

**EPİLEPTİK MEKANİZMAYA
MÜDAHALE EDECEK NANOBOYUTTA
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ
ve
İN VİVO DAVRANIŞININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Güsel Yurtdaş Kırımhoğlu

Doktora Tezi

**EPİLEPTİK MEKANİZMAYA
MÜDAHALE EDECEK NANOBOYUTTA
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ
ve
İN VİVO DAVRANIŞININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Güsel Yurtdaş Kırımlioğlu

Doktora Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Eskişehir, Ekim 2014

Tez Danışmanı : Prof.Dr. E. Yasemin YAZAN

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1206S106).

Jüri ve Enstitü Onayı Örneği

Gülsel YURTDAS KIRIMLIOĞLU' nun “ Epileptik Mekanizmaya Müdahale Edecek Nanoboyutta İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve *İn Vivo* Davranışının Değerlendirilmesi “ başlıklı, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki Doktora tezi, 23.10.2014 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof.Dr. E. Yasemin YAZAN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Prof.Dr. Sevda ŞENEL Hacettepe Üniversitesi	
Üye	Doç.Dr. Rana ARSLAN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Yard.Doç.Dr. Ebru BAŞARAN Anadolu Üniversitesi	
Üye	Yard.Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ Anadolu Üniversitesi	

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 25.09.2014 tarih ve26..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Fatih Demirci



ÖNSÖZ

Bu çalışmada epileptik mekanizmaya müdahale edecek moleküler baskılanmış polimer, polimerik nanopartikül ve nanotüp formülasyonlarının hazırlanması planlanmıştır.

Moleküler baskılanmış polimer formülasyonlarında 4-aminobutirat transaminaz enziminin baskılanması ve sonrasında boş moleküler baskılanmış polimerlerin uygulanması ile γ -aminobutirik asit'in yıkımında rol alan enzimin fazlasının vücuttan uzaklaştırılması ile inhibisyonun sağlanması ve epileptik aktivitenin baskılanması amaçlanmış ancak enzimin temin edilememesi nedeni ile hazırlanamamıştır. GABA'nın polimerlere baskılanması ve kontrollü salım sağlanması planlanmış ancak GABA'nın tek çözücüsü su olması nedeni ile jel formunda moleküller baskılanmış polimerler elde edilmiştir.

Endojen bir bileşik olan γ -aminobutirik asit'in özgün olarak sentezlenen polimerik nanopartikül formülasyonlarının ve inorganik yapıdaki halosit nanotüp formülasyonlarının hazırlanması ile günümüzde kullanılan epileptik ajanların yan etkilerinin ve toksik reaksiyonlarının önlenmesi amaçlanmıştır. Hazırlanan sistemlerin karakterizasyon ve kararlılık çalışmaları yapılmış, *in vitro* salım deneyleri, *in vitro* sitotoksisite testi ve *in vivo* hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmam süresince her türlü olanağı sağlayan, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. E. Yasemin YAZAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Polimer sentezleme prosesinde bana ışık tutan, bilgi ve birikiminden yararlandığım Prof.Dr. Yusuf MENCELOĞLU'na ve ekibindeki tüm araştırmacı arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm sevgili hocalarım ve bölüm arkadaşlarım, Prof.Dr. Lütfi GENÇ'e, Doç.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Yrd.Doç.Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Yrd.Doç.Dr. Ebru BAŞARAN'a, Yrd.Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Yrd.Doç.Dr. Murat Sami BERKMAN'a, Uzm. Sefa AVCIER'e, Araş.Gör. Umay Merve GÜVEN'e ve Araş.Gör. Ahmet Alper ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analizlerinde bilgi ve yardımını esirgemeyen Doç.Dr. Erol ŞENER'e teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiksel değerlendirme analizlerinde yardımlarını gördüğüm Uzm.Biy. Şennur GÖRGÜLÜ'ye teşekkür ederim.

Taramalı elektron mikrokobu analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlayan Prof.Dr. Alpagut KARA ve yardımcı olan Y.Müh. Eda KÜÇÜKOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

In vivo çalışmalarda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Kevser EROL'a, desteklerini esirgemeyen Araş.Gör. Çiğdem ÇENGELLİ ve Araş.Gör. Şule AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince laboratuvarında yardımını gördüğüm sevgili öğrencim Kemal Can DEMİRKİLİNÇ'a teşekkür ederim.

Beni her zaman destekleyen, yreklendiren, sevgi ve ilgilerini her zaman yanımda hissettiğim çok sevgili ailem ve biricik eşim Melih KIRIMLIOğLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Glsel YURTDAş KIRIMLIOğLU

EPİLEPTİK MEKANİZMAYA MÜDAHALE EDECEK NANOBOYUTTA İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ

ve

İN VİVO DAVRANIŞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Epilepsi tüm dünyada sık görülen nörolojik hastalıklardan birisidir. Beynin jeneralize veya fokal ani paroksizmal reaksiyonu “epilepsi” olarak adlandırılmaktadır. Epilepsi üzerine pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu araştırmalarda γ -aminobutirik asit (GABA) sentezinin inhibisyonu, salımının blokajı veya postsinaptik bir reaksiyonun konvülziyonları provoke ettiği saptanmıştır. Beynin sinir terminallerindeki GABA konsantrasyonlarında, febril konvülziyonlarda ve tedaviye dirençli hastalarda serebrospinal sıvıdaki GABA konsantrasyonunda azalma görülmüştür. Aynı zamanda GABA konsantrasyonunun azalması ile konvülziyon, koma ve hatta ölüm gözlenebildiği bildirilmiştir.

Epilepsi tedavisi için farklı yaklaşımlar bulunmakla birlikte en güncel teori olan GABA ile ilgili teoriye dayanarak, çalışmamızda özgün olarak ters emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanan polimerik nanopartiküller (PNP) ve halosit nanotüpler (HNT) kullanılması ile GABA içeren, beyne hedeflendirilmiş, nanoboyutta, nontoksik, biyoyumlu, spesifitesi ve afinitesi yüksek formülasyonların geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Hazırlanan sistemler üzerinde parçacık büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel, parçacık şekli ve yüzey özellikleri, fiziksel görünüş, termal, x-ışını kırınımı (XRD), infrared (IR), etkin madde miktar tayini analizleri yapılmıştır. Karakterizasyon ve *in vitro* salım çalışmaları ışığında seçilen formülasyonların kararlılık çalışmaları, *in vitro* sitotoksikite testleri ve *in vivo* hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Pentilentetrazol (PTZ) ile epileptik model oluşturulan sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen *in vivo* hayvan deneylerinde, fosfat tamponu (pH 7.4) (PBS), GABA çözeltisi ya da GABA içeren PNP ve HNT formülasyonları deney gruplarına uygulanmıştır. Enjeksiyondan 4 saat sonra PTZ intraperitoneal (*i.p.*) olarak uygulanarak konvülziyon oluşturulmuştur. 30 dk süresince sıçanlar gözlenmiş ve skorlama ile değerlendirme yapılmıştır. Gözlem süresi sonrasında sıçanların beyinleri çıkartılmış ve *Stratum Corsatum* doku örnekleri alınmış, homojenize edilmiş ve GABA düzeyi enzime bağlı immün analiz (ELISA) kiti yardımıyla belirlenmiştir.

İzleme süresince elde edilen verilere göre, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler ile toz GABA ve PBS karşılaştırıldığında latens süresi, konvülziyonların toplam zamanı ve şiddetli konvülziyon süreleri ve ölüm oranında anlamlı değişiklikler olduğu istatistiksel analizler ile gösterilmiştir. Enzim immün yöntemi analiz cihazı (EIA) ile belirlenen GABA miktarlarının PNP-29 kodlu formülasyonda anlamlı düzeyde yükselme gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak, *in vitro* ve *in vivo* analiz sonuçlarına göre endojen bir bileşik olan GABA'nın beyne taşınmasını sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlerin elde edildiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Polimerik nanopartikül, γ -aminobutirik asit, Halosit, Epilepsi, Polimerizasyon

**DEVELOPMENT of a NANOSIZED DRUG DELIVERY SYSTEM
INTERFERING EPILEPTIC MECHANISM
and
EVALUATION of ITS IN VIVO BEHAVIOUR**

ABSTRACT

Epilepsy is one of the most common neurological diseases worldwide. Generalized or paroxysmal focal reaction of brain is called "epilepsy". A number of study is being performed on epilepsy. In those studies, inhibition of γ -aminobutyric acid (GABA) synthesis, blockage of release or postsynaptic reaction were determined to provoke convulsions. Decrease in GABA concentrations was seen cerebrospinal fluid with GABA concentrations in brain nerve terminals, febrile convulsions and patients resistant to epilepsy treatment. It was also reported that convulsion, coma and even death can be observed by means of reduction in the concentration of GABA.

Even though there are different approaches for the treatment of epilepsy, in this study incorporation of GABA into unique polymeric nanoparticles (PNP) prepared with reverse emulsion polymerization method and halloysite nanotubes (HNT) was aimed depending on the most recent theory related to GABA. In other words, development of brain-targeted, nanosized, nontoxic, biocompatible, highly specific and high affinity formulations was aimed by using unloaded/loaded PNP and HNT drug delivery systems.

Characterization studies of formulations were performed by particle size and distribution, zeta potential, particle shape and surface properties, physical appearance, thermal, x-ray diffraction (XRD), infrared (IR), determination of the amount of active agent analyses. *In vitro* cytotoxicity and *in vivo* animal studies were performed on formulations selected considering characterization and *in vitro* analyses results.

In the *in vivo* studies achieved on epileptic rat induced by pentylenetetrazole (PTZ), phosphate buffer (pH 7.4) (PBS), GABA and PNP and HNT formulations containing GABA were applied on experimental groups. After 4 hours of injections, PTZ was injected intraperitoneally (i.p.) and convulsions were generated. Rats were monitored for 30 minutes and were evaluated by scoring. After this monitorization period, brains were removed and *Stratum Corsatum* were isolated, homogenized and GABA levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

According to the data obtained from the comparison of drug delivery systems prepared with GABA and PBS, significant changes in latency, total convulsion period, severe convulsion period and mortality of rats were demonstrated by statistical analyses. Amount of GABA analyzed by enzyme immune assay analyzer (EIA) was increased considerably for PNP-29. As a result, drug delivery systems ensuring transportation of the endogen compound GABA to the brain could be prepared regarding *in vitro* and *in vivo* analyses results.

Key Words: Polymeric nanoparticles, γ -aminobutyric acid, Halloysite, Epilepsy, Polymerization

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xxi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xxviii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Epilepsi	2
Kan-Beyin Engeli	7
Epilepside KBE	8
Beyne Etkin Madde Taşıyan Sistemler	9
Polimerik Nanopartiküller	9
<i>Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri</i>	10
<i>Polimerizasyon yöntemi</i>	10
<i>Emülsiyon polimerizasyonu</i>	10
<i>Konvensiyonel emülsiyon polimerizasyonu</i>	10
<i>Ters emülsiyon polimerizasyonu</i>	11
<i>YEM olmaksızın emülsiyon polimerizasyonu</i>	12
<i>Mini-emülsiyon polimerizasyonu</i>	12
<i>Mikroemülsiyon polimerizasyonu</i>	13
<i>Yüzeylerarası polimerizasyon</i>	14
<i>Kontrollü radikal polimerizasyon</i>	15
<i>Koaservasyon veya iyonik jelasyon yöntemi</i>	15
<i>Çözücü buharlaştırma yöntemi</i>	15
<i>Nanoçöktürme yöntemi</i>	17
<i>Tuzla çöktürme yöntemi</i>	18
<i>Diyaliz yöntemi</i>	18
<i>Süperkritik sıvı teknolojisi</i>	19
<i>Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu</i>	20
<i>Parçacık büyüklüğü</i>	20

<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	21
<i>Zeta potansiyel</i>	22
<i>pH analizi</i>	22
<i>Etkin madde yüklenmesi</i>	23
<i>Etkin madde salımı</i>	23
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonlarının kararlılığı</i>	23
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonlarının toksisitesi</i>	23
<i>Polimerik nanopartiküllerin üstünlükleri</i>	24
Halosit Nanotüpler	25
<i>Halosit nanotüp ile formülasyon hazırlama yöntemleri</i>	25
<i>Sıcaklık uygulanarak formülasyon hazırlama</i>	25
<i>Vakum ile formülasyon hazırlama</i>	25
<i>Halosit nanotüplerin karakterizasyonu</i>	25
<i>Parçacık büyüklüğü</i>	25
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	25
<i>Zeta potansiyel</i>	25
<i>Termal analiz</i>	26
<i>Yapı analizi</i>	26
<i>Etkin madde yüklenmesi ve etkin madde salımı</i>	26
<i>Halosit nanotüplerin kararlılığı</i>	27
<i>Halosit nanotüplerin toksisitesi</i>	27
<i>Halosit nanotüplerin üstünlükleri</i>	28
<i>Halosit nanotüplerin uygulama alanları</i>	28
Gama-aminobutirik asit	29
<i>GABA'nın farmakolojik özellikleri</i>	29
<i>GABA'nın kararlılığı</i>	31
<i>GABA'nın miktar tayini yöntemleri</i>	31
<i>GABA içeren ticari preparatlar</i>	33
GEREÇLER	36
Kullanılan Maddeler	36
Kullanılan Cihazlar	37
YÖNTEMLER	39
<i>İn Vitro Çalışmalar</i>	39
<i>GABA ile yapılan çalışmalar</i>	39

<i>Erime derecesi tayini</i>	39
<i>Termal analiz</i>	39
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	39
<i>İnfrared analizi</i>	39
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	39
<i>GABA'nın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi</i>	39
<i>Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları</i>	40
<i>Doğrusallık</i>	40
<i>Keskinlik</i>	41
<i>Doğruluk</i>	41
<i>Duyarlılık</i>	42
<i>Seçicilik</i>	42
<i>Sağlamlık/Tutarlılık</i>	43
<i>Çalışma koşullarında kararlılık</i>	43
<i>Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık</i>	43
<i>Etkin madde miktar tayini analizi için numune hazırlama koşullarındaki kararlılık</i>	43
<i>Sterilizasyon yöntemi koşullarındaki kararlılık</i>	43
<i>İn vitro salım ortamı koşullarındaki kararlılık</i>	43
<i>İn vitro salım çalışmasında GABA miktar tayini için validasyon çalışmaları</i>	43
<i>Polimerik yüzey etkin madde ile yapılan çalışmalar</i>	43
<i>Polimerik yüzey etkin madde sentezi</i>	43
<i>Titrasyon prosedürü</i>	44
<i>Termal analiz</i>	44
<i>İnfrared analiz</i>	44
<i>Kullanılan diğer maddeler ile yapılan çalışmalar</i>	44
<i>Termal analiz</i>	44
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	44
<i>İnfrared analizi</i>	45
<i>Halosit ile yapılan çalışmalar</i>	45
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi</i>	45
<i>Zeta potansiyel analizi</i>	45
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	45

<i>Termal analiz</i>	45
<i>İnfrared analizi</i>	45
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonu hazırlama çalışmaları</i>	45
<i>Polimerik nanopartikül ön formülasyon çalışmaları</i>	45
<i>Polimerik nanopartikül formülasyon çalışmaları</i>	46
<i>Polimerizasyon için PYEM yüzdesinin belirlenmesi</i>	46
<i>Polimerizasyon için uygun PYEM:GABA oranının belirlenmesi</i>	47
<i>Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması</i>	47
<i>Farklı karıştırıcılar kullanılarak formülasyonların hazırlanması</i>	48
<i>Farklı NMBAc kullanılarak formülasyonların hazırlanması</i>	49
<i>Farklı PEG türevleri kullanılarak formülasyonların hazırlanması</i>	49
<i>Formülasyonların sterilizasyonu</i>	50
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar</i>	50
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi</i>	50
<i>Zeta potansiyel analizi</i>	51
<i>Fiziksel görünüş</i>	51
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	51
<i>Termal analiz</i>	51
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	51
<i>İnfrared analizi</i>	51
<i>Formülasyonlarda etkin madde miktar tayini</i>	51
<i>İn vitro salım çalışmaları</i>	51
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları</i>	52
<i>Halosit nanotüp formülasyonu hazırlama çalışmaları</i>	52
<i>Halosit nanotüp formülasyonu ön formülasyon çalışmaları</i>	52
<i>Halosit nanotüp formülasyonu çalışmaları</i>	52
<i>Vakum altında formülasyon hazırlama</i>	52
<i>Sıcaklık uygulanarak formülasyon hazırlama</i>	52
<i>Formülasyonların sterilizasyonu</i>	53
<i>Halosit nanotüp formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar</i>	53
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi</i>	53
<i>Zeta potansiyel analizi</i>	53
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	53
<i>Termal analiz</i>	53

<i>X-ışını kırınım analizi</i>	53
<i>İnfrared analizi</i>	53
<i>Halosit nanotüp formülasyonlarında etkin madde miktar tayini</i>	53
<i>İn vitro salım çalışmaları</i>	53
<i>Halosit nanotüp formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları</i>	54
<i>İn vitro toksisite testleri</i>	54
<i>İn Vivo Çalışmalar</i>	55
<i>Formülasyonların uygulanması, izlenmesi ve örneklerin alınması</i>	55
<i>Stratum Corsatum örneklerinde GABA miktar tayini</i>	56
<i>BULGULAR ve TARTIŞMA</i>	57
<i>İn Vitro Çalışmalar</i>	57
<i>GABA ile yapılan çalışmalar</i>	57
<i>Erime derecesi tayini</i>	57
<i>Termal analiz</i>	57
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	57
<i>İnfrared analizi</i>	57
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	59
<i>GABA'nın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi</i>	59
<i>Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları</i>	59
<i>Doğrusallık</i>	59
<i>Kesinlik</i>	60
<i>Doğruluk</i>	61
<i>Duyarlılık</i>	61
<i>Seçicilik</i>	61
<i>Sağlamlık/Tutarlılık</i>	62
<i>Çalışma koşullarında kararlılık</i>	72
<i>Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık</i>	72
<i>Etkin madde miktar tayini analizi için numune hazırlama koşullarındaki kararlılık</i>	72
<i>İn vitro salım ortamı koşullarındaki kararlılık</i>	72
<i>Sterilizasyon yöntemi koşullarındaki kararlılık</i>	73
<i>İn vitro salım çalışmasında GABA miktar tayini için validasyon çalışmaları</i>	73
<i>Doğrusallık</i>	73

<i>Keskinlik</i>	74
<i>Doğruluk</i>	75
<i>Duyarlılık</i>	75
<i>Polimerik yüzey etkin madde ile yapılan çalışmalar</i>	75
<i>Termal analiz</i>	75
<i>İnfrared analiz</i>	76
<i>Kullanılan diğer maddeler ile yapılan çalışmalar</i>	77
<i>Termal analiz</i>	77
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	78
<i>İnfrared analizi</i>	79
<i>Halosit ile yapılan çalışmalar</i>	81
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi</i>	81
<i>Zeta potansiyel analizi</i>	81
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	81
<i>Termal analiz</i>	81
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	82
<i>İnfrared analizi</i>	83
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonu hazırlama çalışmaları</i>	84
<i>Polimerik nanopartikül ön formülasyon çalışmaları</i>	84
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonu çalışmaları</i>	85
<i>Formülasyonların sterilizasyonu</i>	85
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar</i>	85
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı</i>	85
<i>Zeta potansiyel analizi</i>	88
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri</i>	91
<i>Termal analiz</i>	98
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	102
<i>İnfrared analizi</i>	106
<i>Formülasyonlarda etkin madde miktar tayini</i>	114
<i>İn vitro salım çalışmaları</i>	114
<i>Polimerik nanopartikül formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları</i>	118
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi</i>	118
<i>Zeta potansiyel</i>	124
<i>pH ölçümü</i>	128

<i>Fiziksel görünüş</i>	131
<i>Termal analiz</i>	132
<i>Infrared analizi</i>	140
<i>Etkin madde miktar tayini analizi</i>	148
<i>Halosit nanotüp formülasyonu hazırlama çalışmaları</i>	149
<i>Halosit nanotüp formülasyonu ön formülasyon çalışmaları</i>	149
<i>Halosit nanotüp formülasyonu çalışmaları</i>	149
<i>Formülasyonların sterilizasyonu</i>	149
<i>Halosit nanotüp formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar</i>	150
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi</i>	150
<i>Zeta potansiyel</i>	150
<i>Parçacık şekli ve yüzey özellikleri analizi</i>	151
<i>Termal analiz</i>	152
<i>X-ışını kırınım analizi</i>	153
<i>Infrared analizi</i>	154
<i>Halosit nanotüp formülasyonlarında etkin madde miktar tayini</i>	155
<i>İn vitro salım çalışmaları</i>	155
<i>Halosit nanotüp formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları</i>	157
<i>Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi</i>	157
<i>Zeta potansiyel</i>	159
<i>pH ölçümü</i>	160
<i>Fiziksel görünüş</i>	160
<i>Termal analiz</i>	161
<i>Infrared analizi</i>	163
<i>Etkin madde miktar tayini analizi</i>	165
<i>İn vitro toksisite testleri</i>	165
<i>İn Vivo Çalışmalar</i>	167
<i>Formülasyonların uygulanması, izlenmesi ve örneklerin alınması</i>	167
<i>Stratum Corsatum örneklerinde GABA miktar tayini</i>	170
SONUÇ ve ÖNERİLER	172
KAYNAKLAR	174
EKLER	
EK-1	
Etik Kurul Kararı	

EK-2

Poster Bildiri

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 Antiepileptik Etkin Maddeler ve Yan Etkileri	5
Çizelge 2 Hetero-faz Polimerizasyon Sistemleri Arasındaki Farklılıklar	13
Çizelge 3 GABA İçeren Ticari Preparatlar	33
Çizelge 4 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları	39
Çizelge 5 Farklı PYEM Yüzdelerinde (%0.25, %0.5, %1, %2, %3) Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları	46
Çizelge 6 Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları	47
Çizelge 7 Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları	47
Çizelge 8 Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları	48
Çizelge 9 Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları	49
Çizelge 10 Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları	49
Çizelge 11 Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan Formülasyonların Molar Bileşenleri ve Formülasyon Hazırlama Koşulları	50
Çizelge 12 GABA'nın Analitik Miktar Tayini Doğrusallık Çalışması Amacıyla Hazırlanan Seriler	60
Çizelge 13 GABA'nın Analitik Miktar Tayini İçin Güniçi ve Günlerarası Kesinlik Sonuçları	61
Çizelge 14 GABA'nın Analitik Miktar Tayini İçin Elde Edilen Doğruluk Değerleri	61

Çizelge 15 <i>İn vitro</i> Salım Çalışmasında GABA Miktar Tayini için Doğrusallık Çalışması Amacıyla Hazırlanan Seriler	74
Çizelge 16 <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmasında GABA Miktar Tayini için Güniçi ve Günlerarası Kesinlik Sonuçları	75
Çizelge 17 <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmasında GABA Miktar Tayini için Elde Edilen Doğruluk Değerleri	75
Çizelge 18 Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri	85
Çizelge 19 Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri	86
Çizelge 20 Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri	86
Çizelge 21 Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri	86
Çizelge 22 Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri	87
Çizelge 23 Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri	87
Çizelge 24 Farklı PEG 1000 MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri	87
Çizelge 25 Farklı PYEM ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	88
Çizelge 26 Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	89
Çizelge 27 Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	89
Çizelge 28 Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	89
Çizelge 29 Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	90
Çizelge 30 Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	90

Çizelge 31	Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	90
Çizelge 32	GABA İçeren Farklı PNP Formülasyonlarının Taşıdığı Etkin Madde Miktarı	114
Çizelge 33	GABA ve GABA içeren PNP Formülasyonlarına ait <i>In Vitro</i> Salım Verileri	115
Çizelge 34	PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	119
Çizelge 35	PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	120
Çizelge 36	PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	121
Çizelge 37	PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	123
Çizelge 38	PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	124
Çizelge 39	PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	125
Çizelge 40	PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	126
Çizelge 41	PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	127
Çizelge 42	PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri	129
Çizelge 43	PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri	129
Çizelge 44	PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri	130
Çizelge 45	PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri	130
Çizelge 46	Kararlılık Test Ortamlarında Saklanan PNP Formülasyonlarında Etkin Madde Miktarları	148

Çizelge 47 GABA içeren Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Kod ve Bileşenleri	149
Çizelge 48 Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Parçacık Boyut ve Dağılımı	150
Çizelge 49 Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri	150
Çizelge 50 Halosit Nanotüp Formülasyonlarında Etkin Madde Miktarı	155
Çizelge 51 GABA ve Sıcaklık ile Hazırlanan HNT Formülasyonlarına ait <i>İn Vitro</i> Salım Verileri	155
Çizelge 52 GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	157
Çizelge 53 GABA İçeren Halosit Nanotüp Formülasyonunun Farklı Koşullardaki Zeta Potansiyel Değerleri	159
Çizelge 54 GABA İçeren Halosit Nanotüp Formülasyonunun Farklı Koşullarda Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri	160
Çizelge 55 Farklı Koşullarda Saklanan GABA içeren Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Etkin Madde Miktarı	165
Çizelge 56 <i>İn vivo</i> Deneylerde Kullanılan Formülasyonların ve Plasebolarının MTT Testi Verileri	165
Çizelge 57 Hayvan Deneyi Gruplarında İzlenen Nöbet Parametrelerine İlişkin Veriler	168
Çizelge 58 Hayvan Deneyi Gruplarında İzlenen Nöbet Parametrelerinin Bağımlı Örneklem T Testine Göre İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	169

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	KBE'yi Oluşturan Nörovasküler Birimin Şematik Gösterimi	7
Şekil 2	Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması için Kullanılan Çeşitli Tekniklerin Şematik Gösterimi	9
Şekil 3	Mini-emülsiyon Polimerizasyonunun Şematik Gösterimi: (a) Preemülsifikasyon, (b) Yüksek-kayma emülsifikasyon ve (c) Polimerizasyon	12
Şekil 4	Çeşitli Hetero-Faz Polimerizasyon Yöntemleri Arasındaki Farklılıklar (A) Polimerizasyon Öncesi ve (B) Polimerizasyon Sonrası	14
Şekil 5	S/Y/S Çoklu Emülsiyonu Hazırlanması: (a) Yüksek Hızda Emülsiyon Oluşturma (b) Düşük Hızda Emülsiyon Oluşturma	16
Şekil 6	RESS ile Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması İçin Deneysel Proses	19
Şekil 7	RESOLV Deneysel Prosesi	20
Şekil 8	GABA'nın Kimyasal Yapısı, Açık ve Kapalı Formülü	29
Şekil 9	Aminoasitlerin OPA/BME ile Türevlendirilmesi ile Oluşan İzöindol Türevleri	40
Şekil 10	Doku Örneklerinin Alınmasına Ait Fotoğraflar	56
Şekil 11	GABA'ya Ait Termogram	57
Şekil 12	GABA'ya Ait X-Işını Kırınım Profili	58
Şekil 13	GABA'ya Ait FTIR Spektrumu	58
Şekil 14	GABA'ya Ait SEM Görüntüsü	59
Şekil 15	GABA'nın Analitik Miktar Tayini İçin HPLC Standart Eğrisi	60
Şekil 16	Hareketli Faza Ait Kromatogram	62
Şekil 17	% 50 Metanol'e Ait Kromatogram	63
Şekil 18	Fosfat Tamponuna (pH 7.4) Ait Kromatogram	63
Şekil 19	GABA'ya Ait Kromatogram	63

Şekil 20	PNP-9 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	64
Şekil 21	PNP-12 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	65
Şekil 22	PNP-13 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	66
Şekil 23	PNP-23 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	67
Şekil 24	PNP-25 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	68
Şekil 25	PNP-29 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	69
Şekil 26	PNP-30 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	70
Şekil 27	HNT-GABA Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları	71
Şekil 28	<i>İn Vitro</i> Salım Ortamında Etkin Maddenin Kararlılığına Ait Profil	72
Şekil 29	UV Sterilizasyon Ortamında Etkin Maddenin Kararlılığına Ait Profil	73
Şekil 30	<i>İn Vitro</i> Salım Çalışmasında GABA Miktar Tayini için GABA'nın HPLC Standart Eğrisi	74
Şekil 31	PYEM'a Ait Termogram	76
Şekil 32	PYEM'e Ait FTIR Spektrumu	76
Şekil 33	Akrilamit'e Ait Termogram	77
Şekil 34	N,N-Dimetilakrilamit'e Ait Termogramı	77
Şekil 35	N,N-Metilenbisakrilamit'e Ait Termogramı	78
Şekil 36	Akrilamit'e Ait X-Işını Kırınım Profili	78
Şekil 37	N,N-Metilenbisakrilamit'e Ait X-Işını Kırınım Profili	79
Şekil 38	Akrilamit'e Ait FTIR Spektrumu	79
Şekil 39	N,N-Dimetilakrilamit'e Ait FTIR Spektrumu	80
Şekil 40	N,N-Metilenbisakrilamit'e Ait FTIR Spektrumu	81
Şekil 41	Halosit Nanotüplere Ait SEM Görüntüsü	82
Şekil 42	Halosit Nanotüplere Ait Termogramı	82
Şekil 43	Halosit Nanotüplere Ait X-Işını Kırınım Profili	83

Şekil 44	Halosit Nanotüplere Ait FTIR Spektrumu	83
Şekil 45	Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	92
Şekil 46	Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	93
Şekil 47	Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	94
Şekil 48	Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	95
Şekil 49	Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	96
Şekil 50	Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	96
Şekil 51	Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	97
Şekil 52	Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları	98
Şekil 53	Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları	99
Şekil 54	Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Termogramları	100
Şekil 55	Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları	101
Şekil 56	Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonunun Termogramı	101
Şekil 57	Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları	101
Şekil 58	Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri	103
Şekil 59	Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri	103
Şekil 60	Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri	104

Şekil 61	Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri	104
Şekil 62	Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri	105
Şekil 63	Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri	105
Şekil 64	Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları	107
Şekil 65	Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları	108
Şekil 66	Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının FTIR Spektrumları	110
Şekil 67	Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları	111
Şekil 68	Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları	111
Şekil 69	Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları	112
Şekil 70	GABA ve GABA içeren PNP Formülasyonlarına ait <i>İn Vitro</i> Salım Profilleri	116
Şekil 71	<i>İn Vivo</i> Çalışmalar için Seçilen PNP Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Profilleri	117
Şekil 72	UV Sterilizasyon Sonrası PNP Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Profilleri	118
Şekil 73	PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	119
Şekil 74	PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	120
Şekil 75	PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	122
Şekil 76	PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	123
Şekil 77	PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	125

Şekil 78	PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	126
Şekil 79	PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	127
Şekil 80	PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri	128
Şekil 81	PNP-23 Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	132
Şekil 82	PNP-23 Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	132
Şekil 83	PNP-23 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları	133
Şekil 84	PNP-23 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	133
Şekil 85	PNP-25 Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	134
Şekil 86	PNP-25 Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	134
Şekil 87	PNP-25 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları	135
Şekil 88	PNP-25 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	135
Şekil 89	PNP-29 Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	136
Şekil 90	PNP-29 Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	136
Şekil 91	PNP-29 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları	137
Şekil 92	PNP-29 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	137
Şekil 93	PNP-30 Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	138
Şekil 94	PNP-30 Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	138
Şekil 95	PNP-30 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları	139
Şekil 96	PNP-30 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	139
Şekil 97	PNP-23 Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki FTIR Spektrumları	140
Şekil 98	PNP-23 Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki FTIR Spektrumları	141
Şekil 99	PNP-23 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları	141

Şekil 100	PNP-23 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	142
Şekil 101	PNP-25 Formülasyonunun 4°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	142
Şekil 102	PNP-25 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	143
Şekil 103	PNP-25 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları	143
Şekil 104	PNP-25 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	144
Şekil 105	PNP-29 Formülasyonunun 4°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	144
Şekil 106	PNP-29 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	145
Şekil 107	PNP-29 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları	145
Şekil 108	PNP-29 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	146
Şekil 109	PNP-30 Formülasyonunun 4°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	146
Şekil 110	PNP-30 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	147
Şekil 111	PNP-30 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları	147
Şekil 112	PNP-30 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları	147
Şekil 113	Halosit Nanotüp Formülasyonlarının SEM Görüntüleri	151
Şekil 114	Hazırlanan Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Termogramları	152
Şekil 115	Hazırlanan Halosit Nanotüp Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri	153
Şekil 116	Halosit Nanotüp Formülasyonlarının FTIR Spektrumları	154
Şekil 117	GABA ve Sıcaklık ile Hazırlanan HNT Formülasyonlarına ait <i>İn Vitro</i> Salım Profili	156
Şekil 118	UV Sterilizasyon Sonrası HNT Formülasyonunun <i>İn Vitro</i> Salım Profili	157
Şekil 119	GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına Ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri	158
Şekil 120	GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına Ait Zeta Potansiyel Değerleri	159

Şekil 121	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	161
Şekil 122	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	161
Şekil 123	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları	162
Şekil 124	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları	162
Şekil 125	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki FTIR Spektrumları	163
Şekil 126	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki FTIR Spektrumları	163
Şekil 127	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları	164
Şekil 128	GABA İçeren HNT Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki FTIR Spektrumları	164
Şekil 129	<i>In Vivo</i> Deneylede Kullanılan Formülasyonların ve Plasebolarının MTT Testi Verileri	167
Şekil 130	<i>Stratum Corsatum</i> 'da Belirlenen GABA miktarları	170

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Ac	: Akrlamit
AEİ	: Antiepileptik İlaç
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AHS	: Antikonvulsan Hipersensitivite Reaksiyonu
AIBN	: Azoisobutironitril
BME	: 2-Merkaptoetanol
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BSS	: Bağlı Standart Sapma
CI	: Güven Aralığı
C/LRP	: Kontrollü Radikal Polimerizasyon
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DMAc	: N,N-Dimetilakrilamit
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ELİSA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Yöntemi
EPA 4A	: List 4A - Minimal Risk Inert Ingredients
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GABA	: γ -aminobutirik asit
GABA-T	: GABA Transaminaz
HBSS	: Kalsiyumsuz Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi
HCl	: Hidroklorür
HNT	: Halosit Nanotüp
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı
ILAE	: Uluslararası Epilepsi ile Savaş Derneği (<i>International League Against Epilepsy</i>)
KBE	: Kan Beyin Engeli
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Miktar Tayini Sınırı
m	: Korelasyon Eşitliğinin Eğimi
Ma	: Molekül Ağırlığı

MAA	: Metakrilik Asit
MEKC	: Miseller Elektrokinetik Kromatografi
MTT	: Tetrazolyum Tuzu
NaCl	: Sodyum Klorür
NDA	: Naftilen-2,3-dikarboksialdehit
NMBAc	: N,N-Metilenbisakrilamit
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
OPA	: Orto-fitaldialdehit
ORT	: Ortalama
P	: Polimerizasyon
PBS	: Fosfat Tamponu
PCS	: Foton Korelasyon Spektroskopisi
PEG	: Polietilen Glikol
PEG MA	: Polietilen Glikol Maleik Anhidrit
PEG 1000 MA	: Polietilen Glikol 1000 Maleik Anhidrit
PEG 1500 MA	: Polietilen Glikol 1500 Maleik Anhidrit
PEO	: Polietilen oksit
PNP	: Polimerik Nanopartikül
PLA	: Polilaktit
PLGA	: Polilaktit-ko-glikolit
PPO	: Polipropilen oksit
PR	: Elektrokardiyogramda P ve R dalgaları aralığı
PTZ	: Pentilentetrazol
PYEM	: Polimerik Yüzey Etkin Madde
RAFT	: Fragmentasyon Zincir Transferi
RESOLV	: Sıvı Çözücüdeki Süperkritik Çözeltinin Hızlı Genleşmesi
RESS	: Süper Kritik Çözeltinin Hızlı Genleşmesi
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
Q	: Tepkime Dönüşüm Miktarı
SCF	: Süper Kritik Sıvı Teknolojisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	: Standart Hata
SS	: Standart Sapma
SSS	: Santral Sinir Sistemi

STR	: Stok Türevlendirme Çözeltisi
TBT	: Sodyum Tetraborat Tamponu
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TR	: Türevlendirme Reaktifi
UT	: Ultraturaks
UV	: Ultraviyole
XRD	: X-ışını Kırınım
XPS	: X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi
XRF	: X-ışını Floresansı
VBC	: Vinil Benzil Klorür
YEM	: Yüzey Etkin Madde

GİRİŞ ve AMAÇ

Epilepsi anormal nöronal deşarjlar ile belirlenen karmaşık patolojik bir bozukluktur. Epilepsinin etiyojisi ve patofizyolojik mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Kronik ilaç kullanımı gerektiren bir hastalık olan epilepside tedavi yaklaşımları genellikle var olan antiepileptik ilaçlar (AEİ) ile epileptik nöbetlerin baskılanması ilkesine dayanmaktadır.

Günümüzde kullanılan AEİ'ler plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanma, yüksek düzeyde metabolizasyona uğrama, ilaç etkileşimlerine açık olma, yüksek yan etki düzeyi ve belirli bir epileptik sendroma spesifik olmama gibi özellikler taşıdığından, hiçbirisi terapötik etki ve yan etkiler açısından ideal sayılmamaktadır.

Endojen bir bileşik olan γ -aminobutirik asit (GABA) beynin ana inhibitör nöromediyatörüdür. GABA salınan nöronlar beynin ve daha az olarak omuriliğın her tarafına yayılmıştır. Suda çözünürlüğü yüksek olan GABA'nın, başta sinir iletimi olmak üzere hipotansif, diüretik ve sakinleştirici etkilerin indüksiyonu gibi birçok biyolojik fonksiyona sahip olduğu bilinmektedir.

Nörolojik hastalıkların tedavisindeki en önemli güçlüklerden birisi, terapötik amaçla kullanılan etkin maddenin beyne taşınması ve kontrollü şekilde salımının sağlanmasıdır. Aminoasit, peptit, protein ve nöropeptit gibi etkin maddelerin beyin içine taşınması için gereksinim duyulan nanoboyutta taşıyıcı sistemlerin kullanılması ile endojen bir bileşik olan GABA'nın polimerik taşıyıcı sistemlere ve halosit nanotüplere (HNT) yüklenmesi, uzatılmış ya da kontrollü salımının sağlanması ve beyne ulaştırılması ile *in vivo* davranışının değerlendirilmesi planlanmıştır.

Kan beyin engelini aşmanın (KBE) bir diğer yolu ise etkin madde taşıyıcısı olarak nano boyutta ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıdır. Farklı monomerler, farklı polietilen glikol (PEG) türevleri ve çalışma için sentezlenen bir polimerik yüzey etkin madde (PYEM) kullanılarak ters emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanan GABA yüklü polimerik matristen veya inorganik materyal olan HNT'lerden kontrollü GABA salımı ile saf halde KBE'yi geçemeyen GABA'nın beyindeki miktarının artırılması ve böylece epilepsi nöbetlerinin önlenmesi ya da azaltılması çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Nörotransmitter yapısındaki GABA'nın nanoboyutta, toksik olmayan, biyoyoumlu, spesifitesi ve afinitesi yüksek formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemler ile GABA salımının düzenlenmesi ile AEİ'lerin şiddetli yan etkilerinin en aza indirgeneceği ve kronik ilaç tedavisi gören epileptik hastaların uyuncunun artırılacağı düşünülmektedir.

Hazırlanan formülasyonların epilepsi tedavisinde yeni bir yaklaşım yaratacağı düşünülmektedir.

KAYNAK BİLGİSİ

Epilepsi

Tarihsel veriler hastalık olarak epileptik fenomenlerin ve özellikle de büyük nöbetlerin oldukça eski dönemlerden beri çeşitli toplumlarca fark edildiğini göstermektedir. Günümüzde kullandığımız epilepsi sözcüğü eski Yunanca'da "yakalamak", "kavramak" anlamlarına gelen "epilambanein" kelimesinden türetilmiştir (Eşkazan, 2008).

Epilepsi ile ilgili bilinen en eski kayıtlar Mezopotamya uygarlığına aittir. Babil kralı Hammurabi'nin yasalarında "bennu" kelimesi ile yer alan epilepsi daha sonra "antastubba", "atreya" gibi farklı ifadeler ile farklı uygarlıklarda da yerini almıştır. Tarihten günümüze kadar uzanan epilepsi ile ilgili en önemli yapıt Hippocrates'in (M.Ö. 460-375) epilepsiyi konu alan "Kutsal Hastalık" adlı kitabıdır. Bu yapıtında Hippocrates epilepsiyi çağının mistik görüşlerinden uzak, bugünün anlayışına uyan yaklaşım ile değerlendirmiş ve beynin bir hastalığı olarak açıklamıştır (Brodie ve ark., 2008; Eşkazan, 2008).

Halk dilinde epilepsi kelimesinin karşılığı olarak kullanılan "sar'a" sözcüğü Arapça kökenlidir ve "yere serme" anlamına gelmektedir. Türklerin tarihinde epilepsiyi tanımlamakta kullandıkları yazılı ulaşılabilen ilk sözcük "talgan" ya da "talgan ig" olup Kaşgarlı Mahmut'un 19. yüzyılda yazdığı "Divanü Lugat-it Türk" isimli açıklamalı sözlüğünde sar'a karşılığı olarak verilmektedir (Eşkazan, 2008).

Epilepsi tekrarlayan nöbetlerle karakterize bir durumdur. Yaygın olarak görülen epilepsi, anormal nöronal deşarjlar ile belirlenebilen karmaşık patolojik bir bozukluktur (Solmaz, 2005; Carcaboso ve ark., 2008; Mandal ve Mandal, 2010). Başka bir ifade ile epilepsi, paroksizmal olarak başlayan, kısa süren ve genellikle kendiliğinden geçen, bazen bilinç kaybına neden olan pozitif belirtilerin (fokal ve/veya jeneralize kasılmalar ve halüsinasyonlar gibi) ya da negatif belirtilerin (çevreyle ilişkinin kesilmesi gibi) eşlik ettiği nöbetler şeklinde seyreden nörolojik bir hastalıktır (Kayaalp ve Dalkara, 2009). Epilepsinin etiyolojisi ve patofizyolojik mekanizmaları halen tam olarak bilinmemektedir. Dolayısıyla tedavi yaklaşımları var olan antikonvülzan ilaçlar ile epileptik nöbetlerin baskılanması şeklinde olmaktadır (Şahiner, 2008).

İnsan epileptik dokusunda yapılan araştırmalar özellikle insan beyninin hücresel ve moleküler özelliklerinin bazı nöronal şebekelerin saptanmasında ve bir dizi epileptik mekanizmanın detaylarını ortaya çıkarmada yardımcı olmuştur (Avoli ve Williamson, 1996). Epilepsi oluşumunda rolü olduğu kabul edilen güçlü hipotezler:

- Nöronal reseptörlerin yeniden organize olarak dağılımlarının değişimi (*up* veya *down* regülasyon),
- GABAerjik inhibisyonun epileptogenezi baskılamak yerine, paradoksal olarak fonksiyonel değişimler yaratması ve epileptik aktiviteyi arttırması (Şahiner, 2008).

Beyindeki nöronlarda eksitabilite düzeyi eksitator ve inhibitör etkiler arasındaki dengeye bağlıdır. Eksitabilitenin artması teorik olarak eksitator etkinliğin artmasına ve inhibitör etkinliğin azalmasına yani disinhibisyona bağlıdır. Nöron düzeyinde

eksitabilitenin ayarlanmasında temel olay, Na⁺, Ca⁺², K⁺ ve Cl⁻ iyonlarına karşı permeabilitenin değiştirilmesidir (Kayaalp ve Dalkara, 2009).

Epidemiyolojik çalışmalar epilepsinin tüm dünyada yaygın şekilde görüldüğünü ve hiçbir etnik fark, cinsiyet ayrımı ve yaş sınırı tanımadığını göstermektedir. Değişik bölgelerde gerçekleştirilmiş prevelans çalışmaları bulunmaktadır. Ülkemizde gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarda aktif epilepsili hastaların %55-76'sının çalışma gününde AEİ almadıkları dikkati çeken belki de en önemli bulgudur. Epilepside tedavi açığı %60-98 arasında değişmektedir. AEİ kullanımının altında yatan nedenler çok açık değildir. Oysa epilepsi tedavi edilebilir bir hastalıktır ve tedavi maliyeti çeşitli hastalıklara göre (örneğin multipl sklerozda interferonlar, kanserde kemoterapötikler gibi) daha düşüktür. Buna karşın dünyada 100 milyon civarında olduğu düşünülen epilepsili hastanın 35 milyonunun tedavi olmadığı tahmin edilmektedir (Yeni, 2008). Tedavi açığının altında yatan nedenler çok açık değildir. Ekonomik nedenlerin yanı sıra hastalıkla ilgili yanlış inanışların da rolü olduğu düşünülmektedir (Kale, 2002).

Epilepsi bugüne kadar çok çeşitli şekilde sınıflandırılmıştır. En son sınıflandırma 1989 yılında ILAE (*International League Against Epilepsy*) bünyesinde toplanan komisyon tarafından yapılmıştır (ILAE, 1989). Buna göre:

1. Lokalizasyona Bağlı (fokal, lokal, parsiyel) epilepsiler ve sendromlar

1.1. İdiyopatik (Başlangıcı yaşa bağlı)

- . Benin çocukluk epilepsisi (*centrotemporal spike* ile birlikte)
- . Çocukluk epilepsisi (okspital paroksizmlerle birlikte)
- . Primer okuma epilepsisi

1.2. Semptomatik

- . Çocukluk çağının *epilepsia parsiyalis*'inin progresif ve kronik devamı (*Kojewhikow' syndrome*)
- . Spesifik faktörlerle uyarılan nöbetlerle karakterize sendromlar
- . Temporal lobe epilepsisi
- . Frontal lobe epilepsisi
- . Paryetal lobe epilepsisi
- . Okspital lobe epilepsisi

1.3. Kriptojenik

2. Jeneralize Epilepsiler ve Sendrom

2.1. İdiyopatik

- . Benin neonatal ailesel konvülsiyonlar
- . Benin neonatal konvülsiyonlar
- . Bebeklerin benin miyoklonik epilepsileri
- . Çocukluk çağı absans epilepsisi (piknolepsi)
- . Juvenil absans epilepsi
- . Juvenil miyoklonik epilepsi (impulsif petitmal)
- . Grandmal epilepsi
- . Diğer idiyopatik jeneralize epilepsiler
- . Spesifik presipitasyonla oluşan epilepsiler

2.2. Kriptojenik veya semptomatik epilepsiler

- . West Sendromu (infantil spazmlar, *Blitz-Nick-Salaam Kraemphe*)
- . *Lennox-Gastaut* Sendromu
- . Miyoklonik astatik nöbetli epilepsi
- . Miyoklonik absans epilepsisi

2.3. Semptomatik

2.3.1. Nonspesifik etiyolojili olanlar

- . Erken myoklonik ensefalopati
- . Erken infantil epileptik ensefalopati ile birlikte süpresyon patlamaları
- . Diğer semptomatik jeneralize epilepsiler

2.3.2. Spesifik sendromlar

3. Fokal veya Jeneralize Oldukları Belirlenemeyen Epilepsiler

3.1. Jeneralize ve fokal konvülziyonlu epilepsiler

- . Neonatal konvülziyonları
- . Bebeklerin ağır miyoklonik nöbetleri
- . Uykuda görülen devamlı *spike-waves* ile seyreden epilepsiler
- . Edinsel epileptik afazi (*Landau-Kleffner Syndrome*)
- . Diğer belirlenemeyen epilepsiler

3.2. Jeneralize veya fokal görünümü açıklanamayan nöbetler

4. Özel Sendromlar

4.1. Duruma bağlı nöbetler

- . Febril konvülziyonlar
- . İzole nöbetler veya izole *Status epilepticus*
- . Yalnızca akut metabolik veya toksik bozukluklar sonucu ortaya çıkan nöbetler (ILAE, 1989)

Büyük bölümü son 50 yıl içerisinde olmak üzere tarihten günümüze kadar 20'ye yakın anti-epileptik etkin madde geliştirilmiştir. Bununla birlikte, kullanılan AEİ'lerin hiçbirisi terapötik etki ve yan etkiler açısından ideal sayılamamaktadır (**Çizelge 1**) (Brodie ve ark., 2008). İdeal bir AEİ'de olması beklenen başlıca özellikler, emiliminin taşıyıcıya bağlı olarak gerçekleşmemesi, plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmaması, metabolizmaya uğramaması, ilaç etkileşimlerinin olmaması, hasta uyuncuna ilişkin olarak olabildiğince az yan etkiye sahip olması ve doğal olarak belli bir epileptik sendrom için etkili olduğunun kanıtlanmış olması şeklinde sıralanabilir (Eşkan, 2008; Onat, 2008).

Tedavide tekli ilaç kullanımı denendiği gibi sendrom tipine bağlı olarak çoklu ilaç kullanımı da söz konusu olabilir. Ayrıca epilepsi cerrahisi, *Vagus* siniri uyarımı, ketojenik diyet ve alternatif tıp farmakolojik olmayan tedavi yaklaşımlarıdır (Brodie ve ark., 2008).

Çizelge 1. Antiepileptik Etkin Maddeler ve Yan Etkileri (Brodie ve ark., 2008; Panayiotopoulos, 2011)

Etkin Madde	Yan etkiler
Eslikarbazepin	İdiyosenkratik reaksiyonlar, baş dönmesi, somnolans baş ağrısı, ataksi, dikkat bozukluğu, diplopi, tremor, bulantı, kusma, hiponatremi, elektrokardiyogramda P ve R dalgaları aralığı (PR) uzaması
Etosüksimit	Gastrointestinal sisteme etki (bulantı, kusma, hıçkırık, karın ağrısı, anoreksi), baş ağrısı, baş dönmesi, uyku hali, antikonvülzan hipersensitivite reaksiyonu (AHS), renal ve hepatik yetmezlik
Felbamat	Uykusuzluk, baş ağrısı, bulantı, anoreksi, somnolans, kusma, kilo kaybı, baş dönmesi, aplastik anemi, hepatotoksisite
Fenitoin	Nörotoksisite (ataksi, nistagmus, dizartri), kronik dismorfik etkiler (dişeti hiperplazisi, hirsutizm, akne, yüzde kabalaşma), uzun süre kullanım sonrası folat eksikliği, osteopeni, periferik nöropati, serebellar atrofi, nadiren idiyosenkratik reaksiyonlar, AHS, hepatik yetmezlik
Fenobarbital	Sedasyon, depresyon, ajitasyon; çocuk ve yaşlılarda hiperaktivite, fetal anormallik riski artışı, çocuklarda hiperkinezi, omuz-el sendromu, AHS, hepatik yetmezlik
Gabapentin	Uyku hali, ataksi, baş dönmesi, nistagmus, yüksek doz kullanımında kilo alımı, midede gaz, diyare ve miyoklonik sıçrama, akut pankreatit hepatit, <i>Stevens-Johnson</i> Sendromu, akut renal yetmezlik
Karbamazepin	SSS toksisitesi, idiyosenkratik reaksiyonlar (morbiliform döküntüler, <i>Erithema multiforme</i> , <i>Stevens-Johnson</i> sendromu), tersinir lökopeni, hiponatremi, kardiyak aritmi, hepatik yetmezlik
Klobazam	Depresyon, sedasyon, yorgunluk, duygusal davranış ve kognitif bozulma, huzursuzluk, hipersalivasyon
Klonazepam	Klobazam gibi
Lakosamit	Baş dönmesi, baş ağrısı, diplopi, bulantı, kusma, bulanık görme, elektrokardiyogramda PR uzaması
Lamotrijin	Baş ağrısı, bulantı, kusma, uykusuzluk, baş dönmesi, diplopi, ataksi, tremor, döküntü (sıklıkla makulopapüler; az sayıda bullöz <i>Erithema multiforme</i> , <i>Stevens-Johnson</i> sendromu ve toksik epidermal nekrozli olgular), AHS, hepatik yetmezlik
Levetirasetam	Uykusuzluk, somnolans, baş ağrısı, anoreksi, sinirlilik, ajitasyon, agresyon, düşmanca davranışlar, psikoz, anksiyete ve depresyon gibi davranış problemleri, hepatik yetmezlik

Çizelge 1. (Devam) Antiepileptik Etkin Maddeler ve Yan Etkileri (Brodie ve ark., 2008; Panayiotopoulos, 2011)

Etkin Madde	Yan etkiler
Okskarbazepin	Baş dönmesi, uyku hali, baş ağrısı, diplopi, bulantı, kusma, baş ağrısı, nadiren <i>Stevens-Johnson</i> sendromu ve epidermal nekroliz, AHS, hiponatremi
Pregabalin	Baş dönmesi, somnolans, baş ağrısı ve ataksi, kilo alımı, periferik ödem, renal yetmezlik, AHS
Pirimidon	Sedasyon, ataksi, libido azalması ve impotans
Sodyum valproat	Tremor, iştah açılması ile kilo alımı, saçlarda incelme veya saç kaybı menstrual düzensizlik, polikistik over sendromu, teratojenisite riski, hepatik ve pankreatik yetmezlik
Tiagabin	Baş dönmesi, asteni, sinirlilik, tremor, konsantrasyon bozukluğu, letarji ve depresyon, <i>Absans stupor</i> , <i>Status Epileptikus</i>
Topiramamat	Ataksi, konsantrasyon güçlüğü, konfüzyon, disfazi, baş dönmesi, yorgunluk, parestezi, somnolans, kelime bulmada zorluklar ve bilişsel yavaşlama; anoreksi ve kilo kaybı, nefrolitiaz riskinde 10 kat artış
Vigabatrin	Yorgunluk, baş dönmesi, baş ağrısı, kilo alımı, ajitasyon, kırgınlık, davranış bozulması ve depresyon, paranoit ve psikotik semptomlar, görme alanı daralması riski
Zonisamit	Anoreksi, baş dönmesi, ataksi, yorgunluk, somnolans, konfüzyon, konsantrasyon güçlüğü, fotoduyarlılık, gastrointestinal sorunlar, spontan dikkatin azalması ve kilo kaybı, AHS, anhidroz

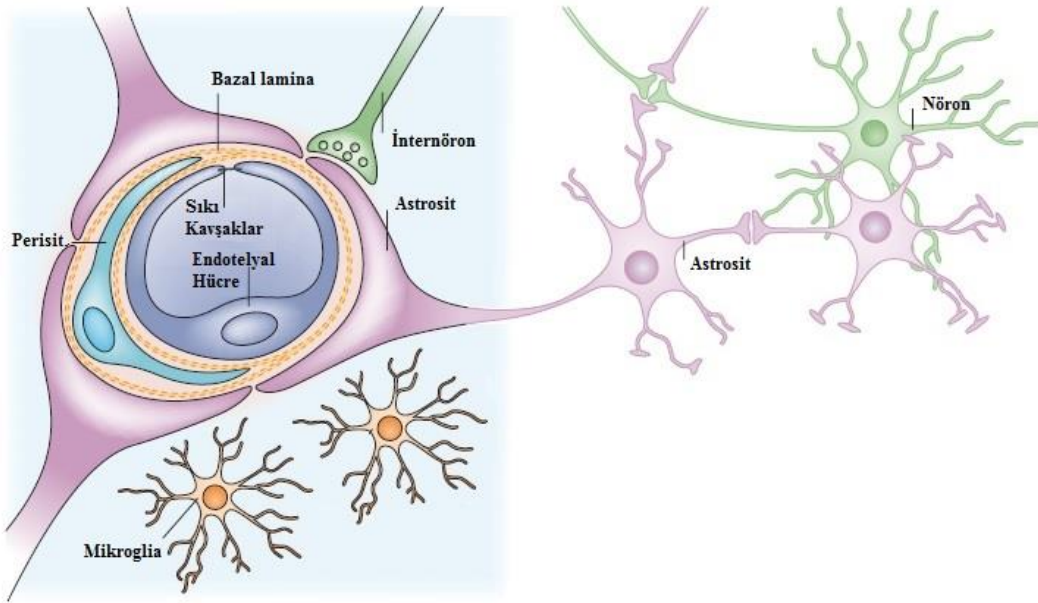
Kan-Beyin Engeli

KBE beyni mikroorganizmalardan ve istenmeyen maddelerden koruyan dinamik bir engeldir (Chen ve Liu, 2012). KBE'nin asıl amacı santral sinir sisteminde (SSS) var olan dengeli iç ortamı korumak ve kandan gerekli besin maddelerinin geçişini sağlamaktır (Abbott ve ark., 2006).

KBE'nin anatomik yapısının temelini mikrovasküler endotel hücreleri ve hücrelerin etrafında kapilerlere komşu yerleşim gösteren düz kas benzeri yapıları olan perisitler ve astroglial yapılar oluşturmaktadır. KBE esas olarak beyni sistemik kan dolaşımından ayıran membranöz yapıda bir engeldir (Çapan ve Yemişçi, 2014).

KBE'nin yüzeyi 12 m² iken hacmi sadece 1.2 mL'dir (Çapan ve Yemişçi, 2014). İnsan beyni için kapilerler arası uzaklık yaklaşık 40 µm'dir (Bauer ve ark., 2011). Bu nedenle glikoz gibi küçük moleküller endotelial bariyeri geçtikten sonra beyin interstisyel boşluğu boyunca hemen dengeye erişmektedir (Çapan ve Yemişçi, 2014).

KBE'nin işlevini sıkı bağlantılar, metabolik enzimler ve taşıyıcılar oluşturmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. KBE'yi Oluşturan Nörovasküler Birimin Şematik Gösterimi (Abbott ve ark., 2006).

SSS'de bulunan kapilerler diğer dokularda bulunan kapilerlerden yapı olarak farklıdır. Diğer organlarda kan dolaşımındaki maddelerin subendotelial alana ve buradan da interstisyel dokuya geçmesi endotelial hücreler arasında var olan boşluklar aracılığıyla mümkün olurken, KBE endotel hücreleri aralarında bulunan sıkı bağlantılar, düşük pinositik aktiviteleri ve boşluk içermemeleri sayesinde yüksek bir transendotelial direnç oluşumu sağlamakta ve seçici bir şekilde madde geçişine izin vermektedir (Bodor ve Buchwald, 1999).

Beyin mikrovasküler sisteminde bulunan metabolik enzimler (Sitokrom P450, Sitokrom 1B1, v.b.) metabolik engelin varlığına işaret etmektedir. Günümüzde

fizyolojik ve patofizyolojik koşullarda metabolik enzimlerin KBE'deki rolünü ve beyne AEİ'lerin taşınmasını enzimlerin sınırlayıp sınırlamadığını tam olarak açıklayabilmek için daha fazla çalışma yapmak gerekmektedir (Bauer ve ark., 2011).

KBE perifer dokularda ve beyinden gelen sinyalleri yanıtlayan aktif, dinamik ve seçici bir arayüzü temsil etmektedir. Engel işlevinin oluşumunda yer alan anahtar bileşenlerden biri de içeri alma ya da dışarıya vermede rol alan, beyne endojen ve eksojen toksinlerden koruyan ve besin sağlayan taşıyıcılardır [alanin/serin/sistein/treonin taşıyıcıları, glikoz taşıyıcıları, büyük aminoasit taşıyıcıları, v.b.] (Bauer ve ark., 2011).

KBE'den geçiş fizyolojik koşullarda ancak yağda çözünen yapıların pasif difüzyon yolu, suda çözünen yapıların ise kolaylaştırılmış ve enerji bağımlı reseptör aracılıklı taşınması, iyon kanalları aracılığı, transitoz ve nadiren de paraselüler yol ile olabilmektedir (Çapan ve Yemişçi, 2014).

Epilepside KBE

Son yıllarda KBE'nin epilepsideki rolü ilgi çekici konu haline gelmiştir. Epilepside KBE, taşıyıcıların ve metabolik enzimlerin ekspresyonu ve engelden sızma gibi değişiklikler göstermektedir. Bu tip patolojik durumlar sonucunda nöbet oluşumu ve AEİ'lere karşı direnç görülmektedir (Bauer ve ark., 2011).

AEİ direnci ile ilişkili olarak beyin kapiler endotellerinde efluks taşıyıcılarda ve metabolik enzimlerde artış görülmektedir. Sisodiya ve arkadaşlarının (Sisodiya ve ark., 2002) gerçekleştirdiği çalışmada ilaca dirençli epilepsili hastalarda beyinde taşıyıcı molekül olan P-glikoprotein mRNA'nın ve kapiler endotellerinde protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu artış ile AEİ'lerin beyne girişinin engellendiği ve AEİ'lere karşı direncin ortaya çıktığı öne sürülmüştür. Aynı zamanda taşıyıcı inhibitörlerinin kullanılması ya da taşıyıcı regülasyonunun düzenlenmesi ile AEİ'lere karşı gelişen bu direncin üstesinden gelinebileceği bildirilmektedir (Bauer ve ark., 2011).

