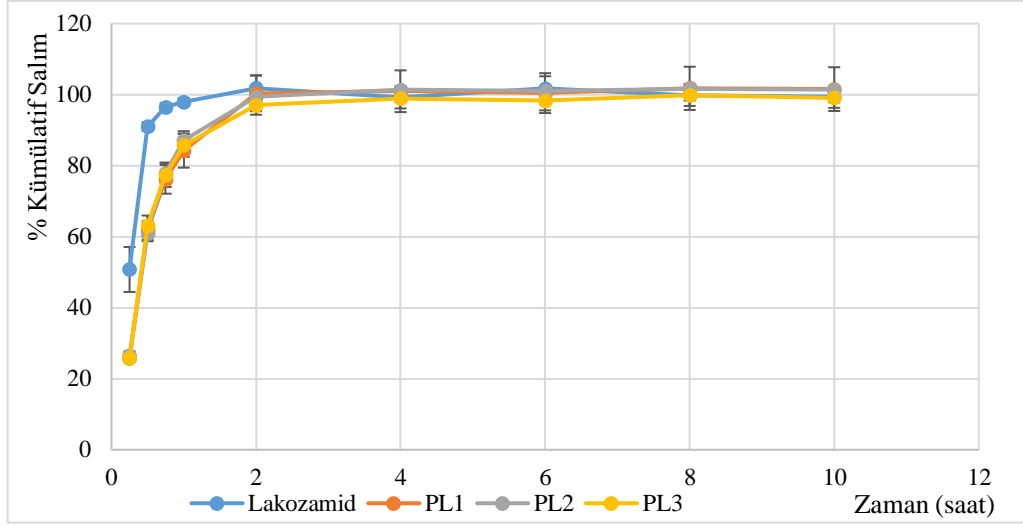
Etkin madde miktar tayini sonuçları Çizelge 5.23'te verilmiştir.

Çizelge 5.23. *In situ* jel formülasyonların miktar tayini sonuçları

Formülasyon Kodu	Etkin Madde Miktarı (%a±SH, n=3)
PL1	10,081±0,057
PL2	15,039±0,045
PL3	20,025±0,083

5.4.3.9. *In vitro* salım çalışması

In situ jellerden salım çalışmasının sonuçları Şekil 5.51'de gösterilmiş, salım modellemesi Çizelge 5.24'te verilmiştir.



Şekil 5.51. *In situ* jel formülasyonlardan salım grafiği

Çizelge 5.24. *In situ* jel formülasyonların salım modelleri

Formülasyon	Parametre	Salım Modelleri					
		Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Higuchi	Hixon-Crowell	Hopfenberg	Korsmeyer-Peppas
PL1	k	14,490	1,852	43,241	0,000	0,482	70,875
	r ²	-3,033	0,972	-0,407	-11,660	0,984	0,667
	AIC	91,900	46,882	82,425	102,194	43,860	47,168
	MSC	-1,617	3,385	-0,564	-2,760	3,720	0,434
	n	-	-	-	-	-	0,217
PL2	k	14,505	1,760	43,358	0,219	0,438	39,589
	r ²	-3,189	0,973	-0,483	-5,383	0,966	-0,781
	AIC	92,115	46,657	82,767	95,904	50,702	57,223
	MSC	-1,654	3,396	-0,616	-2,075	2,946	-1,244
	n	-	-	-	-	-	0,629
PL3	k	14,202	1,024	42,518	0,168	0,168	69,967
	r ²	-3,431	0,661	-0,595	-0,493	-0,276	0,561
	AIC	91,939	68,793	82,743	82,152	82,736	48,413
	MSC	-1,710	0,860	-0,689	-0,623	-0,688	0,158
	n	-	-	-	-	-	0,437
Lakoamid	k	14,564	1,050	44,901	0,164	0,164	83,893
	r ²	-14,728	-2,008	-5,949	-6,238	-5,886	0,381
	AIC	95,659	80,770	88,308	88,674	90,225	68,541
	MSC	-2,978	-1,323	-2,161	-2,202	-2,374	0,035
	n	-	-	-	-	-	0,113

İn situ jel formülasyonların *in vitro* salım çalışması sonucunda bütün formülasyonlardan bir saat içinde etkin maddenin %85'ten fazlasının salındığı yapılan analizlerle tespit edilmiştir (Şekil 5.51). Nazal uygulanan formülasyonlar kısa sürede burundan uzaklaştırılmaktadır (Jaiswal vd., 2017). Hazırlanan formülasyonlardan bir saat içinde etkin maddenin yüksek oranda (%85) serbestleşmesi terapötik dozda etkin madde uygulamak için bir üstünlük sağlamaktadır.

Çizelge 5.25. *İn situ* jel formülasyonların lakozamide göre benzerlik ve fark faktörleri

Formülasyon	(f ₁) fark faktörü	(f ₂) benzerlik faktörü
PL1	11,56	40,76
PL2	11,06	41,44
PL3	11,10	41,56

İn situ jel formülasyonların salım modellemesi sonucunda elde edilen AIC, MSC ve r² parametreleri (Çizelge 5.24) her üç formülasyon için de geçerli salım modelinin Korsmeyer-Peppas olduğunu göstermektedir (Zuo vd., 2014). Polimerik yapıları sahip sistemler genellikle Korsmeyer-Peppas modeline uygun salım göstermektedir (Costa ve Lobo, 2001). Çizelge 5.24'te yer alan "n" değerlerine göre etkin madde PL1 ve PL3 formülasyonlarından Fick yasasına uygun difüzyon ile serbestleşmekte iken PL2 formülasyonunda Fick yasasına uymayan difüzyon görülmektedir (Grassi ve Grassi, 2005).

İn situ jel formülasyonların lakozamidin salım profiline göre benzerlik faktörleri Çizelge 5.25'te verilmiştir. Referans ile kıyaslanan formülasyonların benzer salım profiline sahip olması için f₁ değerinin 15'ten küçük olması ve f₂ değerinin 50'den büyük olması gerekmektedir. Elde edilen sonuçlara göre *in situ* jel formülasyonlarının salımı, serbest haldeki lakozamidden farklı olmaktadır.