Epileptik hastalarda ya da deneysel epilepsi modelinde kullanılan hayvanlarda epileptik nöbetlere bozulmuş KBE bütünlüğünün eşlik ettiği bilinmektedir. KBE bütünlüğünün bozulması ile kan yolu ile taşınan moleküllerin beyne geçişine izin veren kısa süreli sızıntılar oluşmaktadır. Kan bileşenlerinin beyne sızmasının uyarılabilirliğinin, nöbet oluşumunun ve epilepsinin ilerlemesinin artması ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir (Bauer ve ark., 2011).

KBE AEİ'ler ile tedavide etkinlik için sınırlayıcı en büyük etken olduğundan, AEİ'lerin beyin parankimasına penetrasyonunu arttırmak ve beyin dokusundaki sürekliliğini sağlamak için beyne ilaç taşınmasında yeni stratejiler geliştirilmiştir (Bennewitz ve Saltzman, 2009). Yeni ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi, ön-ilaç tasarımı ve lipidizasyon, reseptör ya da taşıyıcı aracılı taşınım gibi girişimsel olmayan teknikler ve KBE'nin bozulması ya da beyin parankimasına doğrudan ilaç enjeksiyonu gibi girişimsel teknikler KBE'den etkin madde taşınmasında kullanılan stratejiler arasında yer almaktadır (Bennewitz ve Saltzman, 2009; Çaban, 2010).

Beyne Etkin Madde Taşıyan Sistemler

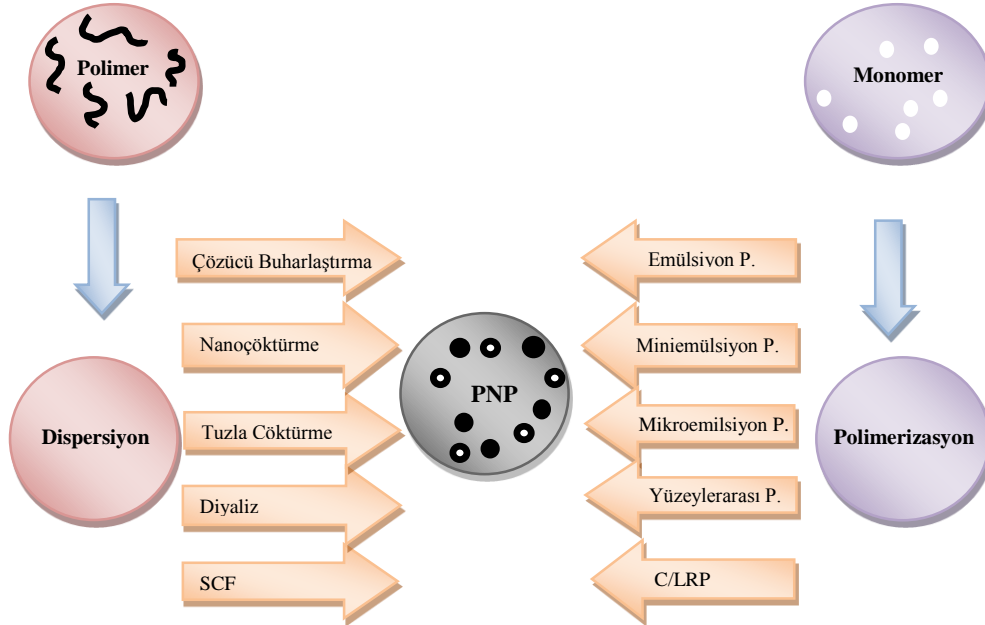
Beyne etkin madde taşıyıcı sistemler arasında konvensiyonel ilaç taşıyıcı sistemlere ek olarak etkin madde taşıyıcı yeni sistemler adı altında polimerik nanopartikül (PNP) (Sun ve ark., 2004), katı lipit nanopartikül (Dhana Lakshmi ve ark., 2012), inorganik nanopartikül, altın nanopartikül, manyetik nanopartikül, nanokristal, quantum dot, karbon nanotüp (Dikpati ve ark., 2012), lipozom, misel, dendrimer, nanojel, nanoemülsiyon ve nanosüspansiyon (Wong ve ark., 2011) yer almaktadır.

Nanopartiküller boyutu 10-1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı koloidal parçacıklardır. Nanopartiküllerden istenen özellikler arasında etkin maddeyi kontrollü olarak salması, etki etmeleri istenen bölgede toplanması, kararlılık sorunu taşımaması, taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve sterilize edilebilmesi sayılabilir (Kaş, 2002).

Nanopartiküller daha önceden hazırlanmış çok çeşitli polimerler kullanılarak ya da monomerlerden hareketle farklı polimerizasyon tekniği ile PNP adı altında ya da katı veya sıvı yağların kullanılması ile sırasıyla katı lipit nanopartikül veya nanoyapılı lipit taşıyıcılar olarak hazırlanabilir (Rao ve Geckeler, 2011).

Polimerik Nanopartiküller

Çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme, diyaliz ve süper kritik sıvı teknolojisi (SCF) gibi yöntemler ile daha önceden hazırlanmış polimerler kullanılarak hazırlanırken, PNP'ler yüzeylearası polimerizasyon, emülsiyon yapıcı olmaksızın polimerizasyon, miniemülsiyon polimerizasyonu ve mikroemülsiyon polimerizasyonu gibi çeşitli polimerizasyon teknikleri kullanılarak monomerlerin doğrudan sentezi ile de hazırlanabilmektedir (**Şekil 2**) (Rao ve Geckeler, 2011).



Şekil 2. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması için Kullanılan Çeşitli Tekniklerin Şematik Gösterimi (SCF: Süperkritik Sıvı Teknolojisi, C/LRP: Kontrollü Radikal Polimerizasyon, P: Polimerizasyon)

Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri

Polimerizasyon yöntemi

Özel uygulamalar için istenen özelliklerin elde edilmesinde monomerlerin polimerizasyonu ile uygun PNP'ler tasarlanabilmektedir. Günümüzde monomerlerin polimerizasyonu yolu ile PNP'lerin üretilmesinde başlıca miniemülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyonu olmak üzere yüzeylerarası polimerizasyon ve kontrollü radikal polimerizasyon (C/LRP) gibi diğer hetero-faz polimerizasyonları üzerine yoğunlaşmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu çok geniş özgünlükte polimerlerin üretilmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Dispersiyon ortamı olarak suyun kullanımı çevre ile uyumludur ve aynı zamanda polimerizasyon işlemi süresince ısının mükemmel yayılımına olanak tanımaktadır. Yüzey etkin madde (YEM) kullanımına bağlı olarak konvensiyonel ve YEM kullanılmaksızın gerçekleştirilen polimerizasyon olarak sınıflandırılabilir (Rao ve Geckeler, 2011).

Konvensiyonel emülsiyon polimerizasyonu

Konvensiyonel emülsiyon polimerizasyonunda tüm bileşenler su ile ilişkilidir. Monomerin suda çözünürlüğü düşük iken başlatıcı ve YEM suda çözünür özelliğe sahiptir. Reaksiyon sonunda oluşan PNP'ler genellikle $\sim 10^2$ nm boyutundadır ve her biri birçok polimer zincirine sahiptir (Rao ve Geckeler, 2011).

Kolloidal kararlı kılıcı madde elektrostatik, statik ve elektrosterik özellikte olabilmektedir. Sürekli fazda çözünmüş olan monomer molekülü, iyon ya da serbest radikal olan başlatıcı molekül ile çarpıştığında reaksiyon başlamaktadır. Alternatif olarak monomer molekül γ -radyasyon, ultraviyole ve güçlü görünür ışık gibi yüksek enerjili radyasyon ile başlatıcı radikale dönüştürülebilir. Faz ayrışması ve katı parçacıkların oluşması polimerizasyon reaksiyonunun sonlanması öncesinde ya da sonrasında gerçekleştirilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011).

Zhang ve arkadaşları (Zhang ve ark., 2001a) gerçekleştirdikleri çalışmada emülsiyon polimerizasyonu tekniğini kullanarak polibutilsiyanoakrilat nanopartiküllerini hazırlamıştır. Ortalama 254 nm boyutuna parçacıkların sıçanlara pulmoner yoldan uygulanması ile insülinin hipoglisemik etkisinin süresi önemli derecede uzatılmıştır. Hazırlama sırasında insülin molekülünün katı PNP'lere adsorbe olması ya da PNP'lerin içine yerleşmesi sonucu insülin salımı kısmi olarak kontrol edilebilmiştir. Diğer açıdan, akciğer dokusundaki parçacıklar makrofajlar tarafından alınabilmekte ve bu durum uzatılmış farmakolojik etki ile sonuçlanabilmektedir.

Polistiren, polimetilmetakrilat, polivinilkarbazol, polietilsiyanoakrilat nanopartikülleri YEM aracılığıyla sikloheksan, n-pentan ve toluen gibi çözücüler içerisinde dağıtılarak hazırlanmıştır (Rao ve Geckeler, 2011).

Ters emülsiyon polimerizasyonu

Ters emülsiyon polimerizasyonu sürekli faz olan organik fazda monomerin emülsiyon veya ters emülsiyon şeklinde dispersiyonunu ya da monomerin çözünmediği bir çözücüde dağıtılmasını içermektedir. Bu yöntemle poliakrilamit nanokürelerinin hazırlandığı bildirilmiştir (Reis ve ark., 2006). Ters emülsiyon homopolimerizasyonu ile poliakrilamit sentezinde genellikle toluen (Zhang ve ark., 2006a), heptan (Chen ve ark., 1997) ve izooktan gibi çeşitli yağlar sürekli faz olarak kullanılmaktadır.

Barari ve arkadaşları (Barari ve ark., 2011) sürekli faz olarak ksilen, YEM olarak sorbitan monooleat (Span[®] 80) ve polioksietilensorbitan trioleat (Tween[®] 85) karışımı, monomer olarak akrilamit (Ac) kullandıkları polimerizasyonda başlatıcı olarak benzoil peroksit kullanmış ve reaksiyon 60°C'de gerçekleştirmiştir. Kullanılan sürekli fazın, sonuçta elde edilen ürünün molekül ağırlığını, parçacık büyüklüğünü ve büyüklük dağılımını etkilediği bildirilmiştir. Ürünün, reaksiyon kinetiğinin, parçacık büyüklüğünün ve dağılımının karıştırma hızından da etkilendiği belirtilmiştir. Aynı zamanda ağırlıkça %5 emülsiyon yapıcı konsantrasyonuna kadar, emülsiyon yapıcı konsantrasyonunun elde edilen polimerin molekül ağırlığını arttırdığı bulunmuştur. Parçacık boyutunun başlatıcı tipinden etkilendiği ancak konsantrasyonundan etkilenmediği bildirilmiştir. Partikül boyutu ve dağılımının sıcaklıktan etkilenmediği ve elde edilen suda şişen nanopartiküllerin çoğunluğunun 200 nm'den küçük olduğu rapor edilmiştir.

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada sürekli faz olarak toluen ve n-heptan denenmiştir (Chen ve ark., 1997). Toluene sisteminde koagülasyonu engellemek için emülsiyon yapıcının ağırlıkça %10'dan fazla olması gerekirken, n-heptan ile gerçekleştirilen polimerizasyonda reaksiyon kararlılığı ve mikrojellerde tekdüze parçacık boyutu için emülsiyon yapıcı miktarının ağırlıkça %7'den büyük olması istenmektedir. Çapraz bağlayıcı ajan olan N,N-metilenbisakrilamit'in (NMBAc) reaksiyon kararlılığını arttırdığı böylece daha küçük ve tekdüze mikrojellerin elde edildiği bildirilmiştir.

Ouyang ve arkadaşları (Ouyang ve ark., 2011) tersinir ekleme fragmentasyon zincir transferi tekniği ile ters emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak lipofilik ve hidrofilik başlatıcılar ve farklı emülsiyon yapıcılar kullanarak iyi tanımlanmış poliakrilamit polimerleri sentezlemiştir.

Ters emülsiyon polimerizasyonu ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada alkaline fosfatase enziminin bu yöntemle üretilmiş kolloidal parçacıklara hapsedilmesi ile enzimin immobilizasyonu sağlanmıştır (Daubresse ve ark., 1996). Yüzey özelliği saptanarak ana monomer olan Ac, çapraz bağlayıcı olan NMBAc ile N-akrilil-1,6-diaminohekzan ya da akrilik asit kombinasyonu varlığına bağlanmıştır. Komonomerlerin parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyel üzerine etkileri araştırılmış ve immobilize enzim bütünlüğü p-nitrofenil-fosfatın hidrolizine karşı katalitik aktivitesi saptanarak belirlenmiştir.

Polimetilmetakrilat, polietilsiyanoakrilat ve polibutylsiyanoakrilat nanopartikülleri organik faz olarak siklohekzan, n-pentan ve toluen gibi çözücüler içerisinde YEM aracılığıyla dispersiyon ile hazırlanmıştır (Yadav ve ark., 2012). Bu çalışmada enkapsüle edilen etkin maddeler arasında triamkinolon, fluoresin, pilokarpin ve timolol yer almaktadır (Reis ve ark., 2006)

YEM olmaksızın emülsiyon polimerizasyonu

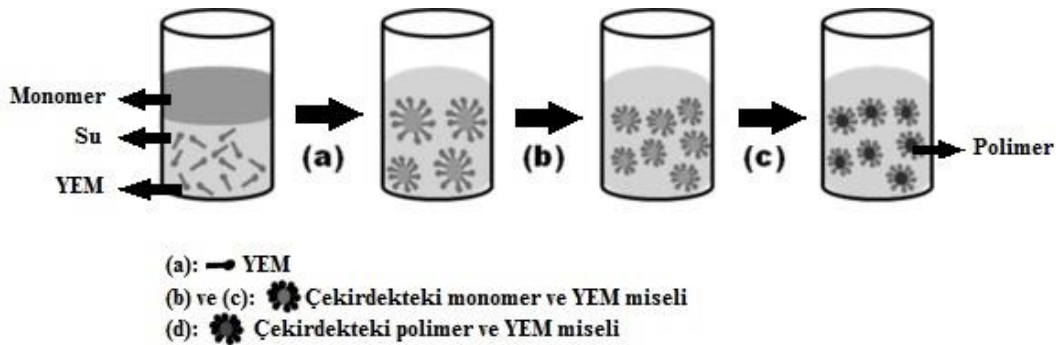
Konvensiyonel emülsiyon polimerizasyonu sisteminde son üründen arındırılması gereken çeşitli miktarlarda YEM'ler kullanılmaktadır. Son üründen YEM'lerin uzaklaştırılması zordur, zaman alıcıdır ve maliyeti arttırmaktadır. Emülsiyon yapıcı olmaksızın gerçekleştirilen işlem literatürde emülsiyon yapıcı olmaksızın polimerizasyon ve sabun olmaksızın polimerizasyon olarak da adlandırılmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Bu yöntemde deiyonize su, suda çözünebilir başlatıcı (örneğin potasyum persülfat) ve genellikle vinil ya da akril monomerler kullanılmaktadır. Bu tür polimerizasyonda PNP'lerin kararlı kılınması iyonize olabilen başlatıcılar veya iyonik ko-monomerler kullanımı ile sağlanmaktadır. YEM olmaksızın gerçekleştirilen polimerizasyonda çekirdeklenme ve parçacık büyümesi için misel benzeri çekirdeklenme ve homojen çekirdeklenme gibi çeşitli mekanizmalar önerilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011).

YEM olmaksızın emülsiyon polimerizasyonu kararlılık sağlayan YEM'lerin eklenmesi ve ardından uzaklaştırılması olmaksızın PNP üretilmesinde temiz ve basit bir sistemdir. Bu üstünlüklere karşın, çeşitli sorunlar monodispers ve kontrol edilebilir parçacık büyüklüğü ile nanopartikül hazırlanması gibi sistemin çeşitli yararlarından faydalanılmasına engel olmaktadır (Zhang ve ark., 2001b).

Miniemülsiyon polimerizasyonu

Miniemülsiyon polimerizasyonunda genel olarak kullanılan formülasyon su, monomer karışımı, yardımcı kararlılık sağlayıcı, YEM ve başlatıcı bileşenlerinden oluşmaktadır (**Şekil 3**). Emülsiyon polimerizasyonu ve mini-emülsiyon polimerizasyonu arasındaki başlıca fark düşük molekül ağırlıklı bileşik ve yüksek hızlı karıştırıcı (ultrasonik, v.b.) kullanımınıdır. Miniemülsiyonlar önemli derecede kararlıdır ve kararlı duruma ulaşmak için yüksek hız gerektirmektedir. Miniemülsiyonlarda yüzeylerarası gerilim sıfırdan büyüktür (Yadav ve ark., 2012).



Şekil 3. Mini-emülsiyon Polimerizasyonunun Şematik Gösterimi: (a) Önemülsifikasyon, (b) Yüksek-kayma emülsifikasyon ve (c) Polimerizasyon (Rao ve Geckeler, 2011)

Esfandyari-Manesh ve arkadaşları (Esfandyari-Manesh, 2012) gerçekleştirdikleri çalışmada miniemülsiyon polimerizasyonu yöntemini kullanarak karbamazepin baskılanmış PNP'ler hazırlamıştır. Fonksiyonel monomer olarak metakrilik asit (MAA), çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat ve hidrofobik ajan olarak hekzadekan kullandıkları çalışmalarında boyutu 180-251 nm aralığında olan ve küresel özellikte parçacıklar elde etmişlerdir.

Gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise YEM olarak Span[®] 80 veya poli(etilenkobutilen)-b-poli(etilenoksit) ve yardımcı kararlılık sağlayıcı olarak sikloheksan ya da heksadekan kullanılarak dar dağılım gösteren 50-200 nm aralığında parçacıklar elde edilmiştir (Landfester ve ark., 2000).

Mikroemülsiyon polimerizasyonu

Mikroemülsiyon polimerizasyonu nanoboyutlu polimerik parçacıkların hazırlanmasında yeni ve etkili bir yöntemdir (Yadav ve ark., 2012). Emülsiyon polimerizasyonu ve miniemülsiyon polimerizasyonu yüksek molar kütlede kolloidal polimerik parçacıklar üretebildiğinden benzer gözükmesine karşın iki yöntem kinetik açıdan karşılaştırıldığında tamamen farklıdır (Rao ve Geckeler, 2011). Emülsiyon polimerizasyonu üç reaksiyon hızı aralığı gösterirken, bu aralıkların sadece iki tanesi mikro-emülsiyon polimerizasyonunda görülmektedir. Hem parçacık büyüklüğü hem de her parçacığın ortalama zincir sayısı mikroemülsiyon polimerizasyonunda önemli ölçüde küçüktür.

Mikroemülsiyon polimerizasyonunda suda çözünür başlatıcı, şişmiş miseller içeren termodinamik olarak kararlı mikroemülsiyona eklenmektedir. Polimerizasyon termodinamik olarak kararlı ve kendiliğinden oluşan bu durumdan başlamakta ve polimerizasyon yağ/su ara yüzeyindeki yüzeylerarası gerilimi sıfıra yakın tutan yüksek miktarlarda YEM sistemine dayanmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

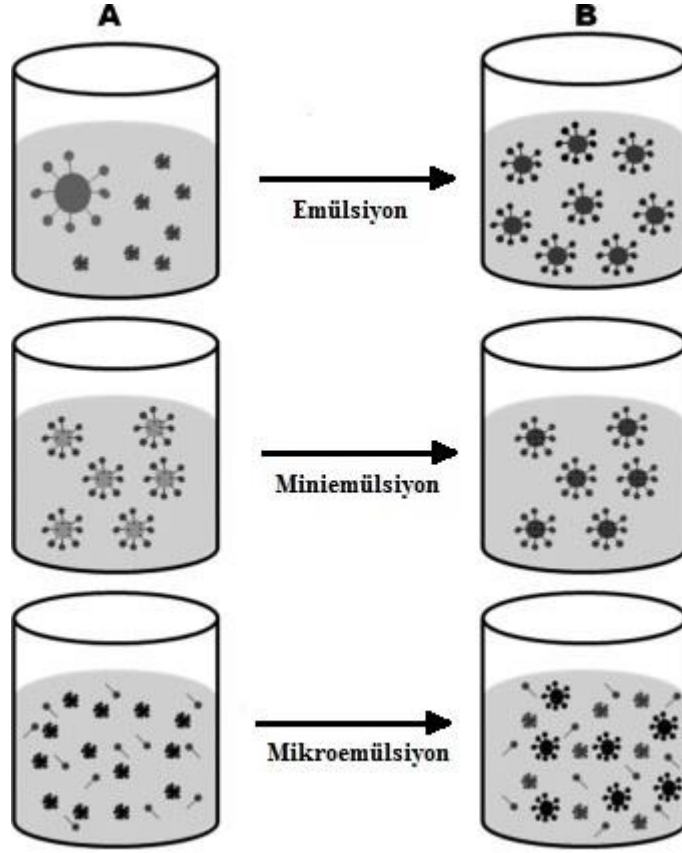
İlk olarak, başlatma eşzamanlı olarak tüm mikrodamlacıklarda gerçekleşemediğinden polimer zincirleri yalnızca bazı damlacıklarda oluşmaktadır. Sonrasında, zincirlerin ozmotik ve esneklik etkisi hassas mikroemülsiyonları kararsızlaştırmakta ve genellikle parçacık boyutunun artmasına, boş misellerin oluşmasına ve ikincil çekirdeklenmeye neden olmaktadır (Yadav ve ark., 2012).

Emülsiyon polimerizasyonunda, çeşitli emülsiyonlar arasındaki farklılıklar **Çizelge 2**'de derlenmiş ve **Şekil 4**'te şematik olarak sunulmuştur (Rao ve Geckeler, 2011).

Başlatıcı tipi ve konsantrasyonu, kullanılan YEM, monomer ve reaksiyon sıcaklığı mikroemülsiyon polimerizasyonu kinetiğini ve PNP özelliklerini etkileyen bazı kritik parametrelerdir (Rao ve Geckeler, 2011).

Çizelge 2. Hetero-faz Polimerizasyon Sistemleri Arasındaki Farklılıklar (Rao ve Geckeler, 2011)

Özellikler	Emülsiyon	Miniemülsiyon	Mikroemülsiyon
Termodinamik kararlılık	Kararlı değil	Kararlı değil	Kararlı
Kararlılık periyodu	Saniyelerden aylara kadar	Saatten aylara kadar	Sonsuz kararlılık
Damlacık boyutu	1-10 µm	20-200 nm	10 nm
Polidisperslik	Düşük	Çok düşük	Çok düşük
Parçacık Boyutu	50-300 nm	10-30 nm	30-100 nm



Şekil 4. Çeşitli Hetero-Faz Polimerizasyon Yöntemleri Arasındaki Farklılıklar
 (A) Polimerizasyon Öncesi ve (B) Polimerizasyon Sonrası (Rao ve Geckeler, 2011)

Yüzeylearası polimerizasyon

Yüzeylearası polimerizasyon yöntemi PNP hazırlanmasında kullanılan iyi anlaşılmiş bir yöntemdir. Yöntem iki reaktif monomer ya da ajanın sırasıyla çözüldüğü basamak polimerizasyonunu (örneğin sürekli ve dispers faz) içermektedir. Reaksiyon iki sıvının ara yüzeyinde gerçekleşmektedir (Rao ve Geckeler, 2011).

Nanometre boyutundaki polimerik parçacıklar çoklu eklenme ve çoklu yoğunlaşma veya radikal polimerizasyonu gibi yüzeylearası çapraz bağlayıcı reaksiyonlar kullanılarak sentezlenmektedir. Yağ içeren nanokapsüller, yağ-içinde-su mikroemülsiyonunun yağ/su ara yüzeyinde monomerlerin polimerizasyonu ile ele edilmektedir. Su ile tamamen karışabilen organik çözücü monomer taşıyıcısı olarak adlandırılmaktadır. Monomerin yüzeylearası polimerizasyonunun emülsiyon oluşumu sırasında açığa çıkan yağ damlacıklarının yüzeyinde oluştuğuna inanılmaktadır (Yadav ve ark., 2012).

Nanokapsül oluşumuna katkıda bulunmak için, aseton ve asetonitril gibi aprotik çözücülerin kullanımı önerilmektedir. Etanol, n-butanol ve izopropanol gibi protik çözücülerin ise nanoküre oluşumuna neden olduğu bulunmuştur (Rao ve Geckeler, 2011). Su içeren nanokapsüller su-içinde-yağ mikroemülsiyonlarında

monomerlerin yüzeylerarası polimerizasyonu ile elde edilebilmektedir. Bu sistemlerde polimer yağ-su ara yüzeyinde bölgesel olarak oluşmakta ve nanokapsül kabuğunun üretilmesi ile çöktürülmektedir (Watnasirichaikul ve ark., 2000).

Watnasirichaikul ve arkadaşları (Watnasirichaikul ve ark., 2000) gerçekleştirdikleri çalışmada yüzeylerarası polimerizasyon tekniğini kullanarak biyoaktif peptit olan insülinin polialkilsiyanoakrilat nanokapsüllerine hapsedilmesi ile 150 nm boyutunda parçacıklar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Kontrollü radikal polimerizasyon

Radikal polimerizasyonundaki öncelikli kısıtlamalar molar kütle, molar kütle dağılımının, elde edilen işlevsel grupların ve makromoleküler yapının kontrol edilememesidir. Kısıtlamalar kaçınılmazdır ve hızlı radikal-radikal sonlanma reaksiyonları nedeniyledir. C/LRP olarak adlandırılan yeni oluşum eski polimerizasyon tekniği kullanılarak yeni bir alan açmıştır (Rao ve Geckeler, 2011).

Endüstriyel radikal polimerizasyon yaygın olarak sulu dispers sistemlerde ve özellikle emülsiyon polimerizasyonunda gerçekleştirilmektedir. İlk hedef molar kütle, molar kütle dağılımı, yapı ve fonksiyon açısından polimerin özelliklerini kontrol etmektir. Endüstriyel olarak önemli sulu disperse edilmiş sistemlerde C/LRP'nin uygulanması kesin parçacık büyüklüğü ve boyut dağılımı aralığı ile sonuçlanmaktadır (Yadav ve ark., 2012).

Kullanılan C/LRP yöntemleri arasında nitroksit aracılıklı polimerizasyon, atom aktarımı radikal polimerizasyonu ve geri dönüşümlü eklenme ve fragmentasyon (parçalara ayrılma) zincir aktarımı polimerizasyonu olmak üzere başarılı ve yaygın olarak çalışılan üç yaklaşım yer almaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Koaservasyon veya iyonik jelasyon yöntemi

PNP'ler kitosan, jelatin ve sodyum aljinat gibi hidrofilik polimerler kullanılarak hazırlanmaktadır (Yadav ve ark., 2012).

Dustgania ve arkadaşları (Dustgania ve ark., 2008) iyonik jelasyon yöntemi ile deksametazon sodyum fosfat yüklü kitosan nanopartikülleri hazırlamışlardır. Çalışmada 250-300 nm boyutunda, küresel özellikte, biyobozunur, biyoyumlu ve biyoadeziv nanopartiküller elde edilmiştir.

İyonik jelasyon yönteminde biri polimer kitosan, diblok kopolimer polietilen oksit (PEO) veya polipropilen oksit (PPO) içeren sulu faz ve diğeri ise polianyon sodyum trifosfat içeren sulu faz karışımı kullanılmaktadır. Yöntemde kitosanın pozitif yüklü amino gruplarının nanometre boyutunda koaservatlar oluşturmak için negatif yüklü tripolifosfat grupları ile etkileştiği düşünülmektedir. Koaservatlar iki sulu faz arasındaki elektrostatik etkileşim sonucunda oluşurken, iyonik jelasyon oda sıcaklığında iyonik etkileşim koşulları nedeniyle süregelen sıvıdan jele dönüşüm materyalini içermektedir (Yadav ve ark., 2012).

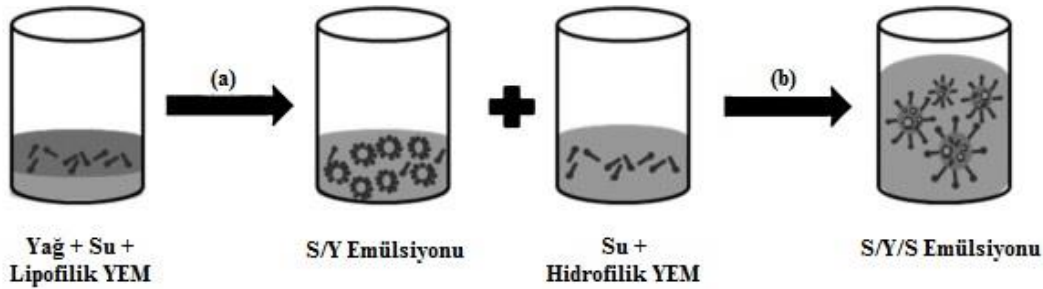
Çözücü buharlaştırma yöntemi

Çözücü buharlaştırma yöntemi önceden hazırlanmış polimerler kullanılarak PNP hazırlanması için geliştirilen en eski yöntemdir (Vanderhoff ve ark., 1979). Yöntem başlangıçta polimer kimyacıları tarafından önerilmesine karşın asıl gelişmeler

farmasötik teknoloji alanında biyoparçalanabilir polimerlerin ilaç taşıyıcı sistemlere uygulanmasında gerçekleştirilmiştir (Rao ve Geckeler, 2011).

Çözücü buharlaştırma yöntemi PNP hazırlanmasında güncel literatürde en çok yararlanılan yöntemlerden biridir. Konvensiyonel yöntemde emülsiyonların oluşturulmasında tek emülsiyon oluşturulması [örneğin yağ-ıçinde-su emülsiyonu (y/s)] veya çoklu emülsiyon oluşturulması gibi [örneğin su-ıçinde-yağ-ıçinde-su emülsiyonu (s/y/s)] iki ana strateji kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde yüksek hızlı homojenizasyon veya ultrasonikasyonun ardından oda sıcaklığında sürekli olarak manyetik karıştırma ile ya da düşük basınç altında çözücünün buharlaştırılmasından yararlanılmaktadır. Ardından katılmış nanopartiküller ultrasantrifüj kullanılarak toplanabilmekte ve YEM'ler gibi yardımcı maddelerin uzaklaştırılması için distile su ile yıkanmaktadır. Son olarak ürün dondurularak kurutulmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Genellikle organik çözücüde çözündürülen polimer ve etkin madde yağlı fazı oluştururken, kararlılaştırıcı madde içeren faz da sulu fazı oluşturmaktadır. **Şekil 5** çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemini özetlemektedir (Rao ve Geckeler, 2011).



Şekil 5. S/Y/S Çoklu Emülsiyonu Hazırlanması: (a) Yüksek Hızda Emülsiyon Oluşturma (b) Düşük Hızda Emülsiyon Oluşturma (Rao ve Geckeler, 2011)

Potineni ve arkadaşları (Potineni ve ark., 2003) yaptıkları çalışmada tekli emülsiyon yöntemi ile 100-150 nm ortalama boyutta PEO ile modifiye edilmiş poli(β -aminoester) nanopartiküller hazırlamıştır. Çalışmada çözücü olarak etanol, kararlılık sağlayıcı olarak noniyonik YEM olan PEO-PPO-PEO'dan oluşan triblok kopolimeri Pluronic® F-108 kullanılmıştır.

Emülsiyon hazırlanmasında kullanılan çözücü ve polimer konsantrasyonu çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PNP'lerin sonuç özelliklerini etkilemektedir. Gerçekleştirilen başka bir çalışmada prazikuantel yüklü polilaktit-ko-glikolit (PLGA) nanopartiküllerinin hazırlanmasında dispers faz olarak metilen klorür ve etil asetat olmak üzere iki organik çözücünden yararlanılmıştır. Araştırma sonucunda metilen klorür ile hazırlanan nanopartiküllerin etil asetat ile hazırlananlardan daha büyük boyutta olduğu bildirilmiştir (Mainardes ve Evangelista, 2005).

Çözücü buharlaştırma yöntemi PNP hazırlanması için basit bir yöntem olmasına karşın zaman alan bir işlemdir ve buharlaştırma işlemi sırasında nanodamlıkların olası koalesansı nedeniyle sonuç ürününün parçacık büyüklüğü ve şekli etkilenebilmektedir (Rao ve Geckeler, 2011).

Nanoçöktürme yöntemi

Nanoçöktürme yöntemi çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntemin esası lipofilik bir çözücünden su ile karışabilen yarı polar bir çözücünün yer değiştirmesi sonrasında polimerin yüzeylerarasında birikimine dayanmaktadır. Non-solvan faza çözücünün hızlı difüzyonu iki faz arasındaki yüzeylerarası gerilimi düşürmektedir. Bu durum yüzey alanını arttırmakta ve küçük organik çözücü damlacıkları oluşumuna neden olmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Nanoçöktürme yöntemi polimer (sentetik, yarı-sentetik, doğal), polimer çözücüsü ve polimer için non-solvan olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır. Su ile karışabilen ve kolaylıkla buharlaştırılabilen organik çözücü (örneğin etanol, aseton, hekzan, metilen klorür ve dioksan) polimer çözücüsü olarak seçilmektedir. Bazen, aseton ve az miktarda su, aseton ve etanol ya da aseton ve metanol gibi ikili çözücü karışımları kullanılabilir. Bir veya daha fazla sentetik ya da doğal olarak oluşan YEM eklenmesi ile oluşan non-solvan faz, non-solvan veya karışımından oluşmaktadır. Yöntemde genellikle biyoparçalanabilir poli-esterler kullanılmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011). Yöntem özellikle PLGA, polilaktit (PLA), poli(ϵ -kaprolakton) ve poli(metil vinil eter-komaleik anhidrit) gibi çeşitli polimerik maddelere uygulanabilmektedir (Yadav ve ark., 2012).

Yöntemin başarısı ve parçacıkların fizikokimyasal özellikleri organik fazın sulu faza eklenme koşulları ile ilişkilidir. Örneğin organik fazın enjeksiyon hızı, sulu fazın karıştırılma hızı, organik fazı eklenme yöntemi ve organik fazın sulu faza oranı bu koşullar arasında yer almaktadır. Benzer olarak, PNP özellikleri bileşenlerin yapısı ve konsantrasyonundan etkilenmektedir (Blouza ve ark., 2006; Moïnard-Chécot, 2008). Nanoçöktürme aracılığıyla PNP hazırlanmasını sağlamak için YEM gerekli olmamasına karşın, parçacık büyüklüğü YEM doğası ve konsantrasyonundan etkilenmektedir. Dahası, YEM eklenmesi yüksek saklama periyodları süresince nanopartikül süspansiyonunu aglomerasyondan korumaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Blouza ve arkadaşları (Blouza ve ark., 2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada suda çözünürlüğü düşük olan spironolaktonun nanoçöktürme yöntemi ile nanopartikülleri hazırlanmıştır. Çeşitli formülasyon değişkenlerinin araştırılmasının ardından seçilen en uygun formülasyon için parçacık büyüklüğü 320-400 nm ve enkapsülasyon etkinliği %96.21 ile oldukça yüksek bulunmuştur. Laboratuvar ölçeğinde ve pilot ölçekte gerçekleştirilen çalışmada nanokapsüllerden hızlı ve simüle edilmiş gastrik sıvıda tam salım gözlemlenmiştir. Böylece spironolaktonun nanoenkapsülasyonu ile oral biyoyararlanımı ve etkinliğinin artacağı ve seçilen en uygun formülasyonun pediatrik kullanım için yüksek olan ilaç konsantrasyonu (1.5 mg.mL^{-1}) nedeni ile tedavinin daha az preparat hacmi ile sağlanacağı belirlenmiştir.

Başka bir çalışmada ise poli(metakrilik asit-ko-etil akrilat) L100-55 polimeri kullanılarak laboratuvar ölçeğinde 141 nm boyutunda ibuprofen yüklü nanopartiküller elde edilmiştir (Galindo-Rodriguez ve ark., 2005). Çalışmada yüklenen ibuprofen miktarının %4.5 hapsedme etkinliğinin ise %50 olduğu bulunmuştur.

Nanoçöktürme, nanokapsül ve nanoküre elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Her ne kadar düşük YEM konsantrasyonları kullanılsa da, organik fazdaki düşük YEM konsantrasyonuna ait sorunlar bildirilmiştir (Rao ve Geckeler, 2011).

Tuzla çöktürme yöntemi

Tuzla çöktürme işleminde emülsiyon aseton gibi tamamen su ile karışabilen polimer çözücüsü ile hazırlanmaktadır. Böylece yüksek herhangi bir karıştırma kuvveti uygulanmaksızın sulu fazda polimer çözeltisinin emülsiyonu elde edilmiş olmaktadır. Yüksek konsantrasyonda tuz veya sukrozun çözündürülmesi ile sulu fazda güçlü tuzla çöktürme etkisi oluşturulmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011). Elektrolit olarak çoğunlukla magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve magnezyum asetat kullanılmaktadır (Alleman ve ark., 1992; Perugini ve ark., 2002; Galindo-Rodriguez ve ark., 2005). Su eklenmesi sonucu emülsiyonun seyreltilmesi ile tuzla çöktürmenin ters etkisi emülsiyondaki damlacıklarda çözünen polimerin çöktürülmesine neden olmaktadır (Rao ve Geckeler, 2011).

Alleman ve arkadaşları (Alleman ve ark., 1992) tarafından gerçekleştirilen bu tür bir hazırlama prosesinde kararlılık düzenleyici ve viskozite arttırıcı ajan olarak kullanılan polivinilalkol içeren elektrolite doygun ya da non-elektrolite doygun sulu çözeltiler, sürekli karıştırma altında polimerin asetondaki çözeltisine eklenmiştir. Doymuş sulu çözelti tuzla çöktürme prosesi ile asetonun su ile karışmasını engellemiştir. Yağ-içinde-su emülsiyonu hazırlandıktan sonra asetonun sulu faza tamamen difüzyonuna izin verecek yeterli miktarda su eklenmesinin ardından nanoküre oluşumu gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada Zhang ve arkadaşları (Zhang ve ark., 2006b) hem emülsiyon yöntemi hem de tuzla çöktürme yöntemi kullanarak poli(trimetilen) karbonat nanopartikülleri hazırlamıştır. Karıştırma hızı ve polimer konsantrasyonunun nanopartikül boyutu üzerine etkisinin değerlendirilmesi üzerine karşılaştırma yapılmıştır. Deksametazon yüklü nanopartiküllerin elde edildiği çalışmada tuzla çöktürme yöntemi ile 183-251 nm boyut aralığında nanopartiküller elde edilmiştir. Çalışmada parçacık boyutu üzerine karıştırma hızının ve polimer konsantrasyonunun emülsiyon yöntemine göre daha az etkili olduğu ve daha ufak boyutta parçacıklar elde edildiği belirlenmiştir.

Diyaliz yöntemi

Diyaliz yöntemi küçük ve dar dağılım boyutuna sahip PNP hazırlanmasında etkili ve basit bir yöntemdir (Nagavarma ve ark., 2012). Bu yöntemde polimer organik çözücüde çözündürülmekte ve uygun molekül ağırlığı sınırındaki diyaliz tüpü içine yerleştirilmektedir. Diyaliz karışabilir çözücü ile karışabilir non-solvan arasında gerçekleşmektedir. Çözücünün membran içine yer değiştirmesi ile çözünürlük azalmakta ve nanopartiküllerin homojen süspansiyonunun oluşumu nedeniyle polimer gitgide agregate olmaktadır. Günümüzde diyaliz yöntemi ile PNP oluşum mekanizması bazı temellere dayandırılrsa da tam olarak anlaşılammıştır (Rao ve Geckeler, 2011).

Bu yöntemle bazı polimer ve kopolimer nanopartikülleri elde edilmiştir. Lee ve arkadaşları (Lee ve ark., 2004) gerçekleştirdikleri çalışmada çözücü olarak dimetilformamit kullanarak PLA-PEO nanopartikülleri hazırlamışlardır. Polimer

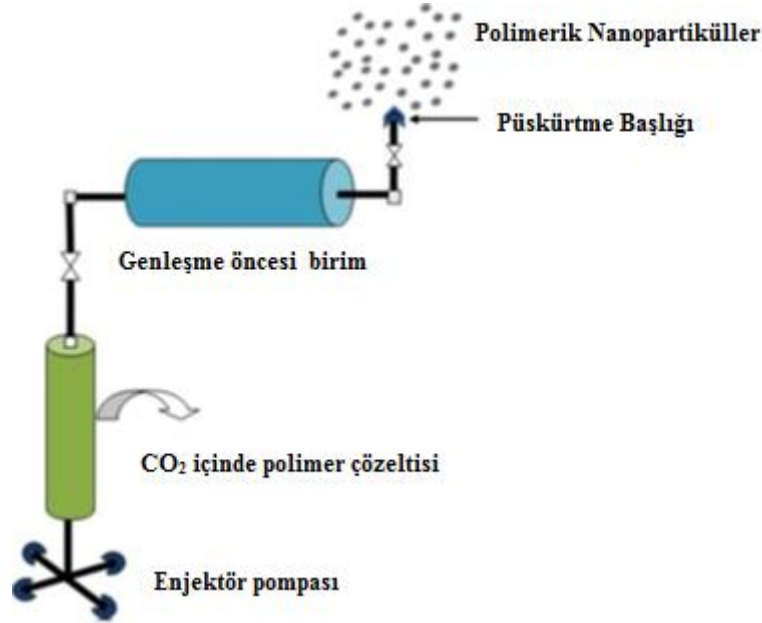
çözeltisi hazırlamada kullanılan çözücünün nanopartiküllerin morfolojisi ve parçacık büyüklüğü dağılımını etkilediğini bildirmişlerdir. Elde ettikleri veriler sonucunda PLA-PEO blok kopolimerinin enjekte edilebilen ilaç taşıyıcı sistemlere iyi bir aday olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Süperkritik sıvı teknolojisi

PNP üretiminde çevresel olarak güvenli yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı çevreye dost olan süperkritik sıvılardan yarar sağlanmasını tetiklemektedir. SCF ile yüksek saflıkta ve organik çözücü kalıntısı olmaksızın PNP üretimi sağlanmaktadır. Süper kritik sıvı ve yoğun gaz teknolojisinin parçacık üretimi için geleneksel yöntemlerin sakıncalarını giderecek ilginç ve etkili bir yöntem sunacağı düşünülmektedir (Yadav ve ark., 2012).

Süperkritik sıvı kullanılarak nanopartikül üretimi için iki ilke geliştirilmiştir: Süperkritik çözeltinin hızlı genişmesi (RESS) ve çözücüdeki süperkritik çözeltinin hızlı genişmesi (RESOLV) (Rao ve Geckeler, 2011).

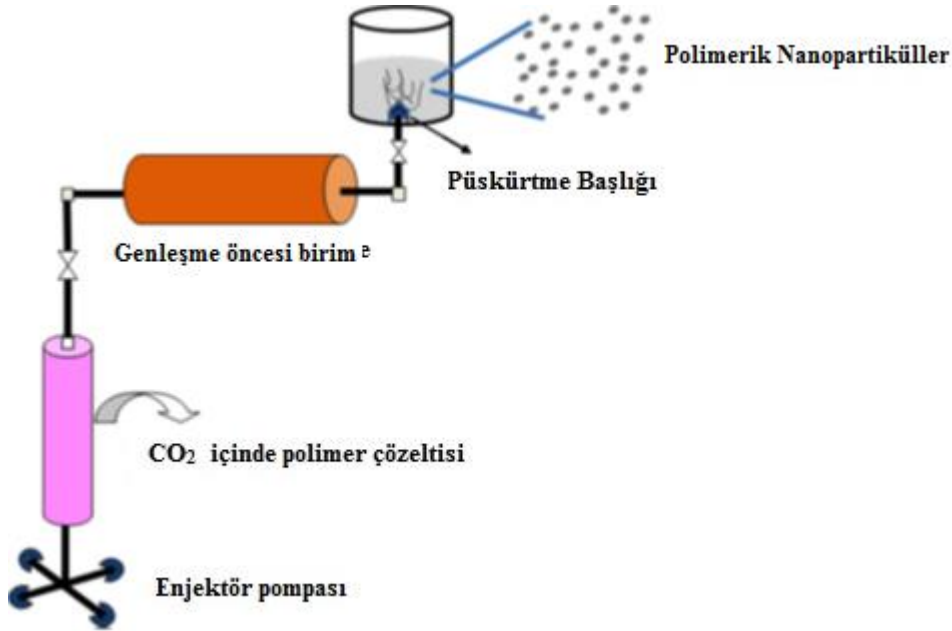
RESS'de çözünen süperkritik sıvıda çözüldürülmekte oluşan çözeltinin hızlı genişmesi sonrasında delik ya da kapiler püskürtücüden havaya geçirilmektedir. Aşırı doygunluk ve buna eşlik eden genişleme ile hızlı basınç düşmesi homojen çekirdeklenme ve iyi dağılım gösteren parçacıkların oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Yadav ve ark., 2012). Deneysel RESS işlemi **Şekil 6**'da sunulmuştur.



Şekil 6. RESS ile Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması İçin Deneysel Proses (Rao ve Geckeler, 2011)

Bu yöntem ile PNP üretilmesinde organik çözücü kullanılmamasına karşın, elde edilen parçacıklar mikroölçektir. RESS'in bu ana sakıncasının üstesinden gelebilmek için RESOLV adı ile bilinen yeni bir SCF geliştirilmiştir (Rao ve Geckeler, 2011).

RESOLV, RESS'in önemli modifikasyonu ile hava yerine sıvı çözücü içerisinde süperkritik çözeltilinin genişmesini içeren basit bir sistemdir. Sıvı çözücü püskürtme memesindeki parçacık büyümesini baskılamakta ve böylece nanoboyutta parçacıklar elde edilmektedir. RESOLV sisteminin şematik gösterimi Şekil 7'de yer almaktadır.



Şekil 7. RESOLV Deneysel Prosesi (Rao ve Geckeler, 2011)

RESS ve RESOLV teknolojilerinde karbon monoksit, n-pentan, su, amonyak gibi birçok süperkritik sıvı kullanılmasına karşın, PNP üretilmesinde bu sistemlerdeki en büyük engel polimerin süperkritik sıvılarda az çözünmesi ya da hiç çözünmemesidir (Rao ve Geckeler, 2011). Aynı zamanda süperkritik sıvı teknolojisi özel olarak tasarlanan ekipman gerektirmektedir ve pahalıdır (Mohanraj ve Chen, 2006).

Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

Parçacık büyüklüğü

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı nanopartikül sistemlerinde en önemli karakterizasyon parametresidir. Nanopartiküllerin *in vivo* dağılımı, biyolojik kaderi, toksisitesi ve hedeflenme yeteneği hakkında önemli bilgi sunar. Aynı zamanda, ilaç yüklenmesi, ilaç salımı ve nanopartiküllerin kararlılığını etkiler (Mohanraj ve Chen, 2006).

İlaç taşıyıcı sistem olarak mikron boyutu altındaki nanopartikül kullanımının mikropartiküllere göre çok sayıda üstünlüğü olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Mikropartikül ile karşılaştırıldığında nanopartiküllerin hücre içine alımı daha yüksektir (Panyam ve Labhasetwar, 2003).

Nanopartiküllerin KBE'yi geçtiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Beyin tümörlerine yönelik yapılan bir çalışmada hiperozmotik mannitol yardımıyla sıkı kavşaklar açılarak beyin tümörü gibi tedavisi güç olan hastalıklar için terapötik

ajanların sürekli salımının sağlandığı bildirilmiştir (Kroll ve ark.,1998). Başka bir çalışmada ise polioksietilensorbitan monooleat (Tween® 80) kaplı nanopartiküllerin KBE'yi geçtiği gösterilmiştir (Kreuter ve ark., 2003).

İlaç salımı da parçacık büyüklüğünden etkilenmektedir. Ufak parçacıklar büyük yüzey alanına sahiptir, bu nedenle etkin maddenin çoğu parçacık yüzeyinde ya da yakınında yer almaktadır. Bu durum etkin maddenin hızlı salımına neden olmaktadır. Aksine büyük parçacıklar daha fazla etkin maddenin hapsedilmesine ve yavaşça dağılmasına olanak tanımaktadır. Ufak parçacıklar saklama ve taşıma sırasında yüksek derecede agregasyon riski taşımaktadır. Bu durum olası en küçük boyut ancak en yüksek kararlılık ile nanopartikül formüle etmek için engel oluşturmaktadır (Mohanraj ve Chen, 2006).

Parçacık büyüklüğünden etkilenen bir diğer parametre polimer bozunmasıdır. Dunne ve arkadaşları (Dunne ve ark., 2000) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada parçacık büyüklüğü arttıkça PLGA polimerinin bozunma hızının da arttığı bildirilmiştir. Buna karşın gerçekleştirilen bir başka çalışmada farklı boyut aralıklarında PLGA parçacıkları hazırlanmış ve *in vitro* ortamda polimer bozunma hızının farklı boyuttaki parçacıklar için büyük ölçüde farklılık göstermediği bildirilmiştir (Panyam ve ark., 2003).

PNP'lerin parçacık büyüklük analizleri yaygın olarak foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ya da diğer adları ile dinamik lazer saçılımı ve yarı-elastik ışık saçılımı yöntemi ile gerçekleştirilmektedir (Haskell, 2006). Foton korelasyon spektroskopisi ortamın yoğunluğunun bilinmesini gerektirmekte ve parçacık çapı *Brown* hareketleri ve ışık tarama özellikleri ile belirlenmektedir (Mohanraj ve Chen, 2006). Daha çok 500 nm ve altındaki parçacıkların analizi için uygulanan PCS yöntemi, parçacık büyüklüğünü dispersiyonlardaki parçacıkların difüzyonu nedeniyle, parçacıklardan bireysel olarak saçılan ışığın şiddetinde meydana gelen dalgalanma sonucundaki gecikmeden hareketle analiz etmektedir. Otokorelasyon fonksiyon ile parçacıkların difüzyon katsayıları hesaplanabilmektedir (Malmsten, 2002a).

Parçacık büyüklüğü dağılımı geniş olan sistemlerde otokorelasyon fonksiyonunu kullanmak zor olabilmektedir. PCS yöntemi ile parçacık büyüklüğü dağılımının araştırılmasında karşılaşılan en önemli sorun, büyük parçacıkların bu yöntemle belirlenememesidir (Malmsten, 2002a).

PCS yöntemi ile elde edilen sonuçlar genellikle taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile onaylanmaktadır (Mohanraj ve Chen, 2006).

Parçacık büyüklüğünün ölçülmesi için PCS yönteminin yanısıra statik ışık saçılımı, ultrasonik spektroskopi, turbidimetri, nükleer manyetik rezonans, tek parçacık optik algılama, hidrodinamik ayırma, alan-akış fraksiyonu ve filtrasyon gibi yöntemler de kullanılmaktadır (Haskell, 2006).

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

PNP'lerin morfolojik yapılarının belirlenmesinde atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Sun ve ark., 2006), TEM (Sun ve ark., 2004; Wen ve ark., 2011), SEM (Galindo-Rodriguez ve ark., 2005) ile yüksek çözünürlük özelliği yardımıyla

morfolojik yapıların yanısıra kimyasal özelliklerin de belirlenebildiği analitik elektron mikroskobu kullanılmaktadır (Sun ve ark., 2006).

Nanopartiküller intravenöz olarak uygulandığında immün sistem tarafından kolaylıkla tanınmakta ve dolaşım sisteminden fagositler tarafından temizlenmektedir. Nanopartiküllerin boyutu dışında, yüzeylerinin hidrofobik özelliği de başlıca proteinler (opsonin) olmak üzere adsorblanan kan bileşenleri miktarını belirlemektedir. Dolayısıyla nanopartiküllerin *in vivo* kaderi bu durumdan etkilenmektedir. Opsoninlerin nanopartiküllerin yüzeyine bağlanması olarak bilinen posonizasyon nanopartikül ile fagosit arasında köprü görevi görür. Yüzeyi modifiye edilmemiş konvensiyonel nanopartiküller kan dolaşımında hızlıca opsonize olur ve büyük oranda mononükleer fagositik sistem (karaciğer, dalak, akciğer ve kemik iliği) makrofajları tarafından uzaklaştırılır. Bu nedenle nanopartiküller ile başarılı ilaç hedeflenmesi olasılığını arttırmak için opsonizasyonu en aza indirmek ve nanopartiküllerin kan dolaşımında kalış süresini uzatmak gerekmektedir (Mohanraj ve Chen, 2006). Nanopartikül yüzeyinin hidrofilik YEM ya da polimerler ile kaplanması veya nanopartiküllerin hidrofilik segmentler taşıyan biyoparçalanır kopolimerler (PEG, PEO, Tween® 80) ile formülasyonu gibi modifikasyonlar ile yüzey özellikleri iyileştirilebilmektedir (Calvo ve ark., 2001).

PEG tabakasının opsoninleri itici gücü nedeni ile nanopartikül yüzeyindeki PEG konformasyonunun son derece önemli olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Olivier, 2005).

Zeta potansiyel

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli yaygın olarak nanopartiküllerin yüzey yükü özelliklerini karakterize etmek için kullanılmaktadır. Zeta potansiyel parçacıkların elektriksel potansiyelini yansıtmakta ve parçacıkların bileşiminden ve dağıtılmış oldukları ortamdan etkilenmektedir. (+/-) 30 mV üstünde zeta potansiyel değerine sahip nanopartiküller agregasyon engellendiği için süspansiyon şeklinde kararlıdır. Zeta potansiyel ayrıca yüklü etkin maddenin enkapsüle ya da parçacık yüzeyine adsorbe olduğunun belirlenmesinde kullanılmaktadır (Mohanraj ve Chen, 2006).

PNP'lerin zeta potansiyel ölçümü PCS yardımı ile yapılabilmektedir (Tosi ve ark., 2007).

pH analizi

Polimerlerin yapısından ve oluştuğu monomerlerden bağımsız olarak, vücutta parçalanabilen poliesterin hidrolizindeki farklılıkları ortaya çıkaran en önemli parametre pH'dır. Düşük molekül ağırlıklı esterlerde olduğu gibi, poliester hidrolizi de hem asit hem de baz ile kataliz edilebilmektedir. Hidrolitik bozunma ve bozunmaya bağlı olarak oluşan etkin madde salımı düşük ve yüksek pH değerleri ile artırılabilirken, nötral pH'da genellikle sınırlanır (Malmsten, 2002b).

Polimerler kimyasal bozunmanın yanısıra enzimatik bozunmaya da uğrayabilmektedir. Enzimlerin aktivitesini belirleyen önemli parametrelerden birisi de pH olduğu için, polimerlerin hem enzimatik hem de kimyasal bozunmasında pH dikkate alınmalıdır (Malmsten, 2002b).

Etkin madde yüklenmesi

Başarılı nanopartikül sistemi yüksek etkin madde yükleme kapasitesine sahip olmalıdır. Böylece uygulama için matris materyal miktarı azaltılmış olacaktır. Etkin madde yüklenmesi nanopartikül üretimi sırasında etkin maddenin katılması veya nanopartikül oluşturulduktan sonra taşıyıcının doygun etkin madde çözeltisi ile inkübe edilmesi sonucunda etkin madde adsorpsiyon/absorpsiyon tekniği olarak iki yöntemle gerçekleştirilebilmektedir (Mohanraj ve Chen, 2006).

Etkin madde salımı

PNP'lerden etkin madde salımı difüzyon, sızma, kopma, parçalanma, polimerin erozyonu, hidrolizi ve iyon değiştirilmesi ile gerçekleşmektedir. Difüzyon mekanizması hariç diğer tüm mekanizmalar kontrollü salım sağlamaktadır. Difüzyon mekanizması parçacık boyutu nedeniyle kontrollü ve sürekli salım göstermemektedir (Kaş, 2002).

Etkin madde salımı, parçacık büyüklüğü, yüzey özellikleri, çeper ile matrisin gözenek sayısı ve yapısı, etkin maddenin ve polimerin özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Gürsoy, 2012).

Etkin maddenin *in vitro* salımının değerlendirilmesinde yapay ya da biyolojik membranlar ile difüzyon hücreleri, difüzyon tekniği ile diyaliz, ters diyaliz tekniği, ultrasantrifüj/santrifüjün ardından ajitasyon ve ultrafiltrasyon ya da santrifüj ile ultrafiltrasyon teknikleri gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir (Mohanraj ve Chen, 2006).

Polimerik nanopartikül formülasyonlarının kararlılığı

Partiküler sistemlerin çoğu termodinamik olarak kararlı değildir. Bu nedenle, bu tür dispers sistemlerde parçacıkların floküle olması ile makroskobik faz ayrışması gözleneceği düşünülmektedir (Malmsten, 2002a). Nanopartiküllerin kararlılığı arttırabildiği gibi yüksek yüzey alanına sahip olması nedeni ile kararlılığı azaltabildikleri de belirtilmiştir (Shah ve Khan, 2009). Nanosüspansiyonların mikro- veya makrosüspansiyonlar ile karşılaştırıldığında daha iyi kararlılığa sahip olduğu da yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Jacobs ve ark., 2000).

Partiküler sistemlerin formülasyonunu kararlı hale getirmek için yeterli ölçüde yüksek konsantrasyonların kullanılması gerekmektedir. Bu durumda etkin madde oksidasyona, hidrolize ya da fotolize eğilimli ise bozunmaya neden olabilir. Nanosistemler amorf ve kristalin etkin madde karışımı içerebilir. Bu tür sistemlerde uzun süreli uygun saklama koşulları belirlenmesi için kararlılık çalışmalarının sistematik olarak yürütülmesi gerekmektedir (Shah ve Khan, 2009).

Polimerik nanopartikül formülasyonlarının toksisitesi

Biyolojik olarak parçalanan polimerlerin birçok yararı olmasına karşın vücutta uzun süre kalmasından kaynaklanan bazı sakıncaları bulunmaktadır. Eğer polimer etkin madde salımı süresince bütünlüğünü koruyorsa bunun bazı üstünlüklerinin yanısıra bazı sakıncaları da olabilir. Bununla birlikte tedavi süresince vücudun polimer ile teması da istenmeyen durumları ortaya çıkarabilir. Etkin madde salımı sırasında parçalanan polimerler bu anlamda daha az toksisite niteliği taşır (Brannon-Peppas ve Peppas, 2002).

Doku enflamasyonu ve doku kapsülasyonu olması polimerin parçalanma hızını değiştirmektedir. Polimerin parçalanması sonucu oluşan monomerlerin, diğer metabolitlerin ve yan ürünlerin dolaşıma gireceklerini unutmamak gerekmektedir (Brannon-Peppas ve Peppas, 2002).

Polimerlerde toksisite sorunu genellikle polimerin üretimi ve işlenmesi sırasında kullanılan (katalizör, YEM, kararlılık sağlayıcı, v.b.) veya yapıya katılan maddeler (plastikleştirici, diğer katkı maddeleri), çevreden karışan kirlilikler ve yapıda polimerleşme sırasında kalan monomerlerden kaynaklanmaktadır (Brannon-Peppas ve Peppas, 2002).

PNP oluşturarak etkin maddenin uzun süre salımı ile kazanılan yararlar ile, polimerin parçalanmasından gelecek zararın çok iyi değerlendirilmesi gerekmektedir (Brannon-Peppas ve Peppas, 2002).

Polimerik nanopartiküllerin üstünlükleri

Nanopartiküller etkin maddenin terapötik etkinliğini arttırmak ve yan etkisini azaltmak amacıyla organlardaki dağılımını ve ardından atılımını değiştirerek ilacın taşınması sırasında ve etki yöresinde kontrollü ya da sürekli salımını sağlamaktadır (Mohanraj ve Chen, 2006). Farklı polimerlerin kullanımı ile PNP'lerden etkin madde salımının modifiye edilebilmesi, kanser tedavisi, aşuların ve kontraseptiflerin taşınması ve hedeflendirilen antibiyotiklerin taşınması gibi alanlarda nanopartiküle üstünlük sağlamaktadır (Yadav ve ark., 2012).