SONUÇ

Yapılan tez çalışması kapsamında, nazal yoldan uygulanmak üzere lakozamid içeren mikroğne ve jel formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyonları, mikroğneler için termal analiz, FT-IR, ¹H-NMR, SEM ile morfolojik inceleme, etkin madde miktar tayini ve *in vitro* salım; *in situ* jel formülasyonlar için ise jelleşme kapasitesi, şişme kapasitesi, fiziksel görünüş ve saydamlık, pH ölçümü, akış özellikleri, FT-IR, ¹H-NMR ve *in vitro* salım çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları hazırlanan formülasyonların epilepsi tedavisinde kullanılma potansiyelleri oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmaların *in vivo* deneyler ile desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Abdelnabi, D. M., Abdallah, M. H., ve Elghamry, H. A. (2019). Buspirone Hydrochloride Loaded *In Situ* Nanovesicular Gel as an Anxiolytic Nasal Drug Delivery System: In Vitro and Animal Studies. *American Association of Pharmaceutical Scientist*, 20(3), 134–148.
- Aderibigbe, B. A. (2018). *In situ*-based gels for nose to brain delivery for the treatment of neurological diseases. *Pharmaceutics*, 10(2), 40–57.
- Ahn, J. S., Kim, K. M., Nam, D. S., Kang, K. U., Choi, P. S., ve Jeong, S. Y. (2014). Preparation of lacosamide sustained-release tablets and their pharmacokinetics in beagles and mini-pigs. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 35(2), 557–561.
- Ami, Y., Tachikawa, H., ve Takano, N. (2011). Formation of polymer microneedle arrays using. *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, 10(1), 1–6.
- Ansari, F., Pourjafar, H., Jodat, V., Sahebi, J., ve Ataei, A. (2017). Effect of Eudragit S100 nanoparticles and alginate chitosan encapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. *AMB Express*, 7(1), 144–151.
- Appasaheb, P. S., Manohar, S. D., ve Bhanudas, S. R. (2013). A Review on Intranasal Drug Delivery System. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3(4), 333–346.
- Arora, P., Sharma, S., ve Garg, S. (2002). Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discovery Today*, 7(18), 967–975.
- Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S., ve Kankane, S. (2008). Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 33(11), 1088–1118.
- Balasingam, R., Khan, A., ve Thinakaran, R. (2017). Formulation of *In Situ* Gelling System for Ophthalmic Delivery of Erythromycin. *International Journal of Students' Research in Technology & Management*, 5(3), 01–08.
- Bansal, M., Mittal, N., Yadav, S. K., Khan, G., Gupta, P., Mishra, B., ve Nath, G. (2018). Periodontal thermoresponsive, mucoadhesive dual antimicrobial loaded in-situ gel for the treatment of periodontal disease: Preparation, *in-vitro* characterization and antimicrobial study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8(2), 126–

- Barakat, N. S., Omar, S. A., ve Ahmed, A. A. E. (2006). Carbamazepine uptake into rat brain following intra-olfactory transport. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(1), 63–72.
- Barati, M., Mohammadi Samani, S., Pourtalebi Jahromi, L., Ashrafi, H., ve Azadi, A. (2018). Controlled-release in-situ gel forming formulation of tramadol containing chitosan-based pro-nanogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118(Part B), 1449–1454.
- Başaran, B. (2008). Siprofloksasin ve Hidroksipropil-Beta- Oftalmik *İn-Sitü* Jel Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Bauquier, S. H., Jiang, J. L., Yue, Z., Lai, A., Chen, Y., Moulton, S. E., Mclean, K. J., Vogrin, S., Halliday, A. J., Wallace, G., ve Cook, M. J. (2016). Antiepileptic Effects of Lacosamide Loaded Polymers Implanted Subdurally in GAERS. *International Journal of Polymer Science*, 2016, 1–10.
- Bediz, B., Korkmaz, E., Khilwani, R., Donahue, C., Erdos, G., Falo, L. D., ve Ozdoganlar, O. B. (2014). Dissolvable microneedle arrays for intradermal delivery of biologics: Fabrication and application. *Pharmaceutical Research*, 31(1), 117–135.
- Berg, A. T., Berkovic, S. F., Brodie, M. J., Buchhalter, J., Cross, J. H., Van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. A., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D., Plouin, P., ve Scheffer, I. E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676–685.
- Berg, A. T., ve Cross, J. H. (2012). Classification of epilepsies and seizures: Historical perspective and future directions. İçinde *Handbook of Clinical Neurology* (1. baskı, C. 107, ss. 99–111). Elsevier B.V.
- Bertram, U., ve Bodmeier, R. (2006). Parameters affecting the drug release from in situ gelling nasal inserts. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 63(3), 310–319.
- Beyreuther, B. K., Freitag, J., Heers, C., Krebsfänger, N., Scharfenecker, U., ve Stöhr, T.