Nanopartiküller oral, nazal, parenteral, intraoküler (Mohanraj ve Chen, 2006), transdermal (Kaş, 2002), vb. birçok uygulama yolu ile kullanılabilir. Geleneksel oral ve intravenöz uygulama yöntemlerine olan bu üstünlükleri ile nanopartiküller önemli gelişme sunmaktadır (Yadav ve ark., 2012).

Parenteral uygulama sonrası pasif ve aktif hedeflendirmenin gerçekleştirilmesi için nanopartiküllerin parçacık büyüklüğü ve yüzey özellikleri kolaylıkla uygun hale getirilebilmektedir (Mohanraj ve Chen, 2006).

Bölgeye spesifik hedefleme, parçacıkların yüzeyine hedefleme ligandları tutturulması veya manyetik yönlendirme kullanılması ile gerçekleştirilebilmektedir (Mohanraj ve Chen, 2006).

Nanopartikülün kontrollü salım ve parçacık bozunma özellikleri matris bileşenlerinin seçimi ile kolaylıkla düzenlenebilmektedir. Etkin madde yükleme kapasitesi ise bağıl olarak yüksektir (Mohanraj ve Chen, 2006).

PNP'ler uçucu özellikteki farmasötik maddelerin kararlılığını arttırmaktadır. Bunun yanı sıra çok sayıda hazırlama yöntemi kullanılarak kolaylıkla ve ucuz maliyetle yüksek miktarda üretime olanak sağlamaktadır (Yadav ve ark., 2012).

Halosit Nanotüpler

Kimyasal olarak kaoline benzeyen iki tabakalı aluminosilikat olarak adlandırılan HNT, mikron- altı boyutta, içi boş tübüler yapıya sahip olan olağan dışı kil mineralleridir (Levis ve Deasy, 2002). Literatürde katmanlı ve küresel, kristal, kıvrımlı, glomerüler ya da soğanimsi yapıda bulunan farklı morfolojide HNT'lerden bahsedilmektedir (Duarte ve ark., 2012). Saf HNT beyaz mineraldir ve kolaylıkla ince toza dönüştürülebilmektedir (Abdullayev ve Lvov, 2013).

Halosit nanotüp ile formülasyon hazırlama yöntemleri

Sıcaklık uygulanarak formülasyon hazırlama

HNT'lere sıcaklık uygulanarak etkin madde yüklenmesi işlemi, HNT'lerin suda şişirilmesinin ardından etkin madde çözeltisinin eklenmesi ve sıcaklık uygulanarak manyetik karıştırıcı ile karıştırılması ile gerçekleştirilmektedir. Yöntem formülasyonların yıkanması, süspansiyonların santrifüj edilmesi ve kurutulması basamaklarını içermektedir (Ghebaour ve ark., 2012).

Vakum ile formülasyon hazırlama

Vakum kullanılarak etkin maddenin HNT'lere yüklenmesi etkin maddenin doygün çözeltisinin toz HNT ya da HNT çözeltisi ile karıştırılması ve yüksek vakum uygulanmasına dayanmaktadır (Lvov ve ark., 2008; Kamble ve ark., 2012). HNT'lere etkin madde yükleme kapasitesini arttırmak için, etkin madde eklenmeden önce boş toz haldeki HNT'lere vakum uygulanarak HNT lümenlerinin açılmasının ve HNT'nin etkin madde çözeltisi ile karıştırılıp vakum uygulanmasının tekrarlanması etkili olduğu bildirilmiştir (Levis ve Deasy, 2003; Vergaro ve ark., 2012).

Halosit nanotüplerin karakterizasyonu

Parçacık büyüklüğü

HNT duvarı alüminyum ve silikon oksit içeren 10-15 tabakadan oluşmaktadır. Ticari HNT örneklerinde dış çap 50-100 nm, iç lümen çapı 10-20 nm ve uzunlukları genellikle 0.5-2 µm aralığındadır (Abdullayev ve Lvov, 2013).

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

HNT'lerin silindirik tübüler yapılarının belirlenmesinde AFM (Kamble ve ark., 2012), TEM (Levis ve Deasy, 2002; Bordepong ve ark., 2011) ve SEM (Ghebaour ve ark., 2012) gibi elektron mikroskoplar kullanılmaktadır.

Lecouvet ve arkadaşları (Lecouvet ve ark., 2013) tarafından yapılan çalışmada AFM kullanılarak HNT'lerin esneklik katsayısı hesaplanmış, küçük deformasyonlara karşılık esneklik davranışı gözlenmiş ve HNT'lerin dış çapının azalması ile esneklik katsayısının arttığı bildirilmiştir.

Zeta potansiyel

HNT'lerin zeta potansiyeli geniş pH aralığında incelendiğinde düşük pH'larda pozitif yakın, pH 2-6 aralığında ise zeta potansiyelin keskin olarak azalma gösterdiği belirlenmiştir (Bordepong ve ark., 2011). pH 6-10 aralığında gözlenen plato sonrasında tekrar hafifçe azalma görülmektedir. pH'ya bağlı zeta potansiyel

azalmasının HNT'lerin eğri yapısından ve dış yüzeydeki silika gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir (Levis ve Deasy, 2002).

HNT'lerin iç yüzeyindeki alumina tabakası ve dış yüzeyindeki silika tabakasına ait olmak üzere HNT'lerde iç ve dış yüzey kimyasının birbirinden farklılığı HNT'lerin doğal özelliğidir. Alüminyum ve silikon oksitler farklı dielektrik ve iyonizasyon özellikleri taşıdığından pH 3-8 aralığında HNT'lerin sudaki iç ve dış yüklerinin zıt olduğu bilinmektedir. Zeta potansiyel ölçümü tüm parçacık hareketinin elektroforetik hareketine dayandığından, HNT'nin zeta potansiyeli iç lümenin yükünden etkilenmeksizin silika yüzeyinin zeta potansiyeli ile oldukça eşdeğerdir (Abdullayev ve Lvov, 2013).

Zeta potansiyel süspansiyonlarda yeniden dağılılabirliğin sağlanmasında ve kararlılığın değerlendirilmesinde önem taşıyan bir parametredir (Öner, 2012).

Termal analiz

HNT'lerin termal analizinde termogravimetrik analiz (Ghebaour ve ark., 2012), diferansiyel taramalı analiz (Bordeepong ve ark., 2011) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) cihazları kullanılmaktadır.

Difenhidramin yüklü HNT formülasyonunun değerlendirilmesinde, ağırlık kaybı ve termal degradasyonun gerçekleştiği sıcaklıklar karşılaştırılarak etkin madde ve HNT etkileşimi hakkında fikir edinilmiştir (Ghebaour ve ark., 2012).

Yapı analizi

Yapı analizinde kullanılan X-ışını floresansı (XRF), X-ışını kırınımı (XRD) ve XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) HNT örneklerinin mineralojik incelenmesinde kullanılmaktadır.

Bordeepong ve arkadaşlarının (Bordeepong ve ark., 2011) gerçekleştirdiği çalışmada, HNT'lerin kimyasal bileşiminin ve yanmaya karşı ağırlık kaybının belirlenmesinde XRF ve XRD kullanılmıştır. Levis ve Deasy (Levis ve Deasy, 2002) ise XRD yöntemini kullanarak HNT örneklerinin hidrate olup olmadığını araştırmıştır.

Ghebaour ve arkadaşlarının (Ghebaour ve ark., 2012) yaptıkları çalışmada XPS yöntemi kullanılarak piklerde meydana gelen kaymalar nedeni ile HNT'nin silanol ve alüminol grupları ile difenhidramin arasında etkileşim olduğu bildirilmiştir.

Moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak gerçekleştirilen Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) HNT'lerin bağ durumları, bağlanma yerleri ve fonksiyonel grupları hakkında bilgi vermektedir (Viseras ve ark., 2009). Karakterizasyon yöntemi olarak FTIR kullanılan bir çalışmada, HNT'lere difenhidraminin yüklendiği spektrumdaki HNT'ye ait belirleyici pikler ile gösterilmiştir (Ghebaour ve ark., 2012). Guo ve arkadaşları (Guo ve ark., 2012) tarafından yürütülen bir çalışmada folik asitin HNT yüzeyine konjugasyonu FTIR verileri kullanılarak açıklanmıştır.

Etkin madde yüklenmesi ve etkin madde salımı

HNT'ler etkin maddeleri çekirdek lümeninde ve çok tabakalı silindirde boşluk kalmayacak şekilde hapsetme yeteneğine sahiptir. (Kamble ve ark., 2012). Çeşitli yöntemlerle yüklenmiş olan hidrofilik veya hidrofobik nitelikte etkin maddelerin

kontrollü ya da sürekli salım yapmasını sağlayabilmektedir (Levis ve Deasy, 2003; Veerabadran ve ark., 2007).

Literatürde nikotinamid adenin dinükleotit, kellin ve tetrasiklin gibi hidrofilik etkin maddelerin HNT'lere yüklendiği ve salım süresinin 2-5 saat olduğu belirtilirken (Price ve ark., 2001), deksametazon, furosemit ve nifedipin gibi suda düşük çözünürlüğe sahip etkin maddelerin 5-20 saat aralığında salım yaptığı gösterilmiştir (Veerabadran ve ark., 2007).

Levis ve Deasy (Levis ve Deasy, 2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada HNT'lere suda çok çözünür diltiazem hidroklorür (HCl) ve düşük molekül ağırlıklı propranolol HCl yüklenmiş ve çözünme profilleri incelenmiştir. Propranolol HCl yüklü HNT'lerde daha uzun süreli sürekli salım profili elde edilmiştir. Polietilenimin ya da polisiyanoakrilat gibi farklı polimerik materyaller ile diltiazem yüklü HNT'lerin modifikasyonu ile salım hızında azalma gözlenmiştir.

HNT'lerden yalnızca ilaç endüstrisinde değil aynı zamanda boyaların katkı maddelerinin, dolgu maddelerinin, kaydırıcıların, herbisitlerin, böcek kovucularının, bazı ev, yemek ve kişisel ürünlerdeki etkin maddelerin, kozmetik nitelikli hammaddelerin, v.b. ajanların kontrollü ya da sürekli salımında yararlanılmaktadır (Du ve ark., 2010).

Nanotaşıyıcı sistem olarak bilinen HNT'lere antikoroziyon ajan olan benzotriazolün yüklendiği çalışmada HNT'lerin uzatılmış salım gerçekleştirdiği ve salım profilinin *Peppas* modeline uygun olduğu belirlenmiştir (Abdullayev ve ark., 2009).

HNT'lerin yanık tedavisinde kullanımının yararlı olacağını belirttiği bir diğer çalışmada etkin madde yüklü HNT'lerin bandaj tabanına gömülmesi ile etkin maddenin uzatılmış salımının sağlanacağı düşünülmüştür. Böylece bandaj yenileme sıklığı azaltılarak hasta memnuniyetinin ve ilaç etkinlik süresinin arttırılacağı belirtilmiştir (Kamble ve ark., 2012).

Kozmetik uygulamalar için kişisel bakım ürünlerinde HNT'lerin kullanımı ile ilgili etkinlik ve güvenlik testleri sürmektedir. Nemlendirici ajan olarak kullanılan gliserolün yüklenmesi ve kontrollü salımı için HNT'ler doğal nanotaşıyıcı sistemlerdir (Kamble ve ark., 2012).

Halosit nanotüplerin kararlılığı

Doğal HNT'lerin oda sıcaklığında ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) saf su, asidik ve bazik ortamda uzun süreli kararlılık çalışmaları yapılmıştır (White ve ark., 2012). Asidik ortamda bekletilen HNT'lerde çözünmenin amorf ve küresel SiO_2 (silikondioksit veya silika) nanopartikülleri oluşmasına yol açacak şekilde nanotüplerin iç yüzeyinde başladığı, aksine bazik ortamda bulunan HNT'lerde çözünmenin nanopartiküllerin iç yüzeyinde fakat $\text{Al}(\text{OH})_3$ nanotabakası oluşumunun eşlik etmesi ile gerçekleştiği bildirilmiştir.

Halosit nanotüplerin toksisitesi

Günümüzdeki çalışmalar HNT'lerin hücre üzerine toksik olmadığını göstermiştir (Kamble ve ark., 2012). İnsan dermal fibroblast ve meme hücrelerinin kullanıldığı *in vitro* sitotoksikite çalışmalarında saf HNT'nin sodyum klorürden 50 kat daha az toksik olduğu belirlenmiştir (Veerabadran, 2009). Lai ve arkadaşları (Lai ve ark., 2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise genel protein ekspresyonu analizi

kullanılarak Caco-2/HT29-MTX hücrelerinin yaşayabilirliği, sitotoksosite, engel permeabilitesi ve sitokin ölçümleri gerçekleştirilmiş ve kültüre 100 µg/mL konsantrasyonda HNT ekleninceye kadar toksisite gözlenmemiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, HNT'lerin toksisite göstermediği ve yüksek derecede biyouyumluluk sergilediğine karar verilmiştir.

Konfokal mikroskop kullanılarak HNT'lerin hücreye alımının incelendiği bir çalışmada ise nanopartiküllerin hücreye penetre olduğu, çekirdek çevresinde yoğunlaştığı ve hücrede HNT birikiminin hücre çoğalmasını engellemediği saptanmıştır (Vergaro ve ark., 2010).

Halosit nanotüplerin üstünlükleri

HNT'ler biyolojik olarak uyumlu, doğal ve toksik olmayan bir maddedir ve *EPA 4A (List 4A - Minimal Risk Inert Ingredients)* (http-1) listesinde yer almaktadır. İnce toz halinde olan HNT'lerin parçacık boyutu ufaktır. İyi dağılım gösterdikleri gibi yüksek yüzey alanına sahiptirler (Kamble ve ark., 2012).

Salım çalışmalarında tekdüze ve sürekli salım yaptıklarını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Guo ve ark., 2012). HNT'ler uyarılmadıkça salımı engelleme ve etkin maddeyi ayarlanabilir salım hızında etkin maddeyi serbestleştirme özelliğine sahiptirler. Özellikle stimulan ve hormon gibi tekdüze ilaç salımının önemli olduğu taşıyıcı sistemlerde güvenilir bir salım profili oluşturmaktadır (Kamble ve ark., 2012).

Lümenlerine hapsettikleri etkin maddeyi sert bir işleme maruz kaldıklarında korurlar. Eş zamanlı olarak çoklu etkin madde yükleme kapasitesine sahiptirler. Yüksek oranda boşluk içerirler. HNT'ler toz, krem, jel, losyon ve sprej gibi çok çeşitli farmasötik şekillerde uygulanabilirliğe sahiptir (Kamble ve ark., 2012).

Halosit nanotüplerin uygulama alanları

HNT biyouyumlu olması nedeni ile son yıllarda medikal araştırmaların ve uygulamaların aranan maddesi olmuştur (Abdullayev ve Lvov, 2013). Antihipertansif (Levis ve Deasy, 2003), antiseptik (Wei ve ark., 2014), antihistaminik (Ghebaour ve ark., 2012), antikanser (Guo ve ark., 2012), antioksidan (Vergaro ve ark., 2012), vazodilatör (Veerabadran ve ark., 2007), düretik (Veerabadran ve ark., 2007) ve kortikosteroid yapısında (Veerabadran ve ark., 2007) çeşitli etkin maddelerin HNT'lere yüklenebildiği bildirilmiştir.

Etkin madde içermeyen HNT'ler absorplayıcı özellikleri nedeni ile istenmeyen toksinleri ve estetik açıdan hoş olmayan yağları uzaklaştırabilme yeteneğine sahiptir (Kamble ve ark., 2012). HNT'ler ölü hücreleri uzaklaştırarak cildin genç ve sağlıklı görünmesine olanak sağlayarak cildi nazikçe soyma görevini üstlenmektedir.

İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmalarının yanı sıra HNT'ler metal korozyonunun önlenmesinde, termal kararlılığın artırılmasında, nanokompozitlerin mekanik ve morfolojik özelliklerinin iyileştirilmesinde, hücre kültürü çalışmalarında hücresel yanıt oluşumunda, enzim ve metal iyonlarının immobilizasyonunda, çeşitli polimerizasyon reaksiyonlarında katalitik destekleyici görevinde ve endüstride adsorban ya da katkı maddesi olarak birçok alanda kullanılmaktadır (Rawtani ve Agrawal, 2012).

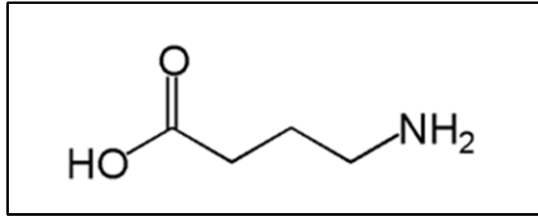
Gama-aminobutirik asit

γ -aminobutirik asit (GABA) fizyolojik açıdan fonksiyonel ve proteinik yapıda olmayan bir aminoasittir (Jiang ve ark., 2010). Ökaryotlar ve prokaryotlar arasında geniş dağılım gösterir (Yang ve ark., 2010).

GABA suda serbestçe çözünen, diğer çözücülerde zayıfça çözünen ya da hiç çözünmeyen, -COOH (karboksil) ve -NH₂ (amino) grubu taşıyan nöromediyatör ajandır (The Merck Index, 1989). Molekül ağırlığı 103.12 g.mol⁻¹ olan GABA 4-aminobütanoik asit, γ -amino-n-butirik asit, piperidik asit, vb. olarak da adlandırılabilir (**Şekil 8**) (The Merck Index, 1989; Martindale, 2009).

GABA fizyolojik pH'larda 4.03 ve 10.56 pKa değerleri ile zwitteriyon davranış (hem pozitif yük hem de negatif yük taşıyan) göstermektedir (Jiang ve ark., 2010; Yang ve ark., 2010).

SSS ana inhibitör nörotransmiteri olarak tanımlanan GABA'nın serebral bozukluklarda önemli olduğu ve aynı zamanda antihipertansif etkiye sahip olduğu çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir (The Merck Index, 1989; Martindale, 2009).



Kapalı Formülü: C₄H₉NO₂

Açık Formülü:

4-aminobütirikasit

Şekil 8. GABA'nın Kimyasal Yapısı, Açık ve Kapalı Formülü

GABA'nın farmakolojik özellikleri

GABA sinir iletiminin sağlanması, hipotansif, diüretik ve sakinleştirici etkilerin indüksiyonu gibi birçok biyolojik fonksiyona sahip biyoaktif bir maddedir (Jiang ve ark., 2010). GABA ilk kez 1883'te sentezlenmiş ve önceleri yalnızca bitki ve mikroorganizmaların metabolik ürünü olduğu düşünülmüştür (Yang ve ark., 2010). 1950'lerde ise memeli beyin dokusunda keşfedilen GABA günümüzde memelilerin SSS'sinin en önemli ana inhibitör nörotransmiteri olarak tanımlanmaktadır (Jiang ve ark., 2010). GABA salınan (GABAerjik) nöronlar beyin ve daha az olarak omuriliğin her tarafına yayılmıştır (Kayaalp ve Uzbay, 2009). Tüm santral sinapsların %30-50'sinin GABAerjik olduğu bildirilmiştir (Jiang ve ark., 2010).

GABA, GABAerjik sinir uçlarında glutamik asit dekarboksilaz enzimi katalizörliğünde glutamik asitin dekarboksillenmesi ile oluşur. Böylece oluşan GABA, sitoplazma içinde kendine özgü veziküller içinde toplanır. Sinir ucu depolarize edildiğinde, GABA parsiyel ekzositoz aracılığıyla salınır. Beyin dilimlerinden ve sinaptozomlardan elektriksel uyarının ve depolarizasyon yapan diğer etmenlerin kalsiyuma bağımlı olarak GABA salımına neden oldukları gösterilmiştir (Kayaalp ve Uzbay, 2009).

Sinaps aralığına salınan GABA'nın inaktivasyonu, esas olarak salıverildiği uca geri-alım (re-uptake), çevredeki glia hücreleri içine alım (uptake) aracılığıyla ve kısmen de difüzyon ile gerçekleşir. Bu olaylar, hücre membranına yerleşmiş yüksek

afiniteli ve düşük afiniteli iki transportör (aktif transport pompası) tarafından gerçekleştirilir. Düşük afiniteli alım mekanizması yalnızca sinapta GABA konsantrasyonu aşırı dereceye çıktığında çalışır. Sitoplazmaya geçen GABA, GABA transaminaz (GABA-T) enzimi tarafından süksinik semialdehite yıkılır; inaktif olan bu madde trikarboksilik asit döngüsüne girer ve sonuçta GABA öncülü olan glutamik asite dönüşmüş olur (Kayaalp ve Uzday, 2009). GABA-T başlıca nöronlar ve glia hücreleri olmak üzere SSS'de yaygın olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda trombositler, böbrek, karaciğer ve kalp gibi çeşitli dokularda da bulunmaktadır (Rainesalo, 2004).

GABA, klasik sinapslarda postsinaptik membranda veya akso-aksonik sinapslarda yer alan GABA reseptörlerini aktive eder. Böylece GABA hiperpolarizasyon ve buna bağlı postsinaptik ve presinaptik inhibisyon yapar (Kayaalp ve Uzday, 2009). GABA reseptörleri, klor iyonlarına seçici geçirgen olan GABA_A ya da GABA_C reseptörleri veya hücre içi siklik adozin trifosfat düzeyini azaltan ve K⁺ kanalı membranlarını açan G-proteinine bağlı olan metabotropik GABA_B reseptörleridir (Rainesalo, 2004).

GABA metabolizmasındaki değişiklik epileptik nöbet kaynağı olarak ve aynı zamanda nöbetin yayılmasında önemli rol oynar (Sherwin; 1999). Birçok çalışmada epileptik neokortekste GABA_A reseptörlerinin azaldığı ve GABA taşıyıcıların düzensizliği ile nöronal eksitabilitenin azaldığı öne sürülmüştür (Petroff ve ark., 2002; Conti ve ark., 2004). Çeşitli epileptik sendromlu hastaların beyin omurilik sıvısında (BOS) GABA düzeyinde önemli azalma görülmüştür (Schmit ve Löscher, 1982). Mikrodialize dayalı gerçekleştirilen GABA ölçümleri, epileptojenik hipokampüste nöbet ile uyarılmış GABA salımında azalma olduğunu göstermiştir. Bu durumun GABA taşıyıcılarda fonksiyonel hasar olduğunu yansıttığı sonucuna varılmıştır (Petroff, 2002). Manyetik rezonans spektroskopisi ile ölçülen oksipital lop GABA konsantrasyonunun kompleks parsiyel nöbetleri olan epileptik hastalarda sıklıkla normal düzeyin altında olduğu bildirilmiştir (Petroff ve ark., 1996).

Beynin doğal yatıştırıcı ajanı olarak tanımlanan GABA epilepsi dışında, depresyon (Sanacora ve ark., 2004), anksiyete (Crittenden, 2004), panik bozukluk (Goddard ve ark., 2001), *Alzheimer* hastalığı, *Parkinson* hastalığı, bipolar bozukluk, şizofreni (Quinones ve Kaddurah-Daouk, 2009) ve *Huntington* hastalığı (Crittenden, 2004; Zhao ve Suo, 2008) gibi çok sayıda psikiyatrik ve nörolojik bozuklukla yakından ilişkilidir.

GABA inhibitör olarak davranmasının dışında hipotansif etkisi (Hayakawa ve ark., 2005), epilepsi tedavisindeki rolü (Ueda ve ark., 2007), sakinleştirici potansiyeli ve hafızayı iyileştirmedeki önemli etkisi ile çeşitli fizyolojik görevlere de sahiptir (Lu ve ark., 2009). Ayrıca hormon sekresyonunu düzenleme (Parkash ve Kaur, 2007) ve karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını uyarma gibi etkileri de bulunmaktadır (Lu ve ark., 2009).

GABA farklı etkilerine ek olarak, vücudun farklı bölgelerindeki hücre proliferasyonuna da yardımcı olmaktadır. GABA'nın proliferatif rolü ile testislerde *TM3 Leydig* hücre çoğalmasında (Geigerseder ve ark., 2004), tavşanlarda dış retinanın gelişmesinde (Messersmith ve Redburn, 1993) ve sinir iltihabının gelişiminde, hücre proliferasyonu ve göçünün organize edilmesinde (Ben-Yaakov

ve Golan, 2003) etkili olduğu gözlenmiştir. GABA ve serotonin yüklü nanopartiküllerin hazırlandığı bir çalışmada, nanopartiküllerin karaciğerde hepatosit proliferasyonunu arttırarak doku yenilenmesini arttırdığı ve böylece nanopartiküllerin karaciğer merkezli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (Shilpa ve ark., 2012).

GABA'nın kararlılığı

GABA'nın toz halde ve çözelti şeklinde kararlılığına ilişkin bazı görüşler Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration- FDA*) tarafından bildirilmiş (http-2), GABA'nın kuru ve serin (10 °C ya da daha az) alanda saklanması önerilmiştir.

GABA'nın toz şekli üzerinde gerçekleştirilen uzun süreli kararlılık çalışmalarında oda sıcaklığında 27 ay süresince kararlı kaldığı saptanmış ve çalışmalar sonunda toz GABA'nın raf ömrünün yaklaşık 2 yıl olduğu belirlenmiştir (http-2).

Yükseltmiş sıcaklıklarda GABA kararlılığını belirlemek için toz GABA 60 dakika boyunca 120°C, 140°C ve 160°C'ye maruz bırakılmış ve 120°C'de yüksek kararlılık gözlenirken sıcaklık arttıkça kararlılığın büyük ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (http-2).

GABA güçlü oksitleyici ajanlarla geçimsizdir ve azot oksit, karbonmonoksit ve karbondioksit maruziyeti sonucu bozunma reaksiyonu gözleneceği belirtilmiştir (http-3).

Çözelti halindeki GABA'nın kararlılığının değerlendirilmesinde ise %5'lik GABA çözeltisi nötr pH'da 30 dakika süresince 100°C ve 120°C'ye maruz bırakıldığında her iki sıcaklıkta da güçlü kararlılık profili görülmüştür. Periyodun 120 dakikaya çıkarılması ile 100°C'de çözeltideki GABA içeriği kararlı olarak kalırken, 120°C'deki GABA içeriği düşük oranda azalmıştır (http-2).

GABA çözeltisi üzerine pH etkisi incelendiğinde, pH 2-6 aralığında GABA'nın çok kararlı olduğu ancak alkali koşullar altında kararlılığın yavaş yavaş azaldığı belirtilmiştir (http-2).

GABA'nın miktar tayini yöntemleri

GABA'nın biyolojik örneklerde belirlenmesinde manyetik rezonans spektrometri (MRS) (Rothman ve ark., 1993; Ke ve ark., 2000), elektrokimyasal sensör (Niwa ve ark., 1998), florometri (Molnár-Perl ve Bozor, 1998), spektrofotometri (Zhang ve Bown, 1997), kapiller elektroforez (Rada ve ark., 1999), radyo reseptör analiz (Schmidt ve Löscher, 1982; Mousah ve ark., 1987), gaz (Palaty ve ark., 1994) ve sıvı kromatografisi (Clarke ve ark., 2007; Reisi ve ark., 2009) gibi çeşitli analitik yöntemlerin kullanıldığı bildirilmiştir.

Psikiyatrik ve nörolojik bozukluklar ile yakından ilişkili bir nörotransmitter olan GABA'nın tayininde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi çok önemli yer tutmaktadır. HPLC yöntemleri kapsamında kolon öncesi ve analitik ya da mikro-boru kolonlar kullanılarak kolon sonrası türevlendirme ayrıntılı olarak rapor edilmiştir (Khuhawar ve Rajper, 2003). Kolon öncesi türevlendirme amacıyla çeşitli çalışmalarda kullanılan maddeler arasında 2,4,6-trinitrobenzensülfonik asit, dansil klorür (Kang ve ark., 2006), orto-fitaldialdehit (OPA) (Reisi ve ark., 2009), dabsil klorür (Krause ve ark., 1995), 6-aminokuinolinil-N-hidroksisüksinimidil

karbamat (Salazar ve ark., 2012), 2-hidroksinaftilaldehit (Khuhawar ve Rajper, 2003), naftilen-2,3-dikarboksialdehit (NDA) (Clarke ve ark., 2007), 9-florofenilmetil kloroformat (Sandberg ve ark., 2003) ve feniltiyokarbomil türevleri (Vasanits ve Molna'r-Perl, 1999) bulunmaktadır.

Diabetli sıçanlarda hipokampüsteki sinaptik aksaklığın değerlendirildiği bir çalışmada, GABA ve glutamat düzeyi OPA ve 2-merkaptotanol (BME) ile türevlendirmenin ardından floresan dedektör kullanılarak HPLC ile belirlenmiştir (Reisi ve ark., 2009). OPA türevlendirmesi ile GABA tayini yapılan diğer bir çalışmada sıçan beyninin hipokampus, talamus ve prefrontal (alın) korteksi gibi çeşitli bölgelerindeki GABA düzeyi floresan dedektör ile dokuz dakikadan kısa sürede belirlenmiştir (Silva ve ark., 2009).

Oral yolla uygulanan L-glutaminin bazal gangliyon dokusundaki ve ekstraselüler sıvıdaki GABA düzeyi üzerine etkisinin incelendiği bir başka çalışmada OPA/sülfür kolon öncesi türevlendirmesi yapılmış ve HPLC yöntemi kullanılarak elektrokimyasal dedektör ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Wang ve ark., 2014). Başka bir çalışmada da, OPA/sülfür türevlendirmesinin ardından 5-7 °C'de beyin homojenatlarında GABA, glutamat ve glutamin miktarı elektrokimyasal dedektör taşıyan HPLC ile analiz edilmiştir (Monge-Acuña ve Fornaguera-Trías, 2009).

Clarke ve arkadaşları (Clarke ve ark.,2007) tarafından NDA ile türevlendirme sonrası gerçekleştirilen GABA analizi için elektrokimyasal veya floresan dedektör ile saptama sağlayan bir yöntem tanımlanmıştır. Sıçan beyninden çıkarılan hipotalamus, ön korteks, beyin sapı ve hipokampus gibi beyin belli bölgelerindeki GABA düzeyinin belirlenmesinde kullanılan bu yöntemin izokratik elüsyon protokolüne dayandığı, tekrarlanabilir olduğu ve adı geçen beyin bölgelerinde uzun süreli değişiminin aydınlatılmasında başarı ile kullanılabileceği bildirilmiştir.

Gerçekleştirilen başka bir çalışmada 2-hidroksinaftilaldehit ile kolon öncesi türevlendirme yapılarak glisin, l-lizin, tiramin ve GABA içeren aminoasit karışımından GABA ayrılarak BOS'da GABA tayini yapılmıştır (Khuhawar ve Rajper, 2003).

Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi yönteminin kullanıldığı çalışmada beyin sinaptozomlarından ekstre edilen GABA, di(ters-butyl(dimetilsilil) ile türevlendirmenin ardından GABA-d6'nın internal standart olarak kullanılmasıyla etkili şekilde analiz edilmiştir (Palaty ve ark., 1994).

Zhang ve Brown (Zhang ve Brown, 1997) GABA'nın ekstraksiyonu ve analizi için 340 nm dalga boyunu kullanan 10-100 nmol aralığındaki GABA düzeyi için doğrusal olan enzim analizine dayanan spektrofotometrik bir yöntem tanımlamışlardır.

Rada ve arkadaşları (1999) insan plazma ve beyin mikrodializ örnekleri üzerinde miseller elektrokinetik kromatografi (MEKC) yardımıyla GABA analizini başarı ile gerçekleştirmiştir. Çalışmada, mikrodializ ile birlikte kullanılan lazer ile uyarılmış floresan dedektör taşıyan MEKC kullanılarak GABA'nın elektroforetik hareketliliği az olmasına karşın hareketli faza YEM eklenerek ayırma partiyon katsayısına bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından yöntemin farklı vücut sıvılarında GABA belirlenmesindeki uygunluğu kanıtlanmıştır. Başka bir çalışmada, NDA ile türevlendirmeye dayalı olarak MEKC ve lazer ile uyarılmış

floresan yöntemi ile beyin *in vivo* görüntülenmesi için mikrodializ örnekleri kullanılarak GABA'nın basit, hızlı ve doğru biçimde ölçülebildiği belirlenmiştir (Kaul ve ark., 2011).

GABA içeren ticari preparatlar

GABA içeren ticari preparatlar **Çizelge 3**'te sunulmuştur. Görüldüğü üzere GABA birçok diğer madde grubu ile birlikte formüle edilmiştir.

Çizelge 3. GABA İçeren Ticari Preparatlar (http-5, http-6)

Preparat İsmi	Firma İsmi	Farmasötik Şekli	Kullanım Amacı
Actebral®	Sanofi Aventis	Dedietilaminoetil-p-aminobenzoato HCl, 150 mg GABA, hematoporfirin HCl içeren kapsül	Zihinsel fonksiyon bozukluğu
Aminalon®	Akrikhin	250 mg GABA içeren film kaplı tablet	Beyindeki metabolik ve vasküler bozukluklar, bellek, dikkat ve konuşma bozuklukları, çocuklarda serebral felç, deniz ve hava taşıtı tutması
Bainto®	T.P. Drug Laboratorios	250 mg GABA içeren tablet	Zihinsel fonksiyon bozukluğu, amnezi, konuşma bozuklukları, felç, hipertansiyon
Cadencial Plus®	Poen Laboratorios	Sinnarizin, 250mg GABA, Vitamin B ₆ içeren tablet	Serebrovasküler bozukluklar, vasküler göz bozuklukları, vestibüler bozukluklar
Cebrocal®	Recalcine Laboratorios	Asetilglutamin, γ -aminohidroksi butirik asit, 250 mg GABA, Vitamin B ₆ içeren kapsül	Düşük okul performansı, global sorunlar ve özgül öğrenme güçlüğü, motor koordinasyon güçlükleri
Cefabol®	Robert	40 mg GABA, sodyum sitidin, aminohidroksi butirik asit, magnezyum glutamat hidrobromür, üridin trifosfat, piridoksin HCl içeren kapsül	Mental fonksiyon bozukluğu, tonik
Complevit®	EMS Industria Farmaceutica	GABA, Buklizin içeren enjeksiyonluk çözelti	Tonik, iştah azalması, taşıtı tutması, vertigo
Gaba®	Neurogistics	100 mg GABA içeren lipozomal formülasyon, 200 mg GABA içeren kapsül	Anksiyete, rahatlama ve uyku desteği

Çizelge 3. (Devam) GABA İçeren Ticari Preparatlar (http-5, http-6)

Gaba®	Nikkho do Brasil Quimica e Farmaceutica	GABA, papaverin HCl, nikotinik asit, kalsiyum pentotonat içeren kapsül	Bozulmuş mental fonksiyon
Gaba®	Solgar	500 mg GABA içeren kapsül	Sinir sistemi destek ürünü, rahatlama sağlama
Gaba Calm®	Serene Science	125 mg GABA, glisin, N- asetil-L-tirozin, taurin içeren dilaltı tableti	Yatıştırıcı etki
Gabakalm®	The Cantassium Company	GABA, multivitaminler, multimineraler içeren kapsül	Vitamin desteği
Gaballon®	Nikkho do Brasil Quimica e Farmaceutica	50 mg GABA, lizin HCl, Vitamin B ₁ , B ₅ ve B ₆ içeren tablet ya da 10mg/mL GABA içeren şurup	Vitamin desteği
Gabax®	Nikkho do Brasil Quimica e Farmaceutica	GABA, vitamin B ₆	Bozulmuş mental fonksiyon
Gabormon®	Nikkho do Brasil Quimica e Farmaceutica	GABA, metiltestosteron	Androjen eksikliği, gecikmiş puberte (erkek), gecikmeli büyüme, meme kanseri (kadın)
Gamalate B6®	Andromaco Laboratorios, Ferrer Farma	75 mg GABA, gama- amino beta hidroksibütirik asit, magnezyum glutamat hidrobromür, vitamin B ₆ içeren draje ve aynı içerik 100mg GABA/5mL şurup	Zihinsel fonksiyon bozukluğu, bunama
Gammalon®	BCM	250 mg GABA içeren tablet	Serebrovasküler bozukluklar, kafa travması, hipertansiyon, alkolik ensafalopati ve polinevrit, Pediatri: serebral felç, zihinsel gelişim geriliği, doğum travması etkileri
Gammar®	Nikkho do Brasil Quimica e Farmaceutica	250 mg GABA içeren tablet	Bozulmuş mental fonksiyon

Çizelge 3. (Devam) GABA İçeren Ticari Preparatlar (http-5, http-6)

Id Sedin®	Nikkho do Brasil Quimica e Farmaceutica	20 mg GABA, 0.2 mg rezerpin içeren tablet	Serebral bozukluk
L-Theanine Complex	Solgar	100 mg GABA, L- Theanin, kedi otu ekstresi içeren kapsül	Stres
Neurocordin®	Solvay	Aseglutamit, GABA, magnezyum pemolin, piritinol içeren tablet	Zihinsel fonksiyon bozukluğu, hiperaktivite
Organoneuro Cerebral	Gross Laboratorio	100 mg GABA, kalsiyum fosfat, glutamik asit, Vitamin B içeren tablet	Vitamin kompleksi, nevrit ve polinevrit,
Vitamil®	Laborsil Industria Farmaceutica	GABA, buklizin, Vitamin B içeren kapsül	Tonik, iştah azalması, taşıt tutması

GEREÇLER

Kullanılan Maddeler

Akrilamit	: Merck, Almanya
2-akrilamido-2-metil propansülfonik asit	: Merck, Almanya
Amonyum persülfat	: Sigma Aldrich, Almanya
Asetonitril	: Sigma Aldrich, Almanya
Azoizobutironitril	: Sigma Aldrich, Fransa
Benzoil peroksit	: Merck, Almanya
β -merkaptolanol	: Aldrich, Almanya
Bromfenol mavisi	: Sigma Aldrich, Almanya
Dimetilkokoamin	: Sigma, Almanya
Diklorometan	: Sigma, Almanya
Dimetilasetamit	: Sigma Aldrich, Fransa
Dimetilsülfoksit	: Merck, Almanya
Disodyum hidrojenfosfat	: Merck, Almanya
Diokzan	: Sigma Aldrich, Fransa
Gama-aminobutirik asit	: Sigma, Çin
Etanol	: Merck, Almanya
Fosforik asit	: Alfa Aesar, Almanya
N,N-İzopropilakrilamit	: Sigma Aldrich, Almanya
Kalsiyum karbonat	: Merck, Almanya
Kloroform	: Merck, Almanya
Maleik anhidrit	: Merck, Almanya
Selüloz ester membran	: Biotech, Amerika
Metakrilik asit	: Sigma Aldrich, Almanya
Metanol	: Sigma Aldrich, Fransa
Metil metakrilat	: Sigma Aldrich, Fransa
n-Hekzan	: Merck, Almanya
N,N-Dimetilakrilamit	: Sigma Aldrich, Fransa
N,N-Metilenbisakrilamit	: Fluka, İsviçre
Oktodesilamin	: Fluka, Almanya
o-fitaldialdehit	: Merck, Almanya
Pentilentetrazol	: Sigma Aldrich, Almanya
Perklorik asit	: Merck, Almanya

Polietilen glikol 2000	: Merck, Almanya
Polietilen glikol 1000	: Merck, Almanya
Polietilen glikol 1500	: Merck, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	: Fluka, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
Sodyum klorür	: Fluka, Almanya
Sodyum tetraborat	: Merck, Almanya
Sodyum tetrafloroborat	: Sigma, Fransa
Tetrahidrofur	: Sigma, ABD
Vinil benzil klorür	: Sigma, Almanya

Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik No Frost, Türkiye
Derin Dondurucu	: Bosch, Almanya
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	: Shimadzu DSC-60, Japonya Ekstar DSC 6200 TETRA, Amerika
Distile Su Cihazı	: Millipore, Fransa
ELİSA Yıkama Cihazı	: Utrao, Çin
Enzim İmmün Yöntemi Analiz Cihazı	: Thermo Lab Original Systems Multiskan EX, Amerika
Erime Derecesi Tayin Cihazı	: Electrothermal 9300, Amerika
Etüv	: Nüve FN500, Türkiye
Fouriyer Dönüşümlü İnfrared Spektrofotometresi	: Shimadzu IR Prestige-21, Japonya
Hassas Terazi	: Ohaus, İsviçre
İnkübatör	: Combi SV12dx Fine PCR, Kore
Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı)	: Heidolph MR 300/K, Almanya IKA®-Werke, Almanya
Otoklav	: Hirayama HVE50, Japonya
Parçacık Büyüklüğü Analiz Cihazı	: Zetasizer Nano Series, İngiltere
pH metre	: WTW Profi Lab Ph 597, Almanya
Santrifüj	: Eppendorf Centrifuge 5417R, Almanya
Steril Kabin	: Kojair Blue Series Technology, Biowizard XtraLine, Finlandiya

Taramalı Elektron Mikroskobu	: FESEM SUPRATM 50 VP ZEISS, Almanya
Ultrasonik Banyo	: Elma T470/H, Singen, Almanya
Ultraturaks	: T25 Janke & Kurtel IKA® Labortechnik
X-Işını Kırınım Cihazı	: XRD-Rikagu Rint 2000, Japonya
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	: Shimadzu 20-A, Japonya
Zeta Potansiyel Analiz Cihazı	: Zetasizer Nano Series, İngiltere

YÖNTEMLER

İn Vitro Çalışmalar

GABA ile yapılan çalışmalar

Erime derecesi tayini

GABA'nın erime derecesi analizi, erime derecesi tayin cihazı (Electrothermal 9300, Amerika) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz 3 kez tekrarlanmıştır.

Termal analiz

GABA'nın (~10 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı (Schimadzu DSC-60, Japonya) kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 50-300°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

X-Işını kırınım analizi

GABA'nın XRD analizi (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya), 2-50°C aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör yardımıyla yapılmıştır.

İnfrared analizi

GABA'nın infrared analizi, FTIR (Schimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

GABA'nın parçacık şekli ve yüzey özellikleri SEM (Fesem Supratm 50 VP Zeiss, Almanya) ile incelenmiştir.

GABA'nın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

İn vitro çalışmalarda GABA'nın miktar tayini HPLC (Schimadzu 20-A, Japonya) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC'de yer alan çalışma koşullarının modifikasyonu sonucu yapılan deneyler ışığında karar verilen ve analizlerde kullanılan çalışma koşulları **Çizelge 4**'te sunulmuştur.

Çizelge 4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları

Cihaz	Shimadzu-20 A
Kolon	4.6 x 100 mm, 3 µm C ₁₈ Inertsil CDS-3 kolon Parçacık Boyutu: 100Å
Fırın Sıcaklığı	30°C
Hareketli Faz	Metanol: Disodyum hidrojen fosfat tamponu (Na ₂ HPO ₄) (40:60) (pH 6.7)
Dedektör	Floresan Dedektör
Çalışılan Dalga Boyu	280nm-450nm
Akış Hızı	0.8 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	27 µL

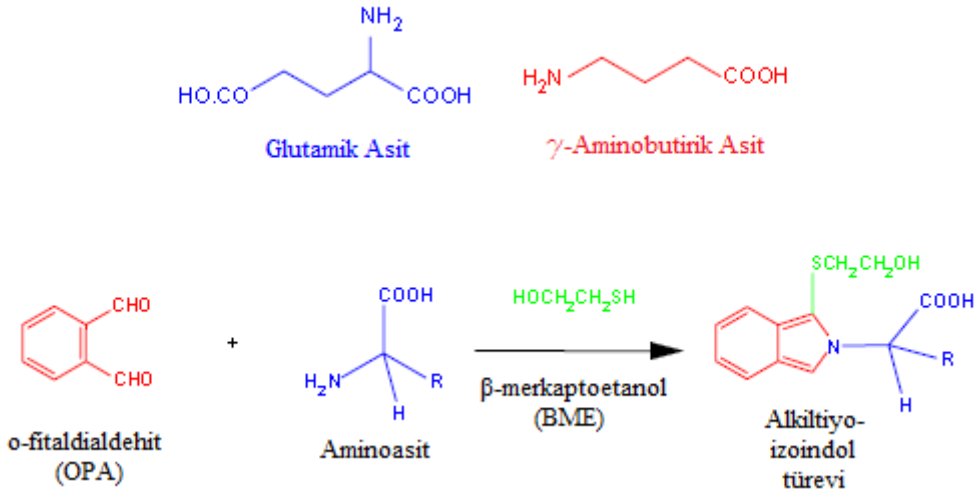
Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları

Analitik yöntem validasyonunun ana hedefi, yöntemin planlanan amaca uygun olduğunu göstermektir; kullanılan test yönteminin doğruluk ve güvenilirliğinin verilerle kanıtlanmasıdır. Miktar tayini validasyonunda, doğrusalık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik, tekrar elde edilebilirlik), özgünlük ve duyarlılık gibi analitik parametreler esas alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmada, Q2(R1)-Analitik İşlem Validasyonu başlıklı Uluslararası Harmonizasyon Kılavuzu esas alınmıştır (ICH, 1996).

Doğrusallık (Linearity)

Yöntemin doğrusallığı, verilen aralıkta analizi yapılan maddeyi değişik konsantrasyonlarda içeren örneklerin elde edilen pik alanları ile doğru orantılı olmasıdır.

GABA'nın kromofor ya da elektrofor özelliği bulunmaması nedeni ile düşük miktarlardaki GABA'nın analizi konvensiyonel HPLC-ultraviyole (UV), HPLC-floresan ya da HPLC-elektrokimyasal saptama ile kolaylıkla yapılamamaktadır. Bu nedenle GABA'nın seçici ve duyarlı olarak analizinin kolon öncesi OPA/BME türevlendirmesi ile mümkün olduğu bildirilmiştir (Şekil 9) (Reisi ve ark., 2009; Silva ve ark., 2009; http-4).



Şekil 9. Aminoasitlerin OPA/BME ile Türevlendirilmesi ile Oluşan İzoindol Türevleri (http-4)

Stok türevlendirme reaktifinin hazırlanması:

Türevlendirme ajanı olarak OPA/BME reaktifi kullanılmıştır. Tartılan 27 mg OPA 1 mL metanolde çözündürülmüş, üzerine 5 µL BME ve 9 mL sodyum tetraborat tamponu (0.1 M, pH 9.3) (TBT) eklenmesi ile stok türevlendirme çözeltisi (STR) hazırlanmıştır. Çözeltinin ışıktan saklandığında 5 güne kadar kararlı olduğu bildirildiğinden ışıktan korunarak buzdolabında saklanmıştır (http-4).

Günlük türevlendirme çözeltisinin hazırlanması:

Her gün taze olarak hazırlanan türevlendirme reaktifi (TR), 2.5 mL STR üzerine 7.5 mL TBT eklenmesi ile seyreltilerek elde edilmiştir (http-4). Çözelti ışıktan korunarak saklanmıştır.

Kolon öncesi türevlendirme işlemi:

Türevlendirme örneğin 400 µL'si üzerine 300 µL TR eklenmesinin ardından 2000 rpm'de 2 dakika süresince karıştırılması ile yapılmıştır. Tepkime karanlıkta yürütülmüştür (http-4).

HPLC yönteminde kullanılacak GABA'ya ait standart eğrinin belirlenmesi amacıyla %50 metanolde stok çözeltiler hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden hareketle 0.6-1.4 µg.mL⁻¹ aralığında seyreltmeler yapılarak çözeltiler hazırlanmıştır. Türevlendirme tepkimelerinin gerçekleştirilmesinin ardından elde edilen beş nokta için GABA konsantrasyonuna karşılık gelen alan değerleri bulunmuştur. Kalibrasyon eşitlikleri oluşturulmuş ve güven aralığı (CI) belirlenmiştir (n=6).

Kesinlik (Precision)

Kesinlik, tekrarlanabilirlik (*repeability*), ara ürün kesinliği (*intermediate precision*) ve tekrar elde edilebilirlik (*reproducibility*) olarak saptanabilmektedir.

Tekrarlanabilirlik, aynı işlem koşullarında ve kısa zaman aralığındaki kesinliği ifade etmektedir. Yöntemin tekrarlanabilirliği, aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin alan ölçümünün birkaç kez tekrarlanması ile elde edilmektedir. Bu işlem çoklu örnek hazırlanması (n=6) ya da 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrar ile yapılabilmektedir.

Ara ürün kesinliğinde, birbirinden bağımsız olayların analitik yöntemin kesinliğine olan etkisi bulunmaktadır. Bu değişkenler, günler, analistler, kullanılan malzeme ve araçlar olabilmektedir. Yeniden üretilebilirlik ise farklı laboratuvarlarda deneyin tekrarlanarak, sonuçlar arasındaki kesinliğin gösterilmesidir. Yöntemin standardizasyonu için genellikle farklı birimlerle ortak çalışmalar yapılmaktadır. Bu zorunlu olmayan bir validasyon parametresidir.

Yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermek için 3 farklı konsantrasyonda GABA içeren örnek hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 6 ölçüm tekrarı yapılmıştır. Yöntemin tekrar elde edilebilirliği için de, aynı seriler farklı günlerde tekrar hazırlanmış; sonuçlar, standart hata (SH), bağıl standart sapma (BSS) ve %95 CI olarak verilmiştir.

Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığıdır. En az 9 tayinle (3 konsantrasyon/3 tekrar) yapılmalı ve % geri kazanım elde edilmelidir.

Doğruluğun belirlenebilmesi için, 3 farklı konsantrasyonda GABA içeren örnek hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 6 ölçüm tekrarı yapılmıştır. Hesaplanan miktarlar, gerçek miktarlarla karşılaştırılmış; sonuçlar % geri kazanım, SH, BSS olarak verilmiştir.

Duyarlılık (Sensitivity)

Kullanılan analitik yöntemlerin düşük konsantrasyonları saptayabilme yeteneğidir. Saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) hesaplanarak değerlendirilmektedir.

LOD, standart madde sinyalinin geri plan gürültüsünden ayrılabilmesi için gerekli olan en düşük madde miktarıdır. Yöntemin aletli olup olmamasına bağlı olarak LOD değerinin belirlenmesinin birçok yöntemi bulunmaktadır. Yöntemler görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve elde edilen cevabın ve eğimin standart sapması olarak sıralanabilir.

Sistemin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimi olan LOD değeri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır (**Eşitlik 1**).

$$LOD = \frac{[3.3 \times SS]}{m} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

Burada, SS: y eksen kesim noktasının standart sapması, m: korelasyon eşitliğinin eğimidir (ICH, 1996).

LOQ, standart maddenin güvenilir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli olan en düşük madde miktarıdır. LOD değerinin belirlenmesi için kullanılan yöntemler LOQ için de geçerlidir.

Analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebildiği miktar tayini alt sınırı (LOQ) değeri **Eşitlik 2** kullanılarak belirlenmiştir.

$$LOQ = \frac{[10 \times SS]}{m} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Burada, SS: y eksen kesim noktasının standart sapması, m: korelasyon eşitliğinin eğimidir (ICH, 1996).

Seçicilik (Specificity)

Analitik yöntemin, yalnızca amaçlanan bileşeni veya bileşenleri tayin edebilme yeteneğidir. Tek bir bileşen için yapılan ölçüm, ortamda bulunabilecek diğer bileşenlerden (yardımcı maddeler, biyolojik örnekteki endojen bileşikler, etkin maddenin bilinen metabolitleri, safsızlıklar, bilinen veya bilinmeyen degradasyon ürünleri) kaynaklanabilecek girişimlerden etkilenmemelidir. Seçicilik, karmaşık numune karışımının analizinde girişim derecesinin de ölçüsüdür.

Yöntemin seçiciliği plasebo analizleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışma için, GABA dışında formülasyondaki diğer bütün bileşenleri içeren PNP ve HNT formülasyonlarının plaseboları hazırlanmıştır. Örnekler miktar tayini çalışmasında kullanılan işlem basamaklarından geçirilmiş, elde edilen kromatogramlardan formülasyondaki diğer bileşenlerin girişiminin GABA'nın seçiciliğine etkisi değerlendirilmiştir.

Sağlamlık/Tutarlılık (Robustness)

Tutarlılık yöntem parametrelerinin çeşitliliği denenerek, yöntemin güvenilir olduğunun gösterilmesidir.

Tutarlılık çalışmaları için hareketli faz, akış hızı, türevlendirme tepkimesi gibi yöntem parametreleri değiştirilmiş, validasyon ve miktar tayininin güvenilirliği için en uygun koşullar belirlenmiştir.

Çalışma koşullarında kararlılık

Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı PNP hazırlama (n-hekzan, 60°C'de) ve HNT hazırlama koşullarında (distile su, 80°C'de) incelenmiştir (n=3).

Etkin madde miktar tayini analizi için örnek hazırlama koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı GABA'nın formülasyondan ekstraksiyonu için kullanılan ortamda, %50 metanolde, 40°C sıcaklıkta ultrasonikasyon altında incelenmiştir (n=3).

İn vitro salım ortamı koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı *in vitro* salım ortamı olan fosfat tamponunda (PBS) (pH 7.4, 37°C'de) incelenmiştir (n=6).

Sterilizasyon yöntemi koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı UV radyasyon ile sterilizasyon ortamında incelenmiştir (n=3).

İn vitro salım çalışmasında GABA miktar tayini için validasyon çalışmaları

İn vitro salım çalışmasında GABA miktar tayini için kullanılan HPLC sistemi daha geniş çalışma aralığı kullanılarak tekrar valide edilmiştir. Doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve duyarlılık parametreleri açısından Sayfa 40'da "Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları"nda anlatıldığı şekilde değerlendirme yapılmıştır.

Polimerik yüzey etkin madde ile yapılan çalışmalar

Polimerik yüzey etkin madde sentezi

PYEM sentezi vinil benzil klorür ve dimetilkokoamin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %80 tepkimeye girecek madde olacak şekilde yürütülen tepkimede 1:1 molar oran için 42 mmol (6.41 g) vinil benzil klorür (VBC) ve 42 mmol (9.618 g) dimetilkokoamin üç boyunlu balona eklenmiştir. Üzerine 20 mL distile su eklenerek bulanık bir karışım elde edilmiştir. Tepkime bazik ortamda daha kısa sürede gerçekleştiğinden yeterli miktar sodyum karbonat eklenerek tepkime ortamı bazik hale getirilmiştir. Tepkimenin başlangıcında tepkime kabından azot gazı (N_{2(g)}) geçirilmiştir. Tepkime 50 °C'de, sekiz saat süresince silikon yağ banyosu kullanılarak manyetik karıştırıcı yardımı ile sağlanmıştır.

Tepkime öncesi gözlenen bulanık karışım tepkime sonunda berrak viskoz çözelti haline dönüşmüştür. Titrasyon ile tepkime dönüşümü değerlendirilmiştir.

Titrasyon prosedürü

Tepkime oluşumunun değerlendirilmesinde kullanılan titrasyonda polimerik yüzey etkin madde sentezi sonucu oluşan örnekten 0.3-0.5 g tartılmış ve üzerine 100 mL distile su eklendikten sonra manyetik karıştırıcıda tamamen çözünme gerçekleşinceye kadar karıştırılmıştır. Bu çözeltilerden 20 mL alınıp üzerine 50 mL distile su, 5 mL pH 10 sodyum fosfat tamponu ve 1 mL bromofenol mavisi eklenerek manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. Mavi renkli çözeltiliye 30 mL kloroform eklenmiş ve 5-10 dk daha 450 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırma sürdürülmüştür. Bir süre dinlendirmenin ardından alt fazı mavi üst fazı beyaz olan iki fazlı bir karışım elde edilmiştir. Alt fazdaki mavilik kaybolup lila rengine dönüncüye kadar titrant olan tetrafloroborat çözeltilisinden eklenmiş ve harcama kaydedilmiştir. **Eşitlik 3**'te yer alan eşitlik kullanılarak % dönüşüm hesaplanmıştır.

$$\% Q = \frac{0.5 \times 0.01 \times Ma \text{ g/mol} \times \text{harcanan mL}}{m \text{ örnek}} \quad (\text{Eşitlik 3})$$

Ma: Sentezlenen yüzey etkin maddenin molekül ağırlığı

Harcanan mL: Harcanan titrantın mililitresi

m örnek: Tartılan örnek miktarı

%Q: Tepkime dönüşüm miktarı

Termal analiz

PYEM'in (~10 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 50-300°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve maddenin termogramı elde edilmiştir.

İnfrared analizi

48 saat süresince 80°C'lik etüvde bekletilen ve suyu uçurulan PYEM çözeltilisinden elde edilen yarı katı şeklin FTIR analizi, 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında yapılmıştır.

Kullanılan diğer maddeler ile yapılan çalışmalar

Termal analiz

Monomer olarak kullanılan Ac ve N,N-Dimetilakrilamid'in (DMAc) ve çapraz bağlayıcı rolünü üstlenen NMBAc'nin (~10 mg ağırlığında) termal analizi, DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 50-300°C aralığında alüminyum referansa karşı yapılmıştır.

X-ışını kırınım analizi

Ac ve NMBAc'nin XRD analizi 2-50°C aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

İnfrared analizi

Ac, DMAc ve NMBac'nin FTIR analizi, 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında yapılmıştır.

Halosit ile yapılan çalışmalar

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi

HNT'nin parçacık büyüklüğü ve dağılımı lazer kırınım cihazı (Zetasizer Nano Series, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir.

Zeta potansiyel analizi

HNT'nin zeta potansiyeli Malvern Zetasizer cihazı (İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler, tek kullanımlık zeta hücrelerinde, 25°C oda sıcaklığında, distile su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Distile sudaki iletkenliğin neden olabileceği küçük değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için kullanılan distile suyun iletkenliği ölçümlerden önce sodyum klorür (NaCl) ile 50 µS'e ayarlanmıştır.

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

HNT'lerin yüzey özellikleri ve şekilleri SEM ile belirlenmiştir.

Termal analiz

HNT'nin (~10 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 50-550°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve maddenin termogramı elde edilmiştir.

İnfrared analizi

HNT'nin FTIR analizi 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

Polimerik nanopartikül formülasyonu hazırlama çalışmaları

Polimerik nanopartikül ön formülasyon çalışmaları

Nanoboyutta parçacıkların elde edilmesi amaçlandığından, çeşitli monomerler, çapraz bağlayıcılar, başlatıcılar ve polimerizasyon prosedürleri kullanılarak formülasyon denemeleri yapılmıştır.

MAA, metilmetakrilat, 2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit, Ac, DMAc, N,N-isopropil akrilamid gibi monomerler; amonyum persülfat, benzoil peroksit, azoizobutironitril (AIBN) gibi başlatıcılar; dispersiyon ya da çözünme ortamı olarak su, diklorometan, dioksan, dimetilsülfoksit (DMSO), dimetilasetamid gibi çözücüler kullanılarak çözelti, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonu gibi farklı polimerizasyon prosedürleri denenmiştir.

Sıcaklık, karıştırma hızı, tepkime süresi gibi parametreler değiştirilerek nanoboyutta formülasyon tasarımı hedeflenmiştir.

Ters emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanan formülasyonları dispersiyon hacminin değiştirilmesine bağlı olarak farklı konsantrasyonlarda PYEM içeren denemeler ile **PNP-1, PNP-2, PNP-3** ve **PNP-4** kodları ile adlandırılmıştır.

Denemelerde dispersiyon ortamı olarak n-hekzan kullanıldığında kapalı sistem uygulanmasına karar verilmiştir.

Gerçekleştirilen ön çalışmalar ışığında, çalışmada sentezlenen monomer ve yüzey etkin madde olarak rol oynayan katyonik yüzey etkin madde, ikincil monomer olarak Ac, DMAc, farklı PEG 1000, PEG 1500 ve PEG 2000 türevleri, çapraz bağlayıcı olarak NMBAc ve başlatıcı olarak AIBN kullanılan emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile PNP'ler hazırlanmıştır.

Ön formülasyonlar sonrasında hazırlama prosedürü parametreleri ve bileşen oranları değiştirilerek çeşitli formülasyonlar elde edilmiştir. “*Formülasyon Çalışmaları*” bölümünde içerikleri ayrıntılı olarak anlatılan bu formülasyonların karakterizasyon, *in vitro* salım ve kararlılık çalışmaları gerçekleştirilmiş ve hayvan deneyleri için kullanılacak formülasyonlar belirlenmiştir.

Polimerik nanopartikül formülasyon çalışmaları

Polimerizasyon için PYEM yüzdesinin belirlenmesi

Formülasyonlar dispersiyon ortamı %0.25 (PNP-8), %0.5 (PNP-7), %1 (PNP-4), %2 (PNP-5) ve %3'ü (PNP-6) oranında PYEM içerecek şekilde hazırlanmıştır. Formülasyon bileşenleri ve miktarları **Çizelge 5**'te yer almaktadır. Tüm formülasyonlarda bileşenlerin molar oranları sabit tutulmuştur. Farklı PYEM yüzdeleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda öncelikli olarak gerekli miktarda tartılan PYEM çözeltisi üzerine gerekli miktarda GABA yaklaşık 400 µL suda çözündürülerek eklenmiştir. Dispersiyon ortamı olarak kullanılan n-hekzanın eklenmesinin ardından tam karışmayı sağlamak ve emülsiyon görünümü elde etmek amacıyla manyetik karıştırıcıda bir saat süre ile karıştırılmıştır. Üzerine çapraz bağlayıcı olarak kullanılan NMBAc eklenmiştir. Başlatıcı olarak AIBN eklenmesinin ardından tepkime ortamından N_{2(g)} geçirilmiştir. Tepkime kabının daha önceden 60°C'ye getirilen silikon yağ banyosuna yerleştirilmesinin ardından tepkime 60°C'de 250 rpm'de manyetik karıştırıcı ile cam şişede gerçekleştirilmiştir. 3 saat 60°C'de yürütülen tepkime sonunda hekzan 50°C'lik etüvde buharlaştırılmış ve kalan monomerlerin uzaklaştırılabilmesi için 50 mL hekzan ile dört saat süresince karıştırılarak parçacıkların yıkanması sağlanmıştır. Elde edilen parçacıklar petri kabına yayılarak 50°C'lik etüvde 8 saat boyunca kurutulmuştur.

Çizelge 5. Farklı PYEM Yüzdelerinde (%0.25, %0.5, %1, %2, %3) Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları

	PNP-4, PNP-5, PNP-6, PNP-7, PNP-8
PYEM	1
Çapraz bağlayıcı (NMBAc)	0.2
Etkin madde (GABA)	0.2
Ortam hacmi (mL)	160
Sıcaklık (°C)	60
Karıştırma hızı (rpm)	250
Karıştırıcı tipi	Manyetik
Süre (saat)	3

Polimerizasyon için uygun PYEM:GABA oranının belirlenmesi

Aynı tepkime prosedürü kullanılarak 1:2, 1:1, 1:0.5 ve 1:0.33 molar oran için gereken miktarda tartılan PYEM çözeltisi ve GABA kullanılarak Sayfa 46'da "Polimerizasyon için PYEM yüzdesinin belirlenmesi" konusunda anlatılan işlem basamakları izlenerek farklı PYEM:GABA molar oranında formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyon bileşenleri ve oranları **Çizelge 6**'da yer almaktadır.

Çizelge 6. Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları

	PNP-9	PNP-10	PNP-11	PNP-17	PNP-14*
PYEM	1	1	1	1	1
Çapraz bağlayıcı (NMBAc)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Etkin madde (GABA)	1	0.5	0.33	2	-
Ortam hacmi (mL)	160	160	160	160	160
Sıcaklık (°C)	60	60	60	60	60
Karıştırma hızı (rpm)	250	250	250	250	250
Karıştırıcı tipi	Manyetik	Manyetik	Manyetik	Manyetik	Manyetik
Süre (saat)	3	3	3	3	3

*: PNP-14 formülasyonu PNP-9 formülasyonunun etkin madde içermeyen (plasebo) şeklidir.

Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması

Formülasyonlar ters emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Monomer olarak Ac ve DMAc içeren parçacıklar sentezlenmiştir. Formülasyon bileşenleri ve miktarları **Çizelge 7**'de yer almaktadır.

Çizelge 7. Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları

	PNP-12	PNP-15*	PNP-13	PNP-16*
PYEM	1	1	1	1
Çapraz bağlayıcı (NMBAc)	0.2	0.2	0.2	0.2
Etkin madde (GABA)	1	-	1	-
Monomer	1 (Ac)	1 (Ac)	1 (DMAc)	1 (DMAc)
Ortam hacmi (mL)	160	160	160	160
Sıcaklık (°C)	60	60	60	60
Karıştırma hızı (rpm)	250	250	250	250
Karıştırıcı tipi	Manyetik	Manyetik	Manyetik	Manyetik
Süre (saat)	3	3	3	3

*: PNP-15 formülasyonu PNP-12'nin, PNP-16 formülasyonu PNP-13'ün etkin madde içermeyen (plasebo) şeklidir.

Gerekli konsantrasyonda PYEM çözeltisinin üzerine suda çözündürülmüş GABA eklenmiştir. Ardından bu karışıma PNP-12 formülasyonu için 1:1 GABA:monomer molar oranı için gereken miktarda Ac, PNP-13 formülasyonu için gereken miktarda DMAc monomeri eklenmiştir. Dispersiyon ortamı olarak kullanılan n-hekzan eklenerek bir saat karıştırılmış, emülsiyon oluşumunun gözlenmesinin ardından NMBAc eklenmiştir. Başlatıcı olarak AIBN eklenmesinin ardından 60°C’de cam şişede tepkime gerçekleştirilmiştir. 3 saat 60°C’de manyetik karıştırıcı ile yürütülen tepkime sonunda n-hekzan 50°C’lik etüvde buharlaştırılmıştır. Kalan monomerlerin uzaklaştırılabilmesi için 50 mL hekzan ile dört saat süresince karıştırarak parçacıkların yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen parçacıklar petri kabına yayılarak 50 °C’de etüvde 8 saat süresince kurutulmuştur.

GABA içermeyen nanopartikül formülasyonları aynı prosedür ile GABA eklenmeksizin hazırlanmıştır.

Farklı karıştırıcılar kullanılarak formülasyonların hazırlanması

SEM görüntüleri esas alındığında PNP’lerde morfolojik açıdan küreselliği yakalamak için ultraturaks (UT) gibi yüksek hızda karıştırıcılar kullanılarak çeşitli formülasyon denemeleri yapılmıştır. Formülasyon bileşenleri **Çizelge 8**’de sunulmuştur.

Çizelge 8. Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları

	PNP-18	PNP-19	PNP-20	PNP-23	PNP-24	PNP-34*
PYEM	1	1	1	1	1	1
Çapraz bağlayıcı (NMBAc)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Etkin madde (GABA)	1	1	1	1	1	-
Monomer (DMAc)	-	-	-	1	-	1
Ortam hacmi (mL)	160	160	160	160	160	160
Sıcaklık (°C)	60	60	60°C	60°C	60°C	60°C
Karıştırma hızı (rpm)	20.000	5000	8000	8000 +250	8000 +250	8000+250
Karıştırıcı tipi	UT Heidolph 12F/M	UT IKA 25N18G	UT IKA 25N25G	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik
Süre (saat)	3 saat	3 saat	3 saat	3 saat	3 saat	3 saat

*: PNP-34 formülasyonu PNP-23 formülasyonunun etkin madde içermeyen (plasebo) şeklidir.

Gerçekleştirilen emülsiyon polimerizasyonu yönteminde, denemeler sonucunda öncelikle yüksek hızlı yani UT kodlu karıştırıcıların kullanılmasına ve polimerizasyona manyetik karıştırıcı ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bu şekilde daha kararlı ön emülsiyon oluşumu ve küresel PNP’ler elde edilmiştir.

Farklı NMBAc kullanılarak formülasyonların hazırlanması

Farklı NMBAc oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonların hazırlama koşulları **Çizelge 9**'da yer almaktadır.

Çizelge 9. Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları

	PNP-21	PNP-22	PNP-23
PYEM	1	1	1
Çapraz bağlayıcı (NMBAc)	0.5	1	0.2
Etkin madde (GABA)	1	1	1
Monomer (DMAc)	1	1	1
Ortam hacmi (mL)	160	160	160
Sıcaklık (°C)	60	60	60
Karıştırma hızı (rpm)	8000+250	8000+250	8000+250
Karıştırıcı tipi	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik
Süre (saat)	3	3	3

Farklı PEG türevleri kullanılarak formülasyonların hazırlanması

PNP-23 ve PNP-24 formülasyonlarının bileşen oranları esas alınarak PEG içeren formülasyon denemeleri yapılmıştır (**Çizelge 10**).

Çizelge 10. Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan Formülasyonların Bileşenlerinin Molar Oranları ve Formülasyon Hazırlama Koşulları

Polimerizasyon Şartları				
	PNP-25	PNP-26	PNP-27	PNP-31*
PYEM	1	1	1	1
Çapraz bağlayıcı (NMBAc)	0.2	0.2	0.2	0.2
Etkin madde (GABA)	1	1	1	-
Monomer (DMAc)	1	1	1	1
Ortam hacmi (mL)	160	160	160	160
Sıcaklık (°C)	60	60	60	60
Karıştırma hızı (rpm)	8000+250	8000+250	8000+250	8000+250
Karıştırıcı tipi	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik
Süre (saat)	3 saat	3 saat	3 saat	3 saat
Pegilasyon Prosedürü				
PEG:PNP (kütle oran)	1:1	1:1	1:1	1:1
Karıştırma hızı (rpm)	200	200	200	200
Karıştırma süresi (saat)	1	6	24	1

*PNP-31 formülasyonu PNP-25 formülasyonunun etkin madde içermeyen (plasebo) şeklindedir.

PNP-25, PNP-26 ve PNP-27 formülasyonları, PNP-23 formülasyonunun bileşenlerinin polimerizasyon tepkimesi sonrasında parçacıkların sulu PEG 2000 çözeltisi ile sırasıyla 1 saat, 6 saat ve 24 saat karıştırılması sonrasında dondurarak kurutulması ile hazırlanmıştır.

PNP-28, PNP-29 ve PNP-30 formülasyonlarında ise polietilen glikol 1000 maleik anhidrit (PEG 1000 MA) ya da polietilen glikol 1500 maleik anhidrit (PEG 1500 MA) gibi PEG türevleri polimerizasyona katılarak kullanılmıştır. Polietilen glikol maleik anhidrit (PEG MA) içeren PNP formülasyonları kodları ve bileşenleri **Çizelge 11**'de verilmiştir.

Çizelge 11. Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan Formülasyonların Molar Bileşenleri ve Formülasyon Hazırlama Koşulları

	PNP-28	PNP-29	PNP-32*	PNP-30	PNP-33*
PYEM	1	1	1	1	1
Çapraz bağlayıcı (NMBAc)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Etkin madde (GABA)	1	1	-	1	-
Monomer (DMAc)	-	-	-	1	1
PEG MA	0.2 (PEG 1500MA)	0.2 (PEG 1000MA)	0.2 (PEG 1500MA)	0.2 (PEG 1000MA)	0.2 (PEG 1000MA)
Ortam hacmi (mL)	160	160	160	160	160
Sıcaklık (°C)	60	60	60	60	60
Karıştırma hızı (rpm)	8000+250	8000+250	8000+250	8000+250	8000+250
Karıştırıcı tipi	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik	UT IKA 25N25G + manyetik
Süre (saat)	3	3	3	3	3

*: **PNP-32** formülasyonu PNP-29 formülasyonunun, **PNP-33** formülasyonu PNP-30 formülasyonunun etkin madde içermeyen (plasebo) şeklidir.

Formülasyonların sterilizasyonu

PNP formülasyonları sıcaklığın uygulanmadığı sterilizasyon yöntemlerinden olan UV ışınları (Kojair Blue Series Xtra Line, Finlandiya) ile 15 dakika süresince sterilize edilmiştir (Tırnaksız, 2009).

Polimerik nanopartikül formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının parçacık büyüklüğü ve dağılımı lazer kırınım cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Zeta potansiyel analizi

Nanopartiküllerin zeta potansiyelleri Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler, tek kullanımlık zeta hücrelerinde, 25°C oda sıcaklığında, distile su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Distile sudaki iletkenliğin neden olabileceği küçük değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için kullanılan distile su ölçümlerden önce NaCl ile 50 µS iletkenliğe ayarlanmıştır.

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

Taze hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yüzey özellikleri ve şekilleri SEM ile belirlenmiştir.

Termal analiz

Nanopartikül formülasyonlarının (~10 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 50-300°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

X-Işını kırınımı Analizi

Formülasyonlara ait XRD analizleri, 2-50°C aralığında, 40 kV voltaj ve 20mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör kullanılarak yapılmıştır.

İnfrared analizi

Nanopartikül formülasyonlarının FTIR analizleri 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonlarda etkin madde miktar tayini

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında etkin madde içeriği GABA'nın HPLC ile Analitik Miktar Tayini bölümünde anlatılan analiz koşullarında saptanmıştır.

Tam tartılmış 50 mg nanopartikül formülasyonu, 100 mL %50 metanol içerisinde 50°C'de 15dk süresince ultrasonik banyo kullanılarak dağıtılmıştır. GABA miktarı 0.22 µm poliyamit filtreden süzülerek gerekli seyreltmelerin ardından belirlenmiştir. Deney her formülasyon için 3 kez tekrarlanmıştır.

Kullanılan poliyamit filtre için 0.1 µg.mL⁻¹, 0.5 µg.mL⁻¹ ve 1 µg.mL⁻¹ GABA konsantrasyonlarında çözeltiler ile filtre adsorpsiyon testi gerçekleştirilmiştir.

İn vitro salım çalışmaları

PNP'lerden GABA salımı PBS'de (pH 7.4) Wilson ve arkadaşları (Wilson ve ark., 2008) tarafından tanımlanan yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma koşulları 25 mL degaze ve sterilize edilmiş PBS (pH 7.4), 37 ±0.5°C sıcaklık ve 100 rpm karıştırma hızı olarak belirlenmiştir. Öncelikle 1 mg GABA içeren nanopartiküller selüloz asetat membrana (molekül ağırlığı 3500-5000 da) yerleştirilmiş ve az miktarda dissolüsyon ortamı eklenmiştir ve sızdırmadan kapatılmıştır. Diyaliz membranı 37 ±0.5°C'de tutulan ve 100 rpm'de sürekli karışan çözünme ortamı içeren reseptör kompartımanına daldırılmıştır. Reseptör kompartıman çözünme ortamının buharlaşmasını önlemek için kapatılmıştır. Örnekler daha önceden belirlenen zaman aralıklarında diyaliz membranının dışındaki çözünme ortamından 0.8 mL hacimde alınmış ve aynı miktarda taze çözünme sıvısı eklenmiştir.

Örneklerdeki GABA konsantrasyonu *GABA'nın "In Vitro Salım Çalışmasında GABA Miktar Tayini için Validasyon Çalışmaları"* bölümünde belirtilen koşullarda HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Farklı zamanlarda salınan GABA konsantrasyonları ile hesaplanan % kümülatif salınan GABA değerleri zamanın fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmiştir. Her bir nanopartikül için deney 6 kez tekrarlanmıştır.

UV radyasyon ile sterilizasyonun nanopartikül özelliklerine etkisini incelemek amacı ile sterilizasyon sonrası PNP formülasyonlarından GABA salımı aynı çalışma şartlarında incelenmiştir (n=6).

Nanopartikül formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları

Hazırlanan PNP formülasyonlarının kararlılık özelliklerini incelemek için preparatlar 25°C ±1°C, 4°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 bağıl nem (BN) ve 40°C ±1°C'lik ortamlara konulmuştur. Formülasyonların kararlılık testleri önceden belirlenen periyotlarda (0., 30., 60. ve 90. günler) gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar üzerinde parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel, pH, fiziksel görünüş, DSC, FTIR ve etkin madde miktar tayini analizleri yapılmıştır.

Halosit nanotüp formülasyonu hazırlama çalışmaları

Halosit nanotüp formülasyonu ön formülasyon çalışmaları

Yapılan ön çalışmalarda HNT'lere etkin madde yüklenmesi farklı basınç uygulamaları ile vakum altında ve sıcaklık uygulanması ile sağlanmıştır. Denemeler sonucunda hazırlama prosesindeki özellikler göz önüne alındığında belirlenen basınçta vakum altında GABA içeren HNT formülasyonları hazırlanmasına karar verilmiştir.

Isı ile hazırlanan formülasyonlarda ise hazırlama süresi açısından denemeler yapılmış ve yükleme kapasitesi etkinliği değerlendirilerek hazırlama süresine karar verilmiştir.

Halosit nanotüp formülasyonu çalışmaları

Vakum altında formülasyon hazırlama

1:1 molar oran olacak şekilde gereken miktarda tartılan boş HNT'lere 15 dk süresince 100 mmHg basınç uygulanması ile havanın uzaklaştırılması ve tüplerin açılması sağlanmıştır. Ardından GABA çözeltisi eklenmiş, manyetik karıştırıcı kullanılarak karışması sağlanmış ve 30 dk süresince 100mmHg basınç ile vakum altında tutulmuştur. Bu proses 2 kez üstüste tekrar edilmiştir.

Sıcaklık uygulanarak formülasyon hazırlama

1:1 molar oran olacak şekilde tartılan boş HNT'ler bidistile suda 80°C'de bir saat süresince şişirilmiştir. Ardından manyetik karıştırıcıda karıştırılan HNT çözeltisine enjektör yardımı ile gereken miktarda GABA çözeltisi eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda 80°C'de 1 saat süresince karıştırılma sürdürülmüştür. Bidistile su ile yıkama işleminin gerçekleştirilmesinin ardından 2000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek GABA içeren nanotüpler ayrılmış ve etüvde kurutulmuştur.

Aynı prosedür kullanılarak 1:2 molar oranda HNT:GABA parçacıkları hazırlanmıştır.

Etkin madde yükleme kapasitesini arttırabilmek amacı ile yıkama yapılmaksızın GABA içeren nanotüpler de hazırlanmıştır.

Formülasyonların sterilizasyonu

HNT formülasyonları UV ışınları ile 15 dakika süresince sterilize edilmiştir.

Halosit nanotüp formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi

HNT'lerin parçacık büyüklüğü ve dağılımı lazer kırınım cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Zeta potansiyel analizi

HNT'lerin zeta potansiyellerinin belirlenmesinde Malvern Zetasizer cihazı kullanılmıştır. Ölçümler, tek kullanımlık zeta hücrelerinde, 25°C oda sıcaklığında, distile su ile seyreltilerek gerçekleştirilmiştir. Distile sudaki iletkenliğin neden olabileceği küçük değişimlerin ölçüm sonuçlarını etkilememesi için kullanılan distile su ölçümlerden önce NaCl ile 50 µS iletkenliğe ayarlanmıştır.

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

HNT'lerin yüzey özellikleri ve şekilleri SEM ile belirlenmiştir.

Termal analiz

HNT formülasyonlarının (~10 mg ağırlığında) termal analizi DSC cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızı, 10°C.dk⁻¹ ısı artışı ile 50-550°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve maddenin termogramı elde edilmiştir.

X-ışını kırınım analizi

HNT'lere ait XRD analizleri, 2-50°C aralığında, 40 kV voltaj ve 20mA akım şiddeti ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör kullanılarak elde edilmiştir.

İnfrared analizi

HNT içeren nanopartikül formülasyonlarının FTIR analizleri 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

Halosit nanotüp formülasyonlarında etkin madde miktar tayini

Hazırlanan nanotüp formülasyonlarında etkin madde miktar tayini “GABA'nın yüksek basınçlı sıvı Kromatografisi” bölümünde anlatılan analiz koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Tam tartılmış 50 mg HNT içeren nanopartikül formülasyonu, 100 mL %50 metanol içerisinde 50°C'de 15 dk süresince ultrasonik banyo kullanılarak dağıtılmıştır. 0.22 µm poliyamid filtreden süzülerek gerekli seyreltmelerin ardından GABA miktarı saptanmıştır. Deney her formülasyon için 3 kez tekrarlanmıştır.

İn vitro salım çalışmaları

HNT'lerden GABA salımı “İn vitro Salım Çalışmaları” konusunda (Sayfa 51) anlatıldığı şekilde PBS'de (pH 7.4) Wilson ve arkadaşları (Wilson ve ark., 2008) tarafından tanımlanan yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki

GABA konsantrasyonu daha önce GABA için belirtilen şartlarda HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Farklı zamanlarda salınan GABA konsantrasyonları ile hesaplanan % kümülatif salınan GABA değerleri zamanın fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmiştir. Her bir nanotüp örneği için deneyler 6 kez tekrarlanmıştır.

UV radyasyon ile sterilizasyonun nanopartikül özelliklerine etkisini incelemek amacı ile sterilizasyon sonrası HNT formülasyonlarından GABA salımı “*In vitro salım çalışmaları*” konusunda (Sayfa 51) anlatılan yöntem ile incelenmiştir (n=6).

Halosit nanotüp formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları

Hazırlanan HNT formülasyonlarının özelliklerini incelemek için preparatlar $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN ve $40^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortamlara konulmuştur. Formülasyonların kararlılık testleri önceden belirlenen periyotlarda (0., 30., 60. ve 90. günler) gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlar üzerinde parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel, pH, fiziksel görünüş, DSC, IR ve etkin madde miktar tayini analizleri yapılmıştır.

In vitro toksisite testleri

In vitro toksisite primer nöron kültürü sistemi kullanılarak toksisite tetrazolyum tuzu (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür) testi dolaylı olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan ilaç duyarlılığı testidir (Mosmann, 1983).

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Birçok hücre popülasyonu için total mitokondriyel aktivite canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilmektedir. MTT sitotoksisite testi tetrazolyum tuzunun canlı hücrelerin sağlam mitokondrileri tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Daha sonrasında mor renkli formazan ürününün çözünmesi amacıyla DMSO eklenmekte ve ortaya çıkan renkli çözeltinin spektrofotometrede ışık absorbansının ölçülmesiyle canlı hücre yoğunluğu belirlenmektedir.

Primer serebellar granül hücreleri bir günlük Sprague Dawley sıçanlardan hazırlanmıştır. Yavru dekapite edildikten sonra serebellum çıkarılmış ve 5 mL kalsiyumsuz *Hank's* dengeli tuz çözeltisi (HBSS) içine alınmıştır. Buna 2 mL tripsin, %25 etilendiamin tetraasetik asit eklenerek 37°C 'de 40 dakika inkübe edilmiştir (Gepdiremen ve ark., 1998). Fetal sığır serumu içeren 5 mL DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) çözeltisi eklenerek tripsinin etkisi sonlandırılmıştır. 3 dakika 800 rpm'de santrifüj edildikten sonra süspansiyon bir kez 5 mL DMEM ile yıkandıktan sonra pastör pipetiyle homojenize edilip poli-D-lizin kaplı DMEM içeren besi ortamına ekilerek hücrelerin tutunması sağlanmıştır. 2-3 gün sonra ortama 10 μM sitozin arabinozid eklenerek non-nöronal hücrelerin uzaklaştırılması için 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar besi yeri değiştirilerek ortam nöronal hücrelerin üremesine hazırlanmıştır. Bu şekilde üretilen hücreler iki hafta sonra tripsin ile toplanıp santrifüj edildikten sonra DMEM içinde tekrar poli-D-lizin kaplı 96'lık plaklara ekilerek 2-3 gün burada yerleşip üremesi sağlandıktan sonra toksisite testi için MTT testi uygulanmıştır.

50 μM konsantrasyonda GABA içerecek şekilde farklı PNP ve HNT formülasyonları hücrelere uygulanmıştır. MTT 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ konsantrasyon olacak

şekilde *Hank's* dengeli tuz çözeltisinde çözüldükten sonra steril filtreden geçirilmiştir. 10 µL MTT mikroplaka kuyucuklarına uygulanmış ve karbondioksitli inkübatörde 4 saat bekletilmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki besiyerleri boşaltıldıktan sonra 150 µL DMSO eklenmiş ve ELİSA (enzime bağlı immün yöntem) kiti okuyucuda (Thermo Lab Original Systems Multiskan EX, Amerika) 540 nm'de değerlendirilmiştir.

***İn Vivo* Çalışmalar**

Günümüzde epilepsinin ve epileptik nöbetlerin fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması için deneysel epilepsi modelleri geliştirilmiştir (Onat, 2008). Bu çalışmada epilepsi oluşturmak için PTZ kullanılmıştır (Akdoğan ve ark., 2003). Gerçekleştirilen *in vivo* deneyler literatürde çoğunlukla rastlandığı gibi sıçanlar üzerinde yapılmıştır (Preece ve ark., 2004; Bambal ve ark., 2011; Nasreen, 2012).

Hazırlanan PNP ve HNT formülasyonları üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* analiz sonuçları göz önünde tutularak, *in vivo* çalışmalar için beş farklı formülasyon belirlenmiştir. *İn vivo* çalışmalar için seçilen beş formülasyon Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Etik Kurulu'ndan gerekli izinler alındıktan sonra (Ek-1) sıçanlara uygulanmıştır.

Bu çalışma kapsamında 250-350 g ağırlığında *Wistar* erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar havalandırması, ısısı ve 12 saat gece-12 saat gündüz olacak şekilde ışığı ayarlanmış hayvan bakım odasında tel kafeslerde 22°C oda sıcaklığında barındırılmıştır. Hayvanlarda yapılan tüm işlemler hijyenik koşullarda gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları her biri yedi sıçandan oluşan yedi gruba ayrılmıştır.

İn vivo çalışmalarda kullanılan deney hayvanları gruplarına PNP-23, PNP-25, PNP-29, PNP-30 ve HNT-GABA formülasyonları uygulanmıştır. Karşılaştırma için kontrol grubu olarak PBS (pH 7.4) ve GABA içeren çözeltiler kullanılmıştır.

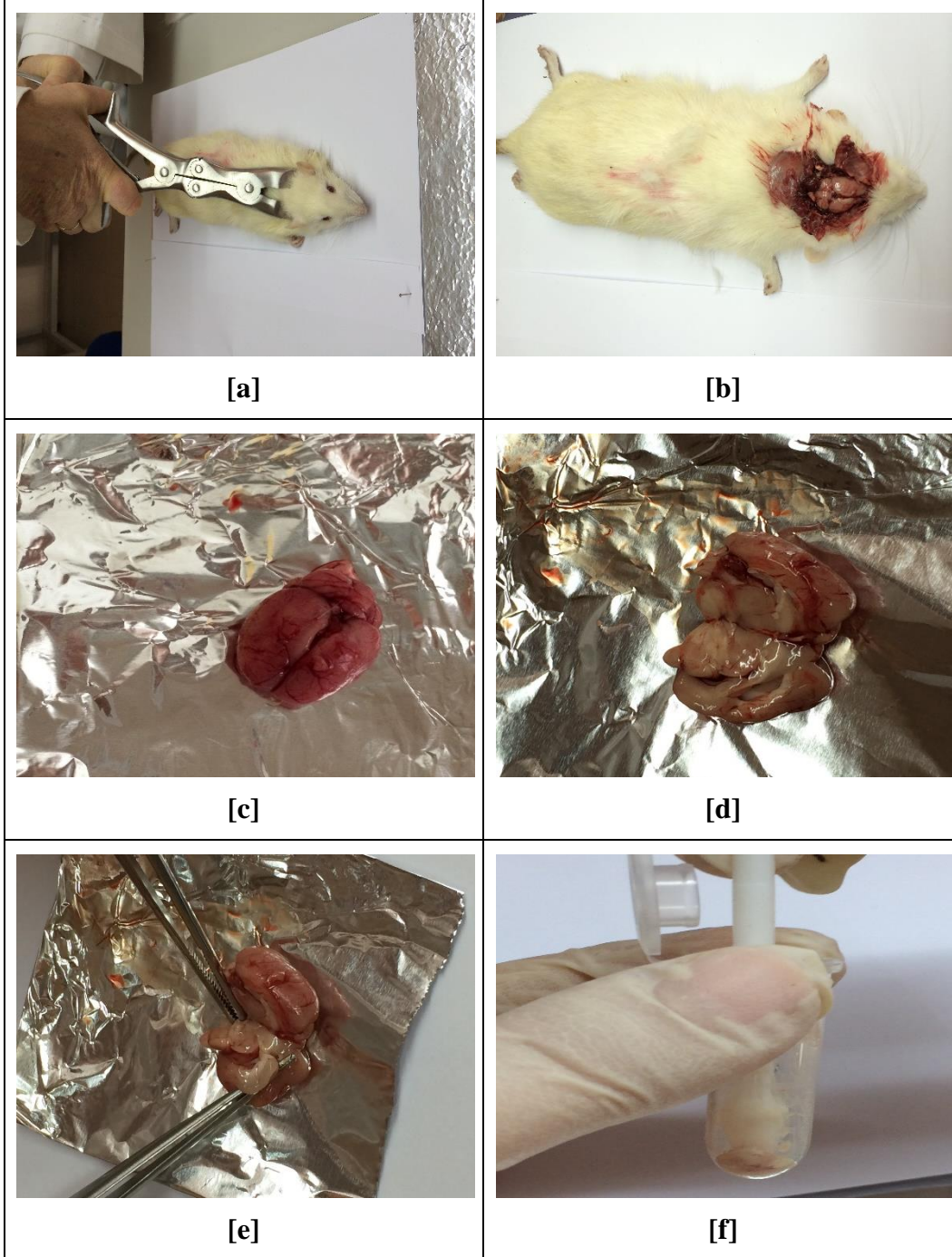
Formülasyonların uygulanması, izlenmesi ve örneklerin alınması

Deney gruplarına PBS, 100 mg.kg⁻¹ dozda GABA veya aynı dozda GABA içeren nanopartikül ve nanotüp formülasyonları uygulanmıştır. Enjeksiyondan 4 saat sonra PTZ *i.p.* olarak 70 mg.kg⁻¹ dozda uygulanarak konvülsiyon oluşturulmuştur (Onat, 2008; Reeta ve ark., 2011). PTZ uygulandıktan sonra hayvanlar 30x30x40 cm'lik pleksiglas kutulara alınarak 30 dakika süreyle izlenmiş ve skorlama ile nöbet değerlendirilmesi yapılmıştır. Konvülsiyonların değerlendirilmesi açısından, myoklonik sıçramaların başlama latensi, jeneralize tonik klonik konvülsiyonların süresi ve kıvranma refleksi kaybı izlenmiştir.

Çalışma sonunda hayvanlar hafif eter anestezisi altında dekapite edilerek beyinleri çıkarılmış ve *Stratum corsatum* bölümü izole edilmiştir. Çıkarılan *Stratum corsatum*'un homojenize edilmesinin ardından, doku örnekleri PBS içerisinde -20°C'de saklanmıştır. Deney yapılmasını ailişkin fotoğraflar **Şekil 10**'da sunulmuştur.

Stratum corsatum örneklerinde GABA miktar tayini

Örneklerdeki GABA düzeyi “CUSABIO Rat Gamma-Aminobutyric Acid” kitleri kullanılarak ELİSA okuyucuda değerlendirilmiştir (Donzanti ve Yamamoto, 1988). Sonuçlar SPSS yardımı ile bağımlı örneklem t testi (paralel-t testi) ile değerlendirilmiştir.



Şekil 10. Doku Örneklerinin Alınmasına Ait Fotoğraflar (a, b, c: Anestezi sonrası beynin çıkarılması; d, e: *Stratum corsatum* bölümünün çıkarılması; f: Dokuların Eppendorf içerisinde PBS ile muamele edilerek homojenize edilmesi)

BULGULAR ve TARTIŞMA

İn Vitro Çalışmalar

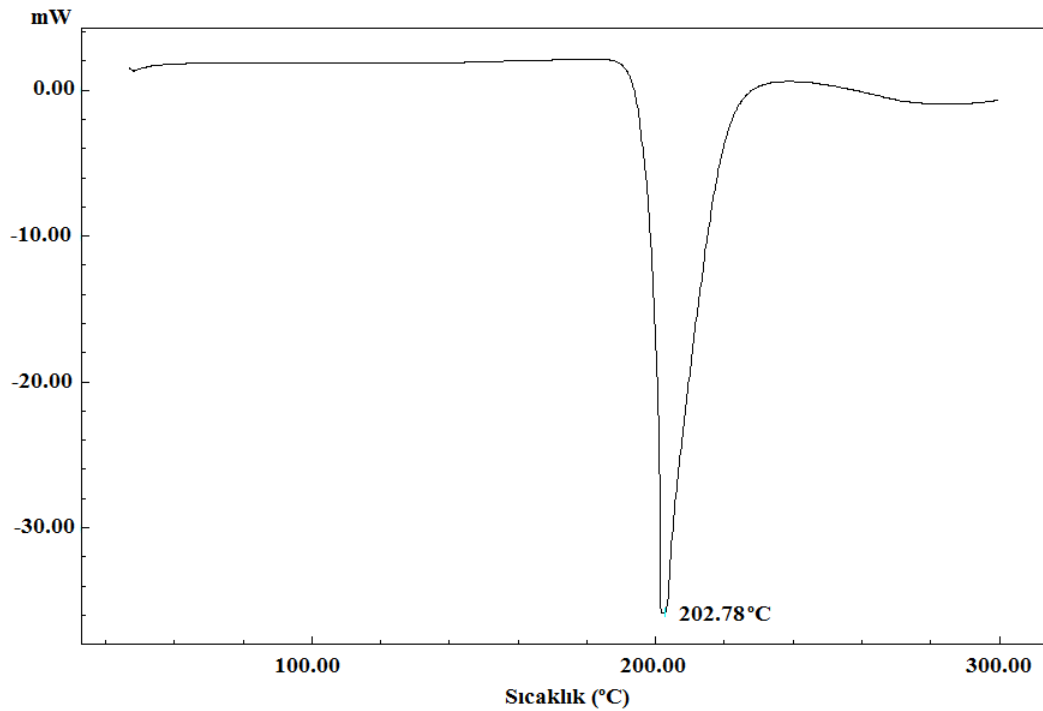
GABA ile yapılan çalışmalar

Erime derecesi tayini

GABA'nın erime derecesi tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilen analizinde erime derecesi 201.67 ± 0.148 (ORT \pm SH) olarak bulunmuştur (n=3).

Termal analiz

GABA'nın DSC cihazı ile 50-300°C aralığında yapılan termal analizinde, GABA'nın 200.74°C'de erimeye başladığı ve erirken 267.10 J/g ısı aldığı bulunmuş ve erime derecesi 202.78 °C olarak tayin edilmiştir (**Şekil 11**). Bulunan değerler literatür ile uygunluk göstermektedir (Contineanu ve ark., 2010).



Şekil 11. GABA'ya Ait Termogram

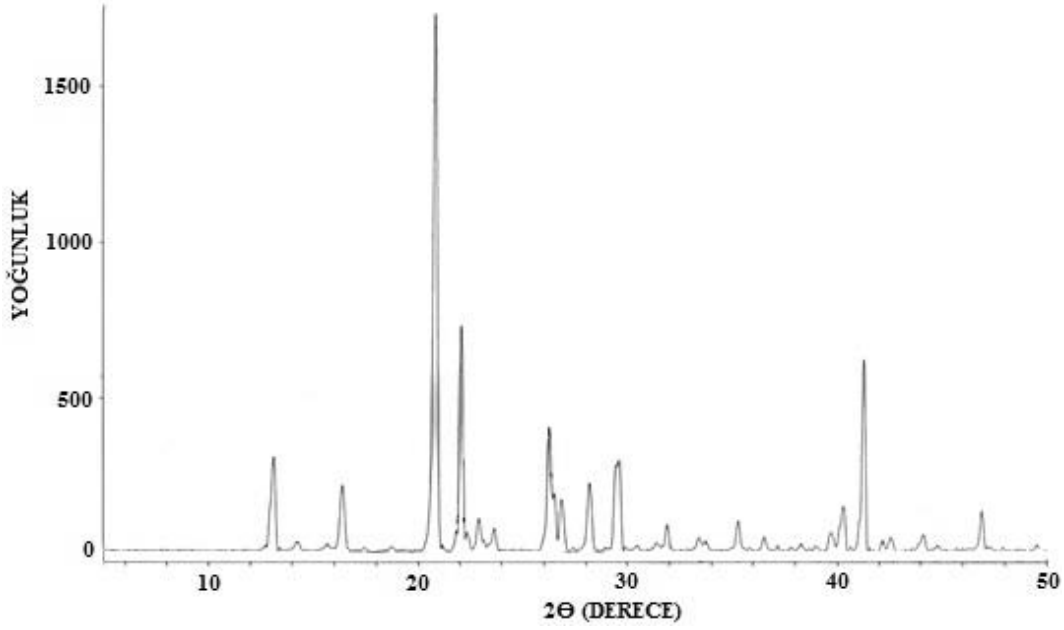
X-ışını kırınım analizi

GABA'nın XRD profili **Şekil 12**'de sunulmuştur. GABA'nın X-ışını kırınım analizinden elde edilen spektrumda karakteristik GABA pikleri gözlenmiştir. X-ışını kırınım profili incelendiğinde maddenin kristal yapıya sahip olduğu görülmektedir (**Şekil 14**). Elde edilen profil çok az kayma ile literatürde GABA'nın monoklinik şekli için verilen profile uygunluk göstermektedir (Dichi ve ark., 2011).

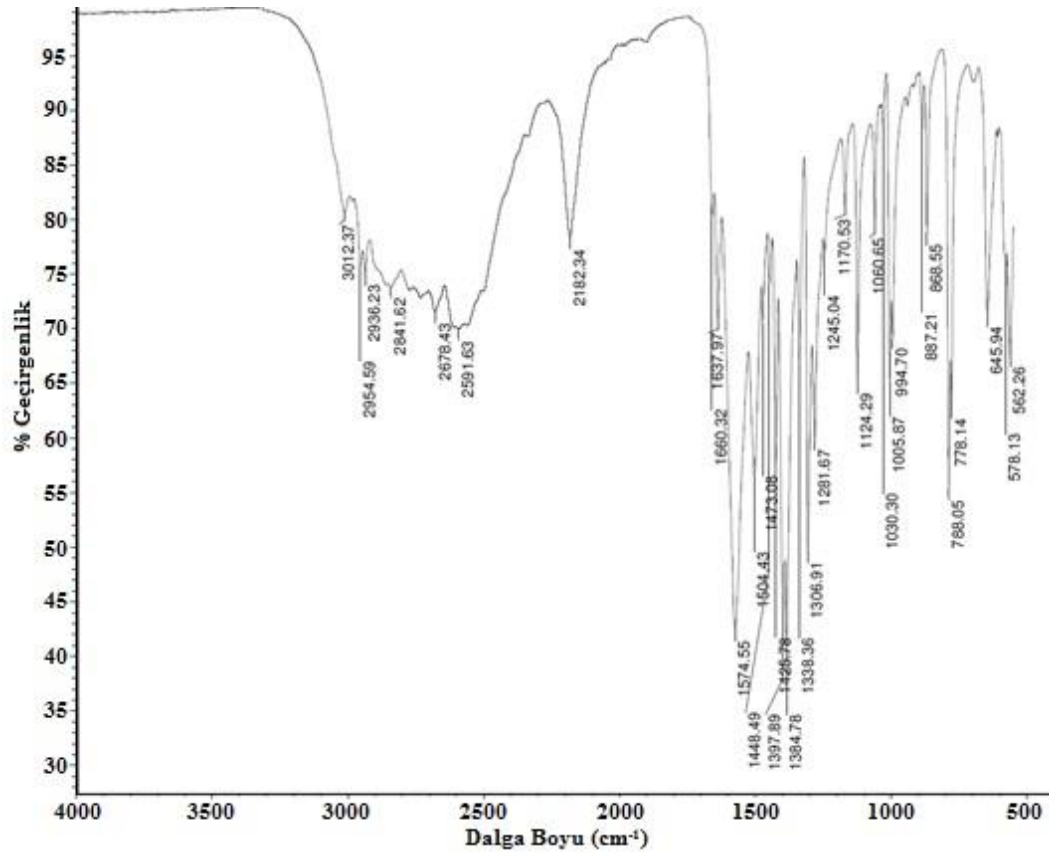
İnfrared analizi

GABA'nın IR spektrumu **Şekil 13**'de sunulmuştur. GABA'nın yapısında bulunan -NH ve -OH bağlarına ait pikler spektrumda gözlenmemiştir (http-7). GABA'ya ilişkin elde edilen spektrumlar amino grubunun NH_3^+ formunda olduğunu doğrulamaktadır (Suresh ve ark., 2008). 2954.59 cm^{-1} , 2936.23 cm^{-1} ve 2841.62

cm^{-1} 'de alifatik $-\text{CH}$ pikleri bulunmuştur (Shilpa ve ark., 2012). Yapıdaki karboksilat (COO^-) grubu asimetrik gerilme titreşimleri 1574.55 cm^{-1} 'de, simetrik gerilme titreşimleri $1397.89\text{-}1384.78 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir (Vamecq ve ark., 2008).



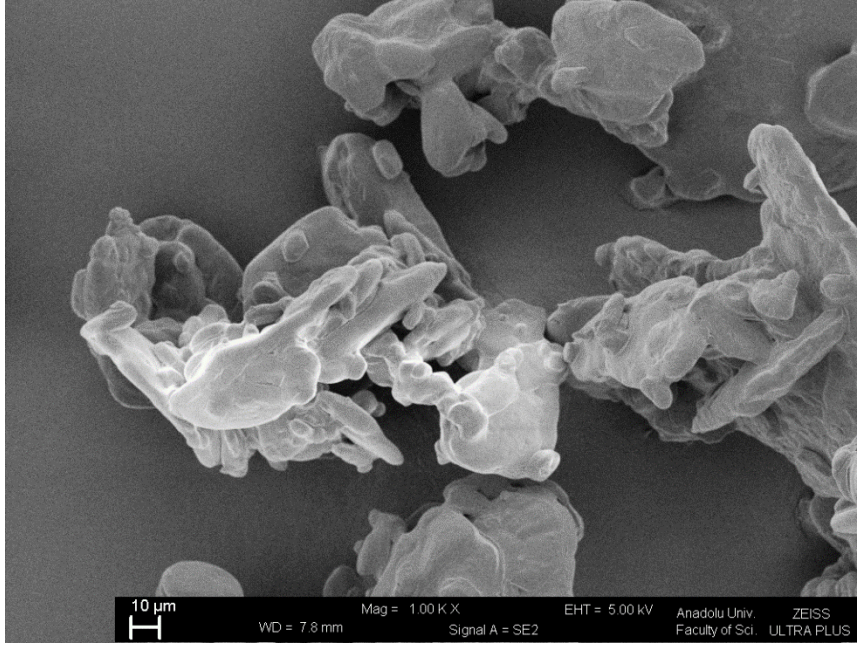
Şekil 12. GABA'ya Ait X-Işını Kırınım Profili



Şekil 13. GABA'ya Ait FTIR Spektrumu

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

GABA'nın SEM görüntüsü **Şekil 14**'te yer almaktadır.



Şekil 14. GABA'ya Ait SEM Görüntüsü (x1000)

GABA'nın çeşitli karakterizasyon yöntemleri ile yapısal, morfolojik ve termal özelliklerinin belirlenmesindeki amaç, maddenin formülasyonlardaki bileşenler ve formülasyon hazırlama parametreleri nedeniyle kimyasal bir değişikliğe uğrayıp uğramayacağını kontrol edilebilmesidir. Değerlendirmeler GABA analiz sonuçları referans alınarak yapılmıştır.

GABA'nın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

Analitik miktar tayini için validasyon çalışmaları

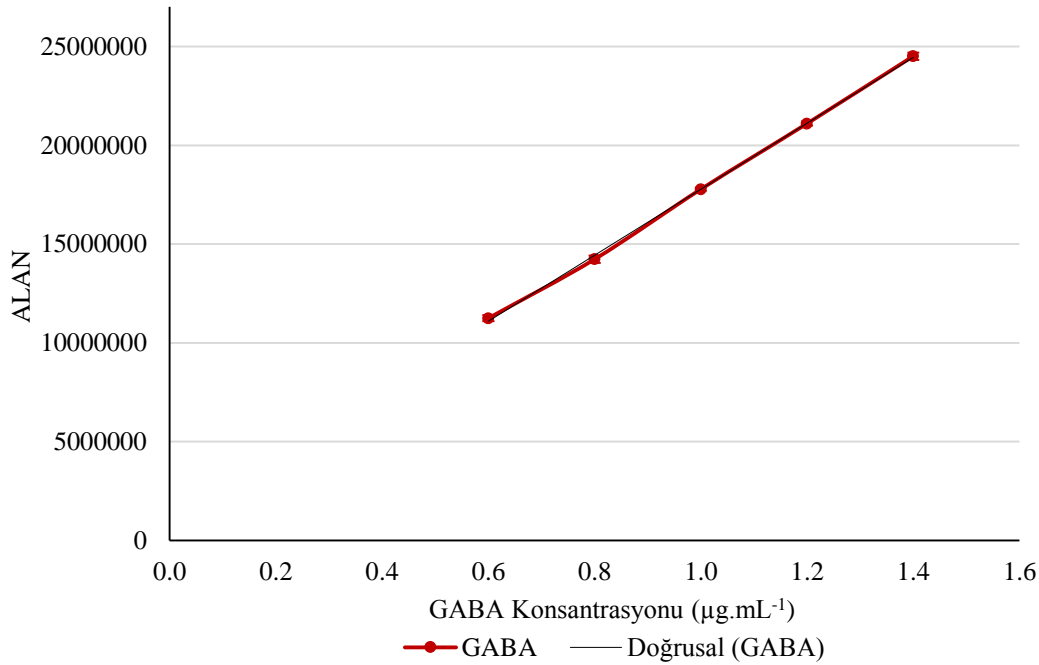
Doğrusallık

0.6-1.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ GABA konsantrasyonu aralığında 5 farklı kalibrasyon seti hazırlanmış ve TR ile türevlendirme tepkimesinin gerçekleştirilmesinin ardından HPLC ile analiz edilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri **Çizelge 12**'de yer almaktadır. Alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğru denklemi **Şekil 15**'te sunulmuştur.

Çizelge 12. GABA'nın Analitik Miktar Tayini Doğrusallık Çalışması Amacıyla Hazırlanan Seriler (n=6)

GABA (µg/mL)	Alan Değerleri						
	1.Seri	2. Seri	3. Seri	4. Seri	5. Seri	6. Seri	ORT
0.6	11528785	11752622	11477103	10826737	11052634	10851236	11586170
0.8	13497808	14550506	14201537	14356321	14786525	14008563	14083284
1	17609151	17481097	18049243	17805623	17865378	17845231	17713164
1.2	21357392	20742267	21436979	20963256	21045920	21052368	21178879
1.4	24348292	24570345	25407314	24244895	24136517	24351195	24775317

Ort: Ortalama



Şekil 15. GABA'nın Analitik Miktar Tayini İçin HPLC Standart Eğrisi (n=6)
(Doğrusallık Eşitliği $y = 16694650.333x + 1078777.667$, $r = 0.9997$, $r^2 = 0.9994$,
Eğim \pm SS= $16694650.333 \pm 579712.554$, Eğimin %95 CI: 16208820-17180480)

Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği ile ilgili tekrarlanabilirlik (güniçi) ve tekrareldeedilebilirlik (günlerarası) kesinlik sonuçlarının değerlendirildiği üç farklı konsantrasyonda yapılan ölçümlerde BSS %2'nin altında ise kullanılan yöntemin kesinliği kanıtlanmış denebilir.

Test sonuçlarına göre yöntemin kesinliği istenilen aralıklar içinde bulunmuştur (Çizelge 13).

Çizelge 13. GABA'nın Analitik Miktar Tayini İçin Güniçi ve Günlerarası Kesinlik Sonuçları

GABA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		Güniçi			Günlerarası
		1. gün	2. gün	3. gün	
0.6	Ortalama Alan	11139912	11261683	11030824	11144140
	SH	178850.034	280681.226	155051.099	209058.757
	BSS	0.0161	0.0249	0.0141	0.0188
1	Ortalama Alan	17935227	17952972	18211755	18033318
	SH	476578.043	326924.582	224103.703	337677.573
	BSS	0.0266	0.0182	0.0123	0.0187
1.4	Ortalama Alan	24850183	25202331	24875964	24976159
	SH	251662.577	65771.569	612677.606	373707.044
	BSS	0.0101	0.0026	0.0246	0.0150

Doğruluk

Doğruluk çalışması için çalışma aralığı içinde üç farklı konsantrasyonda (0.5, 0.75 ve 1.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) GABA içeren örnekler hazırlanmıştır. Yüzde geri kazanım değerlerinin %98-102 aralığında olması gerektiği literatürde belirtilmiştir (Shabir, 2003). %99-101 değerleri ile yöntem iyi geri kazanım sonuçları göstermiştir (Çizelge 14).

Çizelge 14. GABA'nın Analitik Miktar Tayini İçin Elde Edilen Doğruluk Değerleri (n=6)

GABA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Geri Kazanım ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	% Geri Kazanım	SH	BSS
0.75	0.7470	99.596	0.487	0.012
1	1.0053	100.530	0.699	0.017
1.25	1.2609	100.870	0.561	0.014

Duyarlılık

Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanan LOD değeri 0.1069 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanan LOQ değeri ise 0.3239 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Yöntem için kullanılan çalışma aralığı olan 0.6-1.4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon aralığı, hazırlanan formülasyonlardaki GABA miktarlarının yaklaşık olarak %60-140'ı kadardır.

Seçicilik

Seçicilik çalışması için hareketli faz, %50 metanol, PBS (pH 7.4) ve GABA'nın türevlendirilmesi ile elde edilen kromatogramlar Şekil 16- Şekil 19'da verilmiştir.

Çalışmada etkin madde içermeyen formülasyonlar ile etkin madde içeren formülasyonlar analiz edilerek sistemin seçiciliği belirlenmeye çalışılmıştır. Hazırlanan formülasyonların HPLC seçicilik analiz kromatogramları Şekil 20-Şekil 27'de sunulmuştur.

Elde edilen kromatogramlar, GABA'nın iyi bir biçimde ayrıldığını göstermektedir. Formülasyonlarda kullanılan diğer yardımcı maddelerden ve kullanılan diğer çözücü, seyreltme çözeltisi gibi etkenlerden sistemin etkilenmemesi ile yöntemin GABA için seçici olduğu görülmüştür.

Sağlamlık/Tutarlılık

Yöntem parametrelerinin çeşitliliği denenerek, yöntemin güvenilir olduğuna karar verilmiştir.

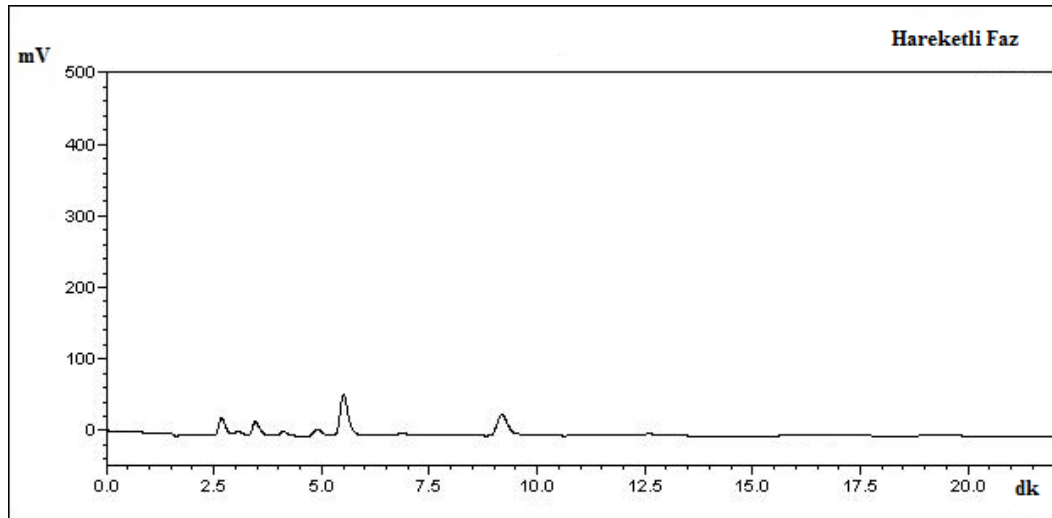
Hareketli faz olarak, metanol:su:asetonitril, metanol:su ve metanol:Na₂HPO₄ tamponu değişik oranlarda denenmiştir. Etkin madde pikinin ayrılması, pik morfolojisi ve uygun alıkonma zamanları için hareketli fazda 40:60 metanol:Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.7) oranına karar verilmiştir.

Akış hızı, kolonun özelliklerine uygun olarak, 0.5-1 mL.dk⁻¹ aralığında denenmiştir. En uygun pik şekli ve alıkonma zamanı için 0.8 mL.dk⁻¹ akış hızında çalışılmasına karar verilmiştir.

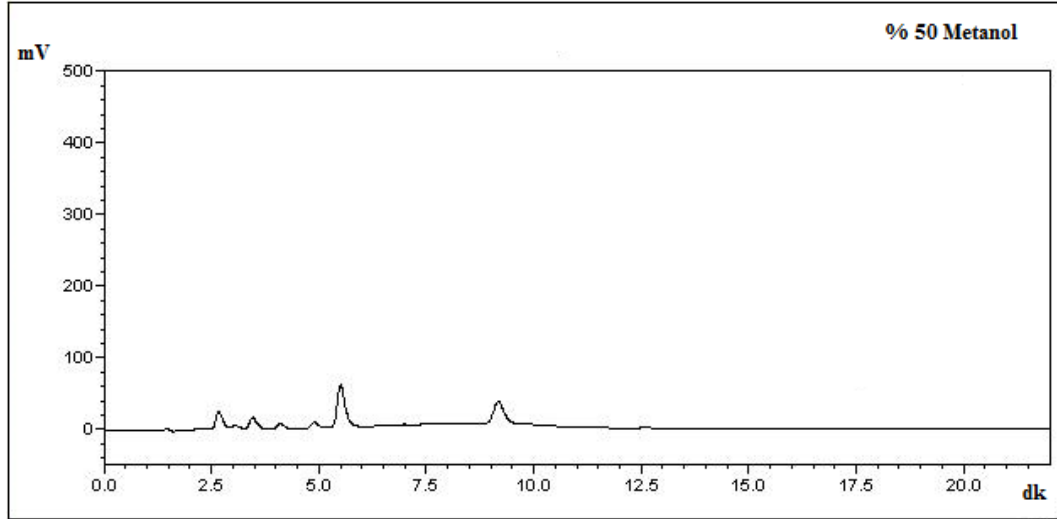
Türevlendirme tepkimesi için türevlendirme tepkimesinin öncesi farklı seyreltme çözeltileri (perklorik asit, PBS ya da 50:50 metanol:su), tepkimede farklı örnek:TR oranları (400 µL:300 µL ve 400 µL:400 µL), farklı tepkime süreleri (1-2 dk) denenmiştir. Piklerin ayrılması, tutarlılığı, konsantrasyona karşı duyarlılığı ve tepkimenin tamamen gerçekleşmesi açısından seyreltme çözeltisi olarak 50:50 metanol:su karışımına, tepkimede örnek:TR oranı için 400µL:300µL oranına ve tepkime süresi için 2dk süresince 2000rpm'de ışıktan korunarak vorteks karıştırıcıda tepkimenin yürütülmesine karar verilmiştir.

Enjeksiyon hacmi, **http-4**'te öngörülen şekilde 27 µL, fırın sıcaklığı 30°C olarak uygulanmıştır.

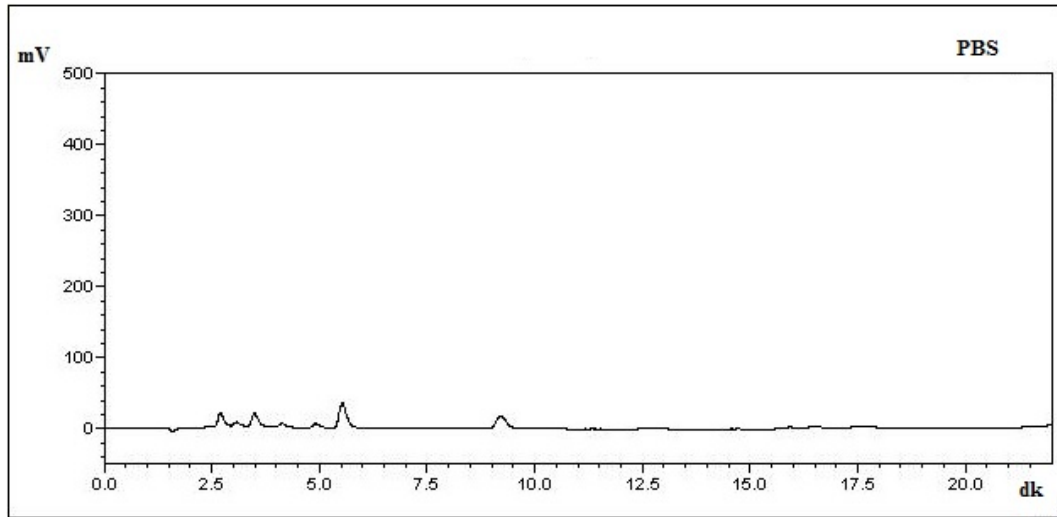
Kolon olarak 4.6 x 100 mm, 3 µm C18 Inertsil ODS-3 kolon tercih edilmiştir.