- (2007). Lacosamide: A review of preclinical properties. *CNS Drug Reviews*, 13(1), 21–42.
- Bhandwalkar, M. J., ve Avachat, A. M. (2013). Thermoreversible nasal in situ gel of venlafaxine hydrochloride: Formulation, characterization, and pharmacodynamic evaluation. *American Association of Pharmaceutical Scientist*, 14(1), 101–110.
- Cawello, W., Stockis, A., Andreas, J.-O., ve Dimova, S. (2014). Advances in epilepsy treatment : lacosamide pharmacokinetic profile. *Annals Of The New York Academy of Sciences*, 1329(2014), 18–32.
- Chai, Q., Jiao, Y., ve Yu, X. (2017). Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels*, 3(1), 6–20.
- Chand, P., Gnanarajan, G., ve Kothiyal, P. (2016). In situ gel : A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research (IJPBR)*, 4(2), 11–19.
- Chatterjee, S., ve Chi-leung Hui, P. (2019). Stimuli-Responsive Hydrogels: An Interdisciplinary Overview. İçinde Lacramioara Popa (Ed.), *Hydrogels - Smart Materials for Biomedical Applications* (ss. 1–23).
- Chen, M.-C., Huang, S.-F., Lai, K.-Y., ve Ling, M.-H. (2013). Fully embeddable chitosan microneedles as a sustained release depot for intradermal vaccination. *Biomaterials*, 34(12), 3077–3086.
- Chen, M. C., Wang, K. W., Chen, D. H., Ling, M. H., ve Liu, C. Y. (2015). Remotely triggered release of small molecules from LaB6@SiO₂-loaded polycaprolactone microneedles. *Acta Biomaterialia*, 13, 344–353.
- Chen, W., Wang, C., Yan, L., Huang, L., Zhu, X., Chen, B., Sant, H. J., Niu, X., Zhu, G., Yu, K. N., Roy, V. A. L., Gale, B. K., ve Chen, X. (2014). Improved polyvinylpyrrolidone microneedle arrays with non-stoichiometric cyclodextrin. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(12), 1699–1705.
- Chen, Y., Gu, Q., Yue, Z., Crook, J. M., Moulton, S. E., Cook, M. J., ve Wallace, G. G. (2017). Development of drug-loaded polymer microcapsules for treatment of epilepsy. *Biomaterials Science*, 5(10), 2159–2168.
- Chen, Z., Ren, L., Li, J., Yao, L., Chen, Y., Liu, B., ve Jiang, L. (2018). Rapid fabrication of microneedles using magnetorheological drawing lithography. *Acta Biomaterialia*,

65, 283–291.

- Chonkar, A., Nayak, U., ve Udupa, N. (2015). Smart polymers in drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77(4), 367–375.
- Costa, P., ve Lobo, J. M. S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 121–133.
- Crowe, T. P., Greenlee, M. H. W., Kanthasamy, A. G., ve Hsu, W. H. (2018). Mechanism of intranasal drug delivery directly to the brain. *Life Sciences*, 195, 44–52.
- D’Souza, S. (2014). A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms . *Advances in Pharmaceutics*, 2014, 1–12.
- Da Silva, F. H. L., Gorter, J. A., ve Wadman, W. J. (2012). Epilepsy as a dynamic disease of neuronal networks. İçinde *Handbook of Clinical Neurology* (1. baskı, C. 107, Sayı 31, ss. 35–62). Elsevier B.V.
- Dardano, P., Calìo, A., Palma, V. Di, Bevilacqua, M. F., Matteo, A. Di, ve Stefano, L. De. (2015). A Photolithographic Approach to Polymeric Microneedles Array Fabrication. *Materials*, 8, 8661–8673.
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., ve Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(3), 217–223.
- Davis, S. P., Martanto, W., Allen, M. G., Member, S., ve Prausnitz, M. R. (2005). Hollow Metal Microneedles for Insulin Delivery to Diabetic Rats. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 52(5), 909–915.
- de Biase, S., Valente, M., Gigli, G. L., ve Merlino, G. (2017). Pharmacokinetic drug evaluation of lacosamide for the treatment of partial-onset seizures. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 13(9), 997–1005.
- Demir, Y. K., Akan, Z., ve Kerimoglu, O. (2013). Characterization of Polymeric Microneedle Arrays for Transdermal Drug Delivery. *PLoS ONE*, 8(10), 1–10.
- Devasani, S. R., Dev, A., Rathod, S., ve Deshmukh, G. (2016). An overview of *in situ* gelling systems. *Pharmaceutical and Biological Evaluations*, 3(1), 60–69.
- Dhakar, R. C., Maurya, S. D., Tilak, V. K., ve Gupta, A. K. (2011). A review on factors affecting the design of nasal drug delivery system. *International Journal of Drug*

- Delivery*, 3(2), 194–208.
- Diniz, I. M. A., Chen, C., Xu, X., Ansari, S., Zadeh, H. H., Marques, M. M., Shi, S., ve Moshaverinia, A. (2015). Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(3), 1–10.
- Duarah, S., Sharma, M., ve Wen, J. (2019). Recent advances in microneedle-based drug delivery: Special emphasis on its use in paediatric population. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 136, 48–69.
- Dumortier, G., Grossiord, J. L., Agnely, F., ve Chaumeil, J. C. (2006). A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical Research*, 23(12), 2709–2728.
- Duygu, D., Baykal, T., Açıkgöz, I., ve Yildiz, K. (2009). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. *Gazi University Journal of Science*, 22(3), 117–121.
- El-Sayed, S., Mahmoud, K. H., Fatah, A. A., ve Hassen, A. (2011). DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends. *Physica B: Condensed Matter*, 406(21), 4068–4076.
- Erdö, F., Bors, L. A., Farkas, D., Bajza, Á., ve Gizurason, S. (2018). Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. *Brain Research Bulletin*, 143(July), 155–170.
- Escobar-Chávez, J. J., López-Cervantes, M., Naik, A., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., ve Ganem-Quintanar, A. (2006). Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 339–358.
- Feng, Y., He, H., Li, F., Lu, Y., Qi, J., ve Wu, W. (2018). An update on the role of nanovehicles in nose-to-brain drug delivery. *Drug Discovery Today*, 23(5), 1079–1088.
- Fenoradosoa, T. A., Ali, G., Delattre, C., Laroche, C., Petit, E., Wadouachi, A., ve Michaud, P. (2010). Extraction and characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. *Journal of Applied Phycology*, 22(2),

131–137.