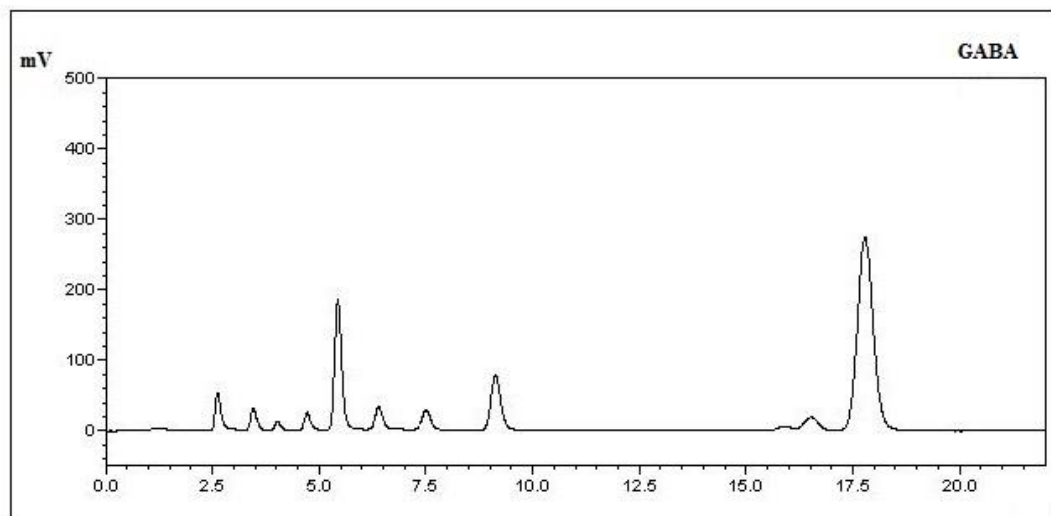
Şekil 16. Hareketli Faza Ait Kromatogram



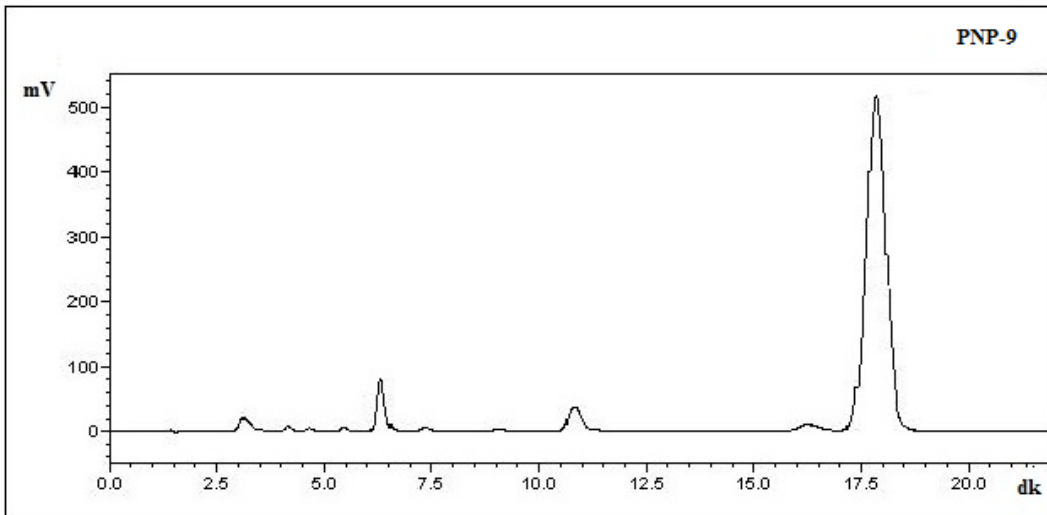
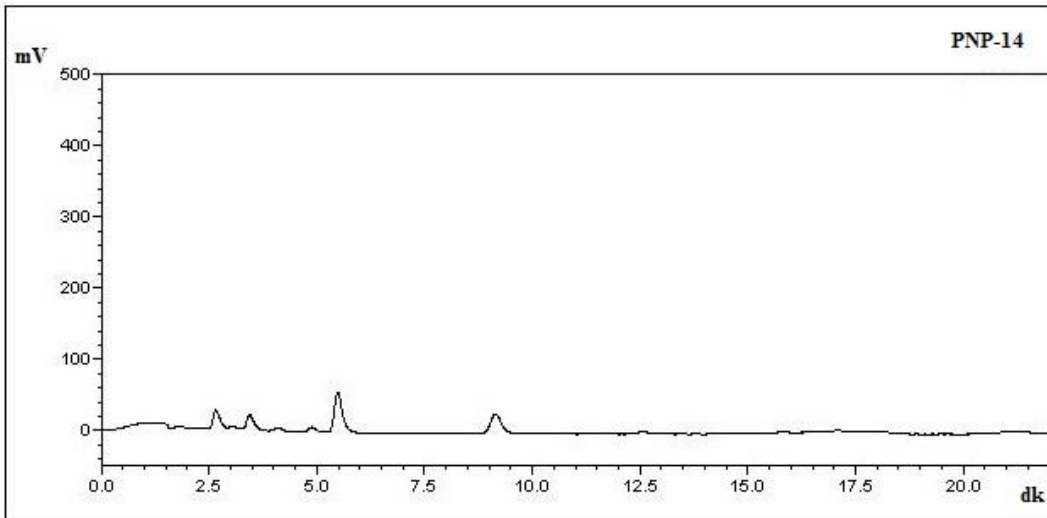
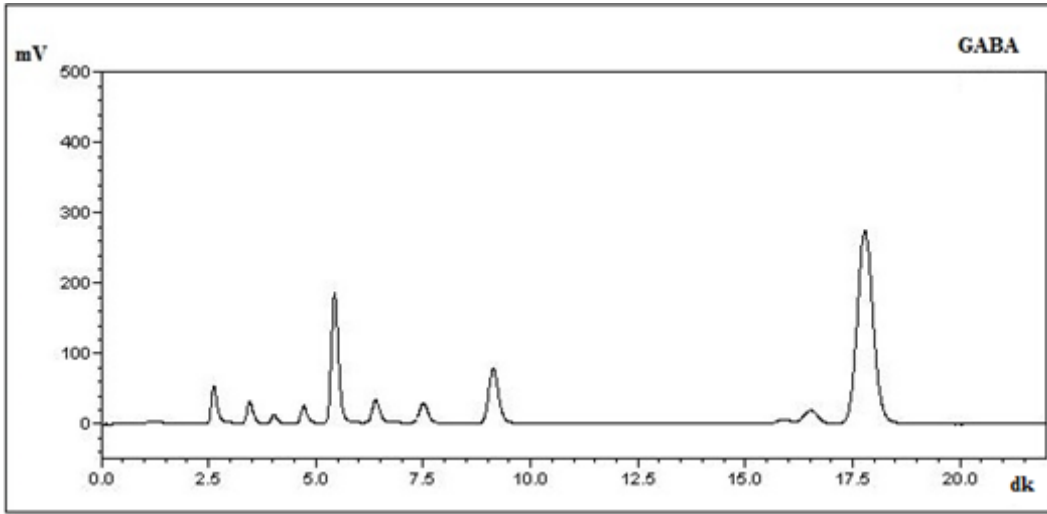
Şekil 17. %50 Metanol'e Ait Kromatogram



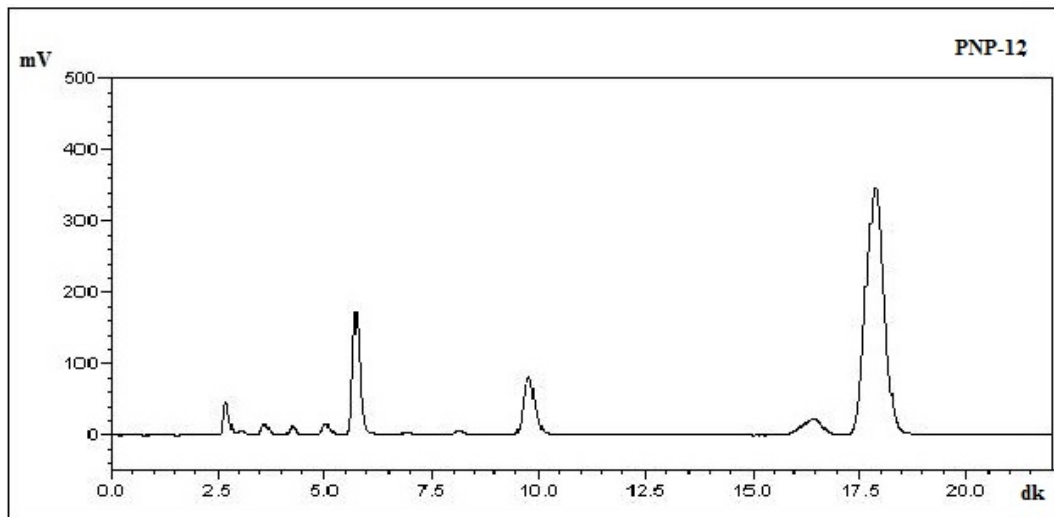
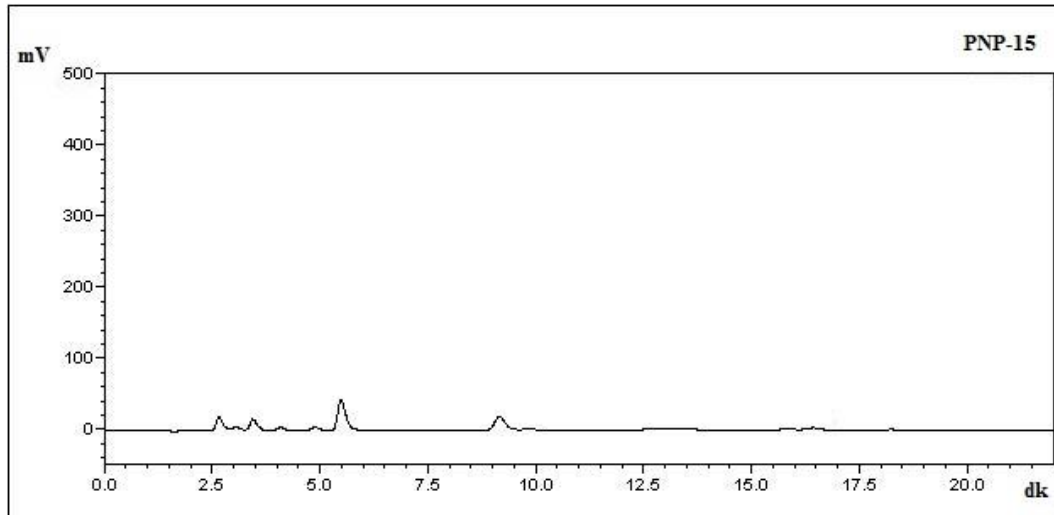
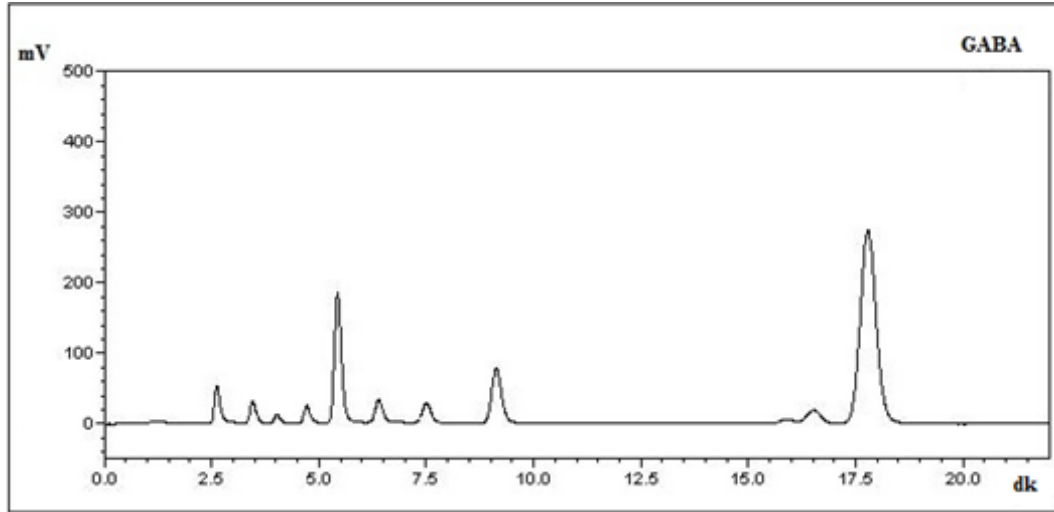
Şekil 18. Fosfat Tamponuna (pH 7.4) Ait Kromatogram



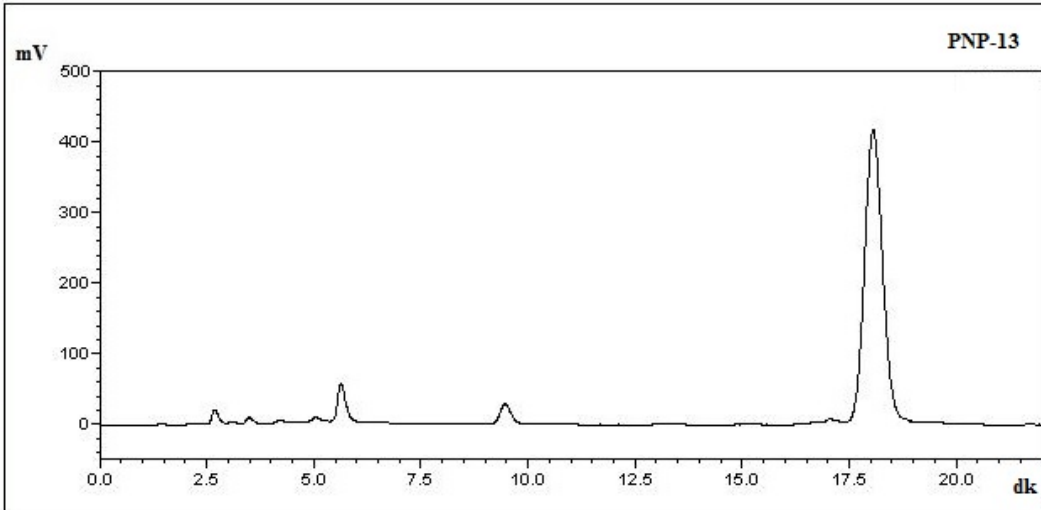
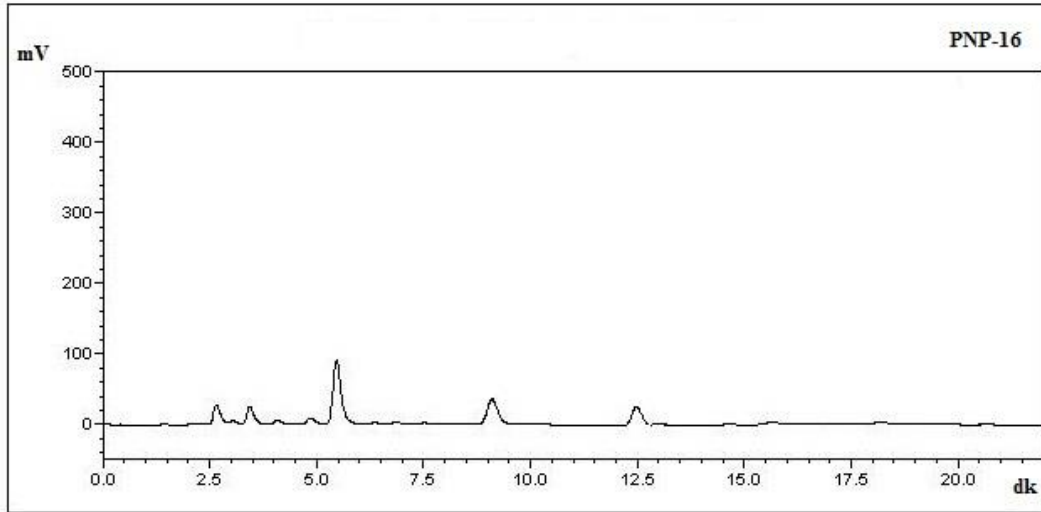
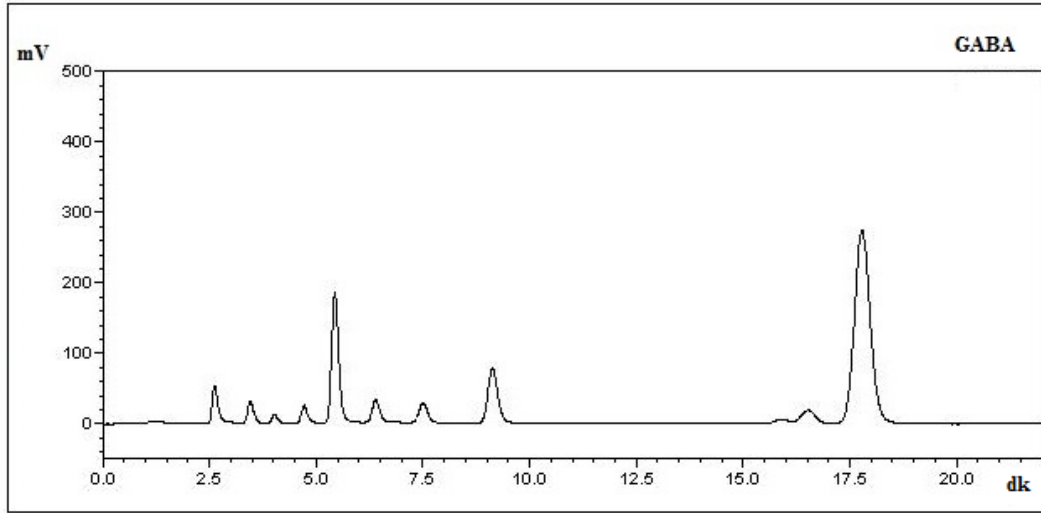
Şekil 19. GABA'ya Ait Kromatogram



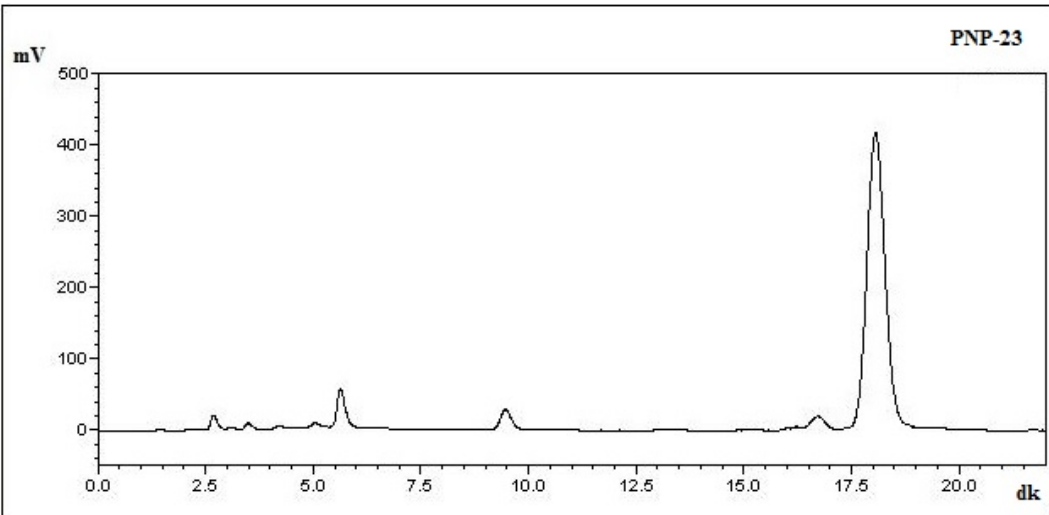
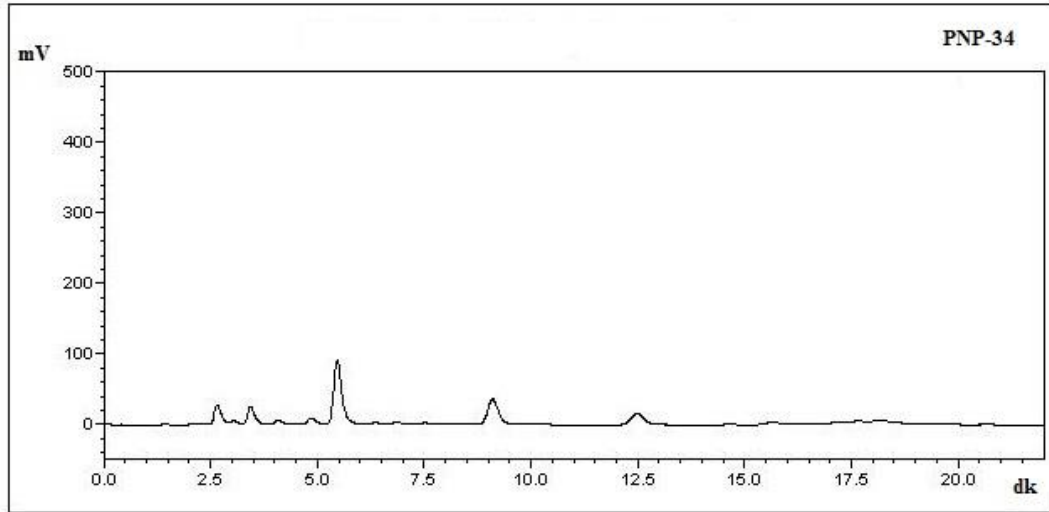
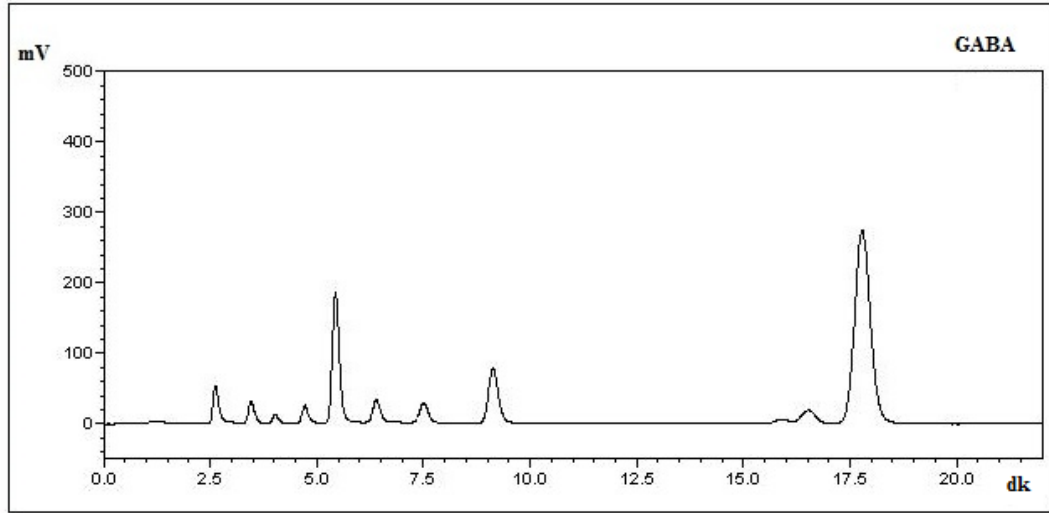
Şekil 20. PNP-9 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları



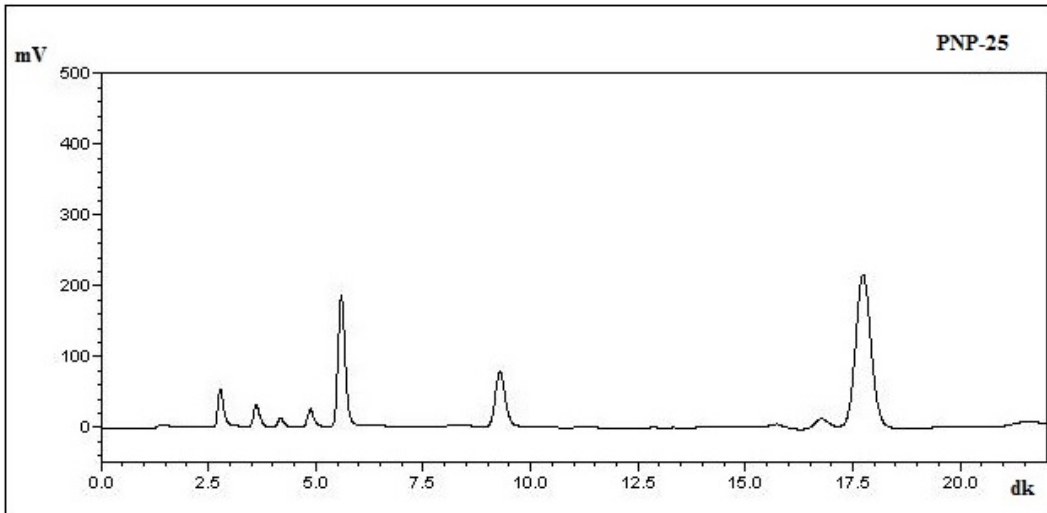
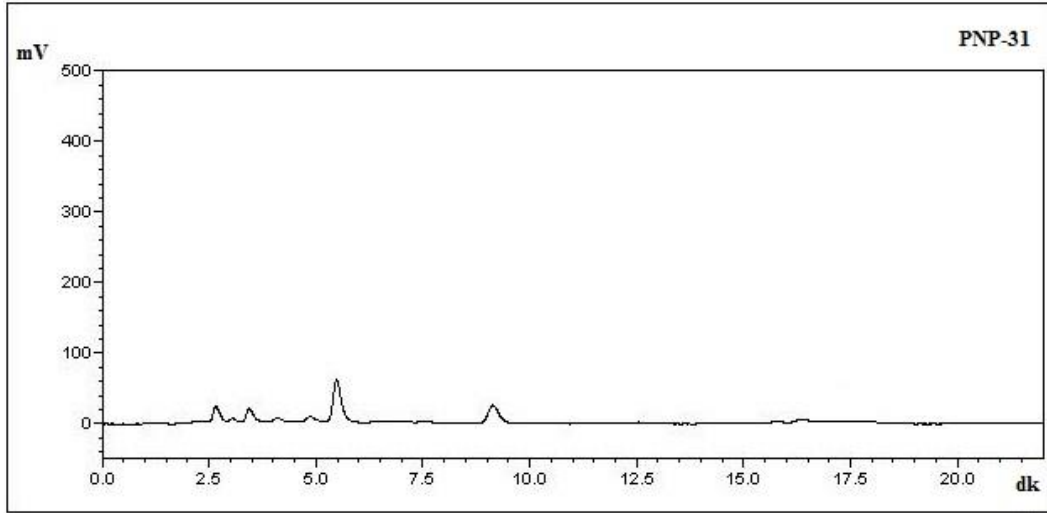
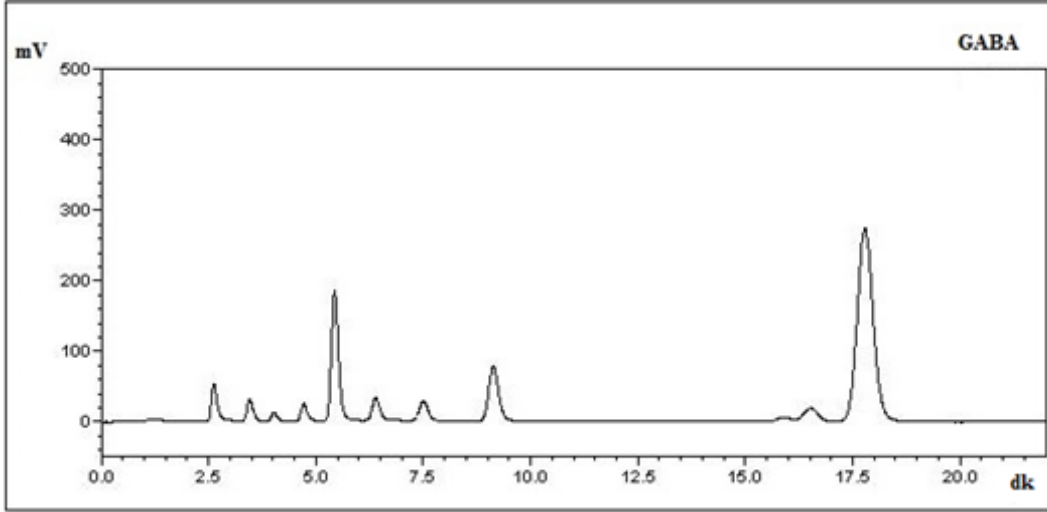
Şekil 21. PNP-12 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları



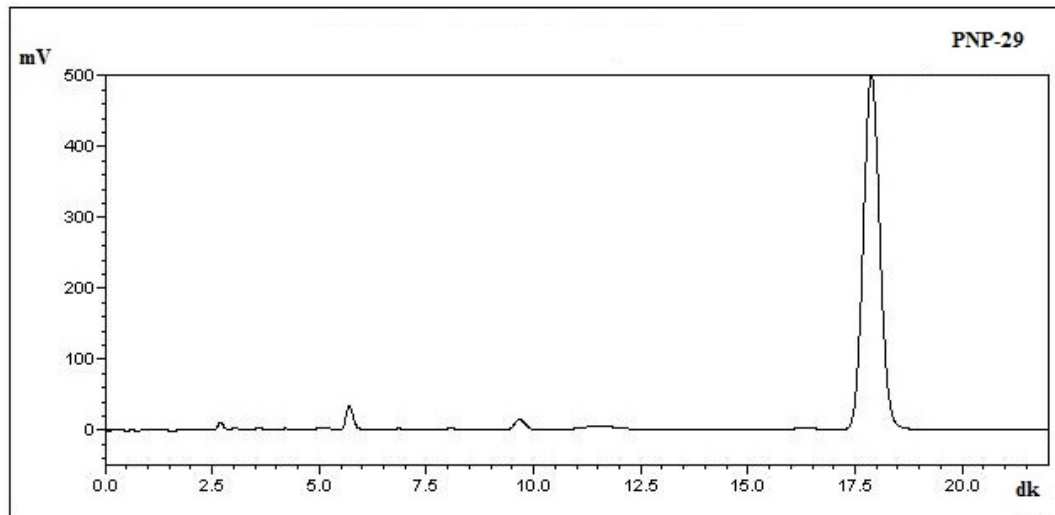
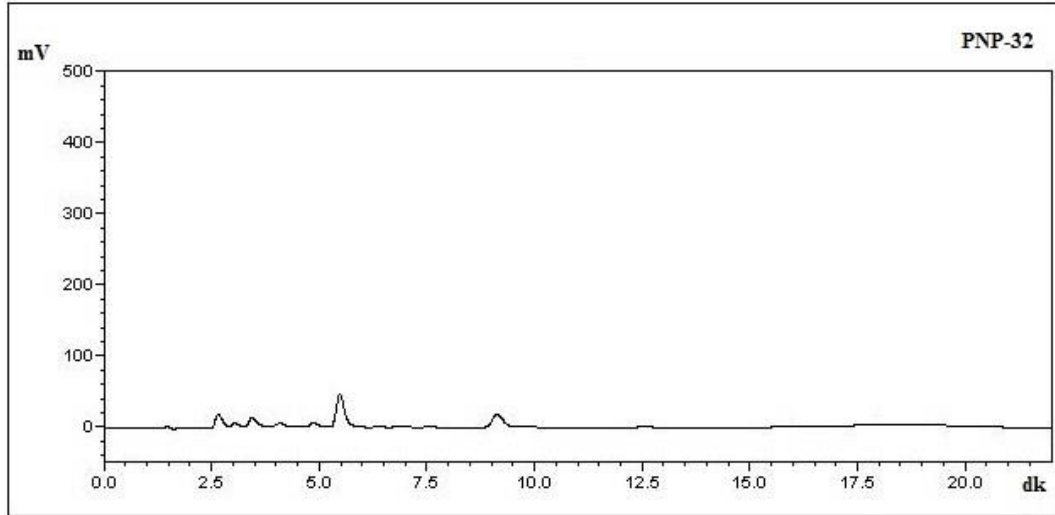
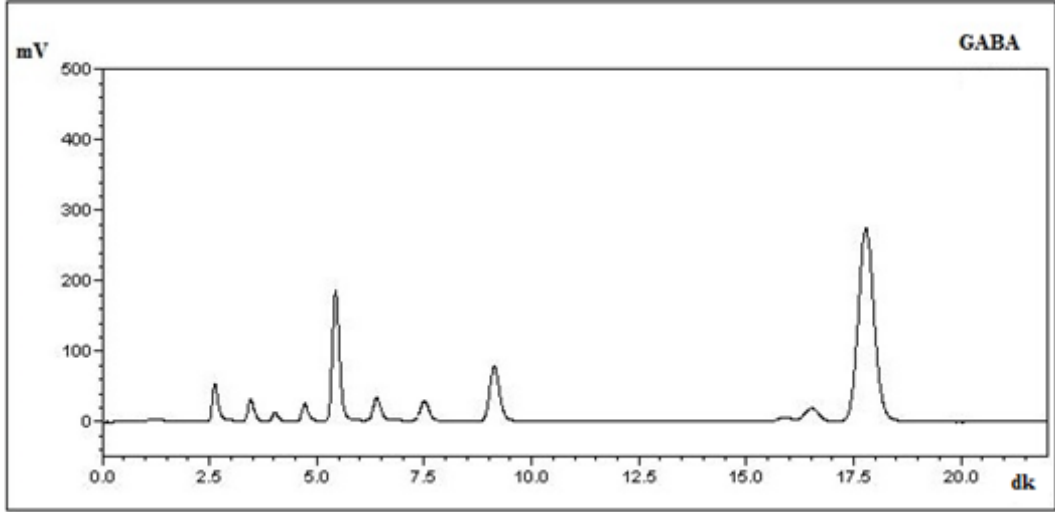
Şekil 22. PNP-13 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları



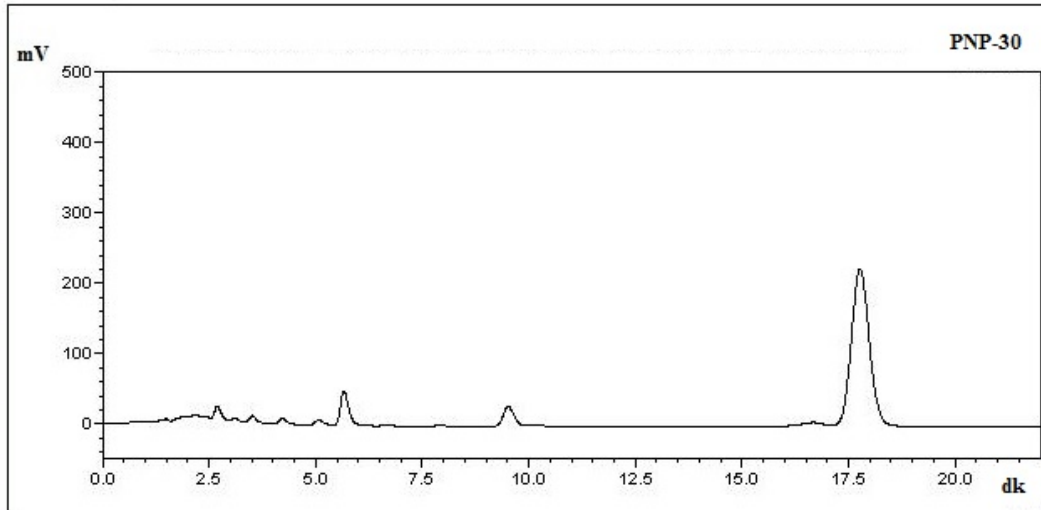
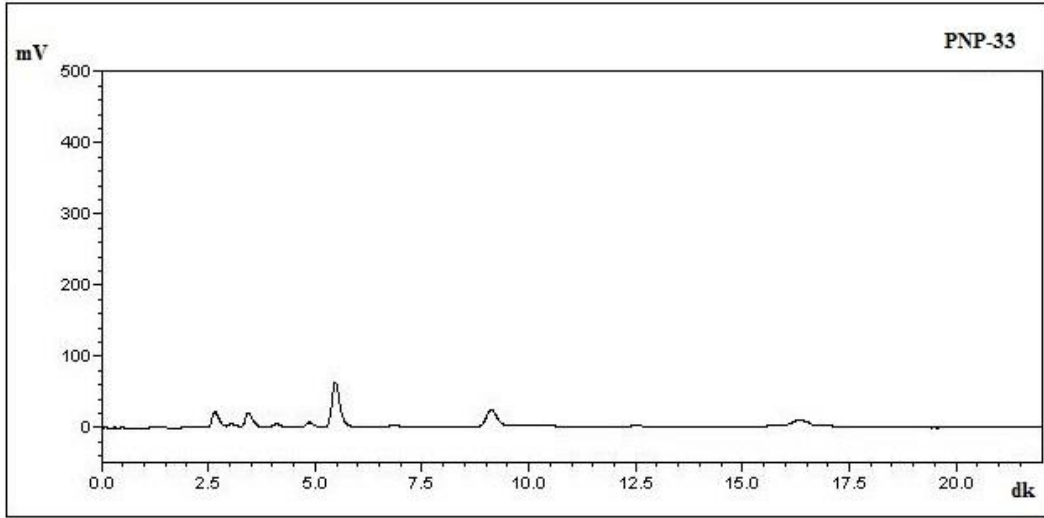
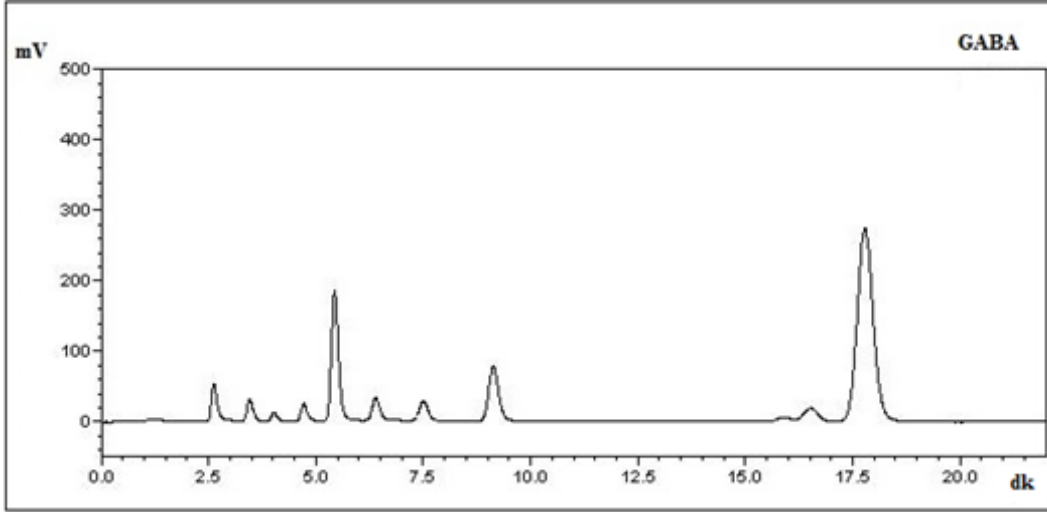
Şekil 23. PNP-23 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları



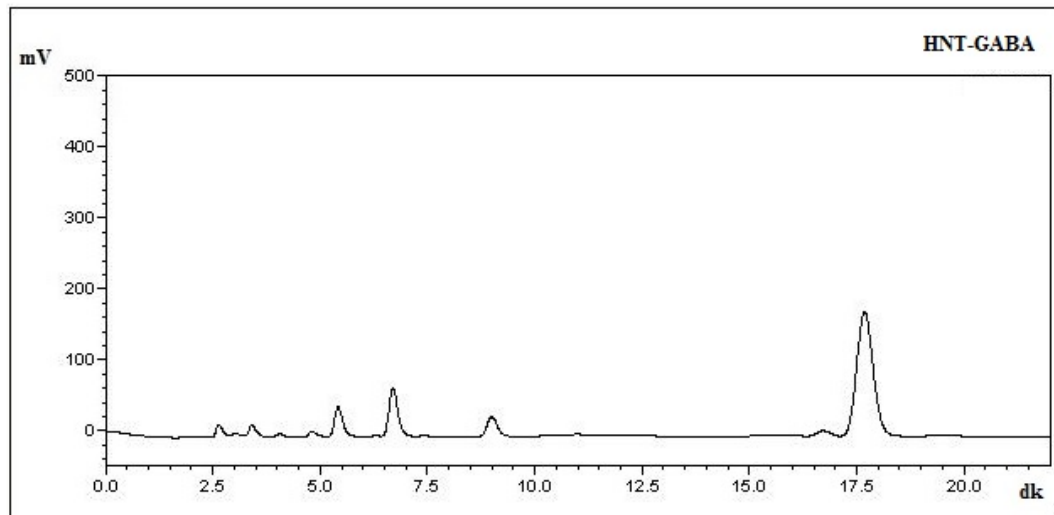
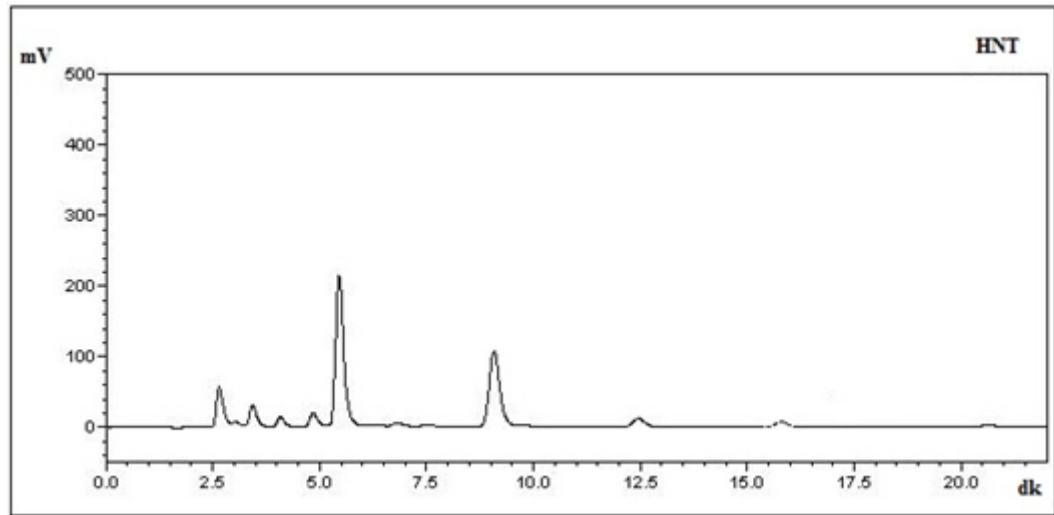
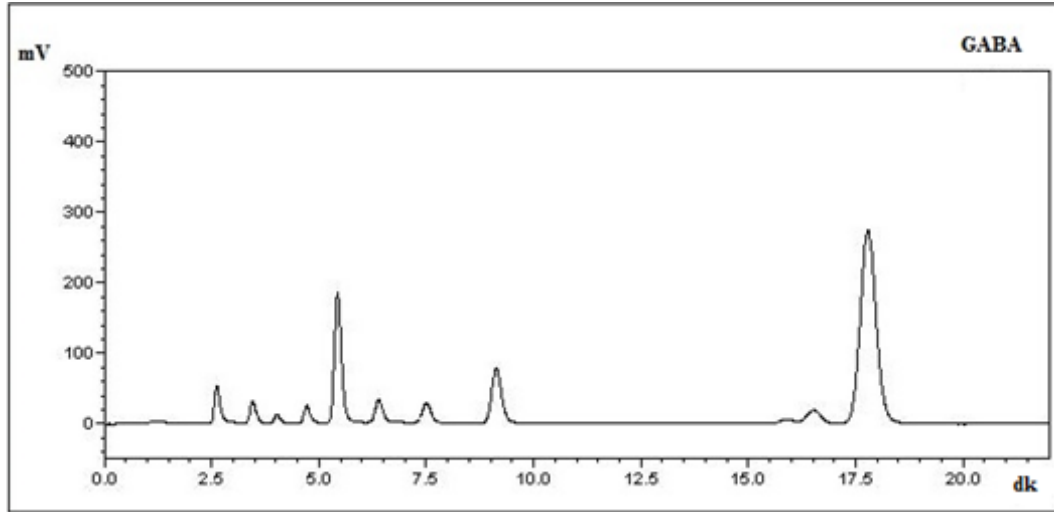
Şekil 24. PNP-25 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları



Şekil 25. PNP-29 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları



Şekil 26. PNP-30 Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları



Şekil 27. HNT-GABA Formülasyonunun Seçicilik Analizi Kromatogramları

Çalışma koşullarında kararlılık

Formülasyon hazırlama koşullarındaki kararlılık

PNP hazırlama koşullarında (n-hekzan, 60°C’de, 3 saat) etkin maddenin kararlılığının incelenmesi, “GABA’nın yüksek basınçlı sıvı kromatografisi” bölümünde (Sayfa 39) anlatıldığı şekilde GABA miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. HPLC ile gerçekleştirilen miktar tayini analizinde etkin maddenin 95.5 ± 1.235 ’inin (ORT \pm SH) bozunmadan kaldığı bulunmuştur.

HNT’lere GABA yüklenmesinde kullanılan hazırlama koşullarında (distile su, 80°C’de, 1 saat) GABA’nın 98.4 ± 0.363 ’ünün (ORT \pm SH) kararlılığını koruduğu gözlenmiştir.

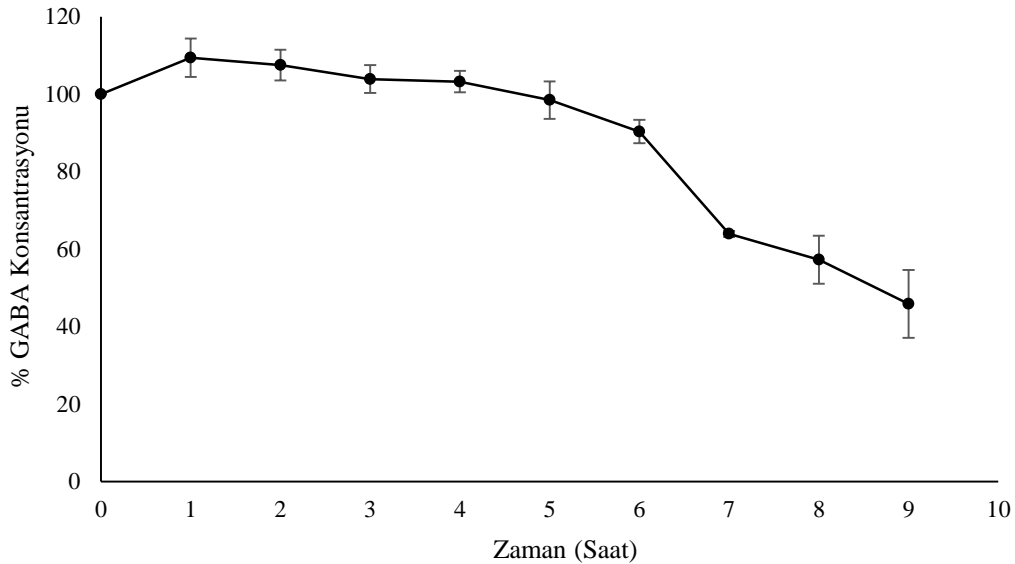
Etkin madde miktar tayini analizi için numune hazırlama koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı %50 metanolde 50°C sıcaklıkta ultrasonikasyon altında incelendiğinde, 15 dk sonunda 99.5 ± 0.724 ’ünün (ORT \pm SH) bozunmadan kaldığı bulunmuştur. Bu nedenle kullanılan koşulların uygun olduğuna karar verilmiştir.

İn vitro salım ortamı koşullarındaki kararlılık

Etkin maddenin kararlılığı *in vitro* salım ortam koşullarında incelendiğinde **Şekil 28**’deki profil elde edilmiştir.

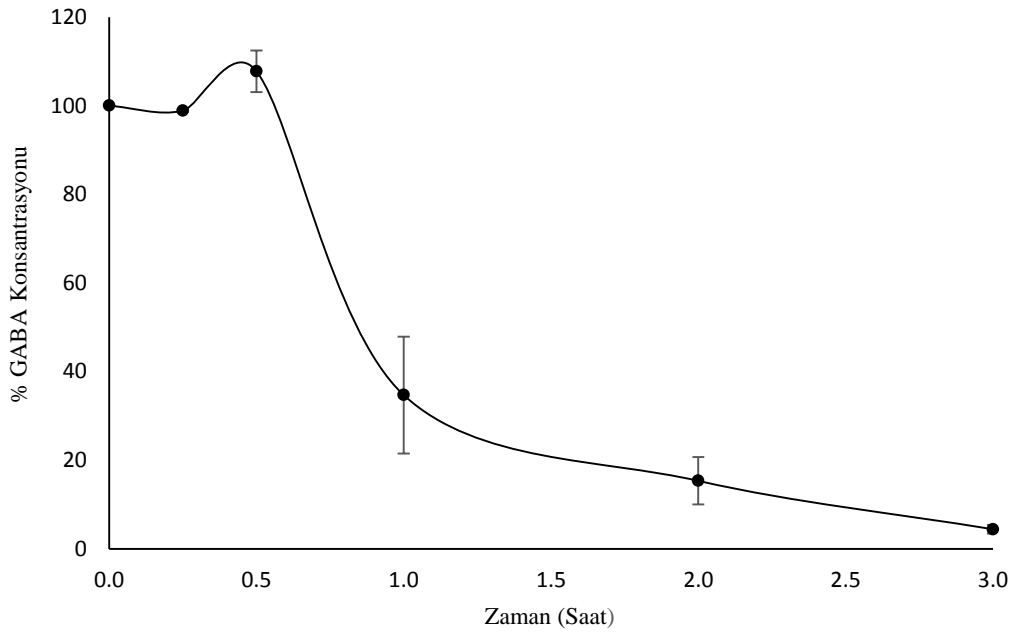
Etkin maddenin salım ortamındaki (PBS, pH 7.4) kararlılığına ilişkin olarak gerçekleştirilen deney sonucunda 6 saatlik süre sonunda etkin maddenin 90.33 ± 1.003 ’ünün bozunmadan kaldığı bulunmuştur (n=6). Bu nedenle *in vitro* salım deneyleri 6 saat süresince gerçekleştirilmiştir.



Şekil 28. *In Vitro* Salım Ortamında Etkin Maddenin Kararlılığına Ait Profil (n=3)

Sterilizasyon yöntemi koşullarındaki kararlılık

Etkin madde ve formülasyonların sterilizasyonu için kullanılan UV radyasyon koşullarında etkin madde kararlılığına ait profil **Şekil 29**'da yer almaktadır. 15. dk sonunda GABA'nın %98.9'unun bozunmadan kaldığı bulunmuştur (n=3). Böylece sterilizasyon için UV radyasyon süresinin 15 dk olmasına karar verilmiştir. Literatürde *Bacillus subtilis*, *E.coli*, *P.aeruginosa* gibi mikroorganizmaların ölmesi için 253.7 nm olan UV ışını ile (şiddeti 20 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$) 15 dakika (18000 $\mu\text{W}/\text{saniye}/\text{cm}^2$) uygulamanın yeterli olduğu bildirilmiştir (Tırnaksız, 2009).



Şekil 29. UV Sterilizasyon Ortamında Etkin Maddenin Kararlılığına Ait Profil (n=3)

İn vitro salım çalışmasında GABA miktar tayini için validasyon çalışmaları

İn vitro salım deneylerinde GABA tayininde daha geniş konsantrasyon aralığında çalışılması gerektiğinden sistemin yeniden valide edilmesine gerek duyulmuştur.

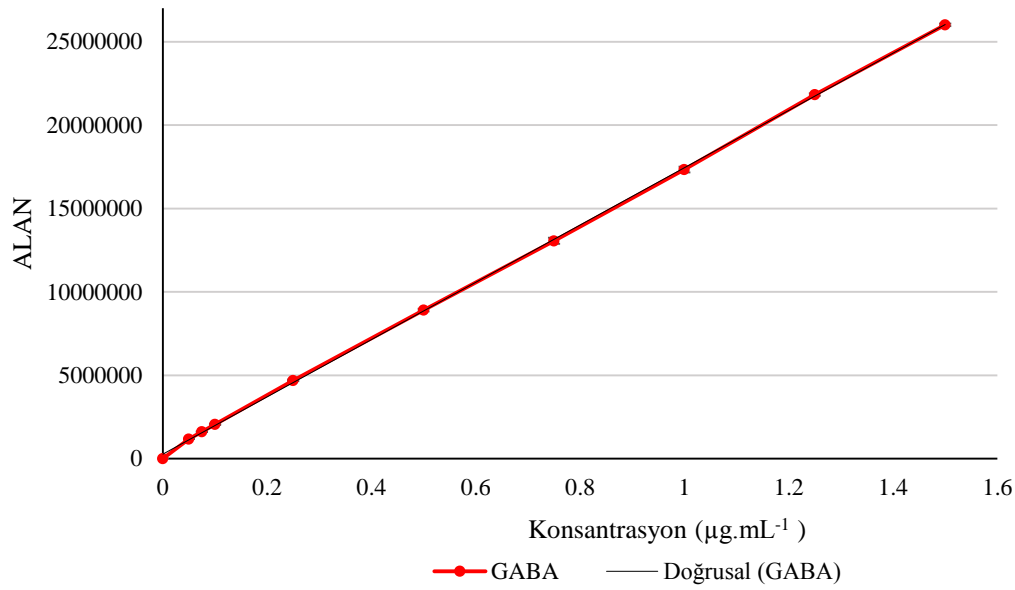
Doğrusallık

Doğrusallık çalışması için hazırlanan serilerde kullanılmak üzere 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ - 1.5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ GABA konsantrasyon aralığında kalibrasyon seti hazırlanmış ve TR ile türevlendirme tepkimesinin gerçekleştirilmesinin ardından HPLC ile analiz edilmiştir. Konsantrasyonlara karşılık gelen alan değerleri **Çizelge 15**'te yer almaktadır. Alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğru denklemi **Şekil 30**'da sunulmuştur. Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler ile yapılan analizde eğimin %95 CI 17003600–17248950 olarak bulunmuştur. Yöntemin yüksek doğrusallığı 0.9999 değerindeki korelasyon katsayısı ile saptanmıştır (Shabir, 2003).

Çizelge 15. *İn vitro* Salm Çalışmasında GABA Miktar Tayini için Doğrusallık Çalışması Amacıyla Hazırlanan Seriler (n=6)

GABA (µg/mL)	Alan Değerleri						ORT
	1.Seri	2. Seri	3. Seri	4. Seri	5. Seri	6. Seri	
0.050	1181639	1162845	1201806	1203882	1219873	1114810	1180809
0.075	1556652	1678820	1637840	1632013	1587153	1570505	1610497
0.100	2161938	2193520	2091938	1957054	1982126	1945812	2055398
0.250	4653914	4571058	4607524	4572240	4870116	4857194	4688674
0.500	9181152	9151152	8974200	8716153	8514703	8910284	8907941
0.750	13378639	13498544	13520476	12080285	12875068	13025085	13063016
1.000	17962557	17574560	16609151	17481097	17549243	16805623	17330372
1.250	21767244	21467253	21662557	22056488	22174560	21829541	21826274
1.500	25723390	25923390	26037854	25870561	26071282	26417358	26007306

ORT: Ortalama



Şekil 30. *İn Vitro* Salm Çalışmasında GABA Miktar Tayini için GABA'nın HPLC Standart Eğrisi (n=6)
(Doğrusallık Eşitliği $y = 17126272.111x + 313396.318$, $r = 0.9999$, $r^2 = 0.99995$,
Eğim \pm SS = $17126272.111 \pm 87082.115$, Eğimin %95 CI: 17003600- 17248950)

Kesinlik

Yapılan analizler sonucunda elde edilen sonuçlar, SH ve BSS değerleri **Çizelge 16**'da sunulmuştur. Test sonuçlarına göre yöntemin kesinliği istenilen aralıklar içinde bulunmuştur.

Çizelge 16. *In Vitro* Salm Çalışmasında GABA Miktar Tayini için Güniçi ve Günlerearası Kesinlik Sonuçları

GABA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		Gün-içi (n=3)			Günlerearası (n=9)
		1.gün	2.gün	3.gün	
0.05	Ortalama Alan	1174615	1166662	1170972	1170375
	SH	8364.458	4086.044	2129.674	2989.073
	BSS	0.0123	0.0061	0.0032	0.0076
0.10	Ortalama Alan	2060952	2037096	2058161	2052070
	SH	35580.823	49832.318	52924.942	14004.589
	BSS	0.0173	0.0245	0.0257	0.0205
1.00	Ortalama Alan	17502848	176196388	17911755	17678080
	SH	274310.152	204801.271	171226.234	126118.669
	BSS	0.0271	0.0201	0.0166	0.0214

Doğruluk

Doğruluk çalışması için çalışma aralığı içinde üç farklı konsantrasyonda (0.1, 0.5 ve 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) GABA içeren örnekler hazırlanmıştır. Yöntem %100.029-% 101.935 değerleri ile iyi geri kazanım sonuçları göstermiştir (**Çizelge 17**).

Çizelge 17. *In Vitro* Salm Çalışmasında GABA Miktar Tayini için Elde Edilen Doğruluk Değerleri (n=6)

GABA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Geri Kazanım ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Geri Kazanım	SH	BSS
0.1	0.1000	100.029	0.664	0.016
0.5	0.5097	101.935	0.611	0.015
1.0	1.0157	101.574	0.506	0.012

Duyarlılık

Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanan LOD değeri 0.0137 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanan LOQ değeri ise 0.0414 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

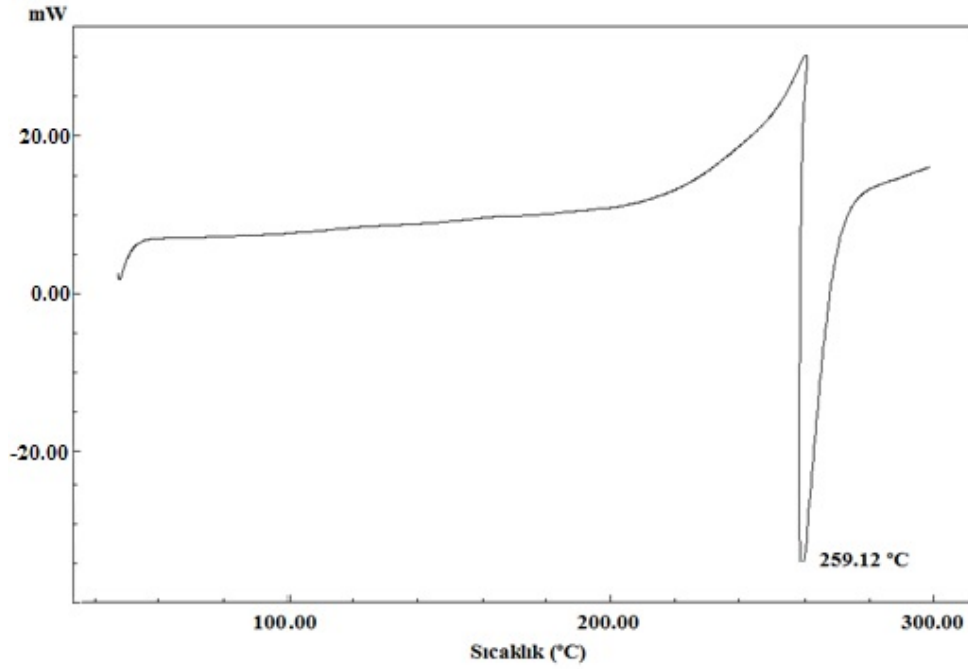
Çalışma aralığı olarak 0.05-1.25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyon kullanılmıştır. Bulunan LOD ve LOQ değerleri çalışma alanı alt sınır olan 0.05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 'in altında olduğundan sitem duyarlılığı saptanmıştır.

Polimerik yüzey etkin madde (PYEM) ile yapılan çalışmalar

PYEM üzerinde gerçekleştirilen çalışmalar PYEM'in 48 saat 50°C'de etüvde tutulması sonrasında gerçekleştirilmiştir.

Termal analiz

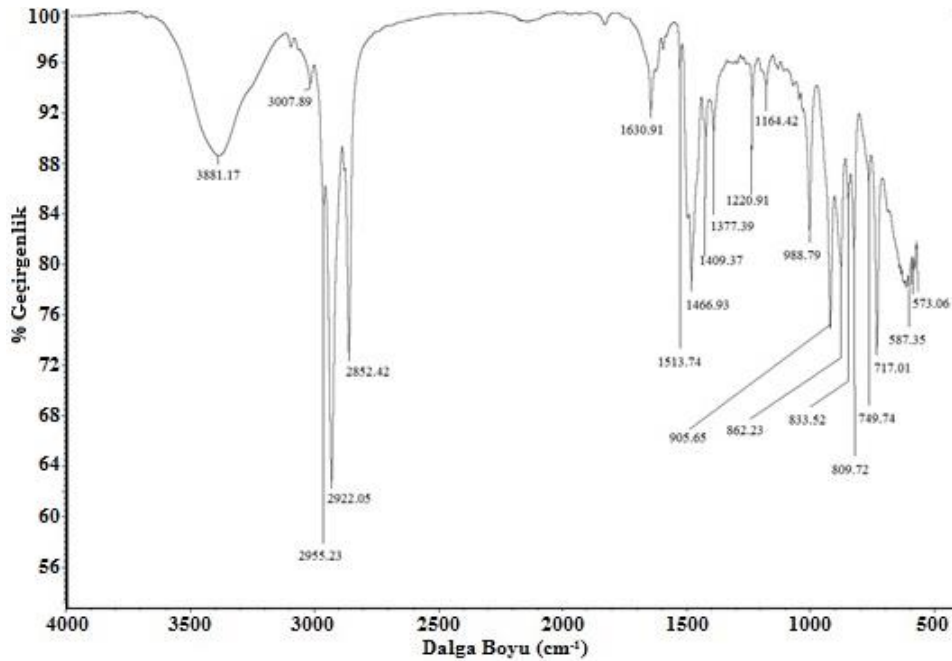
PYEM'in termal analizine ait termogram **Şekil 31**'de sunulmuştur.



Şekil 31. PYEM'e Ait Termogram

İnfrared analizi

PYEM'in FTIR spektrumu Şekil 32'de sunulmuştur. Spektrumda 3381.17 cm^{-1} 'de gözlenen pikin yarı katı şekilden kaynaklı N-H piki olabileceği düşünülmüştür. 3007.89 cm^{-1} 'de gözlenen pikin aromatik C-H'a, 2955.23 cm^{-1} , 2922.05 cm^{-1} ve 2852.42 cm^{-1} 'de gözlenen piklerin alifatik C-H gruplarına ait olduğuna karar verilmiştir. 1630.91 cm^{-1} 'de gözlenen C=C çift bağından kaynaklandığı düşünülmüştür.

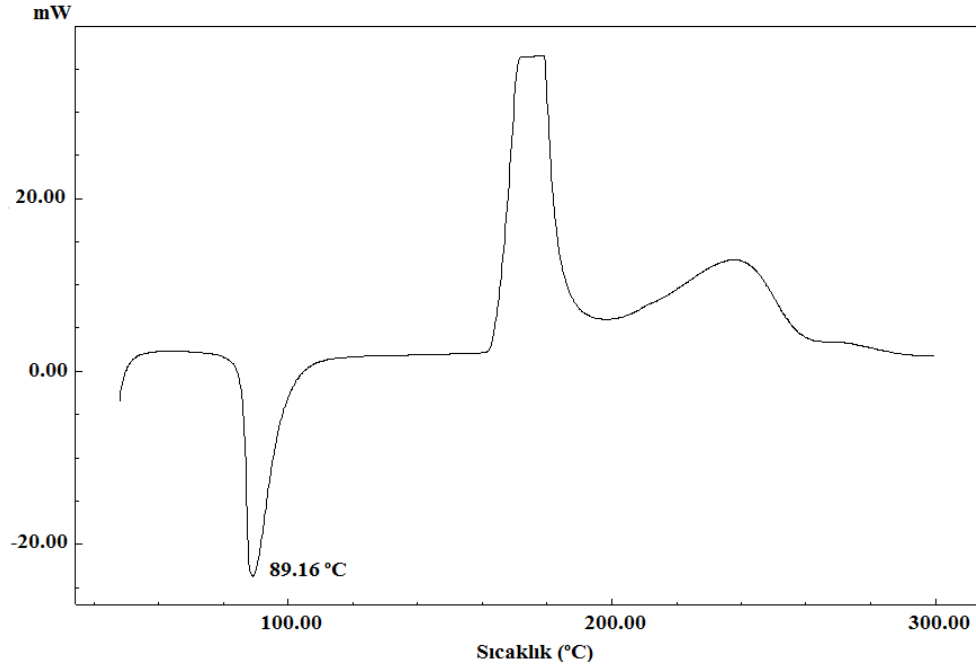


Şekil 32. PYEM'e Ait FTIR Spektrumu

Kullanılan diğer maddeler ile yapılan çalışmalar

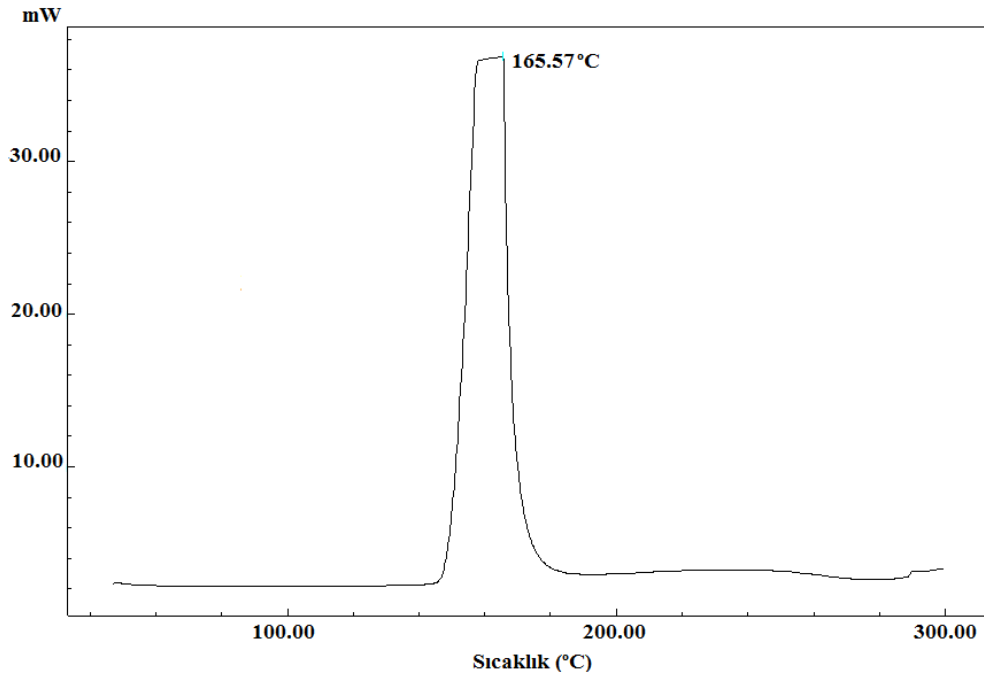
Termal analiz

Ac'nin DSC cihazı ile 50-300°C aralığında yapılan termal analizinde, erime sıcaklığı 89.16 °C olarak bulunmuştur; termogramı **Şekil 33**'de verilmiştir.



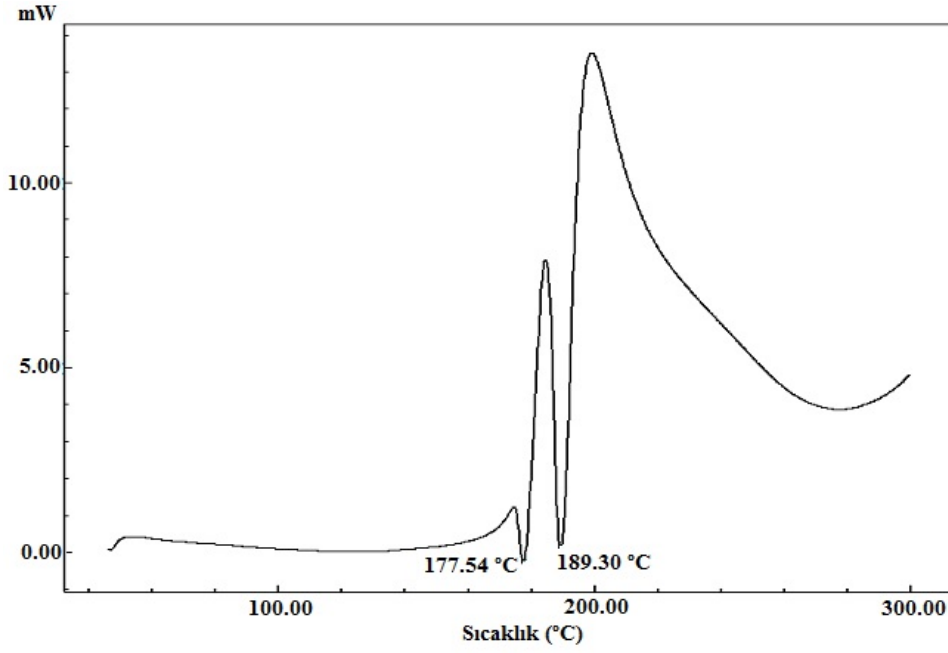
Şekil 33. Akrilamit'e Ait Termogram

DMAc'nin DSC cihazı ile 50-300°C aralığında yapılan termal analizinde, 165.57°C'de tanımlanamayan bir pik gözlenmiştir; termogramı **Şekil 34**'te sunulmuştur.



Şekil 34. N,N-Dimetilakrilamit'e Ait Termogram

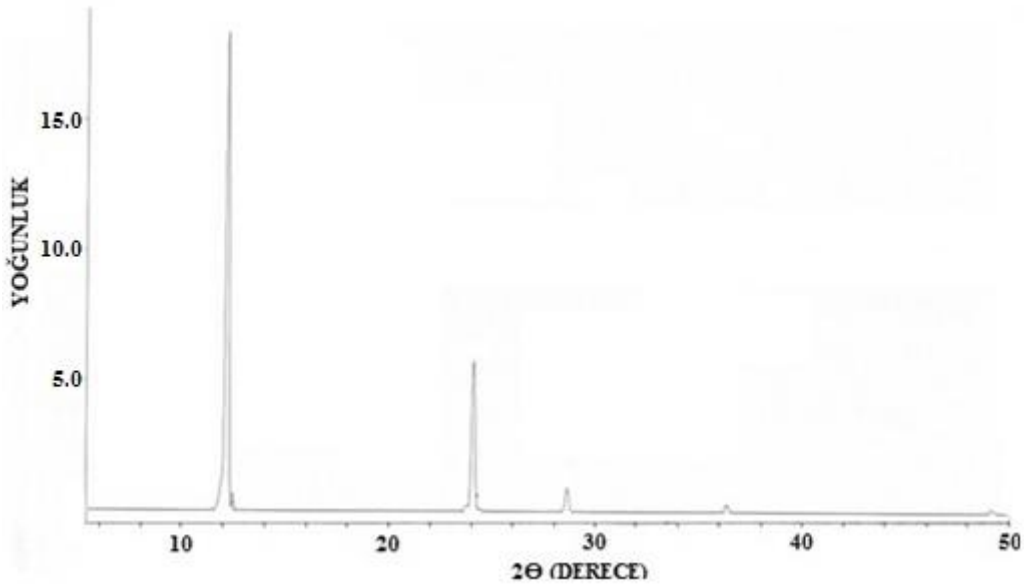
NMBAc'nin DSC cihazı ile 50-300°C aralığında yapılan termal analizinde, erime sıcaklığı 189.30 °C olarak bulunmuştur; termogramı **Şekil 35**'te gösterilmiştir.



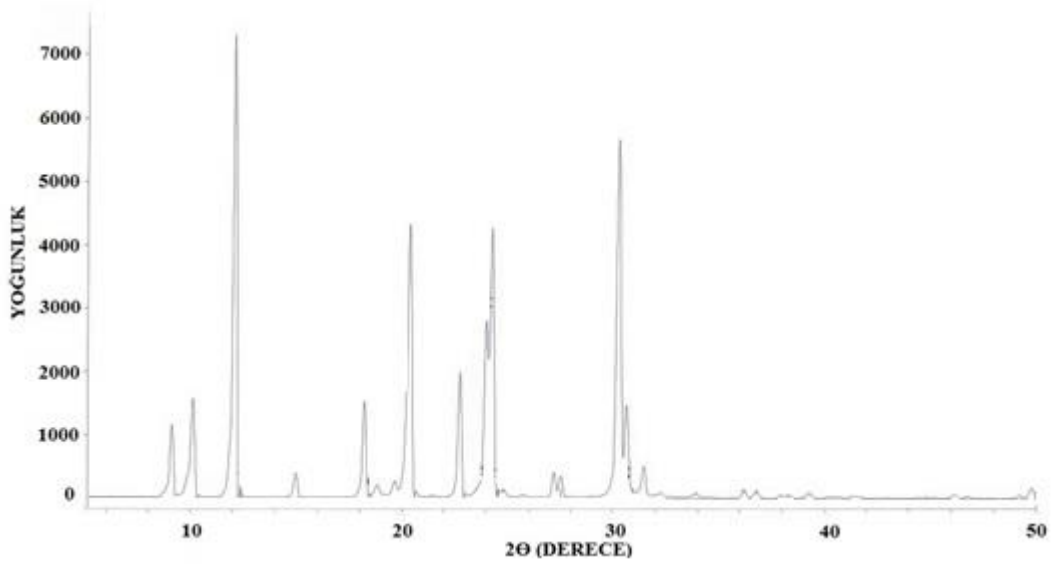
Şekil 35. N,N-Metilenbisakrilamit'e Ait Termogram

X-ışını kırınım analizi

Ac'nin XRD profili **Şekil 36**'da, NMBAc'nin profili ise **Şekil 37**'de sunulmuştur.



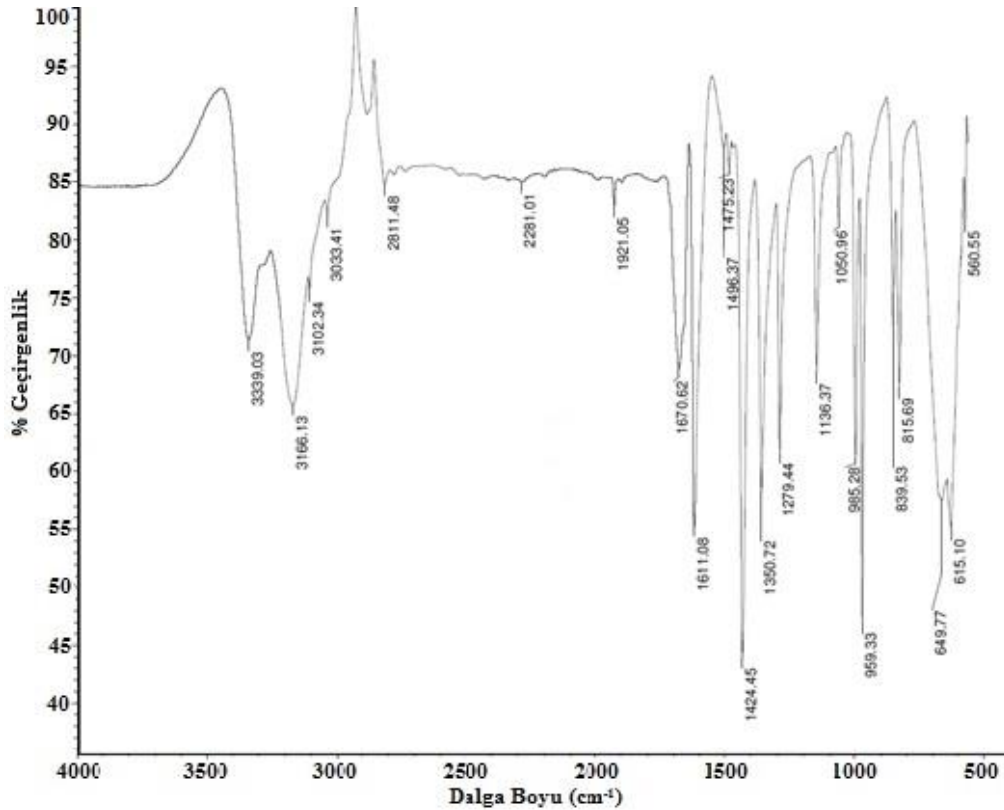
Şekil 36. Akrlamit'e Ait X-İşını Kırınım Profili



Şekil 37. N,N-Metilenbisakrilamit'e Ait X-Işını Kırınım Profili

İnfrared analizi

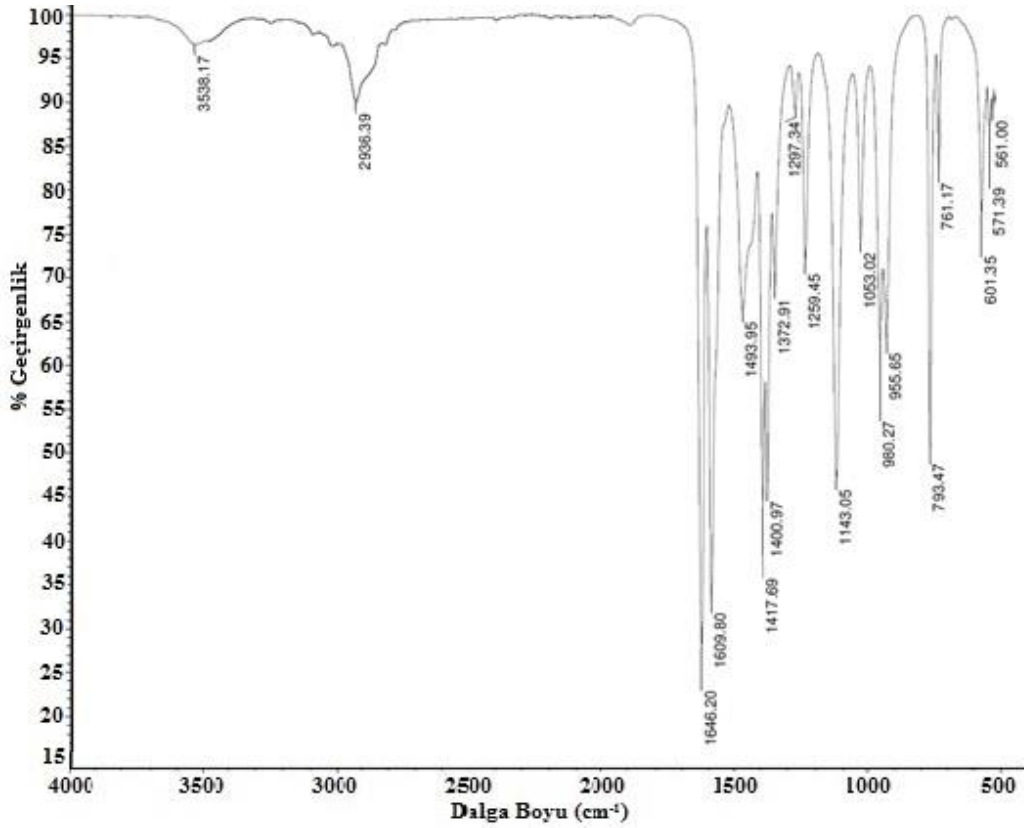
Ac'nin FTIR spektrumu Şekil 38'de verilmiştir. Ac monomerinin yapısında bulunan primer amide ait $-NH$ pikleri 3347.78 cm^{-1} ve 3171.05 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 2811.98 cm^{-1} 'de alifatik C-H bağı gerilmesine rastlanmıştır. Amide ait karbonil grubu piki ise 1673.37 cm^{-1} 'de yer almaktadır. 1611.72 cm^{-1} ve 1423.35 cm^{-1} 'de görülen piklerin N-H eğilmesi ya da C=C gerilmesi olduğu düşünülmüştür.



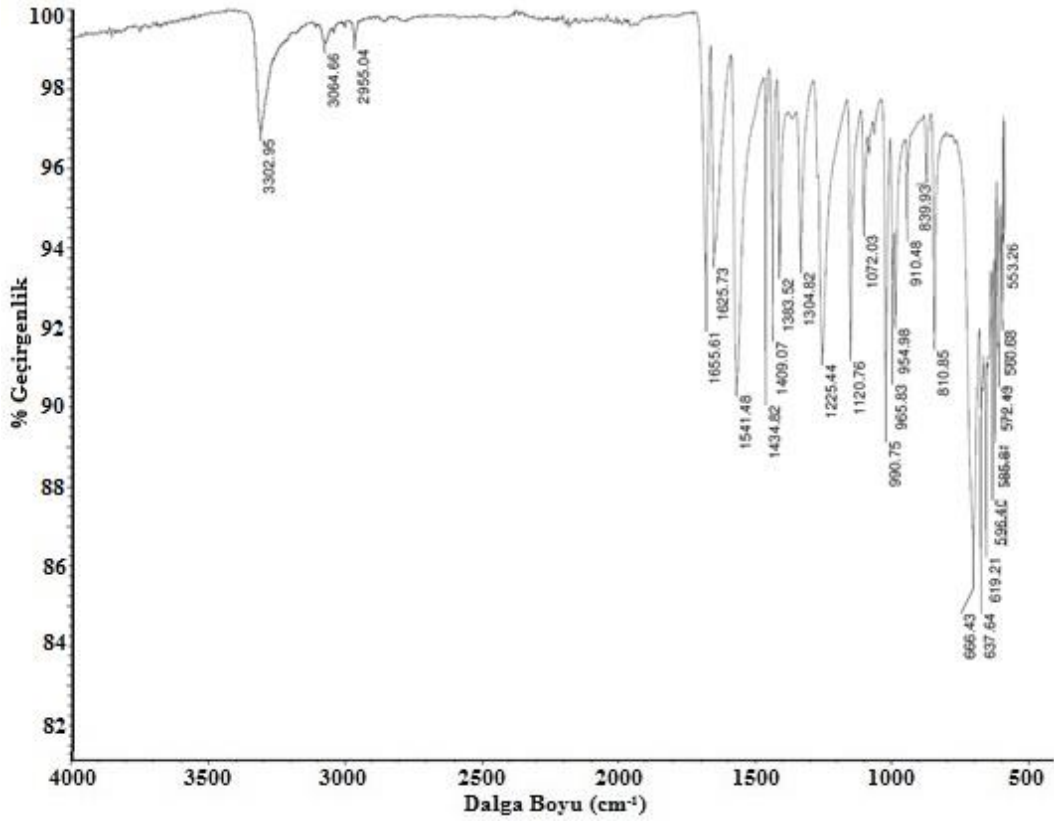
Şekil 38. Akrlamit'e Ait FTIR Spektrumu

DMAc'nin FTIR spektrumu Şekil 39'da sunulmuştur. Spektrumda 3538 cm⁻¹'de N-H bağı gerilmesi, 2936.39 cm⁻¹'de alifatik C-H grubu gerilmesi, 1646.20 cm⁻¹'de amid grubu C=O bağı gerilmesi ve 1609.80- 1400.97 cm⁻¹ aralığında C=C bağı gerilmesi ve N-H bağı eğilmesi titreşimlerine ait pikler olduğu saptanmıştır.

NMBAc'nin FTIR spektrumu Şekil 40'da yer almaktadır. Spektrumda 3302.95 cm⁻¹'de gözlenen pikin monomer yapısında bulunan N-H bağına ait olduğu, 3064.66 cm⁻¹'de gözlenen pikin alken yapısına ait C-H bağına, 2955.04 cm⁻¹'de yer alan pikin alifatik C-H bağına, 1655.61 cm⁻¹'deki pikin amide ait karbonil grubuna ve 1625.73 cm⁻¹ ile 1409.07 cm⁻¹ aralığında gözlenen piklerin ise N-H eğilmesi ya da C=C çift bağı gerilmesine ait olduğu düşünülmüştür. 700 cm⁻¹'den sonra gelen piklerin ise alkene ait düzlem dışı bantlar olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 39. N,N-Dimetilakrilamit'e Ait FTIR Spektrumu



Şekil 40. N,N-Metilenbisakrilamit'e Ait FTIR Spektrumu

Halosit ile yapılan çalışmalar

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi

PCS yardımı ile gerçekleştirilen analiz sonucunda HNT'lerin parçacık büyüklüğü 446.80 ± 23.710 nm (ORT \pm SH) polidisperslik indisi ise (PDI \pm SH: 0.417 ± 0.063) olarak bulunmuştur.

Zeta potansiyel analizi

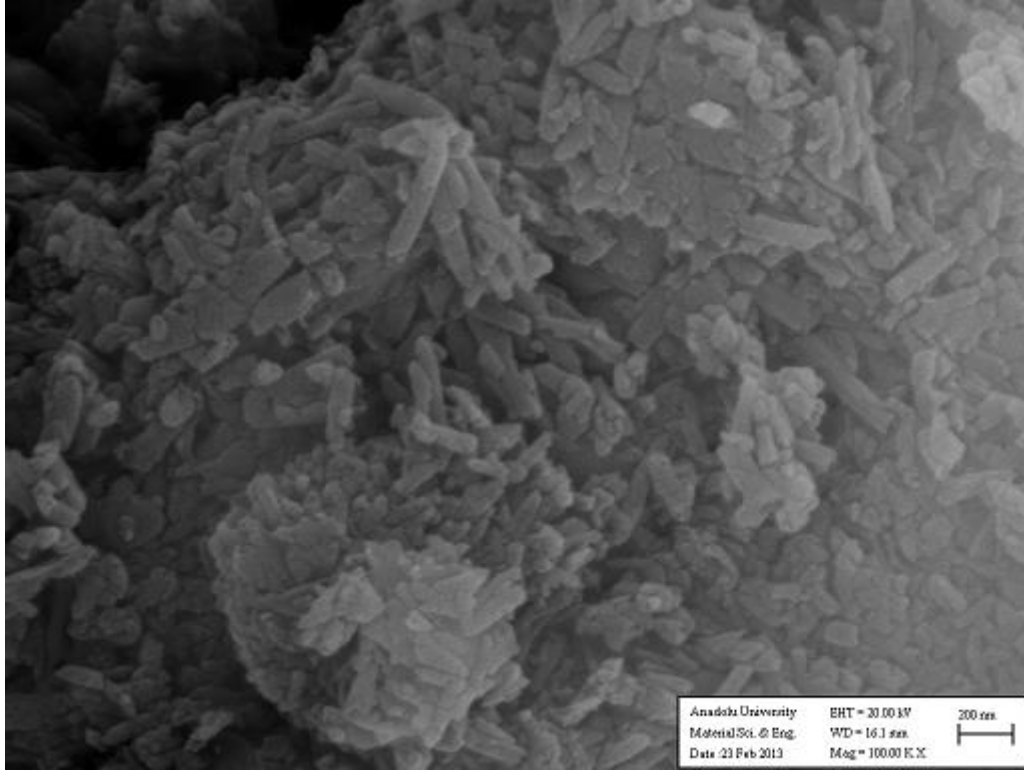
Etkin madde içermeyen HNT'lerin distile suda dağılımları ile ölçülen zeta potansiyelleri -22.3 ± 0.088 mV (ORT \pm SH) olarak saptanmıştır.

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

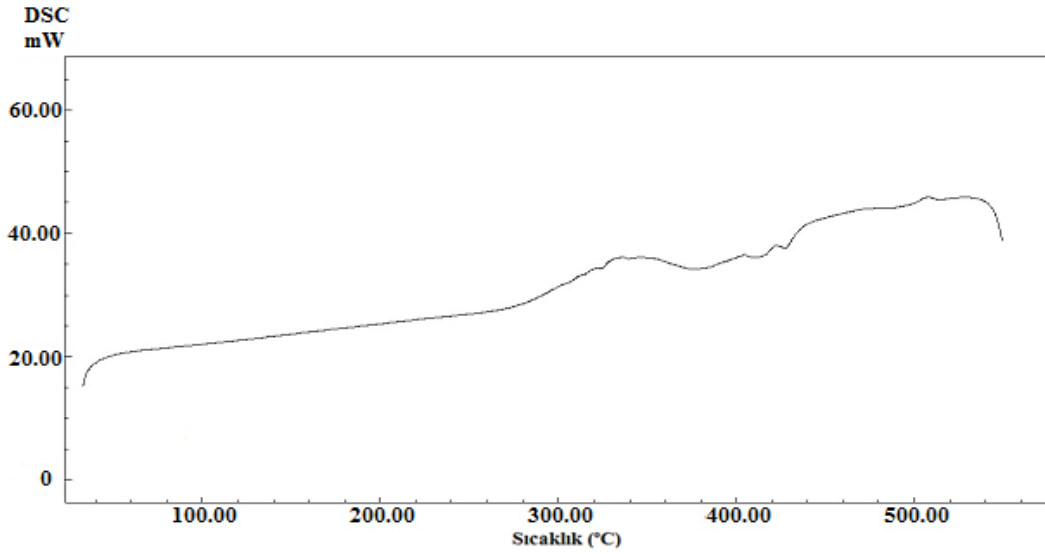
HNT'lerin SEM ile gerçekleştirilen parçacık şekli ve yüzey özelliklerine ait görüntü **Şekil 41**'de yer almaktadır.

Termal analiz

HNT'lerin termogramı **Şekil 42**'de sunulmuştur.



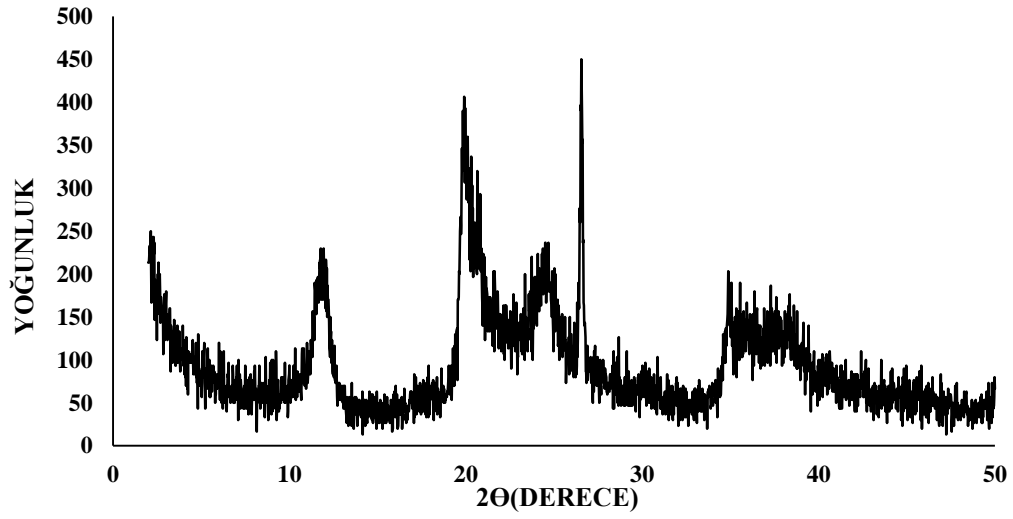
Şekil 41. Halosit Nanotüplere Ait SEM Görüntüsü (x100000)



Şekil 42. Halosit Nanotüplere Ait Termogram

X-ışını kırınım analizi

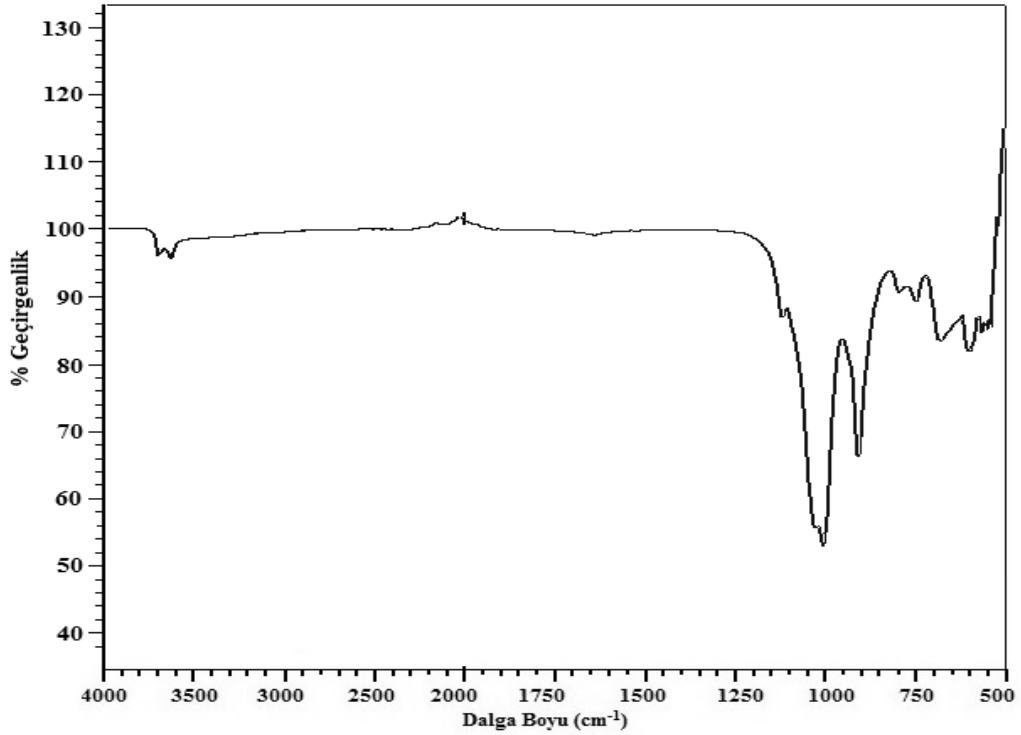
HNT'lere ait XRD profili Şekil 43'de sunulmuştur. Spektrumda HNT'ye ait 12.06° , 19.90° , 25.02° , 26.52° , 34.88° , 37.3° ve 38.1° 2θ değerinde karakteristik pikler gözlenmiştir. Pik değerleri literatür ile paralellik göstermektedir (Levis ve Deasy, 2002; Bordepong ve ark., 2011; Guo ve ark., 2012).



Şekil 43. Halosit Nanotüplere Ait X-Işını Kırınım Profili

İnfrared analizi

HNT'lerin FTIR analizine ait spektrum Şekil 44'te verilmiştir. 3695.61 cm^{-1} ve 3624.25 cm^{-1} gözlenen pikler HNT'nin iç yüzeyindeki hidroksil gruplarının (-OH) gerilme titreşimlerini simgelemektedir. 1028.06 cm^{-1} ve 1004.91 cm^{-1} 'de Si-O-Si gerilme titreşimlerine ait pikler, 908.47 cm^{-1} 'de Al_2OH tekli eğilme bandına ait pikler bulunmaktadır. Elde edilen spektrum literatür ile uygunluk göstermektedir (Viseras ve ark., 2009, Bordepong ve ark., 2011, Ghebaour ve ark., 2012; Guo ve ark., 2012).



Şekil 44. Halosit Nanotüplere Ait FTIR Spektrumu

Polimerik nanopartikül formülasyonu hazırlama çalışmaları

Polimerik nanopartikül ön formülasyon çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında çeşitli monomerler, çapraz bağlayıcılar, başlatıcılar ve farklı polimerizasyon prosedürleri kullanılarak formülasyon denemeleri yapılmıştır.

MAA, metilmetakrilat, 2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit, Ac gibi monomerler ve çözücü olarak su kullanılan tepkimelerde jel oluşumu gözlenmiştir. Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu (NMBAc), başlatıcı ve başlatıcı konsantrasyonu (AIBN, benzoil peroksit ya da amonyum persülfat) değiştirilerek jel yoğunluğu inceltilmeye çalışılmış, elde edilen düşük viskoziteli jellerin sıvı azot altında dondurularak öğütülmesi gerçekleştirilmiş ancak mikron boyutunda küresellikten uzak parçacıklar elde edilmiştir.

Dispersiyon ortamı olarak dimetilasetamit:su gibi çözücü karışımları kullanılarak polimerizasyon tepkimesi ile elde edilen karışımın metanol ile çöktürülmesi denenmiş, parçacık oluşumu gözlenmemiştir. Çöktürme polimerizasyonu bu sistem ile sonuçsuz kalmıştır. Farklı oranlarda dioksan:su karışımı ile gerçekleştirilen çöktürme polimerizasyonu tepkimesinde belli oranlarda jel oluşumu gözlenirken 2:1 oranda çözücü karışımı kullanımı ile parçacık oluşumu gözlenmiş ancak nanoboyut elde edilememiştir.

YEM kullanımı ile ters emülsiyon polimerizasyonu yöntemi için, kuadrat yapıda katyonik özellikli bir polimerik YEM sentezlenmiş ve az miktarda su kullanımı ile n-hekzan'ın dispersiyon ortamı olarak kullanıldığı formülasyon denemeleri yapılmıştır. 60°C sıcaklık ve 3 saatlik tepkime süresi, vb. ana formülasyon parametreleri belirlendikten sonra formülasyonlara dispersiyon hacminin değiştirilmesine bağlı olarak %16, %6.4, %2.133 ve %1 (a/h) oranında PYEM içeren denemeler ile PNP-1, PNP-2, PNP-3 ve PNP-4 olarak adlandırılan formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu denemelerde sırasıyla 10 mL, 25 mL ve 75 mL n-hekzan kullanılmıştır. PNP-1 formülasyonunun kapalı ortamda gerçekleştirilmediğinden ve çözücü hacminin çok az olmasından dolayı n-hekzanın buharlaşmasına bağlı olarak yarı katı bir oluşum gözlenmiştir. Bu nedenle dispersiyon hacmi arttırılarak tepkime 25 mL ile denenmiş ancak katı PNP oluşumu gözlenmemiştir.

Tepkime süresince dispersiyon ortamının aynı hacimde tutulamaması nedeniyle PNP-3 formülasyonu kapalı sistemde hazırlanmıştır. Kapalı sistemde çalışılmasına rağmen, çalışma sıcaklığında 3 saatlik tepkime süresi boyunca n-hekzan'ın buharlaşmasına bağlı olarak karışmanın etkilendiği ve tepkime kinetiğinin bozulduğu düşünülmüştür. Bunun üzerine daha yüksek miktarda dispersiyon ortamı içeren (160 mL) PNP-4 ile parçacık büyüklüğü esas alındığında istenen boyutlara yaklaşıldığı görülmüştür. PNP-4 formülasyonunun hazırlanacak formülasyonlara ışık tutacağı düşünülmüştür.

Gerçekleştirilen ön çalışmalar ışığında, ters emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile monomer ve yüzey etkin ajan olarak rol oynayan ve çalışmada sentezlenen kuadrat yapıli katyonik YEM; ikincil monomer olarak Ac ya da DMAc monomerleri; PEG 1000 MA, PEG 1500 MA ve PEG 2000 gibi PEG türevleri; çapraz bağlayıcı olarak NMBAc ve başlatıcı olarak AIBN içeren PNP formülasyonları hazırlanmıştır.

Ön formülasyon çalışmalarının ardından hazırlama prosedürü parametreleri ve bileşen oranları değiştirilerek çeşitli formülasyonlar hazırlanmıştır. “*Formülasyon Çalışmaları*” (Sayfa 50) bölümünde içerikleri ayrıntılı olarak anlatılan formülasyonlar ile PYEM yüzdesinin, PYEM:GABA molar oranının, ikincil monomer eklenmesinin, yüksek hızlı karıştırıcı kullanımının, farklı NMBAc oranlarının kullanılmasının, polimerizasyona PEG türevleri katılmasının ve polimerizasyon sonrası PEG eklenmesinin elde edilen ilaç taşıyıcı sistem üzerine etkisi araştırılmıştır.

Polimerik nanopartikül formülasyonu çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarının sonucunda belirlenen bileşenlere sahip formülasyonlar Sayfa 46’da “*Polimerik nanopartikül formülasyon çalışmaları*” bölümünde anlatılan şekilde ters emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmış, karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve *in vitro* salım profilleri çıkarılmıştır. Bu çalışmalar ışığında, kararlılık çalışmaları ve hayvan deneyleri için 4 adet PNP formülasyonu seçilmiştir.

Formülasyonların sterilizasyonu

PNP formülasyonları 15 dk süresince UV ışınları ile sterilize edilmiştir. UV ışınları ile sterilizasyon sonrası

Polimerik nanopartikül formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi

Nanopartiküllerin kimyasal, elektronik, manyetik ve mekanik davranışları gibi bir çok özellikleri parçacık büyüklüğüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Akbari ve ark., 2011).

Farklı PYEM yüzdelinde ve farklı PYEM:GABA molar oranında hazırlanan PNP’lerin parçacık boyut dağılımı **Çizelge 18** ve **Çizelge 19**’da sunulmuştur.

PNP formülasyonlarının parçacık büyüklüğü PCS kullanılarak analiz edilmiştir. Farklı PYEM yüzdeleri ile hazırlanan PNP’lerin hazırlanmalarının ardından yapılan analizlerde en küçük parçacık büyüklüğü, 169.4 ± 15.041 nm (PDI: 0.420 ± 0.051) ile %1 oranında PYEM içeren PNP-4 formülasyonu olarak belirlenmiştir (**Çizelge 18**).

Çizelge 18. Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT \pm SH	PDI \pm SH
PNP-4	169.4 \pm 15.041	0.420 \pm 0.051
PNP-5	236.5 \pm 8.806	0.230 \pm 0.010
PNP-6	334.5 \pm 7.360	0.560 \pm 0.070
PNP-7	283.2 \pm 13.585	0.475 \pm 0.030
PNP-8	250.5 \pm 9.469	0.410 \pm 0.030
PNP-14 (plasebo)	154.5 \pm 15.561	0.326 \pm 0.047

PDI: Polidisperslik indisi, **SH:** Standart hata

PNP-4 formülasyonu bileşeni oranları baz alınarak daha yüksek konsantrasyonda GABA içeren yeni formülasyonların hazırlanması düşünülmüştür.

Farklı PYEM:GABA molar oranlarında hazırlanan PNP formülasyonlarında en düşük parçacık büyüklüğüne sahip formülasyonun 99.1 ± 1.040 (PDI: 0.250 ± 0.010) nm ile PNP-9 formülasyonu olduğu bulunmuştur. Farklı oranlarda GABA içeren diğer formülasyonların parçacık büyüklüğünün nanometre aralığında olmasına karşın PNP-9'a göre daha yüksek olduğu **Çizelge 19**'da görülmektedir.

Çizelge 19. Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT \pm SH	PDI \pm SH
PNP-9	99.1 ± 1.040	0.250 ± 0.010
PNP-10	224.5 ± 13.327	0.440 ± 0.085
PNP-11	178.9 ± 14.420	0.375 ± 0.026
PNP-17	262.4 ± 22.360	0.540 ± 0.080
PNP-14 (plasebo)	154.5 ± 15.561	0.326 ± 0.047

PDI: Polidisperslik indisi, **SH:** Standart hata

Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının, farklı NMBAc oranları kullanılmasıyla, polimerizasyon sonrası PEG 2000 katılmasıyla ve farklı (PEG MA türevlerinin polimerizasyona katılmasıyla hazırlanan PNP'lerin parçacık boyut dağılımı analiz sonuçları **Çizelge 20-Çizelge 24**'te sunulmuştur.

Çizelge 20. Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT \pm SH	PDI \pm SH
PNP-12	169.7 ± 4.667	0.340 ± 0.050
PNP-15 (Plasebo)	165.4 ± 7.040	0.410 ± 0.040
PNP-13	123.6 ± 0.570	0.220 ± 0.010
PNP-16 (Plasebo)	121.0 ± 5.860	0.330 ± 0.030

ORT: Ortalama, **PDI:** Polidisperslik indisi, **SH:** Standart hata

Çizelge 21. Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT \pm SH	PDI \pm SH
PNP-18	276.5 ± 0.924	0.277 ± 0.010
PNP-19	245.5 ± 1.488	0.272 ± 0.006
PNP-20	178.9 ± 14.420	0.375 ± 0.026
PNP-23	111.3 ± 0.120	0.177 ± 0.008
PNP-24	104.3 ± 2.573	0.288 ± 0.017
PNP-34 (Plasebo)	120.2 ± 2.875	0.265 ± 0.043

ORT: Ortalama, **PDI:** Polidisperslik indisi, **SH:** Standart hata

Çizelge 22. Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
PNP-21	170.2 ± 2.670	0.445 ± 0.101
PNP-22	155.3 ± 8.820	0.537 ± 0.068
PNP-23	111.3 ± 0.120	0.177 ± 0.008

ORT: Ortalama, PDI: Polidisperslik indisi, SH: Standart hata

Çizelge 23. Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
PNP-25	124.4 ± 0.823	0.238 ± 0.016
PNP-26	182.6 ± 8.088	0.351 ± 0.021
PNP-27	134.5 ± 5.559	0.290 ± 0.036
PNP-31 (Plasebo)	166.7 ± 1.767	0.258 ± 0.174

ORT: Ortalama, PDI: Polidisperslik indisi, SH: Standart hata

Çizelge 24. Farklı PEG 1000 MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
PNP-28	117.3 ± 1.153	0.354 ± 0.022
PNP-29	130.0 ± 2.003	0.168 ± 0.017
PNP-32 (Plasebo)	135.3 ± 3.762	0.257 ± 0.009
PNP-30	107.6 ± 1.629	0.535 ± 0.053
PNP-33 (Plasebo)	130.7 ± 1.581	0.185 ± 0.010

ORT: Ortalama, PDI: Polidisperslik indisi, SH: Standart hata

PNP'lerde morfolojik açıdan küreselliği yakalamak için UT gibi yüksek hızda karıştırıcılar, farklı karıştırma uçları ve farklı karıştırma hızları kullanılarak yapılan formülasyon denemelerinde PNP-23 ve PNP-24 formülasyonları ile ~100nm boyutunda parçacıklar elde edilmiştir (**Çizelge 21**). Parçacıkların küreselliği SEM görüntüleri ile gösterilmiştir (**Şekil 50**).

Küreselliğin elde edilmesinin ardından formülasyon prosedürünün bir kısmında UT kullanılarak hazırlanan farklı çapraz bağlayıcı (NMBAc) oranları içeren formülasyonlardan en düşük parçacık boyutu 111.3 ± 0.120 (PDI: 0.177 ± 0.008) ile PNP-23 formülasyonu ile elde edilmiştir. Daha yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren PNP-21 ve PNP-22 formülasyonlarında da parçacık büyüklüğü 200 nm'den ufaktır ancak PDI PNP-23 formülasyonuna göre daha yüksektir (**Çizelge 22**).

Polimerizasyon sonrası parçacıklara PEG 2000 katılması ile elde edilen formülasyonların tümünde parçacıkların nanometre aralığında olduğu görülmektedir (**Çizelge 23**).

PEG 1000 MA ve PEG 1500 MA polimerlerinin polimerizasyon tepkimesine katılması ile hazırlanan formülasyonların tümünde parçacık boyutunun 150 nm'den ufak olduğu **Çizelge 24**'te görülmektedir.

DMAc monomeri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, ters emülsiyon, ters süspansiyon ve dispersiyon polimerizasyonu yöntemleri kullanılarak çeşitli büyüklük ve dağılıma sahip parçacıklar elde edilmiştir (Babič ve Horák, 2007). Ters süspansiyon polimerizasyonu ile 100 µm çapında parçacıklar, emülsiyon polimerizasyonu ile 130-1000 nm aralığında geniş dağılıma sahip parçacıklar, dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile ise daha küresel özellikli 1-2 µm büyüklüğünde tekdüze dağılımlı parçacıklar olduğu PCS verileri ile ortaya konulmuştur.

İri parçacıklara sahip olan sistemler (>200 nm) genellikle makrofajlar tarafından yakalanmaktadır. Uzaklaştırılmaları 200 nm'den ufak yarıçaplı parçacıklardan daha hızlı gerçekleştirilmektedir. Kurupparachchi ve arkadaşları (Kurupparachchi ve ark., 2011) serbest radikal miniemülsiyon polimerizasyonu ile Ac monomeri kullanarak fotodinamik terapide kullanılmak üzere 45 nm ±10 nm ve 95 nm ±10 nm boyutlarında taşıyıcı sistemler geliştirdiklerini TEM ve PCS verileri ile kanıtlamıştır.

Parçacık büyüklüğü dağılımını değerlendirmek için 0-1 arasında değerler alan PDI verileri de kullanılmıştır. Sıfıra yaklaştıkça tekdüzeliğin arttığı PDI verileri açısından PNP formülasyonları değerlendirildiğinde tüm formülasyonların 0.2-0.5 aralığında değerler alarak tekdüze dağılıma sahip olduğu görülmüştür.

Zeta potansiyel analizi

Kolloidal parçacıklar dispersiyon ortamından iyon adsorbe etmekte ve pozitif ya da negatif olarak yüklenmektedir. Zeta potansiyel parçacığın üzerindeki net etkili yükü göstermektedir (Çelebi, 2012).

Nanopartikül yüzeyi ilaç taşınmasında önemli faktör olarak yerini almaktadır. Yüzey modifikasyonu yapılmamış ve negatif yüklü parçacıkların kan dolaşımında hızlıca opsonize edildiği ve çok büyük kısmının makrofajlar tarafından uzaklaştırıldığı bilinmektedir (Honary ve Zahir, 2013). Bu nedenle bu çalışmada katyonik özellikli nanopartiküllerin üretilmesi amaçlanmıştır.

Farklı PYEM yüzdelerinde ve farklı PYEM:GABA molar oranında hazırlanan PNP'lerin zeta potansiyel analiz sonuçları **Çizelge 25** ve **Çizelge 26**'da sunulmuştur.

Çizelge 25. Farklı PYEM ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)			
	ORT	SS	BSS	SH
PNP-4	-9.470	4.600	0.486	2.656
PNP-5	-13.600	2.390	0.176	1.380
PNP-6	-15.333	1.258	0.082	0.726
PNP-7	-8.850	5.960	1.383	3.441
PNP-8	-3.940	1.476	0.375	0.852
PNP-14 (plasebo)	-8.480	1.860	0.219	1.074

ORT: Ortalama, **SS:** Standart sapma, **BSS:** Bağıl standart sapma; **SH:** Standart hata

Çizelge 26. Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)			
	ORT	SS	BSS	SH
PNP-9	-13.133	0.987	0.075	0.570
PNP-10	-11.267	1.415	0.126	0.817
PNP-11	-8.510	7.743	0.910	4.470
PNP-17	-3.840	0.730	0.077	0.421
PNP-14 (plasebo)	-8.480	1.860	0.219	1.074

ORT: Ortalama, **SS:** Standart sapma, **BSS:** Bağlı standart sapma; **SH:** Standart hata

Manyetik karıştırıcı kullanılarak hazırlanan %0.25, %0.5, %1, %2 ve %3 oranında PYEM içeren formülasyonlarda 0'a en yakın zeta potansiyele sahip formülasyon PNP-8 formülasyonu olmuştur (**Çizelge 25**).

Manyetik karıştırıcı kullanılarak farklı PYEM:GABA molar oranlarında hazırlanan formülasyonlarda ise 0.33 mmol-2 mmol aralığında değişen GABA miktarlarına karşın zeta potansiyelin negatif değerler olarak -3 mV ile -15 mV arasında değişkenlik gösterdiği **Çizelge 26**'da görülmektedir.

Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının, farklı NMBAc oranları kullanılması ile, polimerizasyon sonrası PEG 2000 katılması ile ve farklı PEG MA türevlerinin polimerizasyona katılması ile hazırlanan PNP'lerin zeta potansiyel değerleri **Çizelge 27-31**'de sunulmuştur.

Çizelge 27. Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)			
	ORT	SS	BSS	SH
PNP-12	1.985	1.368	0.689	0.790
PNP-15 (Plasebo)	-3.870	3.240	0.837	1.871
PNP-13	5.667	0.857	0.495	0.151
PNP-16 (Plasebo)	-2.98	2.480	0.832	1.430

BSS: Bağlı standart sapma, **ORT:** Ortalama, **SH:** Standart hata, **SS:** Standart sapma

Çizelge 28. Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)			
	ORT	SS	BSS	SH
PNP-18	17.243	2.360	0.548	1.363
PNP-19	18.267	0.252	0.014	0.145
PNP-20	16.580	0.982	0.228	0.567
PNP-23	24.267	1.150	0.047	0.664
PNP-24	19.045	1.586	0.368	0.916
PNP-34 (Plasebo)	15.675	1.253	0.080	0.723

BSS: Bağlı standart sapma, **ORT:** Ortalama, **SH:** Standart hata, **SS:** Standart sapma

Çizelge 29. Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)			
	ORT	SS	BSS	SH
PNP-21	4.333	1.558	0.360	0.900
PNP-22	-4.310	0.688	0.160	0.397
PNP-23	24.267	1.150	0.047	0.664

BSS: Bağlı standart sapma, ORT: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma

Çizelge 30. Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)			
	ORT	SS	BSS	SH
PNP-25	26.700	2.254	0.084	1.301
PNP-26	28.200	2.563	0.091	1.480
PNP-27	29.600	0.346	0.012	0.200
PNP-31 (Plasebo)	23.100	2.350	0.102	1.357

BSS: Bağlı standart sapma, ORT: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma

Çizelge 31. Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)			
	ORT	SS	BSS	SH
PNP-28	26.700	2.254	0.084	1.301
PNP-29	28.200	2.563	0.091	1.480
PNP-32 (Plasebo)	24.410	2.005	0.052	1.158
PNP-30	22.167	0.346	0.012	0.200
PNP-33 (Plasebo)	23.500	1.063	0.045	0.614

BSS: Bağlı standart sapma, ORT: Ortalama, SH: Standart hata, SS: Standart sapma

Ac ve DMAc monomerleri kullanılarak hazırlanan sistemler arasında DMAc monomeri ile hazırlanan sistemlerde zeta potansiyel 5.667 ± 0.151 mV, Ac monomeri kullanılarak hazırlanan sistemlerde ise 1.985 ± 0.790 mV olarak bulunmuştur (**Çizelge 27**).

Katyonik özellikli PYEM'in kullanıldığı çalışmamızda yüksek hızlı karıştırıcıların kullanılması ile polimerizasyon öncesi termodinamik olarak kararlı emülsiyon sistemler oluşturulmuştur. Kararlı emülsiyonların polimerizasyonu sonucunda artı yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. En yüksek zeta potansiyel 24.267 ± 0.664 mV değeri ile PNP-23 (DMAc monomeri içeren) formülasyonu ile elde edilmiştir (**Çizelge 28**).

Farklı çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan, yüksek oranda çapraz bağlayıcı içeren PNP-22 formülasyonu için -4.310 ± 0.397 mV olarak bulunan zeta potansiyel, katyonik özellikli PYEM'in alkil zincirlerinin parçacığın iç kısmında kaldığını düşündürmüştür. PNP-23 formülasyonu ile elde edilen pozitif yük ideal NMBAc oranının elde edildiği durum şeklinde yorumlanabilir (**Çizelge 29**).

PNP'lerin yüzeylerinin hidrofilik polimerler ile modifikasyonu sonucunda özellikle yüzey yükü gibi yüzey özelliklerinin iyileştirildiği ve fagositler tarafından gerçekleştirilen opsonizasyon prosedürünün kontrol edilebildiği bilinmektedir (Honary ve Zahir, 2013). Polimerizasyon sonrası PEG 2000 katılması ile elde edilen formülasyonlarda 26 mV ile 29.6 mV arasında değişen pozitif yüklü parçacıklar elde edilmiştir (**Çizelge 30**).

PEG 1000 MA ve PEG 1500 MA polimerlerinin polimerizasyon tepkimesine katılması ile hazırlanan formülasyonlarda 22.2 mV ve 28.2 mV aralığında zeta potansiyel değerleri elde edilmiştir (**Çizelge 31**).

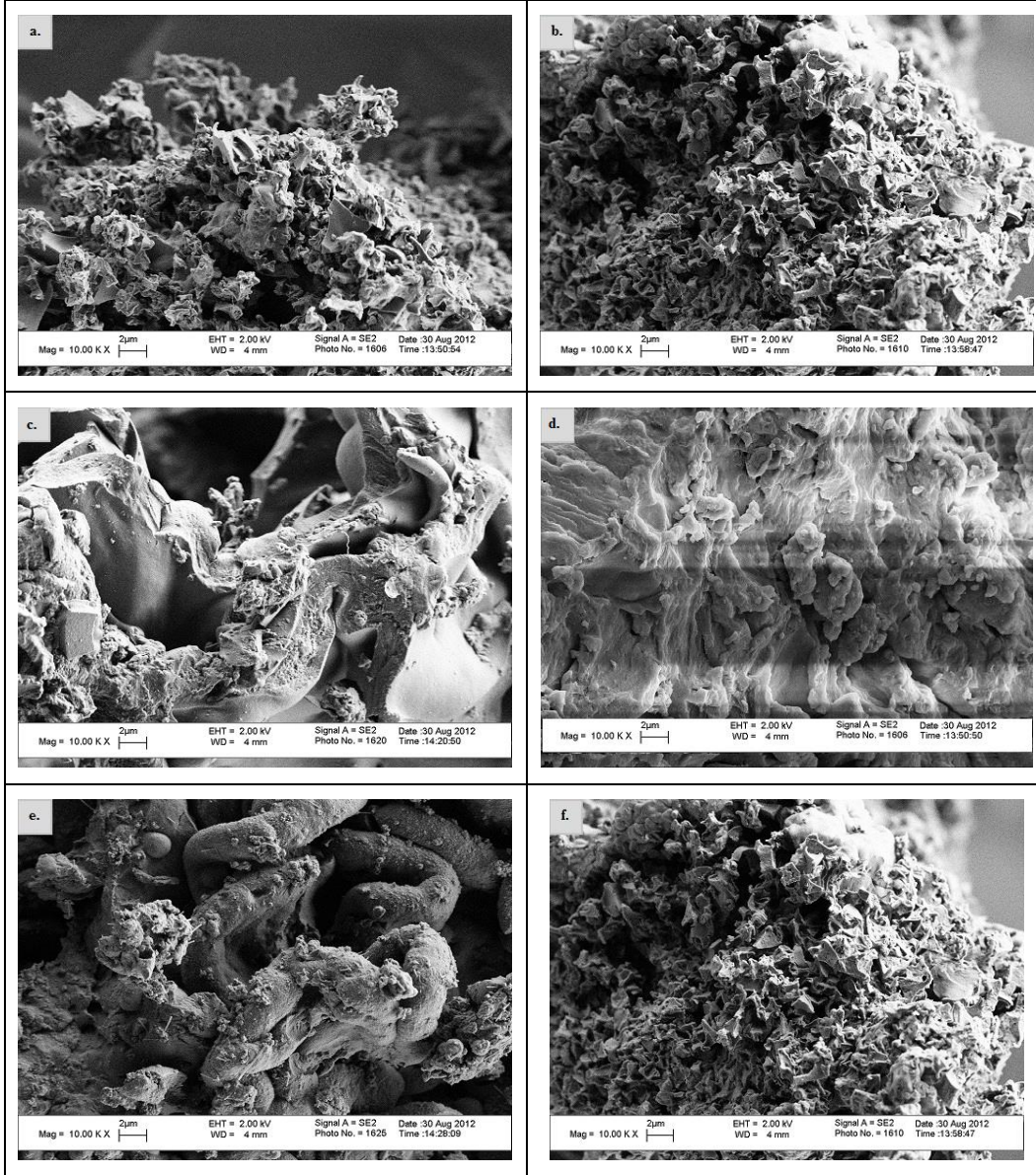
KBE membranındaki negatif yüklü hücrelerin varlığı nedeni ile pozitif değerdeki zeta potansiyel nanopartiküllerin KBE'den taşınmasını kolaylaştırmaktadır. Beyindeki kolin taşıyıcıların anyonik bölgelerinin pozitif yüklü katerner amonyum grupları ile etkileştiği bildirilmiştir (Honary ve Zahir, 2013). Çalışmamızda katerner amonyum grubu içeren katyonik PYEM ile hazırlanan nanopartiküllerin KBE ile etkileşmesinin sağlanacağı düşünülmüştür.

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

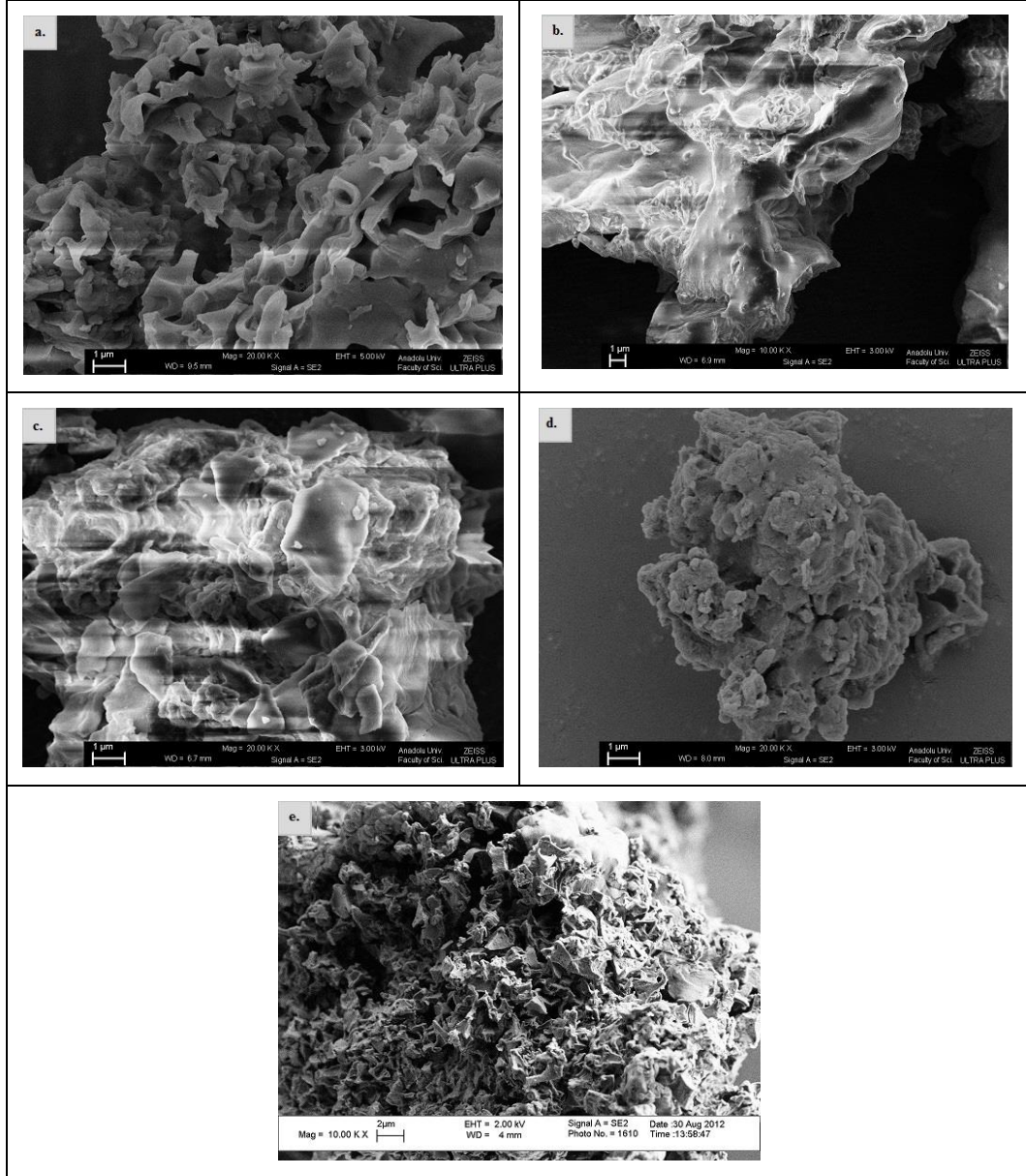
Farklı PYEM yüzdelerinde hazırlanan, farklı PYEM:GABA molar oranında hazırlanan PNP'lerin ve kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının parçacık şekil ve yüzey özelliklerine ilişkin SEM görüntüleri **Şekil 45-Şekil 47**'de sunulmuştur.