- Galgatte, U. C., ve Chaudhari, P. D. (2014). Preformulation study of poloxamer 407 gels: Effect of additives. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 130–133.
- Gáll, Z., ve Vancea, S. (2018). Distribution of lacosamide in the rat brain assessed by in vitro slice technique. *Archives of Pharmacal Research*, 41(1), 79–86.
- Gamal, A. B., Hassan, A. A., ve Nahas, H. M. El. (2016). Optimization and Characterization of Eudragit S 100 Microsponges of Fluconazole. *International Journal of Trend in Research and Development*, 3(6), 141–149.
- Garala, K., Joshi, P., Patel, J., Ramkishan, A., ve Shah, M. (2013). Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 3(1), 29.
- Geis, C., Beyreuther, B. K., Stöhr, T., ve Sommer, C. (2011). Lacosamide has protective disease modifying properties in experimental vincristine neuropathy. *Neuropharmacology*, 61(4), 600–607.
- Gholizadeh, H., Messerotti, E., Pozzoli, M., Cheng, S., Traini, D., Young, P., Kourmatzis, A., Caramella, C., ve Ong, H. X. (2019). Application of a Thermosensitive *In Situ* Gel of Chitosan-Based Nasal Spray Loaded with Tranexamic Acid for Localised Treatment of Nasal Wounds. *American Association of Pharmaceutical Scientist*, 20(7), 299.
- Gill, H. S., ve Prausnitz, M. R. (2007). Coated microneedles for transdermal delivery. *Journal of Controlled Release*, 117(2), 227–237.
- Gouda, R., Baishya, H., ve Qing, Z. (2017). Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. *Journal of Developing Drugs*, 06(02), 1–8.
- Grassi, M., ve Grassi, G. (2005). Mathematical Modelling and Controlled Drug Delivery: Matrix Systems. *Current Drug Delivery*, 2(1), 97–116.
- Güven, U. M. (2016). *Antihistaminik Etkili Oftalmik Kontrollü Salım Gösteren Farklı Sistemler Üzerinde Çalışmalar*. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi.
- Halford, J. J., ve Lapointe, M. (2009). Current Review In Clinical Science, Clinical

- Perspectives On Lacosamide. *Epilepsy Currents*, 9(1), 1–9.
- Han, C.-S., Kim, S., Oh, D.-W., Yoon, J. Y., Park, E.-S., Rhee, Y.-S., Kim, J.-Y., Shin, D. H., ve Kim, D.-W. (2019). Preparation, Characterization, and Stability Evaluation of Taste-Masking Lacosamide Microparticles. *Materials*, 12(6), 1000–1014.
- Helmiyata, ve Aprilliza. (2017). Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 188.
- Hoang, M. T., Ita, K. B., ve Bair, D. A. (2015). Solid microneedles for transdermal delivery of amantadine hydrochloride and pramipexole dihydrochloride. *Pharmaceutics*, 7(4), 379–396.
- Hoare, T. R., ve Kohane, D. S. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993–2007.
- Hoy, S. M. (2018). Lacosamide : A Review in Focal-Onset Seizures in Patients with Epilepsy. *CNS Drugs*, 32(5), 473–484.
- Hussein, A. F., Arunkumar, N., Gomes, C., Alzubaidi, A. K., Habash, Q. A., Santamaria-granados, L. U. Z., Mendoza-moreno, J. F., ve Ramirez-gonzalez, G. (2018). Focal and Non-Focal Epilepsy Localization : A Review. *IEEE Access*, 6, 49306–49324.
- ICH, E. W. G. (2005). *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1) Current*. 1–17.
- Illum, L. (2002). Nasal drug delivery: New developments and strategies. *Drug Discovery Today*, 7(23), 1184–1189.
- Illum, L. (2003). Nasal drug delivery - Possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release*, 87(1–3), 187–198.
- Ita, K. (2017). Dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Advances and challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 1116–1127.
- Ita, K. (2018a). Ceramic microneedles and hollow microneedles for transdermal drug delivery: Two decades of research. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44(2018), 314–322.
- Ita, K. (2018b). Modulation of transdermal drug delivery with coated microneedles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 45(2018), 203–212.

- Jadhav, K., Gambhire, M., Shaikh, I., Kadam, V., ve Pisal, S. (2008). Nasal Drug Delivery System-Factors Affecting and Applications. *Current Drug Therapy*, 2(1), 27–38.
- Jagdale, S., Shewale, N., ve S. Kuchekar, B. (2016). Optimization of Thermoreversible *In Situ* Nasal Gel of Timolol Maleate. *Scientifica*, 2016(6401267), 1–11.
- Jaiswal, N., Sharma, P. K., ve Kumar, A. (2017). Scope of Nasal Drug Delivery : Current Challenges. *World Journal of Medical Sciences*, 14(4), 97–112.
- Jassim, Z. E., ve Al-akkam, E. J. (2018). Review Article A review on strategies for improving nasal drug delivery systems. *Drug Invention Today*, 10(1), 1–9.
- Juster, H., van der Aar, B., ve de Brouwer, H. (2019). A review on microfabrication of thermoplastic polymer-based microneedle arrays. *Polymer Engineering and Science*, 59(5), 877–890.
- Kai, T., Mori, S., ve Kato, N. (2016). Development of a Rapid Prototyping System for Microneedles Using Moving-mask Lithography with Backside Exposure. *Advanced Biomedical Engineering*, 5, 63–67.
- Kang, S.-W. (2010). Application of Soft Lithography for Nano Functional Devices. İçinde Michail Wang (Ed.), *Lithography* (ss. 403–426). InTech.
- Karasin, B., ve Karasin, M. (2017). Epilepsy: Clinical Review and Surgical Options. *AORN Journal*, 106(5), 393–414.
- Karavasili, C., ve Fatouros, D. G. (2016). Smart materials: In situ gel-forming systems for nasal delivery. *Drug Discovery Today*, 21(1), 157–166.
- Kathe, K., ve Kathpalia, H. (2017). Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(6), 487–497.
- Kaur, P., Garg, T., Rath, G., ve Goyal, A. K. (2016). In situ nasal gel drug delivery : A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane. *Artif Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 44, 1167–1176.
- Keck, T., Leiacker, R., Riechelmann, H., ve Rettinger, G. (2000). Temperature profile in the nasal cavity. *The Laryngoscope*, 110(4), 651–654.
- Khan, A. R., Liu, M., Khan, M. W., ve Zhai, G. (2017). Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *Journal of Controlled Release*, 268, 364–389.