Nanopartiküllerden *in vitro* ve *in vivo* etkin madde salım kinetiği, nanopartiküllerin biyodağılımı, kan dolaşımındaki dinamiği, organ ve hücrelere taşınması, hücre içine alımı gibi önem taşıyan parametreleri etkileyen en önemli etkenlerden biri de parçacıkların şeklidir (Caldorera-Moore ve ark., 2010). Hücre içine alım açısından parçacık şekilleri çubuk, küre, silindir ve küp olarak sıralanabilmektedir (Albanase ve ark., 2012).

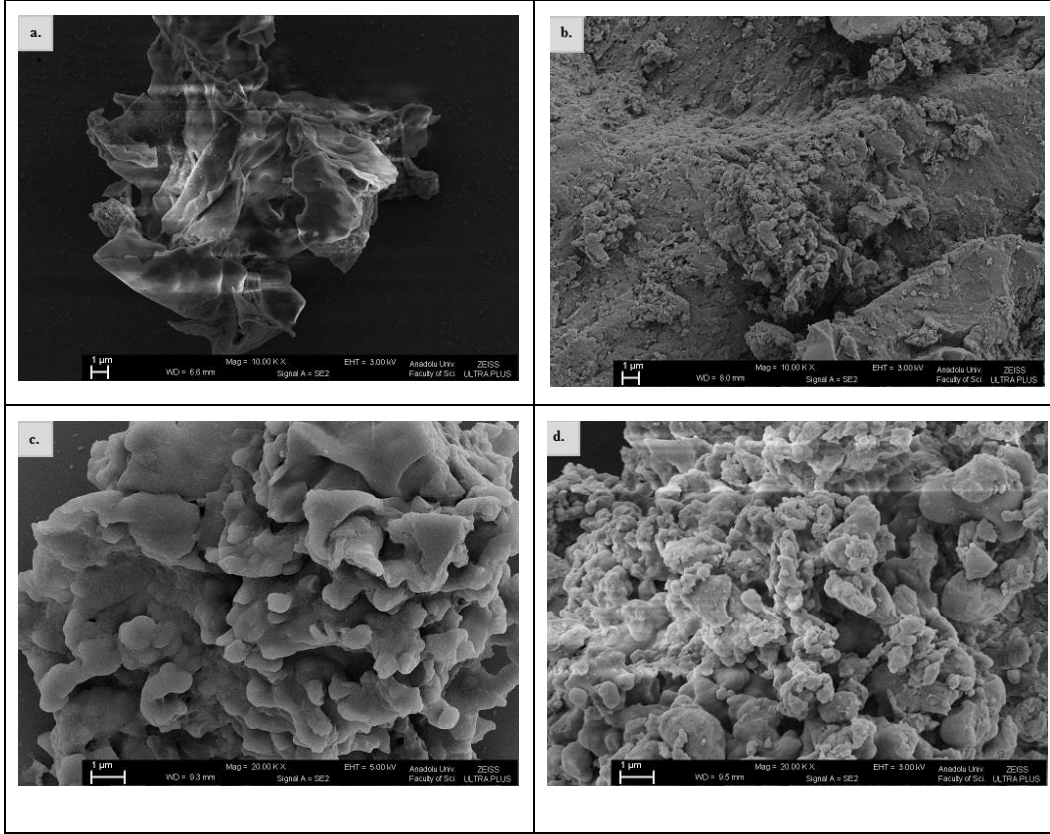
Farklı PYEM yüzdeleri (**Şekil 45**), farklı PYEM:GABA molar oranları (**Şekil 46**) ve farklı monomerlerin tepkimeye katılması ile manyetik karıştırıcı kullanılarak hazırlanan PNP'ler (**Şekil 47**) parçacık şekli ve yüzey özellikleri açısından değerlendirildiğinde, küresellikten uzak parçacıkların elde edildiği SEM analizleri ile gösterilmiştir.



Şekil 45. Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri (a: PNP-4, b: PNP-5, c: PNP-6, d: PNP-7, e: PNP-8, f: PNP-14; x10.000)



Şekil 46. Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri (a: PNP-9, b: PNP-10, c: PNP-11, d: PNP-17, e: PNP-14; a, c ve d x 20000, b ve e x10000)

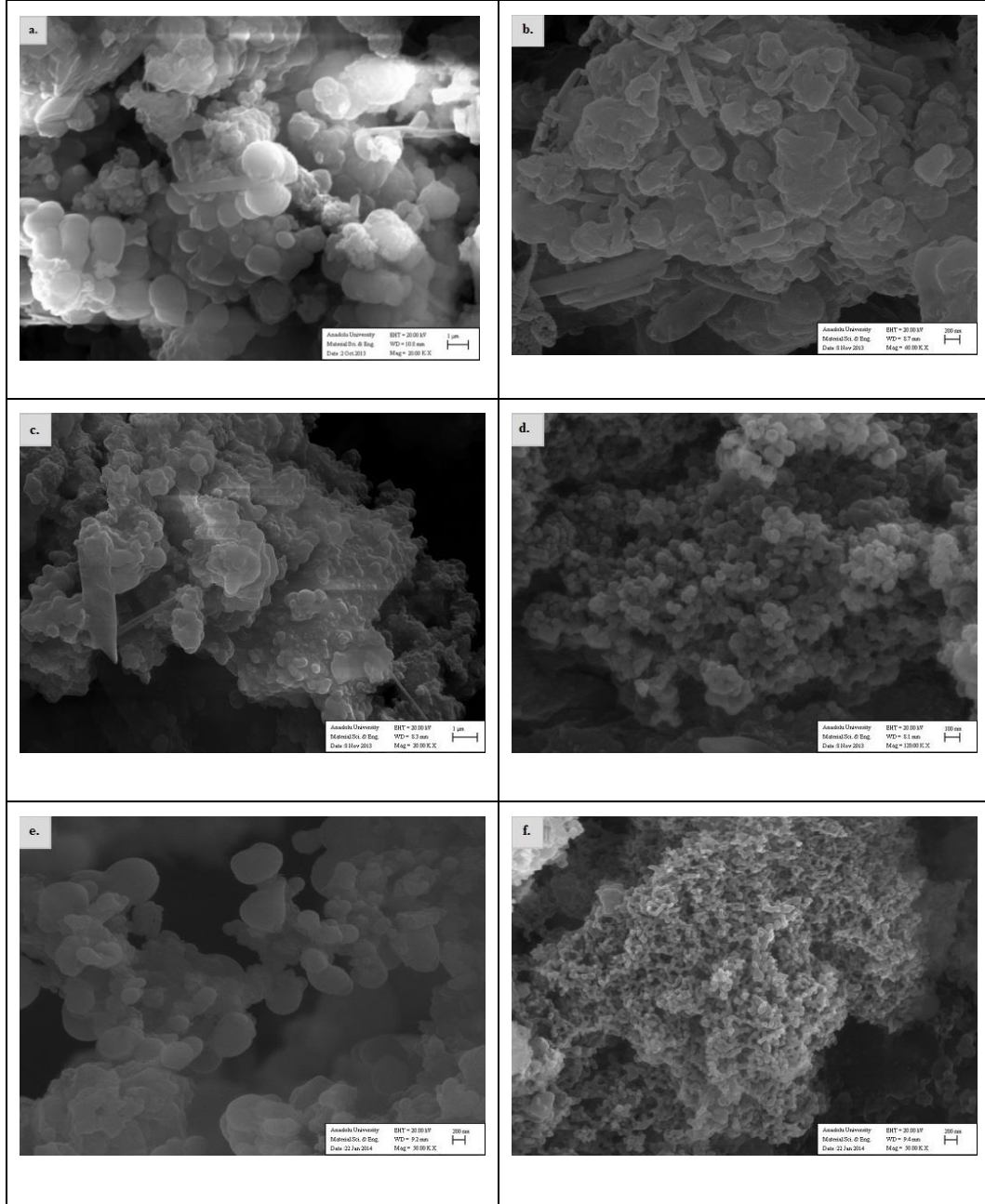


Şekil 47. Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının SEM Görüntüleri
(a: PNP-12, b: PNP-15, PNP-13, PNP-16; a ve b x10000; c ve d x20000)

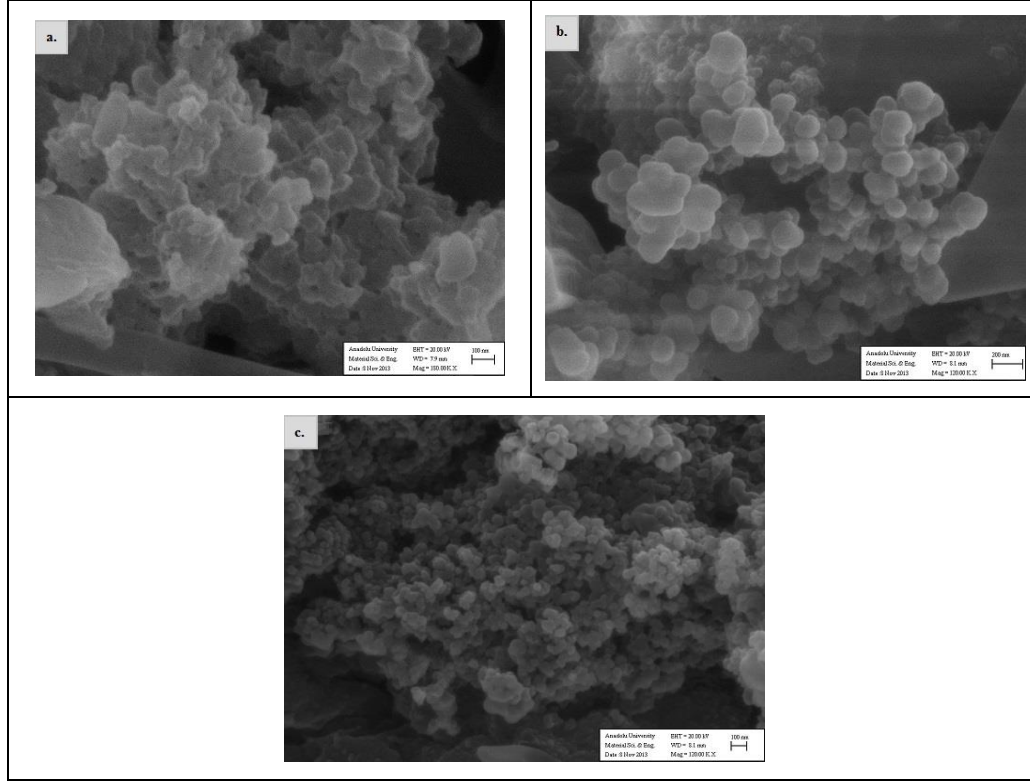
Farklı NMBac oranları kullanılması ile hazırlanan, polimerizasyon sonrası PEG 2000 katılması ile elde edilen ve farklı PEG MA türevlerinin polimerizasyona katılması ile hazırlanan PNP'lerin SEM görüntüleri **Şekil 48-Şekil 51**'de sunulmuştur.

SEM görüntüleri esas alındığında PNP'lerde morfolojik açıdan küreselliği yakalamak için yapılan denemeler sonucunda öncelikle yüksek hızlı karıştırıcıların kullanılması ve polimerizasyona manyetik karıştırıcı ile devam edilmesi sonucunda daha küresel PNP'ler elde edilmiştir (**Şekil 48**). Elde edilen görüntüler poliakrilik asit nanopartiküllerinin (Kriwet ve ark., 1998) ve poli(DMAc) nanopartiküllerinin (Babič ve Horák, 2007) SEM görüntüleri ile benzerlik gösterdiğinden literatür ile uyumluluk belirlenmiştir.

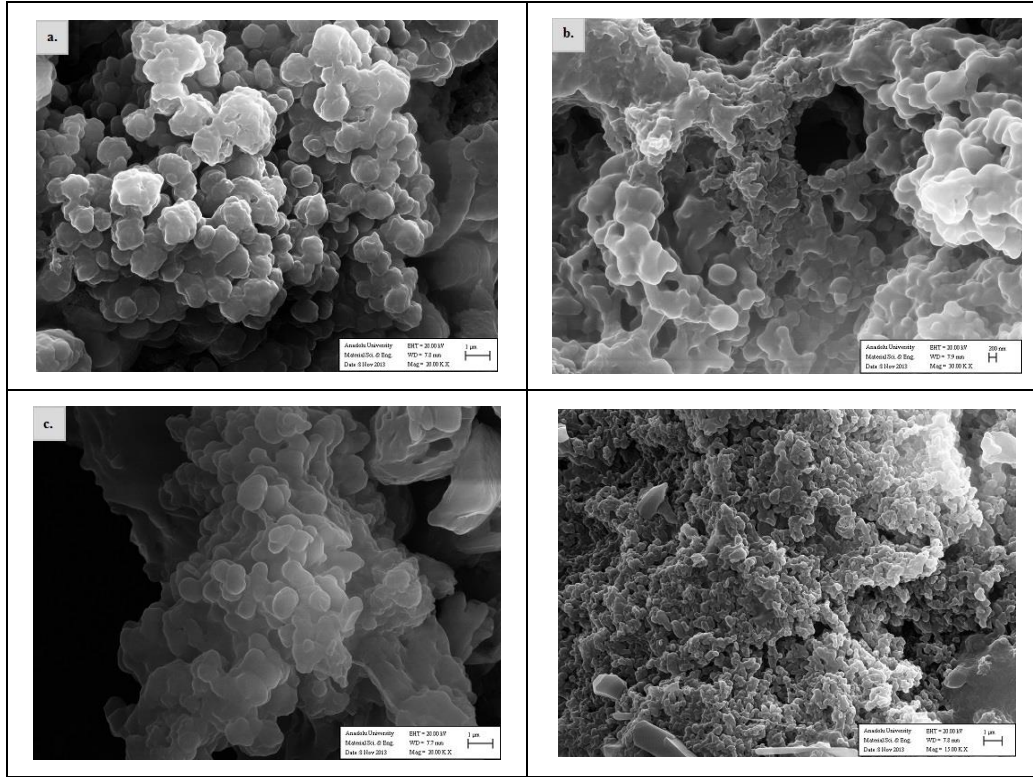
PEG türevleri kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda da küreye yakın parçacıklar elde edildiği SEM görüntülerinde görülmektedir (**Şekil 50-Şekil 51**).



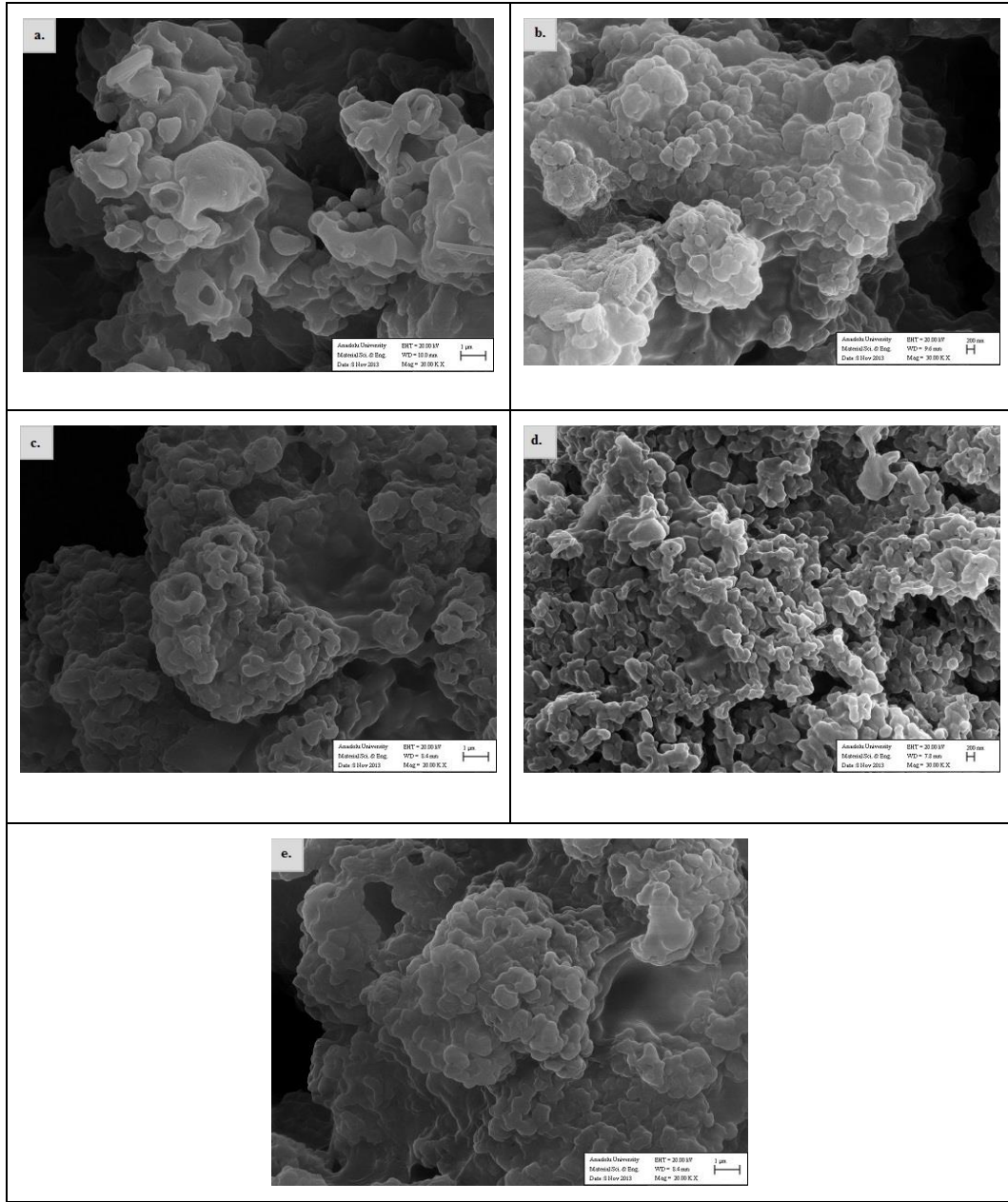
Şekil 48. Farklı Karıştırıcılar Kullanılarak Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri (a: PNP-18, b: PNP-19, c: PNP-20, d: PNP-23, e: PNP-24, f: PNP-34; a ve c x20000, b x60000, d x 120000, e ve f x 50000)



Şekil 49. Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri (a: PNP-21, b: PNP-22, c: PNP-23; a x 180000, b ve c x120000)



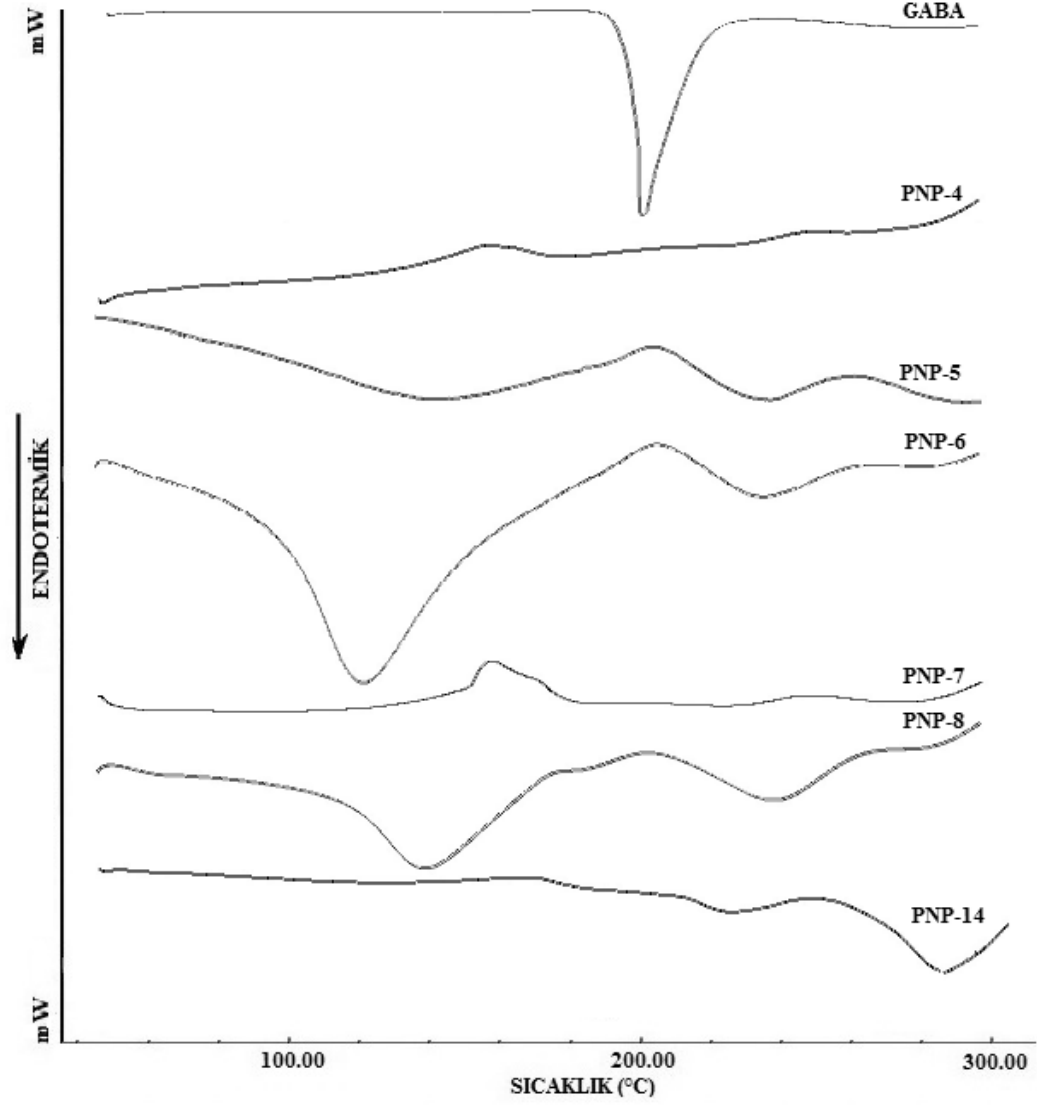
Şekil 50. Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri (a: PNP-25, b: PNP-26, c: PNP-27, d: PNP-31; a ve c x20000, b x30000, d x 15000)



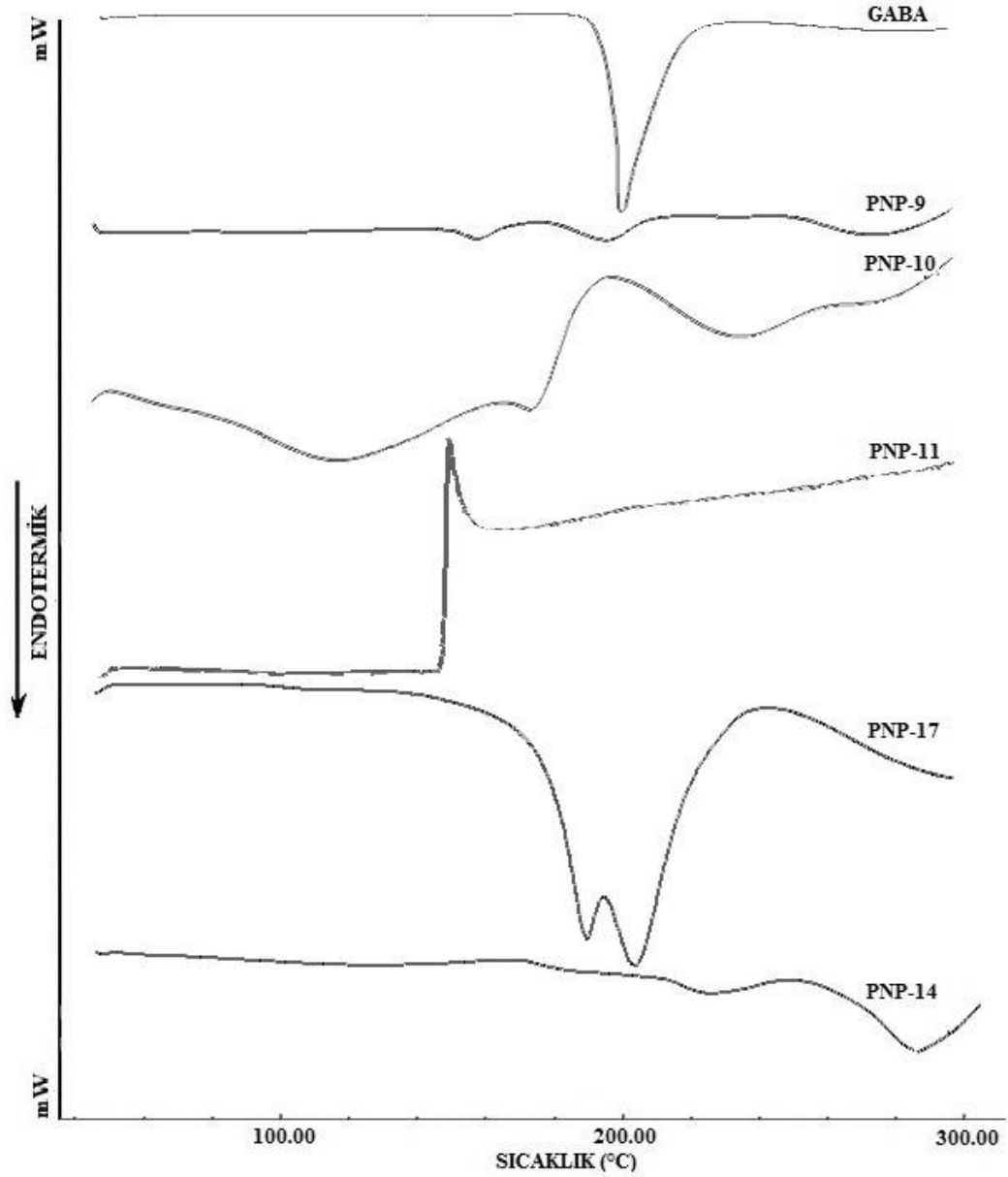
Şekil 51. Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının SEM Görüntüleri (a,c ve e x20000, b,d x30000)

Termal analiz

Farklı PYEM yüzdelerinde ve farklı PYEM:GABA molar oranında hazırlanan formülasyonların termogramları Şekil 52 ve Şekil 53'te sunulmuştur.



Şekil 52. Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları



Şekil 53. Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları

Farklı PYEM yüzdeleri kullanılarak hazırlanan PNP formülasyonlarında 202.78 °C’de gözlenen GABA’ya ait keskin pikin kaybolduğu görülmektedir. Etkin madde pikinin tamamen kaybolması homojen polimer matrisi oluşumu ya da polimerin seyreltme etkisi nedeniyle olabilmektedir (Pagar ve Vavia, 2013). PNP-14 plasebo formülasyonunda görülen pik, GABA içeren formülasyonlarda görülmemiştir. Plasebo formülasyona ait pikin kaybolması ya da pikte kayma meydana gelmesi polimer ilaç etkileşiminin varlığını göstermektedir.

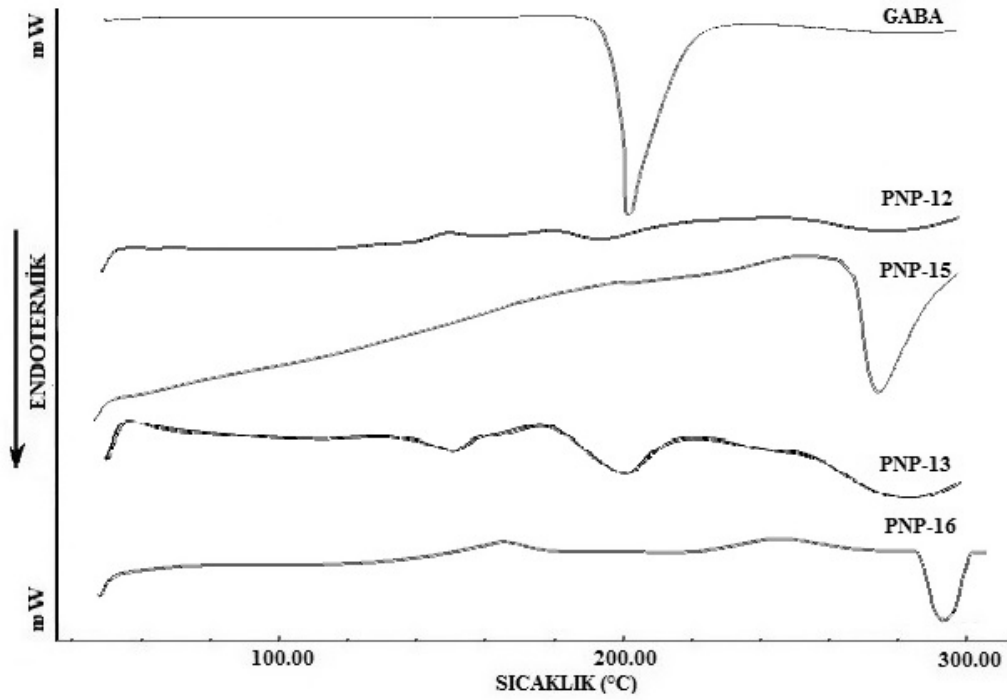
Şekil 52’de tüm formülasyonlarda etkileşim görüldüğünün saptanması nedeniyle parçacık boyutu ve IR verileri kullanılarak PNP-4 formülasyonu üzerinden devam edilerek farklı etkin madde oranlarının denenmiş olduğu farklı PYEM:GABA

molar oranlarında formülasyonlar hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

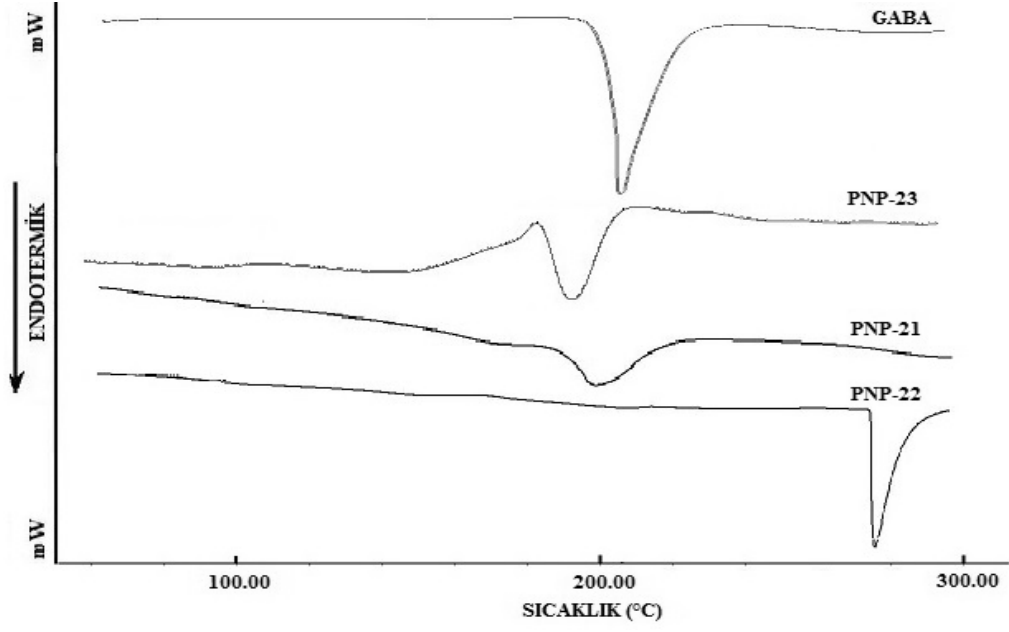
Farklı PYEM:GABA molar oranlarında hazırlanan formülasyonlarda PNP-17 formülasyonu hariç tümünde GABA'ya ait keskin pikin çok düşük şiddette var olduğu, baskılandığı ya da tamamen ortadan kalktığı görülmektedir (Kumari ve ark., 2013) (**Şekil 53**). GABA'nın PNP'lere yüklenmesi ile kristalin yapının önemli ölçüde azaldığı düşünülmüştür (Bhavna ve ark., 2014).

Elde edilen termogramlar ışığında PNP-17 formülasyonu dışında, GABA'nın nanopartiküllere yüklendiği, homojen katı karışımı ya da amorf yapı elde edildiği görülmektedir (Mainardes ve Evangelista, 2005). En yüksek GABA konsantrasyonuna sahip PNP-17 formülasyonunda polimer ile etkileşmeyecek kadar çok GABA var olduğu kararına varılmıştır (Patel ve Pramanik, 2014).

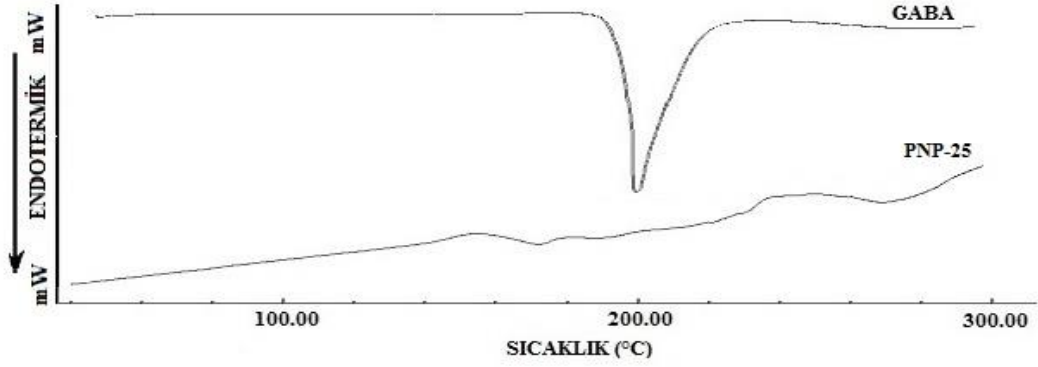
Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının, farklı NMBAc oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonların, polimerizasyon sonrası PEG 2000 katılması ile hazırlanan formülasyonların ve farklı PEG MA türevlerinin polimerizasyona katılması ile hazırlanan formülasyonların termogramları **Şekil 54-Şekil 57**'de sunulmuştur.



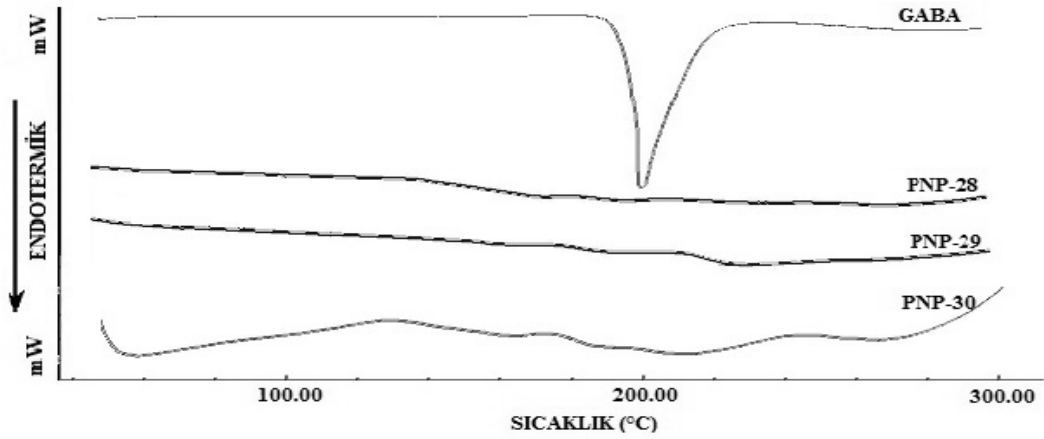
Şekil 54. Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının Termogramları



Şekil 55. Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları



Şekil 56. Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonunun Termogramı



Şekil 57. Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının Termogramları

Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarında PNP-12 (Ac içeren) formülasyonunda GABA'ya ait özgün pikin kaybolduğu, PNP-13 (DMAc içeren) formülasyonunda ise şiddetinin önemli ölçüde azalarak daha yayvan bir pikin ortaya çıktığı **Şekil 54**'te görülmektedir. Bu durum GABA'nın polimerik matris içerisinde homojen dağıldığı (Kumari ve ark., 2013) ya da kristalinitenin yerine amorf yapının oluştuğunu göstermektedir (Pagar ve Vavia, 2013). Plasebo formülasyonlarda (PNP 15-PNP16) görülen piklerin etkin madde içeren formülasyonlarda görülmemiş olması da polimer-GABA etkileşimini işaret etmektedir.

Farklı NMBAc oranlarında hazırlanan PNP formülasyonlarından PNP-22 ve PNP-23 formülasyonlarında GABA'nın endotermik erime pikine rastlanmazken sırasıyla 275.7°C ve 188.2°C'de endotermik pikler saptanmıştır. Bu durum etkin maddenin polimerik matris içerisine katılmış olduğunu göstermektedir (Dhana Lakshmi ve ark., 2012). PNP-21 formülasyonunda ise GABA pikinin şiddeti azalmış ve yayvan pik morfolojisi görülmüştür. Pikte meydana gelen 4°C'lik kayma nedeni ile GABA ve polimer arasında etkileşim olduğu düşünülmüştür (Mello ve Ricci-Junior, 2011) (**Şekil 55**).

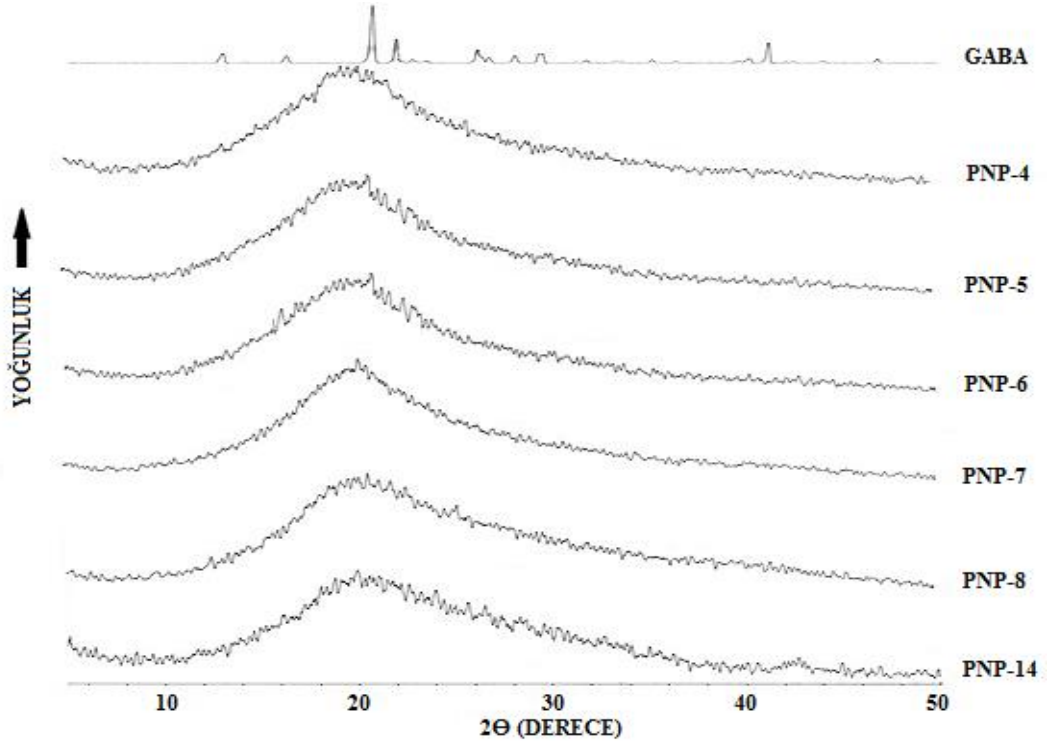
Polimerizasyona PEG 2000 katılması ile hazırlanan formülasyonlardan yalnızca PNP-25'in termogramı alınabilmıştır. PEG 2000 (**Şekil 56**) ve farklı PEG MA türevleri (**Şekil 57**) kullanılarak elde edilen termogramlar incelendiğinde karakteristik GABA pikinin kaybolduğu görülmüştür. Etkin madde pikinin tamamen kaybolması homojen matris oluşumu ya da amorf yapının varlığı şeklinde yorumlanabilmektedir (Mainardes ve Evangelista, 2005).

X-ışını kırınım analizi

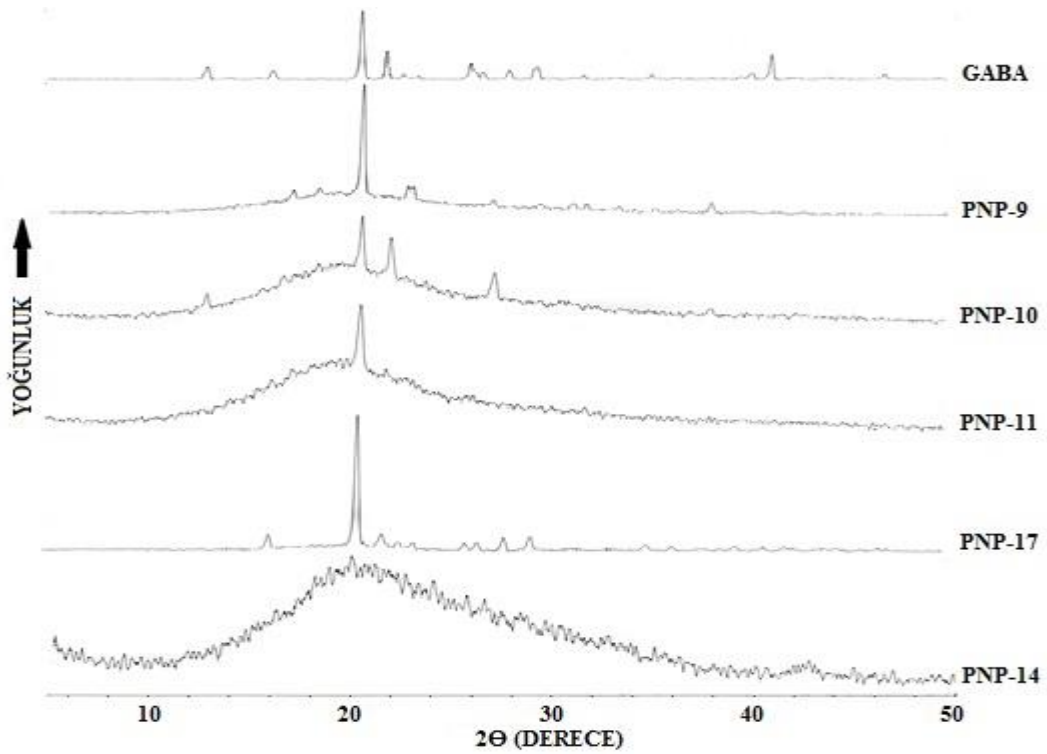
Farklı PYEM yüzdelerinde ve farklı PYEM:GABA molar oranında hazırlanan formülasyonların X-ışını kırınım profilleri **Şekil 58** ve **Şekil 59**'da sunulmuştur.

X-ışını kırınım analizi PNP'lerin moleküler yapılarının aydınlatılması ve polimorfizm çalışmalarının gerçekleştirilmesi için kullanılmaktadır (Kumari ve ark., 2013). Farklı PYEM yüzdeleri kullanılarak hazırlanan PNP formülasyonlarında (**Şekil 58**) GABA'ya ait kristalin piklere rastlanmaması, amorf yapıda PNP formülasyonlarının hazırlandığını ve GABA'nın polimer matrisine moleküler düzeyde dağılmış olduğunu göstermiştir (Shin ve ark., 2010).

Farklı PYEM:GABA molar oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda (**Şekil 59**) GABA oranının artırılması ile GABA'nın kristalin piklerinin yoğunluklarının arttığı görülmektedir. PNP-17 formülasyonunun profili GABA profiline benzerdir. Formülasyonlarda GABA'ya ilişkin bazı piklerin var oluşu GABA'nın yalnızca enkapsüle edilmeyip aynı zamanda parçacıkların dış yüzeyinde de adsorplanmış olabileceğini düşündürmüştür (Kumari ve ark., 2013).

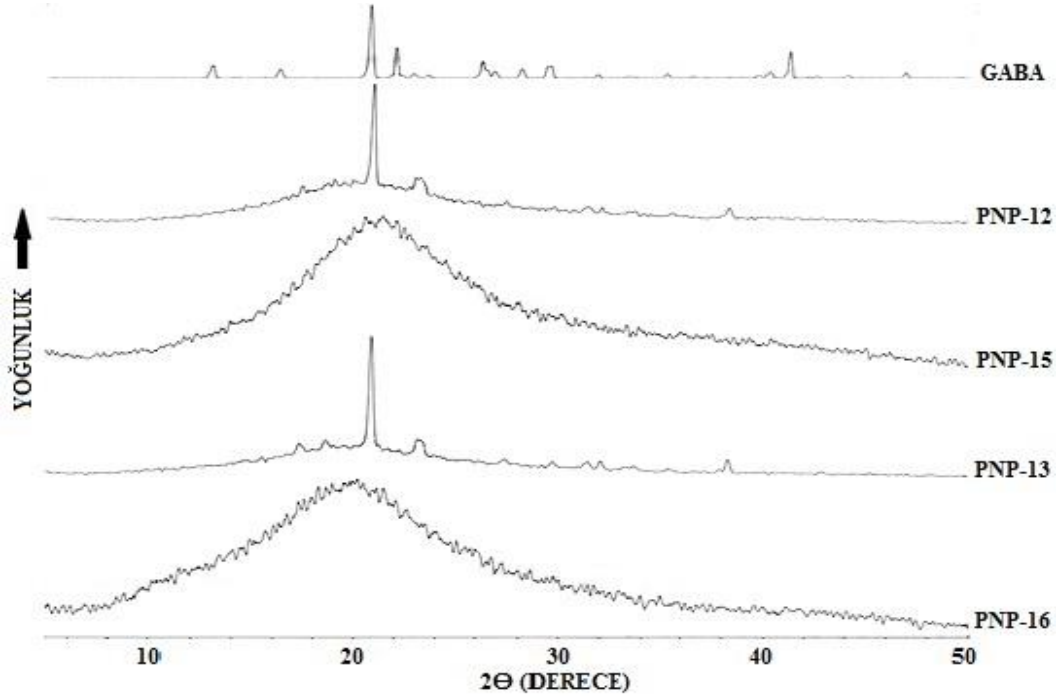


Şekil 58. Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri

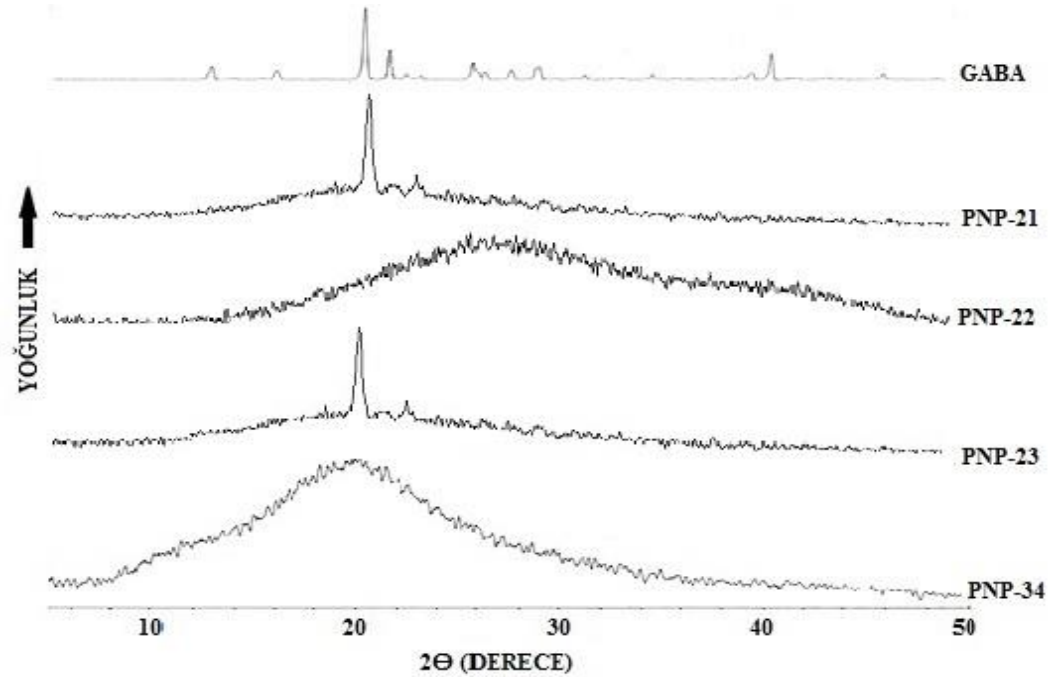


Şekil 59. Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri

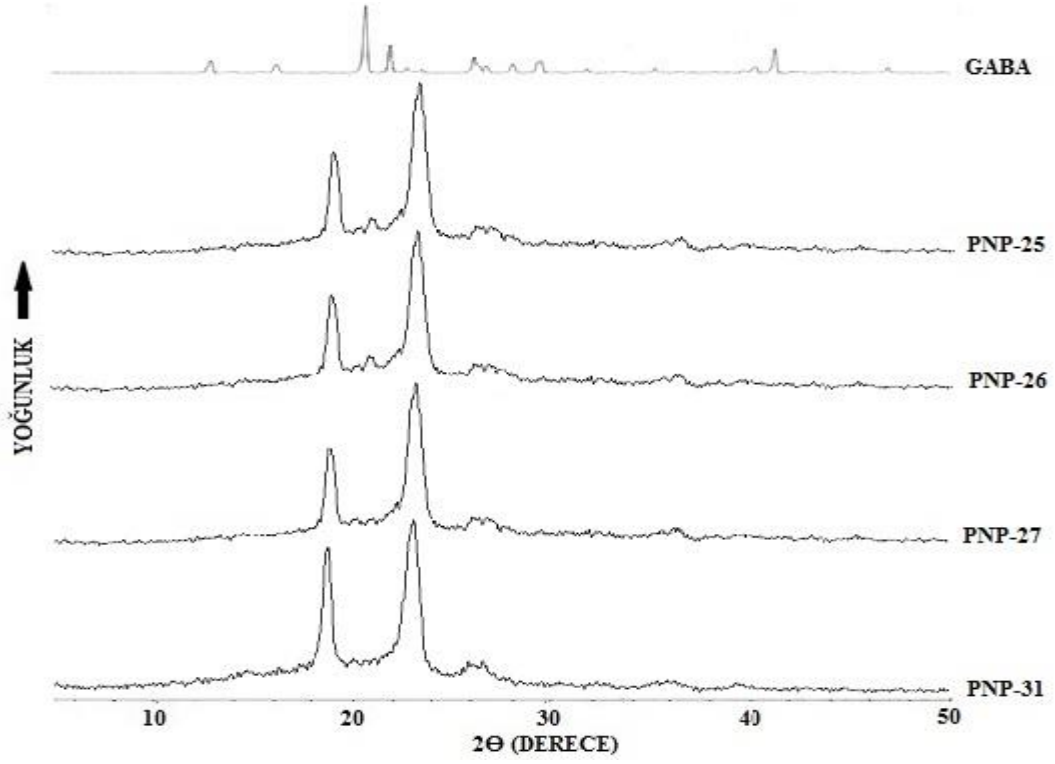
Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının, farklı NMBAc oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonların, polimerizasyon sonrası PEG 2000 katılması ile hazırlanan formülasyonların ve farklı PEG MA türevlerinin polimerizasyona katılması ile hazırlanan formülasyonların X-ışını kırınım profilleri Şekil 60-Şekil 63'te sunulmuştur.



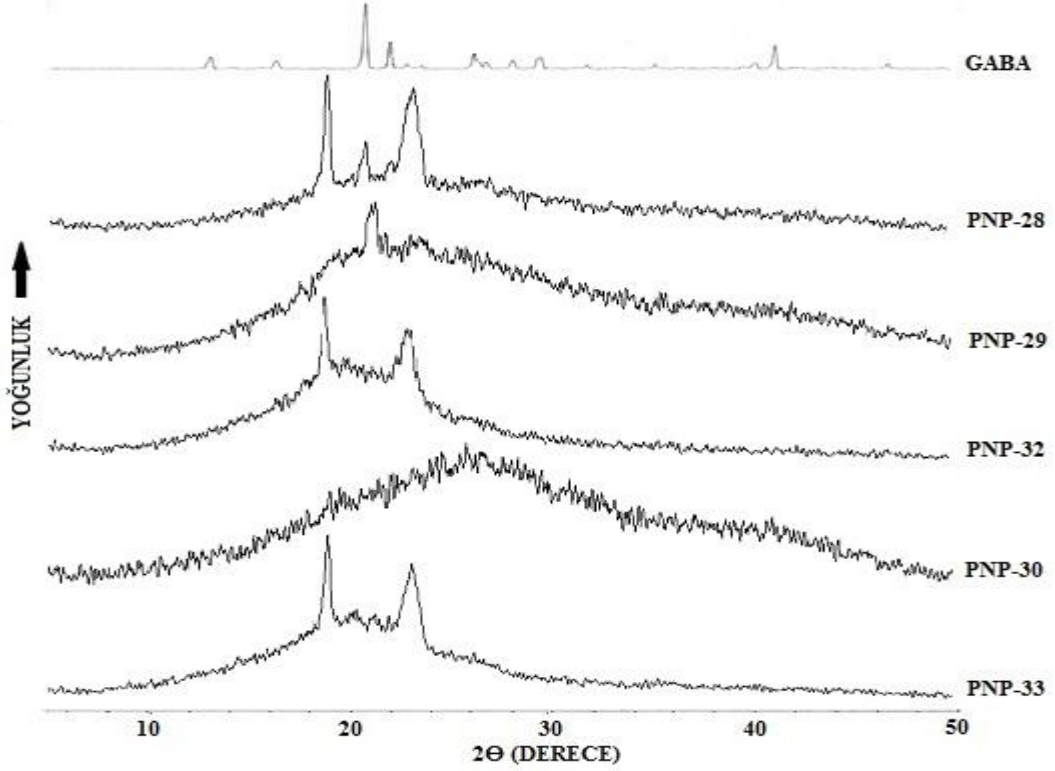
Şekil 60. Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının X-ışını Kırınım Profilleri



Şekil 61. Farklı NMBAc Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-ışını Kırınım Profilleri



Şekil 62. Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri



Şekil 63. Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının X-Işını Kırınım Profilleri

Hazırlanan kopolimerik nanopartiküllerin profilleri incelendiğinde plasebo formülasyonların amorf polimer yapıyı simgelediği görülmektedir. GABA içeren PNP-12 ve PNP-13 formülasyonlarının kristalogramlarında GABA'ya ait bazı karakteristik pikler saptanmıştır (**Şekil 60**).

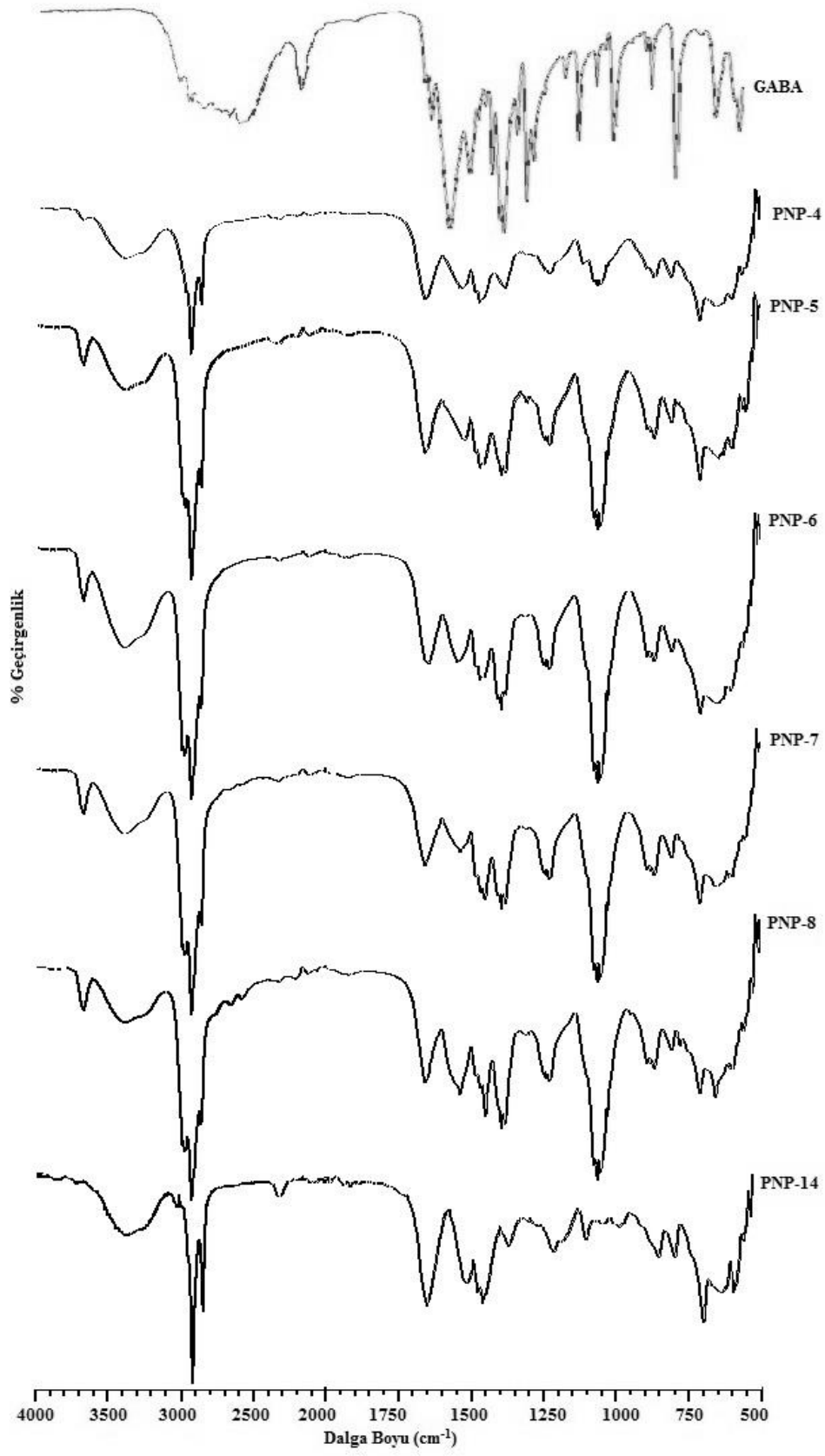
Yüksek hızlı ve manyetik karıştırıcıların birlikte kullanılması ile farklı oranlarda NMBAc eklenerek hazırlanan formülasyonlarda ise, PNP-21 ve PNP-23'de GABA'ya ait bazı pikler mevcutken, PNP-22 formülasyonunda GABA'ya ait pikler gözlenmemiştir (**Şekil 61**). Piklerin niteliklerinde bir değişiklik yokken, etkin madde kristalliğinin tüm formülasyonlarda farklı ölçülerde azaldığı görülmektedir. Etkin maddenin polimerik matris ile farklı yoğunlukla etkileşimi sonucunda farklı NMBAc oranları ile hazırlanan tüm formülasyonlarda etkin maddenin PNP formülasyonlarına katıldığı düşünülmüştür (Pagar ve Vavia, 2013). Aynı zamanda AEİ'lerin stereokimyasal benzerlikleri ve moleküler konformasyonlarının biyoaktivitelerinin üzerine etkili olduğu öne sürülmektedir (Li ve ark., 2007). Bu nedenle GABA'nın kristalin yapısının korunması ile biyolojik sistemlerdeki biyoaktifliği arasında bağlantı olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Polimerizasyon sonrası PEG 2000 polimerinin PNP formülasyonlarına katılması ile hazırlanan sistemlerde GABA'ya ait pik gözlenmemiştir (**Şekil 62**). Elde edilen profiller, GABA'nın parçacığın içinde homojen dağılmasının ve dış yüzeyinde bulunmamasının (Kumari ve ark., 2013) ya da polimer ağının seyreltme etkisinin (Pagar ve Vavia, 2013) göstergesidir. Polimerizasyon sonrası 1 saat, 6 saat ve 24 saat PEG 2000 çözeltisi ile muamele edilen formülasyonların x-ışını kırınım profilleri arasında bir farklılık saptanmamıştır.