- Kim, J. D., Kim, M., Yang, H., Lee, K., ve Jung, H. (2013). Droplet-born air blowing: Novel dissolving microneedle fabrication. *Journal of Controlled Release*, 170(3), 430–436.
- Kim, M. J., Park, S. C., Rizal, B., Guanes, G., Baek, S.-K., Park, J.-H., Betz, A. R., ve Choi, S.-O. (2018). Fabrication of Circular Obelisk-Type Multilayer Microneedles Using Micro-Milling and Spray Deposition. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 1–13.
- Kim, Y., Park, J., ve Prausnitz, M. R. (2012). Microneedles for drug and vaccine delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(14), 1547–1568.
- Kono, H., Oshima, K., Hashimoto, H., Shimizu, Y., ve Tajima, K. (2016). NMR characterization of sodium carboxymethyl cellulose: Substituent distribution and mole fraction of monomers in the polymer chains. *Carbohydrate Polymers*, 146, 1–9.
- Koo, T. S., Kim, S. J., Ha, D. J., Baek, M., ve Moon, H. (2011). Pharmacokinetics, brain distribution, and plasma protein binding of the antiepileptic drug lacosamide in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 34(12), 2059–2064.
- Kopeček, J. (2007). Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*, 28(34), 5185–5192.
- Korkmaz, E., Friedrich, E. E., Ramadan, M. H., Erdos, G., Mathers, A. R., Ozdoganlar, O. B., Washburn, N. R., ve Falo, L. D. (2015). Therapeutic intradermal delivery of tumor necrosis factor-alpha antibodies using tip-loaded dissolvable microneedle arrays. *Acta Biomaterialia*, 24, 96–105.
- Krasowski, M. D., ve Mcmillin, G. A. (2014). Advances in anti-epileptic drug testing. *Clinica Chimica Acta*, 436, 224–236.
- Krieger, K. J., Bertollo, N., Dangol, M., Sheridan, J. T., Lowery, M. M., ve O’Cearbhaill, E. D. (2019). Simple and customizable method for fabrication of high-aspect ratio microneedle molds using low-cost 3D printing. *Microsystems and Nanoengineering*, 5(1), 42–55.
- Kulkarni, J. A., ve Avachat, A. M. (2017). Pharmacodynamic and pharmacokinetic investigation of cyclodextrin-mediated asenapine maleate in situ nasal gel for

- improved bioavailability. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(2), 234–245.
- Kumar, M., Misra, A., Babbar, A. K., Mishra, A. K., Mishra, P., ve Pathak, K. (2008). Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *International Journal of Pharmaceutics*, 358(1–2), 285–291.
- Kuzmanović, M., Božanić, D. K., Milivojević, D., Čulafić, D. M., Stanković, S., Ballesteros, C., ve Gonzalez-Benito, J. (2017). Sodium-alginate biopolymer as a template for the synthesis of nontoxic red emitting Mn²⁺-doped CdS nanoparticles. *RSC Advances*, 7(84), 53422–53432.
- Larrañeta, E., Lutton, R. E. M., Woolfson, A. D., ve Donnelly, R. F. (2016). Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development. *Materials Science and Engineering R*, 104, 1–32.
- Lee, C., Kim, H., Kim, S., Lahiji, S. F., Ha, N. Y., Yang, H., Kang, G., Nguyen, H. Y. T., Kim, Y., Choi, M. S., Cho, N. H., ve Jung, H. (2018). Comparative Study of Two Droplet-Based Dissolving Microneedle Fabrication Methods for Skin Vaccination. *Advanced Healthcare Materials*, 7(11), 1–8.
- Lee, K., ve Jung, H. (2012). Drawing lithography for microneedles: A review of fundamentals and biomedical applications. *Biomaterials*, 33(30), 7309–7326.
- Lee, K., Lee, H. C., Lee, D. S., ve Jung, H. (2010). Drawing lithography: Three-dimensional fabrication of an ultrahigh-aspect-ratio microneedle. *Advanced Materials*, 22(4), 483–486.
- Lee, K. Y., ve Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 37(1), 106–126.
- Leone, M., Mönkäre, J., Bouwstra, J. A., ve Kersten, G. (2017). Dissolving Microneedle Patches for Dermal Vaccination. *Pharmaceutical Research*, 34(11), 2223–2240.
- Li, J. C., Zhang, W. J., Zhu, J. X., Zhu, N., Zhang, H. M., Wang, X., Zhang, J., ve Wang, Q. Q. (2015). Preparation and brain delivery of nasal solid lipid nanoparticles of quetiapine fumarate in situ gel in rat model of schizophrenia. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(10), 17590–17600.

- Li, J., Zhou, Y., Yang, J., Ye, R., Gao, J., Ren, L., Liu, B., Liang, L., ve Jiang, L. (2019). Fabrication of gradient porous microneedle array by modified hot embossing for transdermal drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 96, 576–582.
- Lin, S., Cai, B., Quan, G., Peng, T., Yao, G., Zhu, C., Wu, Q., Ran, H., Pan, X., ve Wu, C. (2018). Novel strategy for immunomodulation: Dissolving microneedle array encapsulating thymopentin fabricated by modified two-step molding technology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 122(2018), 104–112.
- Lopez, C. G., Rogers, S. E., Colby, R. H., Graham, P., ve Cabral, J. T. (2015). Structure of sodium carboxymethyl cellulose aqueous solutions: A SANS and rheology study. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 53(7), 492–501.
- Madhra, M. K., Sriram, H. M., Sharma, M. K., ve Jha, S. C. (2013). *Patent Application Publication* (Patent Sayı 0085304).
- Magazi, D. S., Nkohla, S., ve Mmako, M. T. (2018). Epilepsy seizure types , classification and treatment. *South African Family Practice*, 60(4), 22–27.
- Mahajan, H. S., Tyagi, V., Lohiya, G., ve Nerkar, P. (2012). Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for nasal drug delivery. *Drug Delivery*, 19(5), 270–276.
- Mali, K. K., Dhawale, S. C., Dias, R. J., Dhane, N. S., ve Ghorpade, V. S. (2018). Citric acid crosslinked carboxymethyl cellulose-based composite hydrogel films for drug delivery. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(4), 657–667.
- Malik, N. S., Ahmad, M., ve Minhas, M. U. (2017). Cross-linked β -cyclodextrin and carboxymethyl cellulose hydrogels for controlled drug delivery of acyclovir. *PLoS ONE*, 12(2), 1–17.
- Manikandan, M., Kannan, K., ve Manavalan, R. (2013). Compatibility studies of camptothecin with various pharmaceutical excipients used in the development of nanoparticle formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 315–321.
- Masuelli, M. A., ve Illanes, C. O. (2014). Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements . Comparative analysis between conventional and single point methods. *International Journal of BioMaterials Science and Engineering*, 1(1), 1–11.

- Matanović, M. R., Kristl, J., ve Grabnar, P. A. (2014). Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1–2), 262–275.
- Mathison, S., Nagilla, R., ve Kompella, U. B. (1998). Nasal route for direct delivery of solutes to the central nervous system: Fact or fiction? *Journal of Drug Targeting*, 5(6), 415–441.
- McCrudden, M. T. C., Alkilani, A. Z., McCrudden, C. M., McAlister, E., McCarthy, H. O., Woolfson, A. D., ve Donnelly, R. F. (2014). Design and physicochemical characterisation of novel dissolving polymeric microneedle arrays for transdermal delivery of high dose, low molecular weight drugs. *Journal of Controlled Release*, 180(1), 71–80.
- Mehta, R., Chawla, A., Sharma, P., ve Pawar, P. (2013). Formulation and *in vitro* evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 4(1), 31–41.
- Melekoğlu, N. A. (2012). *Yeni Tanı Almış Epileptik Çocuklarda İntriktal EEG ve Uyku Deprivasyonlu Kısa Süreli Video EEG Mönitorizasyonunun Tanısal Değeri*. Çukurova Üniversitesi.
- Misra, A., ve Kher, G. (2012). Drug Delivery Systems from Nose to Brain. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(12), 2355–2379.
- Moga, K. A., Bickford, L. R., Geil, R. D., Dunn, S. S., Pandya, A. A., Wang, Y., Fain, J. H., Archuleta, C. F., O'Neill, A. T., ve Desimone, J. M. (2013). Rapidly-dissolvable microneedle patches via a highly scalable and reproducible soft lithography approach. *Advanced Materials*, 25(36), 5060–5066.
- Mogusala, N. R., Devadasu, V. R., ve Venisetty, R. K. (2015). Fabrication of Microneedle Molds and Polymer Based Biodegradable Microneedle Patches: A Novel Method. *American Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(2), 60–71.
- Mohanty, D., Bakshi, V., Simharaju, N., Haque, M. A., ve Sahoo, C. K. (2018). A Review on in situ Gel: A Novel Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical Review and Research*, 50(1), 175–181.

- Moura, S., Noro, J., Cerqueira, P., Silva, C., Cavaco-Paulo, A., ve Loureiro, A. (2020). Poloxamer 407 based-nanoparticles for controlled release of methotrexate. *International Journal of Pharmaceutics*, 575, 1–9.
- Mura, P., Mennini, N., Nativi, C., ve Richichi, B. (2018). *In situ* mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 122(Ocak), 54–61.
- Naik, A., ve Nair, H. (2014). Formulation and evaluation of thermosensitive biogels for nose to brain delivery of doxepin. *BioMed Research International*, 2014, 10.
- Nguyen, J., Ita, K. B., Morra, M. J., ve Popova, I. E. (2016). The Influence of Solid Microneedles on the Transdermal Delivery of Selected Antiepileptic Drugs. *Pharmaceutics*, 8(4), 33–46.
- Öztürk, A. A., Çınar, N. İ., ve Yenilmez, E. (2019). Development of nano-sized ketoprofen lysine incorporated Eudragit® S100 nanomedicine by double emulsion solvent evaporation and *in vitro* characterization. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 7(1), 47–58.
- Parhizkar, E., Emadi, L., ve Alipour, S. (2017). Development and evaluation of midazolam *in situ* nasal gel properties in presence of solubility enhancers at cilia-friendly pH. *Macromolecular Research*, 25(3), 255–261.
- Park, E., ve Song, K. (2011). Rheological Properties of Poloxamer 407 Solutions and Gels. *Annual Transactions of the Nordic Rheology Society*, 19, 1–5.
- Park, S.-J., ve Kim, K.-S. (2011). Investigation of Drug Delivery Behaviors by NMR Spectroscopy. *Structure-Activity Relationship Studies in Drug Development by NMR Spectroscopy*, 1, 36–66.
- Patil, R. P., Pawara, D. D., Gudewar, C. S., ve Tekade, A. R. (2019). Nanostructured cubosomes in an *in situ* nasal gel system: an alternative approach for the controlled delivery of donepezil HCl to brain. *Journal of Liposome Research*, 29(3), 264–273.
- Paul, S. D., Sharma, H., Jeswani, G., ve Jha, A. K. (2017). Novel gels: Implications for Drug Delivery. İçinde E. Andronescu & A. M. Grumezescu (Ed.), *Nanostructures for Drug Delivery* (ss. 379–412). Elsevier Inc.

- Pereira, G. G., Dimer, F. A., ve Guterres, S. S. (2013). Formulation And Characterization Of Poloxamer 407®: Thermoreversible Gel Containing Polymeric Microparticles And Hyaluronic Acid. *Quim. Nova*, 36(8), 1121–1125.
- Qazi, K. I., Lam, H. K., Xiao, B., Ouyang, G., ve Yin, X. (2016). Classification of epilepsy using computational intelligence techniques. *CAAI Transactions on Intelligence Technology* 1, 1(2), 137–149.
- Qin, D., Xia, Y., ve Whitesides, G. M. (2010). Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. *Nature Protocols*, 5(3), 491–502.
- Rajagopalan, S., Yang, L., Demarco, R. M., Brule, R. G., ve Perez-Castillejos, R. (2013). Smart photolithography. *Proceedings of the IEEE Annual Northeast Bioengineering Conference, NEBEC*, 76–77.
- Rao, M., Agrawal, D. K., ve Shirsath, C. (2017). Thermoreversible mucoadhesive in situ nasal gel for treatment of Parkinson's disease. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(1), 142–150.
- Ravi, G., Gupta, N. V., ve Gowrav, M. P. (2017). A Comprehensive Review On Microneedles - An Archetype Swing In Transdermal Drug Delivery. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 7(01), 7399–7416.
- Redaelli, F., Sorbona, M., ve Rossi, F. (2016). Synthesis and processing of hydrogels for medical applications. İçinde G. Perale & J. Hilborn (Ed.), *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications: From Fundamentals to Translational Medicine* (ss. 205–228). Elsevier Ltd.
- Rogawski, M. A., Tofighy, A., White, H. S., Matagne, A., ve Wolff, C. (2015). Current understanding of the mechanism of action of the antiepileptic drug lacosamide. *Epilepsy Research*, 110, 189–205.
- Rojek, B., ve Wesolowski, M. (2019). DSC supported by factor analysis as a reliable tool for compatibility study in pharmaceutical mixtures. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 138(6), 4531–4539.
- Rzhevskiy, A. S., Singh, T. R. R., Donnelly, R. F., ve Anissimov, Y. G. (2018). Microneedles as the technique of drug delivery enhancement in diverse organs and tissues. *Journal of Controlled Release*, 270(November 2017), 184–202.

- Saini, J., ve Dutta, M. (2018). Epilepsy classification using optimized artificial neural network. *Neurological Research*, 40(11), 982–994.
- Sanmartí-Vilaplana, F., ve Díaz-Gómez, A. (2018). The effectiveness and safety of lacosamide in children with epilepsy in a clinical practice setting. *Epilepsy and Behavior*, 79, 130–137.
- Saudagar, R. B., ve Khandbahale, S. V. (2017). Formulation Development and Evaluation of Nasal *In-Situ* Gel of Fluticasone Propionate. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(5), 45–54.
- Schaefer, C., Cawello, W., Waitzinger, J., ve Elshoff, J. P. (2015). Effect of Age and Sex on Lacosamide Pharmacokinetics in Healthy Adult Subjects and Adults with Focal Epilepsy. *Clinical Drug Investigation*, 35(4), 255–265.
- Schwartzkroin, P. A. (2012). Cellular bases of focal and generalized epilepsies. İçinde *Handbook of Clinical Neurology* (1. baskı, C. 107, ss. 13–33). Elsevier B.V.
- Seon-Woo, H. S., Kim, H. J., Roh, J. Y., ve Park, J. H. (2019). Dissolving Microneedle Systems for the Oral Mucosal Delivery of Triamcinolone Acetonide to Treat Aphthous Stomatitis. *Macromolecular Research*, 27(3), 282–289.
- Seong, K. Y., Seo, M. S., Hwang, D. Y., O’Cearbhaill, E. D., Sreenan, S., Karp, J. M., ve Yang, S. Y. (2017). A self-adherent, bullet-shaped microneedle patch for controlled transdermal delivery of insulin. *Journal of Controlled Release*, 265, 48–56.
- Serrano-Castañeda, P., Escobar-Chávez, J. J., Rodríguez-Cruz, I. M., Melgoza-Contreras, L. M., ve Martínez-Hernández, J. (2018). Microneedles as enhancer of drug absorption through the skin and applications in medicine and cosmetology. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 73–93.
- Sharma, Sanjay, Hatware, K., Bhadane, P., Sindhikar, S., ve Mishra, D. K. (2019). Recent advances in microneedle composites for biomedical applications: Advanced drug delivery technologies. *Materials Science and Engineering C*, 103(May), 109717.
- Sharma, Suruchi, ve Dixit, V. (2013). Epilepsy – A Comprehensive Review. *International Journal of Pharma Research & Review*, 2(12), 61–80.
- Shih, J. J., Whitlock, J. B., Chimato, N., Vargas, E., Karceski, S. C., ve Frank, R. D. (2017). Epilepsy & Behavior Epilepsy treatment in adults and adolescents : Expert

- opinion , 2016. *Epilepsy & Behavior*, 69, 186–222.
- Singh, R. M., Kumar, A., ve Pathak, K. (2013). Mucoadhesive in situ nasal gelling drug delivery systems for modulated drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 10(1), 115–130.
- Sochi, T. (2010). Non-Newtonian flow in porous media. *Polymer*, 51(22), 5007–5023.
- Soltanzadeh, R., Afsharipour, E., Shafai, C., Anssari, N., Mansouri, B., ve Moussavi, Z. (2018). Molybdenum coated SU-8 microneedle electrodes for transcutaneous electrical nerve stimulation. *Biomed Microdevices*, 20(1), 1–10.
- Sreenivasulu, V., Rao, D. R., Uma Maheswari, B. N., Das, S. K., ve Krishnaiah, A. (2011). Development and validation of a stability-indicating RP - HPLC method for determination of lacosamide. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2(4), 1–11.
- Stafstrom, C. E., ve Carmant, L. (2015). Seizures and Epilepsy: An Overview for Neuroscientists. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5, 1–18.
- Supper, S., Anton, N., Seidel, N., Riemenschnitter, M., Curdy, C., ve Vandamme, T. (2014). Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(2), 249–267.
- Swamy, N. G. N., ve Abbas, Z. (2012). Mucoadhesive *in situ* gels as nasal drug delivery systems: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 168–180.
- Tangri, P., ve Khurana, S. (2011). Nasal Drug Delivery Systems : Scope And Potential. *Drug Invention Today*, 3(3), 18–21.
- Tran, K. T. M., ve Nguyen, T. D. (2017). Lithography-based methods to manufacture biomaterials at small scales. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 2(1), 1–14.
- Trautmann, A., Heuck, F., Mueller, C., Ruther, P., ve Paul, O. (2005). Replication of Microneedle Arrays Using Vacuum Casting and Hot Embossing. *The 13th International Conference on Solid-State Sensors Actuators and Microsystems*, 2, 1420–1423.
- Tuan-Mahmood, T.-M., Mccrudden, M. T. C., Torrisi, B. M., Mcalister, E., Garland, M.

- J., Raghu, T., Singh, R., ve Donnelly, R. F. (2013). Microneedles for intradermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(5), 623–637.
- Tufan, M., Uraz, E., Tosun, Ç., ve Gerçel, H. F. (2016). Synthesis And Characterization Of Carboxymethyl Cellulose Film From Pistachio Shells. *International Journal of Advances in Science, Engineering and Technology*, 4(1), 153–155.
- Ugwoke, M. I., Agu, R. U., Verbeke, N., ve Kinget, R. (2005). Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1640–1665.
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., ve Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering C*, 57, 414–433.
- Ur-Rehman, T., Tavelin, S., ve Gröbner, G. (2010). Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of Poloxamer 407. *International Journal of Pharmaceutics*, 394(1–2), 92–98.
- Van Der Maaden, K., Jiskoot, W., ve Bouwstra, J. (2012). Microneedle technologies for (trans)dermal drug and vaccine delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 645–655.
- Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M., ve Sadiku, R. (2017). A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering C*, 79, 958–971.
- Venkatesh, M. P., K. Liladhar, P., M.P. Kumar, T., ve G. Shivakumar, H. (2011). In Situ Gels Based Drug Delivery Systems. *Current Drug Therapy*, 6(3), 213–222.
- Vyas, V., Sancheti, P., Karekar, P., Shah, M., ve Pore, Y. (2009). Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407. *Acta Pharmaceutica*, 59(4), 453–461.
- Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S. K., Pandey, M. M., Gupta, G., Singh, M., ve Dua, K. (2019). Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 109, 1249–1258.
- Wang, Min, Hu, L., ve Xu, C. (2017). Recent advances in the design of polymeric

- microneedles for transdermal drug delivery and biosensing. *Lab on a Chip*, 17(8), 1373–1387.
- Wang, Q. L., Zhu, D. D., Chen, Y., ve Guo, X. D. (2016). A fabrication method of microneedle molds with controlled microstructures. *Materials Science and Engineering C*, 65, 135–142.
- Wang, X., Liu, G., Ma, J., Guo, S., Gao, L., Jia, Y., Li, X., ve Zhang, Q. (2013). *In situ* gel-forming system: An attractive alternative for nasal drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 30(5), 411–434.
- Wang, Y., Jiang, S., Wang, H., ve Bie, H. (2017). A mucoadhesive, thermoreversible *in situ* nasal gel of geniposide for neurodegenerative diseases. *PLOS ONE*, 12(12), 1–17.
- Washington, N., Steele, R. J. C., Jackson, S. J., Bush, D., Mason, J., Gill, D. A., Pitt, K., ve Rawlins, D. A. (2000). Determination of baseline human nasal pH and the effect of intranasally administered buffers. *International Journal of Pharmaceutics*, 198(2), 139–146.
- Xu, X., Shen, Y., Wang, W., Sun, C., Li, C., Xiong, Y., ve Tu, J. (2014). Preparation and *in vitro* characterization of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels for nasal delivery of phenylephrine hydrochloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(3), 998–1004.
- Yin, J., Xiang, C., ve Song, X. (2016). Nanoencapsulation of psoralidin via chitosan and Eudragit S100 for enhancement of oral bioavailability. *International Journal of Pharmaceutics*, 510(1), 203–209.
- Youssef, N. A. H. A., Kassem, A. A., Farid, R. M., Ismail, F. A., EL-Massik, M. A. E., ve Boraie, N. A. (2018). A novel nasal almotriptan loaded solid lipid nanoparticles in mucoadhesive *in situ* gel formulation for brain targeting: Preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 548(1), 609–624.
- Yu, W., Jiang, G., Zhang, Y., Liu, D., Xu, B., ve Zhou, J. (2017). Polymer microneedles fabricated from alginate and hyaluronate for transdermal delivery of insulin. *Materials Science & Engineering C*, 80, 187–196.

- Zhan, H., Ma, F., Huang, Y., Zhang, J., Jiang, X., ve Qian, Y. (2018). Application of composite dissolving microneedles with high drug loading ratio for rapid local anesthesia. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121, 330–337.
- Zhang, J., Wang, Y., Jin, J. Y., Degan, S., Hall, R. P., Boehm, R. D., Jaipan, P., ve Narayan, R. J. (2016). Use of Drawing Lithography-Fabricated Polyglycolic Acid Microneedles for Transdermal Delivery of Itraconazole to a Human Basal Cell Carcinoma Model Regenerated on Mice. *The Minerals, Metals & Materials Society*, 68(4), 1128–1133.
- Zhang, J. X. J., ve Hoshino, K. (2019). Fundamentals of nano/ microfabrication and scale effect. İçinde *Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering Micro and Nano Technologies* (ss. 43–111).
- Zuo, J., Gao, Y., Bou-Chacra, N., ve Löbenberg, R. (2014). Evaluation of the DDSolver software applications. *BioMed Research International*, 2014, 1–9.
- http-1: <https://www.vibrantbiomedical.com/product/zetaplus-c-silicone-intro-kit/>
(Erişim tarihi: 31.12.2019)
- http-2: <https://dermapen.com> (Erişim tarihi: 31.12.2019)