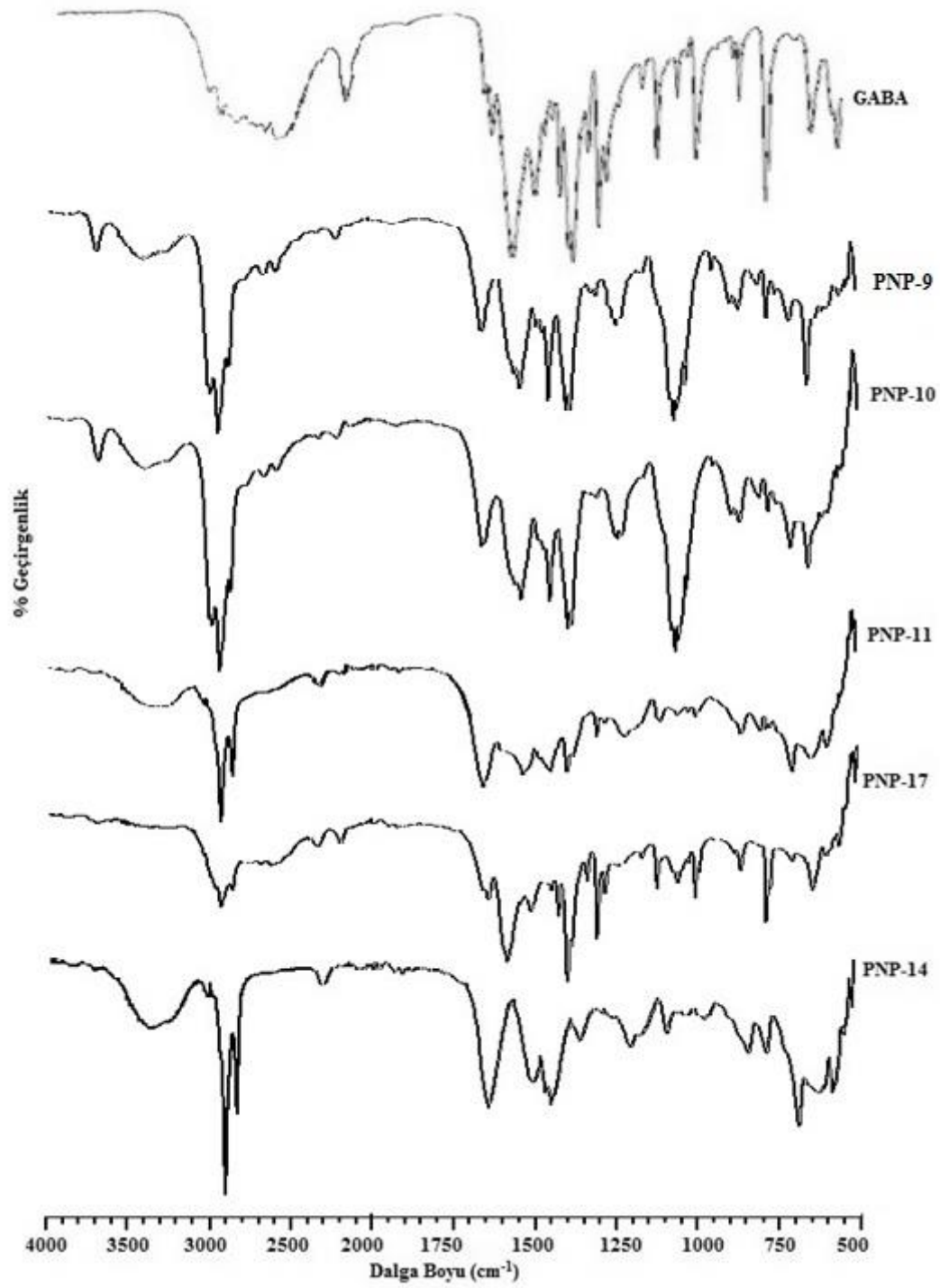
PEG 1000 MA ve PEG 1500 MA polimerlerinin tepkimeye katılması ile hazırlanan PNP formülasyonlarında, PEG 1500 MA polimeri ile hazırlanan PNP-28 formülasyonunda düşük yoğunluklu olmak üzere GABA'ya ait karakteristik pik görülmüştür (**Şekil 63**). PEG 1000 MA polimeri ile hazırlanan nanopartiküllerden hem PNP-29 ve hem de PNP-30 formülasyonu amorf profil vermiştir. Böylece etkin maddenin parçacık içerisinde homojen dağılım gösterdiği ve iç yüzeyde kaldığı düşünülmüştür (Shin ve ark., 2010; Mello ve Ricci-Junior, 2011).

İnfrared analizi

Farklı PYEM yüzdelерinde ve farklı PYEM:GABA molar oranında hazırlanan formülasyonların FTIR spektrumları **Şekil 64** ve **Şekil 65**'te sunulmuştur.



Şekil 64. Farklı PYEM Yüzdeleri ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları



Şekil 65. Farklı PYEM:GABA Molar Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları

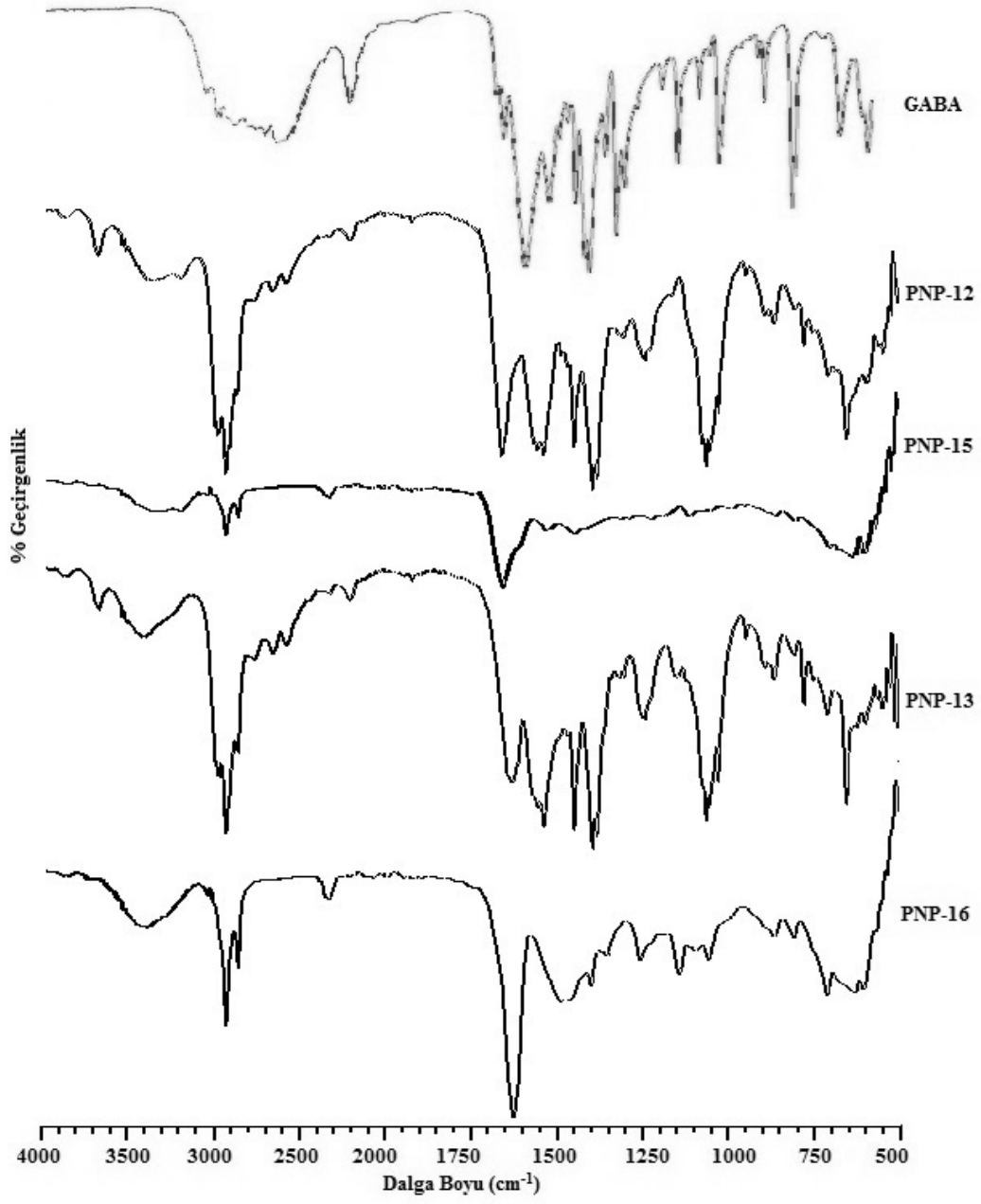
IR bölgesinin 4000 cm^{-1} ile 1300 cm^{-1} arasında kalan kısmında karşılaşılan bantlar, moleküllerde çeşitli fonksiyonel gruplara ait belirgin bantlardır. Bantlar molekülün yapısında yalnızca o grubun varlığı ile ortaya çıkmakta ve molekülün diğer kısmından çok az etkilenmektedir. Bu nedenle, bantların geldiği bölgeye “belirgin fonksiyonel grup bölgesi” denilmektedir. 3300 cm^{-1} civarında C-H, N-H ve O-H gerilmeleri gözlenmektedir. 2500 cm^{-1} ile 2000 cm^{-1} arasında kalan bölgede $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{C}=\text{C}$ ve $\text{C}=\text{O}$ gerileme titreşimleri, 1650 cm^{-1} - 1450 cm^{-1} arasında aromatik halkalardaki $\text{C}=\text{C}$ gerilme titreşimleri, 1600 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} arasında C-H, N-H ve O-H eğilme titreşimleri yer almaktadır (Yıldız ve ark., 1997).

Farklı PYEM yüzdelerinde hazırlanan formülasyonlardan PNP-14 plasebo formülasyonunun spektrumu incelendiğinde (**Şekil 64**), 3358.07 cm^{-1} 'de N-H bağı gerilmesi titreşimi, 2922.16 ve 2852.72 cm^{-1} 'de alifatik C-H grubu gerilmesi titreşimleri, 1658.78 cm^{-1} 'de amit grubunu gösteren $\text{C}=\text{O}$ bağı gerilme titreşimleri ile polimer oluşumu nedeni ile PYEM ve NMBAc spektrumlarından farklı olarak yeni pikler saptanmıştır (Kumari ve ark., 2013).

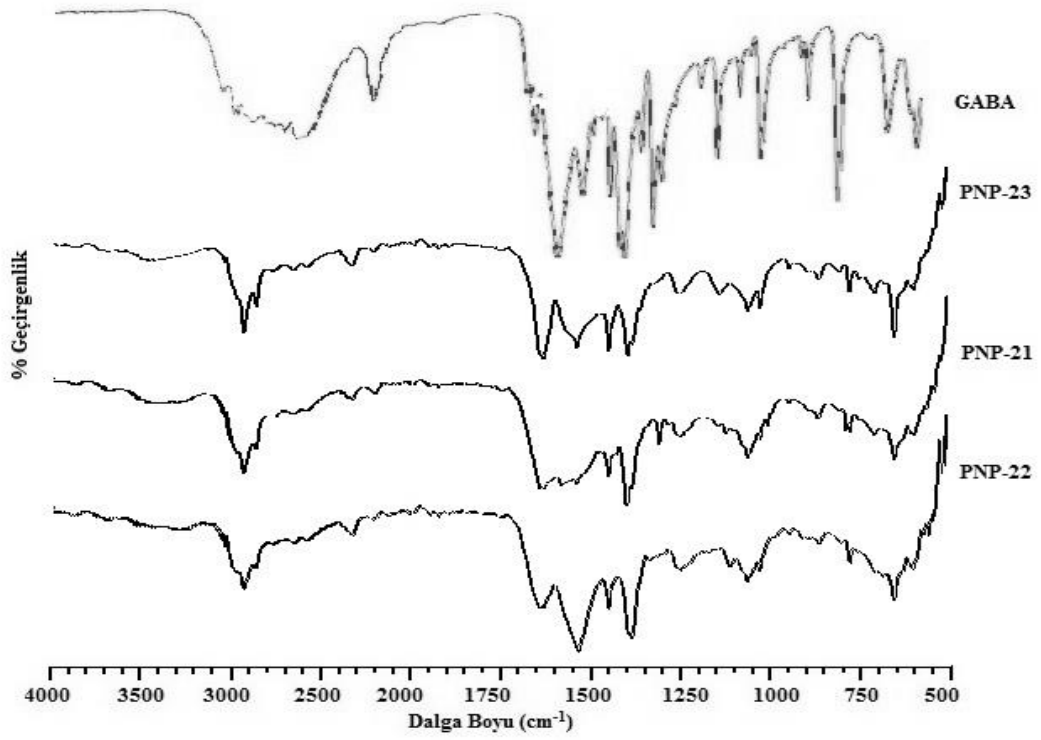
Farklı PYEM yüzdelerinde hazırlanan GABA içeren formülasyonların tümünde GABA'nın karboksilat (COO^-) grubuna ait 1574.55 cm^{-1} 'de gözlenen pik kaybolmuştur. Aynı zamanda formülasyonlardaki N-H pikinde ve amit grubu $\text{C}=\text{O}$ pikinde kaymalar meydana gelmiştir. GABA'nın karboksilat pikinin kaybolması ve formülasyon piklerinde oluşan kaymalar nedeni ile GABA ile polimer arasında etkileşim olduğu düşünülmüştür (Shilpa ve ark., 2012).

Farklı PYEM:GABA molar oranlarında hazırlanan PNP formülasyonlarından (**Şekil 65**) GABA miktarının en çok olduğu PNP-17 formülasyonunda kristalin piklerin saf GABA spektrumuna benzer şekilde artışı nedeni ile polimer ilaç etkileşiminin en az olduğu düşünülmüştür. PNP-17 formülasyonu hariç GABA içeren diğer formülasyonlarda GABA'nın 1574.55 cm^{-1} 'de gözlenen piki kaybolmuştur. Plasebo formülasyon (PNP-14) ile karşılaştırıldığında N-H ve $\text{C}=\text{O}$ gerilmeleri titreşimlerinde polimer etkin madde etkileşimi nedeni ile olduğu düşünülen belirgin kaymalar görülmüştür (Shilpa ve ark., 2012). PNP-9 ve PNP-11 formülasyonlarında GABA'ya ait olduğu düşünülen ancak saf GABA'ya göre daha yüksek dalgaboyunda gözlenen piklerin alifatik C-H grubu kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Etkin madde ve polimerik matris arasında hidrojen bağı oluşumunun söz konusu olabileceği görüşü ortaya çıkmıştır (Gu ve ark., 2007).

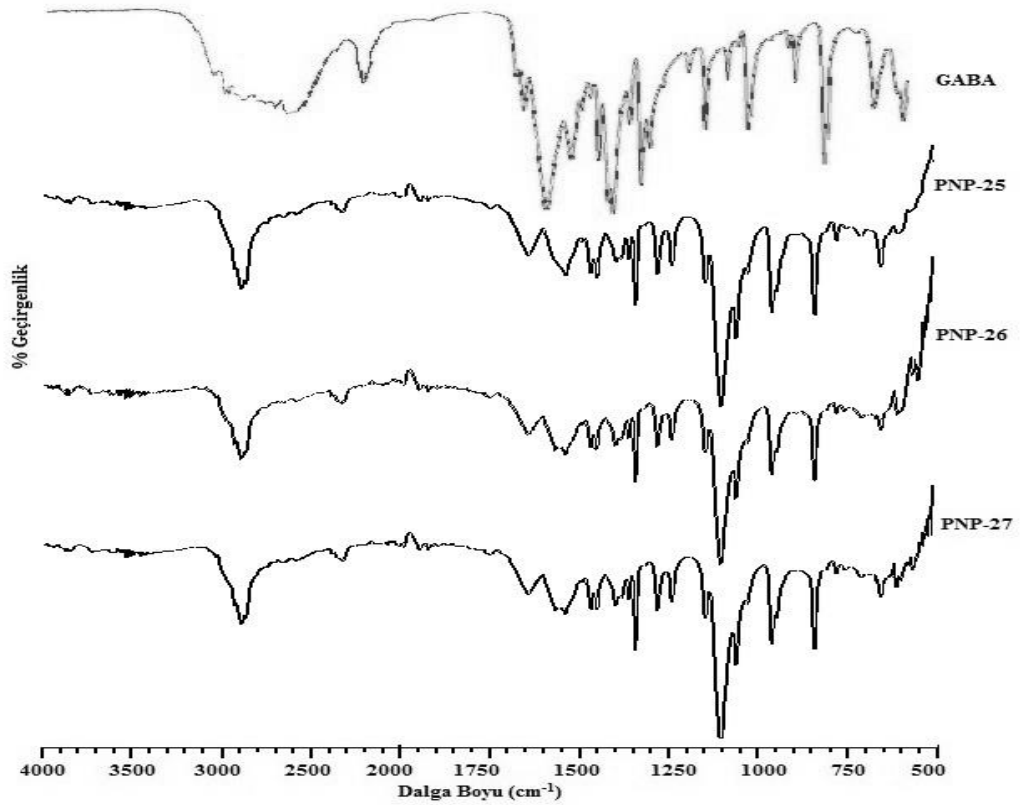
Kopolimerik nanopartikül formülasyonlarının, farklı NMBAc oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonların, polimerizasyon sonrası PEG 2000 katılması ile hazırlanan formülasyonların ve farklı PEG MA türevlerinin polimerizasyona katılması ile hazırlanan formülasyonların FTIR analizine ait spektrumlar **Şekil 66-Şekil 69**'da sunulmuştur.



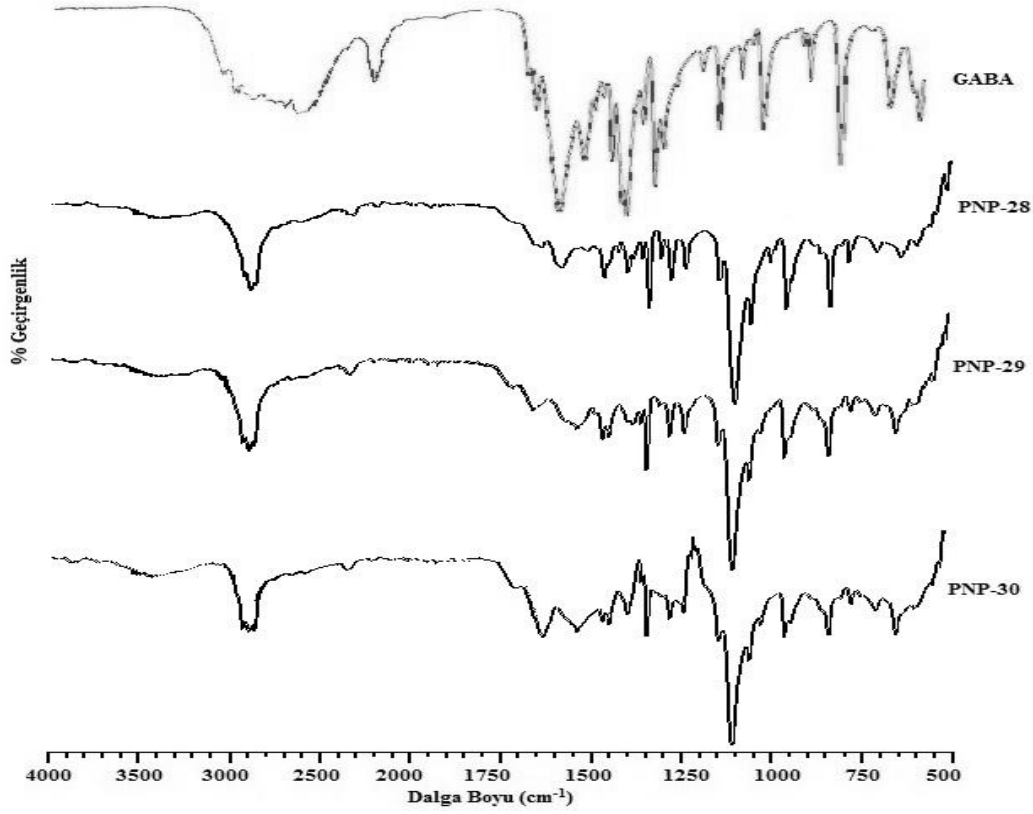
Şekil 66. Kopolimerik Nanopartikül Formülasyonlarının FTIR Spektrumları



Şekil 67. Farklı NMBac Oranlarında Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları



Şekil 68. Polimerizasyon Sonrası PEG 2000 Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları



Şekil 69. Farklı PEG MA Türevlerinin Polimerizasyona Katılması ile Hazırlanan PNP Formülasyonlarının FTIR Spektrumları

DSC, XRD, IR ve *in vitro* salım verileri varlığında PNP-17 formülasyonundan sonra en çok GABA taşıyan PNP-9 formülasyonu üzerinden ikincil monomerlerin de polimerizasyona eklenmesi ile kopolimerik nanopartikül formülasyonları hazırlanmasına karar verilmiştir.

Kopolimerik nanopartikül formülasyonları Ac ve DMAc monomerlerinin polimerizasyona eklenmesi ile hazırlanmıştır. Ac monomeri kullanılarak hazırlanan PNP-12 formülasyonunda Ac yapısında bulunan $-NH_2$ grubunu simgeleyen pikler 3184 cm^{-1} ve 3350.35 cm^{-1} 'de, amide ait karbonil grubunu simgeleyen pikler ise 1651.07 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Bennour ve Louzri, 2014). Plasebo formülasyonda (PNP-15) $-NH_2$ grubu ve amidin karbonil grubuna ait pikler aynı frekansta görülmektedir. GABA içeren PNP-12 formülasyonunda GABA'nın karakteristik karboksilat piki görülmemiş ve plasebo formülasyon piklerine ek olarak PNP-9 formülasyonunda görülen alifatik C-H piklerinin mevcut olduğu saptanmıştır (Şekil 66).

DMAc monomeri ile hazırlanan PNP-16 plasebo formülasyonunda 3419.79 cm^{-1} 'de N-H piki, 2922.16 ve 2852.72 cm^{-1} 'de alifatik C-H pikleri, 1634.60 cm^{-1} 'de amid yapısına ait karbonil grubu pikleri gözlenmiştir. Yapıya GABA eklenmesi ile hazırlanan formülasyonda N-H piki ve karbonil grubu pikinde kaymalar olduğu, GABA'nın karboksilat grubuna ait pikin kaybolduğu ve yeni alifatik C-H grubu pik oluşumları saptanmıştır. Bu durumda GABA ile polimer

arasında etkileşim ve yüklenen GABA'nın yanısıra matrise dağılmış serbest GABA moleküllerinin var olabileceği düşünülmüştür (Gu ve ark., 2007).

Yüksek hızlı karıştırıcılar kullanılarak gerçekleştirilen formülasyon denemeleri sonrasında parçacık büyüklüğü, zeta ve parçacık şekli ve yüzey özellikleri analiz sonuçlarına dayanarak ön emülsiyonun UT IKA 25N25G kullanılarak 8000 rpm'de hazırlanmasına ve ardından polimerizasyon tepkimesinin 250 rpm'de manyetik karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu formülasyonların DSC, IR ve XRD analizleri yapılmamıştır.

Farklı NMBAc oranları kullanılarak hazırlanan PNP formülasyonlarının spektrumları göz önüne alındığında, NMBAc oranı arttıkça N-H pikinin ve alifatik C-H piklerinin yüksek dalga boyuna kaydığı görülmüştür. PNP-23 formülasyonunun spektrumu değerlendirildiğinde, 3355.78 cm^{-1} 'de N-H grubu, 2920.23 cm^{-1} ve 2852.72 cm^{-1} 'de alifatik C-H grubu, 1629.85 cm^{-1} 'de amid yapısının karbonil grubu ve 1581.63-1398.39 cm^{-1} 'de N-H eğilmesi ve C=C çift bağı gerilmesine ait pikler olduğu saptanmıştır.

Yalnızca manyetik karıştırıcı kullanarak hazırlanan formülasyonlar ile UT ve manyetik karıştırıcının birlikte kullanıldığı formülasyonlar karşılaştırıldığında, GABA'ya ait herhangi bir karakteristik pikin var olmadığı ve genel anlamda spektrumlardaki kristalinitenin azalmış olduğu görülmektedir. Sonuç olarak etkin maddenin polimerik parçacıklara tamamen yüklendiği düşünülmüştür (Vino ve ark., 2014) (**Şekil 67**).

Polimerizasyon sonrası PEG 2000 çözeltisi ile parçacıkların karıştırılması ve liyofilizasyon işlemi kapsayan PNP'lerin IR spektrumları incelendiğinde, 1 saat, 6 saat ve 24 saat PEG 2000 çözeltisine maruz bırakılan PNP formülasyonları birbiri ile karşılaştırıldığında anlamlı pik farklılıkları gözlenmemiştir (**Şekil 68**).

PEG 2000 içeren formülasyon spektrumunda PEG zincirine ait 3365.78 cm^{-1} 'de zayıf -OH gerilmesi, 2885.51'de C-H pik gerilmesi, 1278 cm^{-1} 'de O-H eğilmesi, 1465.90-1340.53 cm^{-1} 'de -CH eğilmesi, 1242.16 cm^{-1} ve 1101.35 cm^{-1} 'de C-O-C pik gerilmesi, 1060.85 cm^{-1} 'de C-OH gerilmesi, 960.55 ve 840.96 cm^{-1} 'de C-C tek bağ gerilmesi piklerine rastlanmıştır. PEG 2000 zinciri kaynaklı piklerde, literatürdeki PEG 2000 spektrumlarına göre küçük kaymalar gözlenmiştir (Tunç ve ark., 2008; Shamel ve ark., 2012). Ayrıca polimerik matristen kaynaklı amit yapısının karbonil grubuna ait 1641.42 cm^{-1} 'de C=O piki görülmüştür. GABA'ya ilişkin karakteristik herhangi bir pik gözlenmemiştir. Bu nedenle polimerizasyon ile hazırlanmış olan nanopartiküllerin dış yüzeyine PEG 2000'in tutunmuş olabileceği düşünülmüştür.

PEG 1000 MA ve PEG 1500 MA içeren PNP formülasyonlarının FTIR spektrumları değerlendirildiğinde, tüm formülasyonlarda GABA'nın karboksilat pikinin kaybolduğu görülmüş ve dolayısıyla formülasyonlara GABA'nın yüklendiğini düşünülmüştür. PNP-28 formülasyonunda 3392.79 cm^{-1} 'de PEG 1500 MA zincirine ait zayıf -OH gerilmesi, 2887.44 cm^{-1} 'de C-H gerilmesi, 1710.86 cm^{-1} 'de karboksilik asitin C=O grubu, 1240.23-1105.21 cm^{-1} 'de C-O-C gerilmesi, 1060.85 cm^{-1} 'de C-OH gerilmesi, 962.48 cm^{-1} ve 840.96 cm^{-1} 'de C-C tek bağ gerilmeleri saptanmıştır. Ayrıca spektrumda plasebo formülasyonlarda ve hatta PNP-23 (DMAc içeren) formülasyonunda da görülen polimerik matrise ait

olduğu düşünölen 2922.16 cm⁻¹ ve 2856.58 cm⁻¹'de C-H bağı ve 1641.42 cm⁻¹'de C=O grubu gerilmelerine rastlanmıştır (**Şekil 69**).

PNP-29 ve PNP-30 formölasyonlarındaki pik frekans kaymalarının PNP-28'e göre daha belirgin olduğu belirlenmiştir. Pik frekanslarında meydana gelen kaymalar kullanılan monomerler ile birlikte tepkimeye giren PEG MA molekülerinin hidrojen bağı etkileşimini düşöndürmüştür (Bennour ve Louzri, 2014).

Formölasyonlarda etkin madde miktar tayini

Formölasyonlarda etkin madde miktar tayini bölümünde açıklanan şekilde HPLC analizleri sonucunda PNP formölasyonlarında belirlenen GABA miktarları **Çizelge 32**'de sunulmuştur.

Yüksek hızlı karıştırıcılar ile ön emölşiyon şekli oluşturularak hazırlanan formölasyonlarda etkin madde miktarı tayini analiz sonuçlarının standart hataları daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 32. GABA İçeren Farklı PNP Formölasyonlarının Taşıdığı Etkin Madde Miktarı (n=3)

	% Etkin madde miktarı ± SH
PNP-4	2.177 ± 0.256
PNP-9	19.395 ± 0.347
PNP-12	12.148 ± 0.322
PNP-13	16.815 ± 0.193
PNP-21	17.669 ± 0.037
PNP-22	14.144 ± 0.042
PNP-23	16.622 ± 0.012
PNP-25	11.193 ± 0.002
PNP-28	14.846 ± 0.032
PNP-29	15.074 ± 0.007
PNP-30	15.180 ± 0.019

SH: Standart Hata

Filtre adsorpsiyon testi sonucunda 0.1 µg.mL⁻¹ GABA konsantrasyonu için %99.4, 0.5 µg.mL⁻¹ GABA konsantrasyonu için %99.3 ve 1 µg.mL⁻¹ GABA konsantrasyonu için %99.7 yüzde geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Yüksek % geri kazanım değerleri nedeni ile miktar tayini analizleri için poliyamit filtre kullanımının uygun olduğuna karar verilmiştir.

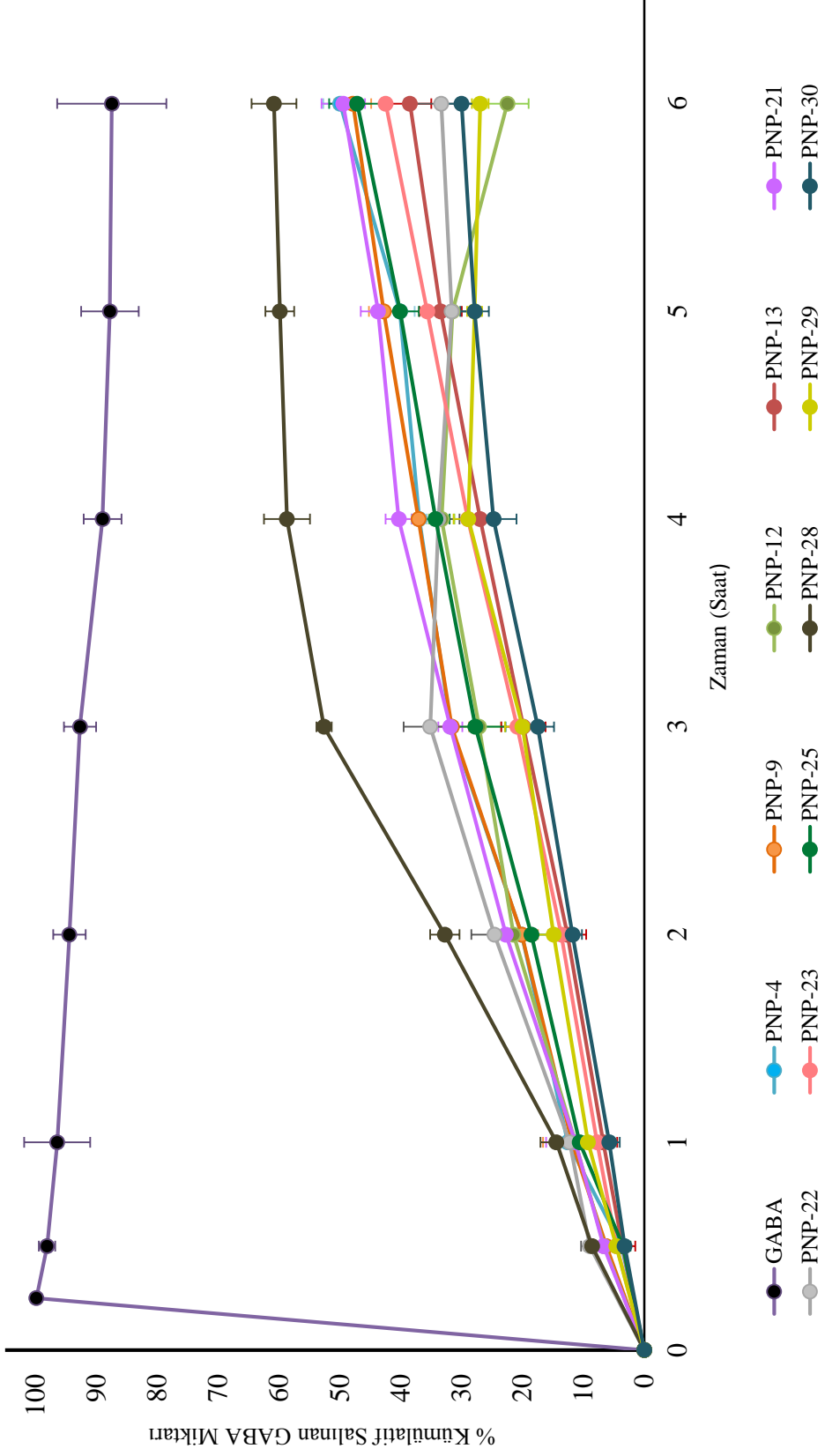
İn vitro salım çalışmaları

Beyne ilaç taşınmasında *in vitro* salım çalışmaları 3.5-5 KDa (Wilson ve ark., 2008) veya 12-14 KDa (Vergoni ve ark., 2009) boyutlarında diyaliz membranlarının kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Diyaliz membranı ile (3.5-5 KDa) gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmasında % kümülatif salım miktarları **Çizelge 33**'de, elde edilen salım profilleri **Şekil 70**'de sunulmuştur.

Çizelge 33. GABA ve GABA içeren PNP Formülasyonlarına ait *In Vitro* Salım Verileri (n=6)

	Örnek Zamani (Saat)						
	0.5	1	2	3	4	5	6
GABA	98.11 ± 1.33	96.43 ± 5.43	94.44 ± 2.67	92.69 ± 2.66	88.99 ± 3.11	87.80 ± 4.73	87.48 ± 8.96
PNP-4	3.74 ± 0.53	12.58 ± 1.68	20.14 ± 2.47	31.75 ± 0.47	36.98 ± 1.23	40.14 ± 2.44	49.98 ± 2.78
PNP-9	6.25 ± 1.12	11.89 ± 4.74	20.13 ± 2.65	31.63 ± 2.85	37.10 ± 3.56	42.78 ± 2.46	47.87 ± 3.03
PNP-12	6.62 ± 1.42	11.34 ± 1.01	21.49 ± 3.71	27.14 ± 3.85	33.29 ± 5.28	31.49 ± 5.87	22.50 ± 9.70
PNP-13	3.58 ± 2.10	6.75 ± 2.30	12.64 ± 3.10	19.87 ± 3.65	26.97 ± 2.08	33.46 ± 3.49	38.50 ± 3.50
PNP-21	6.72 ± 1.52	11.33 ± 4.78	22.74 ± 2.53	31.87 ± 1.95	40.33 ± 2.17	43.74 ± 2.86	49.46 ± 3.58
PNP-22	8.96 ± 1.43	12.27 ± 2.55	24.62 ± 3.80	35.16 ± 4.36	33.81 ± 3.45	31.63 ± 4.77	33.37 ± 6.02
PNP-23	4.58 ± 0.56	7.75 ± 1.23	13.64 ± 3.56	20.87 ± 2.55	28.97 ± 1.54	35.64 ± 2.21	42.50 ± 2.46
PNP-25	3.49 ± 1.20	10.63 ± 1.45	18.55 ± 3.78	27.75 ± 4.95	34.29 ± 2.29	40.14 ± 3.13	47.16 ± 4.63
PNP-28	8.58 ± 1.24	14.45 ± 2.58	32.78 ± 2.41	52.60 ± 1.26	58.71 ± 3.78	59.88 ± 2.35	60.83 ± 3.68
PNP-29	4.60 ± 1.88	9.25 ± 0.66	14.88 ± 3.76	19.99 ± 2.90	28.91 ± 2.44	27.88 ± 1.24	26.96 ± 1.37
PNP-30	3.24 ± 0.52	5.76 ± 1.73	11.79 ± 1.54	17.48 ± 2.65	24.76 ± 3.75	27.86 ± 2.35	30.02 ± 2.65

ORT: Ortalama, SH: Standart Hata



Şekil 70. GABA ve GABA içeren PNP Formülasyonlarına ait *In Vitro* Salınım Profilleri (n=6)

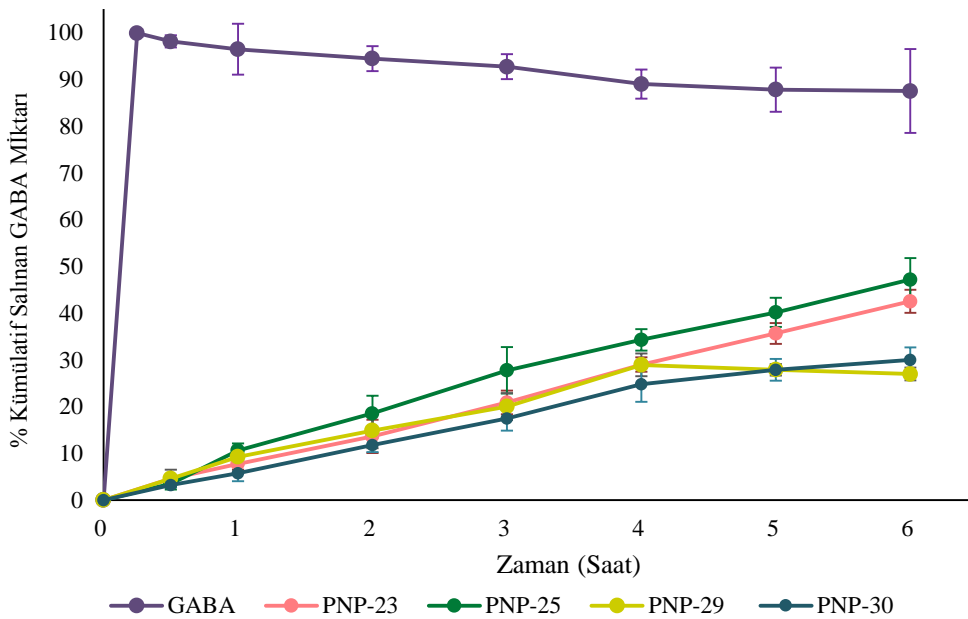
Hazırlanan PNP formülasyonları ile suda çözünürlüğü yüksek endojen bir bileşik olan GABA'nın salımının toz GABA'ya oranla daha uzun sürede gerçekleştiği **Şekil 70**'de görülmektedir.

GABA'nın PNP formülasyonları ile elde edilen profilleri dikkatle incelendiğinde, PNP-4, PNP-9, PNP-12 ve PNP-13 formülasyonları arasında PNP-13 formülasyonunun daha uzun sürede GABA salımı sağlayan ve doğrusal özellikli bir salım profiline sahip olduğu göze çarpmaktadır. Küresel nitelikli formülasyon hazırlanması amacı ile PNP-13 formülasyonunun yüksek hızlı karıştırıcı ve manyetik karıştırıcı kullanılarak hazırlanması ile elde edilen PNP-23 formülasyonundan da doğrusal özellikli salım elde edilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonda NMBAc içeren PNP-22 formülasyonunda da GABA salım süresi uzatılmıştır ancak standart hatanın yüksekliği göze çarpmaktadır.

PEG 2000 polimerinin polimerizasyon sonrası parçacıklara katılması ile hazırlanan PNP-25 formülasyonunun salım profili de GABA'ya göre farklı bulunmuş ve formülasyon ile GABA salım süresinin uzatıldığı belirlenmiştir.

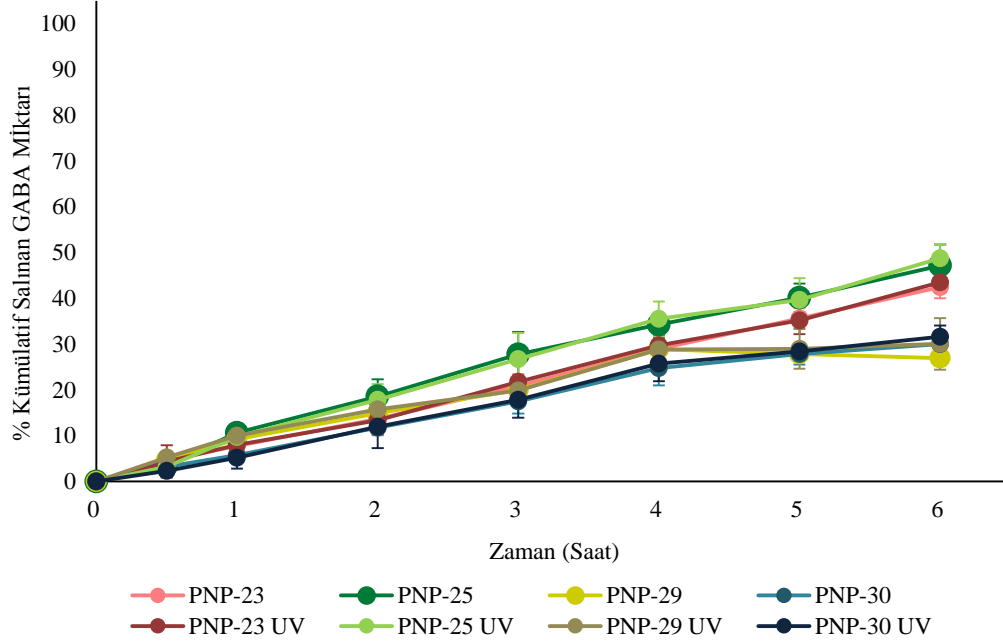
PEG MA içeren PNP formülasyonlarından, PNP-28'den 6 saat sonunda salınan % kümülatif GABA miktarı 60.832 ± 3.682 ; PNP-29'dan salınan $\%26.959 \pm 1.365$ ve PNP-30'dan salınan 30.021 ± 2.647 olarak bulunmuştur. PNP-28 formülasyonundan GABA salımı daha çabuk gerçekleştiğinden *in vivo* hayvan deneylerinde tercih edilmemiştir.

PNP formülasyonları üzerinde gerçekleştirilen parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel, parçacık şekli ve yüzey özellikleri, termal, x-ışını kırınım, infrared, etkin madde miktarı analizleri gibi karakterizasyon ve *in vitro* salım çalışmaları sonucunda PNP-23, PNP-25, PNP-29 ve PNP-30 formülasyonlarının *in vivo* hayvan deneylerinde kullanılmasına karar verilmiştir. Bu formülasyonlara ait salım profilleri **Şekil 71**'de sunulmuştur.



Şekil 71. *İn Vivo* Çalışmalar için Seçilen PNP Formülasyonlarının *İn Vitro* Salım Profilleri (n=6)

PNP formülasyonları UV radyasyon ile sterilize edilmiştir. UV sterilizasyon sonrası PNP formülasyonları üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen salım salım profilleri **Şekil 72**'de sunulmuştur.



Şekil 72. UV Sterilizasyon Sonrası PNP Formülasyonlarının *İn Vitro* Salım Profilleri (n=6)

Nanopartikül formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi

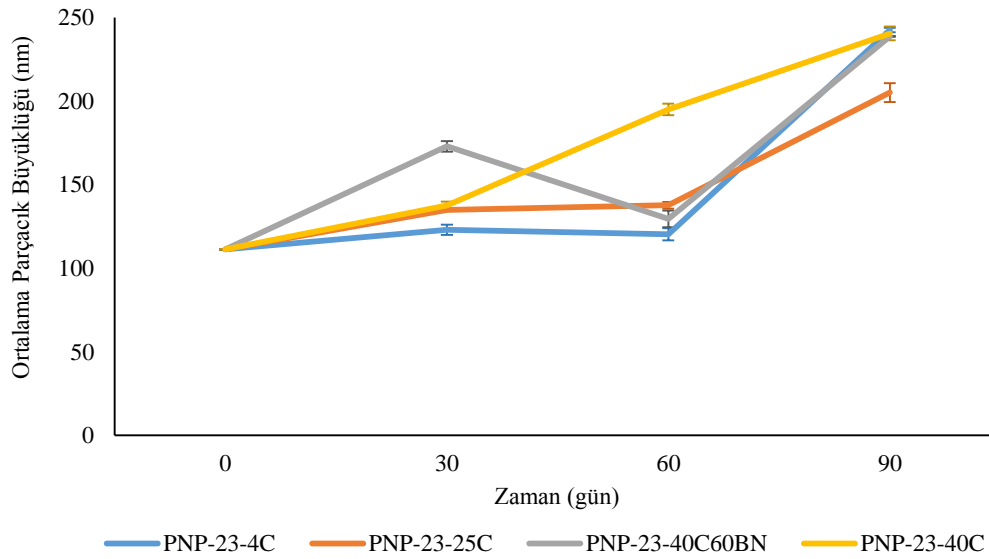
Parçacık büyüklüğü tayinleri farmasötik sistemler üzerinde kontrol mekanizması oluşturulmasına yardımcıdır. Çözünme hızı ve *in vivo* çalışmalar yerine geçemez ancak ilaç taşıyıcı sistemlerin özelliklerini kontrol etmek ve üretim alanlarındaki kalite denetimi için önem taşımaktadır (Kaş, 2012).

PNP-23 formülasyonunun 0.zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki parçacık büyüklüğü ve dağılımı ve polidisperslik indisi verileri **Çizelge 34**'te, karşılaştırmalı olarak **Şekil 73**'de yer almaktadır.

Çizelge 34. PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
PNP-23-4C-T0	111.3 ± 0.120	0.177 ± 0.008
PNP-23-4C-T30	123.0 ± 3.147	0.229 ± 0.038
PNP-23-4C-T60	120.3 ± 3.658	0.249 ± 0.016
PNP-23-4C-T90	242.5 ± 1.298	0.319 ± 0.011
PNP-23-25C-T0	111.3 ± 0.120	0.177 ± 0.008
PNP-23-25C-T30	134.9 ± 0.384	0.261 ± 0.027
PNP-23-25C-T60	137.7 ± 2.041	0.196 ± 0.036
PNP-23-25C-T90	205.1 ± 5.603	0.264 ± 0.054
PNP-23-40C60BN-T0	111.3 ± 0.120	0.177 ± 0.008
PNP-23-40C60BN -T30	172.9 ± 3.110	0.243 ± 0.036
PNP-23-40C60BN -T60	129.5 ± 4.994	0.348 ± 0.027
PNP-23-40C60BN -T90	238.7 ± 0.208	0.399 ± 0.024
PNP-23-40C-T0	111.3 ± 0.120	0.177 ± 0.008
PNP-23-40C-T30	137.5 ± 2.318	0.261 ± 0.027
PNP-23-40C-T60	195.0 ± 3.510	0.232 ± 0.019
PNP-23-40C-T90	240.5 ± 4.122	0.339 ± 0.030

BN: Bağıl Nem **ORT:** Ortalama, **PDI:** Polidisperslik İndisi, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 73. PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

PNP-23 formülasyonunun 111.3 ±0.120 nm (PDI: 0.177 ±0.008) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 3. ayın sonunda 4°C±1°C'de saklanan formülasyonda 242.5 ±1.298 nm (PDI: 0.319 ±0.011), 25°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 205.1 ±5.603 nm (PDI: 0.264 ±0.054), 40°C ±1°C %60 BN'de saklanan formülasyonda 238.7 ±0.208 nm (PDI: 0.399 ±0.024) ve 40°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 240.5 ±4.122 nm (PDI: 0.339 ±0.030) olarak belirlenmiştir (Çizelge 34).

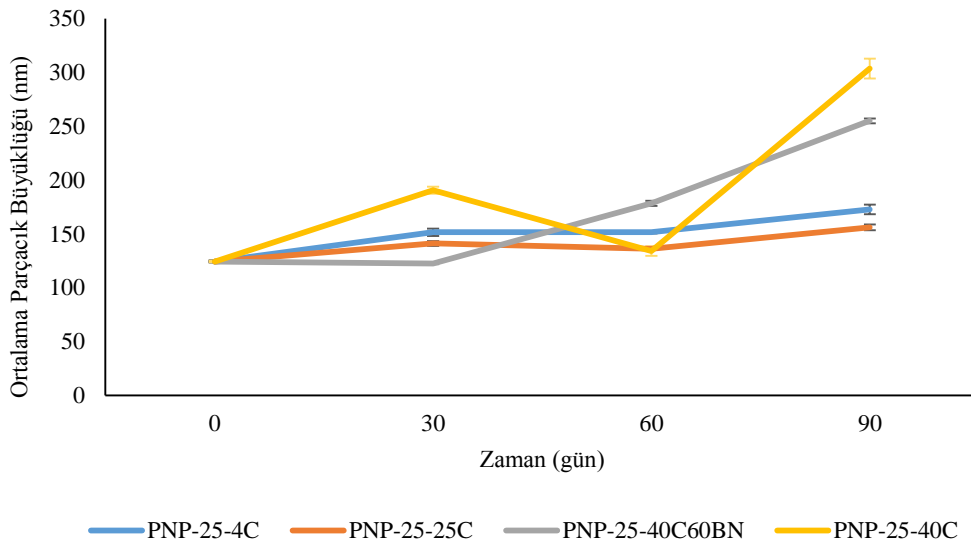
PNP-23 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay parçacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark (p<0.001), 25°C ±1°C’de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark (p<0.01) olduğu görülmüştür.

PNP-25 formülasyonunun 0.zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki parçacık büyüklüğü ve dağılımı ve polidisperslik indisi verileri **Çizelge 35**'te, karşılaştırmalı olarak **Şekil 74**'te yer almaktadır.

Çizelge 35. PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
PNP-25-4C-T0	124.4 ± 0.823	0.238 ± 0.016
PNP-25-4C-T30	151.6 ± 3.419	0.267 ± 0.019
PNP-25-4C-T60	151.5 ± 1.154	0.372 ± 0.063
PNP-25-4C-T90	172.8 ± 4.475	0.217 ± 0.020
PNP-25-25C-T0	124.4 ± 0.823	0.238 ± 0.016
PNP-25-25C-T30	141.1 ± 2.109	0.248 ± 0.009
PNP-25-25C-T60	136.3 ± 0.812	0.200 ± 0.018
PNP-25-25C-T90	156.1 ± 2.778	0.238 ± 0.013
PNP-25-40C60BN-T0	124.4 ± 0.823	0.238 ± 0.016
PNP-25-40C60BN -T30	122.5 ± 0.639	0.245 ± 0.009
PNP-25-40C60BN -T60	178.4 ± 2.245	0.420 ± 0.039
PNP-25-40C60BN -T90	255.0 ± 2.261	0.218 ± 0.112
PNP-25-40C-T0	124.4 ± 0.823	0.238 ± 0.016
PNP-25-40C-T30	190.5 ± 3.310	0.429 ± 0.070
PNP-25-40C-T60	134.1 ± 4.441	0.281 ± 0.051
PNP-25-40C-T90	303.6 ± 9.130	0.317 ± 0.004

BN: Bağlı Nem **ORT:** Ortalama, **PDI:** Polidisperslik İndisi, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 74. PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

PNP-25 formülasyonunun 124.4 ±0.823 nm (PDI: 0.238 ±0.016) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 3. ayın sonunda 4°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 172.8 ±4.475 nm (PDI: 0.217 ±0.020), 25°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 156.1 ±2.778 nm (PDI: 0.238 ±0.013), 40°C ±1°C %60 BN’de saklanan formülasyonda 255.0 ±2.261 nm (PDI: 0.218 ±0.112) ve 40°C ±1°C’de saklanan formülasyonda 303.6 ±9.130 nm (PDI: 0.317 ±0.004) olarak belirlenmiştir (**Çizelge 35**).

PNP-25 formülasyonunun 0. ve 90. gün parçacık büyüklüğü analiz sonuçları göz önüne alındığında, 4°C ±1°C ve 25°C ±1°C’de saklanan formülasyonlarda parçacık büyüklüğünde belirgin bir artış görülmemişken, 40°C ±1°C ve %60 BN’de saklanan formülasyonda 255 nm, 40°C ±1°C’de saklanan formülasyonlarda ise 303.6 nm’ye kadar artış görülmüştür (**Şekil 72**).

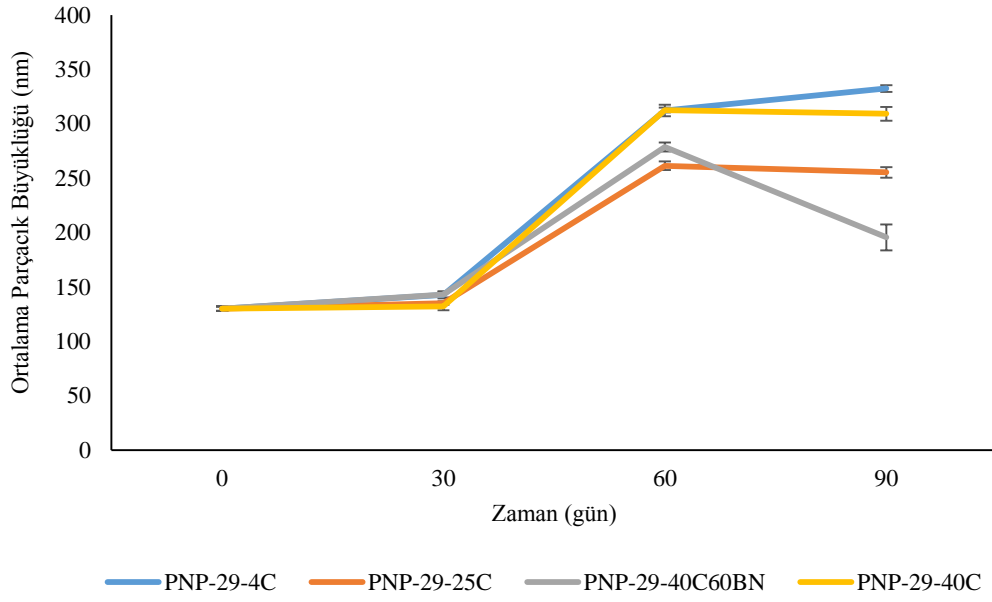
PNP-25 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay parçacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve 4°C ±1°C, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C’de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark (p<0. 01), 40°C ±1°C ve %60 BN’de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark (p<0.001) olduğu görülmüştür.

PNP-29 formülasyonunun 0.zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki parçacık büyüklüğü ve dağılımı ve PDI verileri **Çizelge 36**’da, karşılaştırmalı olarak **Şekil 75**’te yer almaktadır.

Çizelge 36. PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
PNP-29-4C-T0	130.0 ± 2.003	0.168 ± 0.017
PNP-29-4C-T30	142.7 ± 3.299	0.223 ± 0.004
PNP-29-4C-T60	312.3 ± 5.391	0.396 ± 0.027
PNP-29-4C-T90	332.6 ± 3.049	0.302 ± 0.017
PNP-29-25C-T0	130.0 ± 2.003	0.168 ± 0.017
PNP-29-25C-T30	135.2 ± 1.702	0.238 ± 0.029
PNP-29-25C-T60	261.5 ± 3.953	0.358 ± 0.009
PNP-29-25C-T90	255.4 ± 4.897	0.337 ± 0.019
PNP-29-40C60BN-T0	130.0 ± 2.003	0.168 ± 0.017
PNP-29-40C60BN -T30	143.1 ± 2.610	0.270 ± 0.015
PNP-29-40C60BN -T60	278.8 ± 4.201	0.325 ± 0.067
PNP-29-40C60BN -T90	195.6 ± 11.856	0.310 ± 0.006
PNP-29-40C-T0	130.0 ± 2.003	0.168 ± 0.017
PNP-29-40C-T30	132.0 ± 3.451	0.261 ± 0.011
PNP-29-40C-T60	312.7 ± 2.256	0.331 ± 0.046
PNP-29-40C-T90	309.3 ± 6.304	0.333 ± 0.056

BN: Bağlı Nem **ORT:** Ortalama, **PDI:** Polidisperslik İndisi, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 75. PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

PNP-29 formülasyonunun 130.0 ± 2.003 nm (PDI: 0.168 ± 0.017) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 3.ayın sonunda $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 332.6 ± 3.049 nm (PDI: 0.302 ± 0.017), $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 255.4 ± 4.897 nm (PDI: 0.337 ± 0.019), $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ %60 BN'de saklanan formülasyonda 195.6 ± 11.856 nm (PDI: 0.310 ± 0.006) ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 309.3 ± 6.304 nm (PDI: 0.333 ± 0.056) olarak belirlenmiştir. Tüm kararlılık test ortamlarındaki formülasyonların parçacık büyüklüğünde artış görülmesi ile birlikte 3. ayın sonunda en çok artış 309.3 nm ile 40°C 'de saklanan formülasyonda gözlenmiştir (**Şekil 75**).

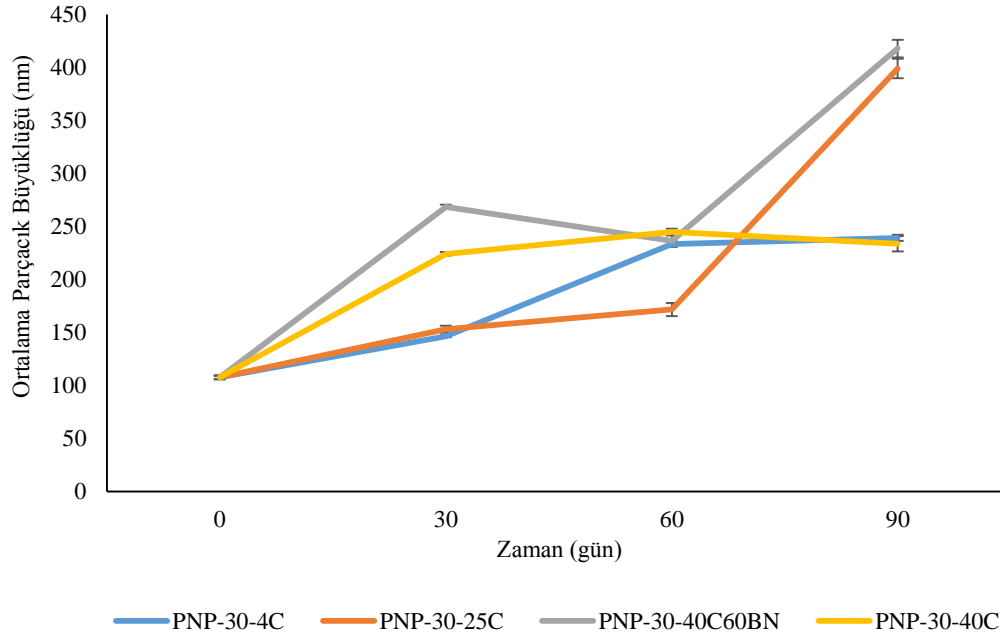
PNP-29 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay parçacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark ($p < 0.001$), $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda önemli fark ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür.

PNP-30 formülasyonunun 0.zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki parçacık büyüklüğü ve dağılımı ve polidisperslik indisi verileri **Çizelge 37**'de, karşılaştırmalı olarak **Şekil 76**'da yer almaktadır.

Çizelge 37. PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
PNP-30-4C-T0	107.6 ± 1.629	0.535 ± 0.053
PNP-30-4C-T30	146.4 ± 1.004	0.280 ± 0.035
PNP-30-4C-T60	233.5 ± 2.675	0.424 ± 0.079
PNP-30-4C-T90	239.2 ± 2.953	0.302 ± 0.080
PNP-30-25C-T0	107.6 ± 1.629	0.535 ± 0.053
PNP-30-25C-T30	153.0 ± 3.332	0.261 ± 0.027
PNP-30-25C-T60	171.6 ± 6.095	0.329 ± 0.023
PNP-30-25C-T90	399.0 ± 9.284	0.393 ± 0.047
PNP-30-40C60BN-T0	107.6 ± 1.629	0.535 ± 0.053
PNP-30-40C60BN -T30	268.5 ± 1.980	0.454 ± 0.062
PNP-30-40C60BN -T60	236.4 ± 5.457	0.450 ± 0.047
PNP-30-40C60BN -T90	417.8 ± 8.248	0.478 ± 0.024
PNP-30-40C-T0	107.6 ± 1.629	0.535 ± 0.053
PNP-30-40C-T30	224.1 ± 1.564	0.304 ± 0.008
PNP-30-40C-T60	244.7 ± 3.147	0.423 ± 0.046
PNP-30-40C-T90	333.6 ± 7.337	0.351 ± 0.027

BN: Bağlı Nem **ORT:** Ortalama, **PDI:** Polidisperslik İndisi, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 76. PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

PNP-30 formülasyonunun 107.6 ±1.629 nm (PDI: 0.535 ±0.053) olan başlangıç parçacık büyüklüğü, 3. ayın sonunda 4°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 239.2 ±2.953 nm (PDI: 0.302 ±0.080), 25°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 399.0 ±9.284 nm (PDI: 0.393 ±0.047), 40°C ±1°C %60 BN'de saklanan formülasyonda 417.8 ± 8.248 nm (0.478 ±0.024) ve 40°C ±1°C'de saklanan formülasyonda 233.6 ± 7.337 nm (0.351 ±0.027) olarak belirlenmiştir. 3. ay analizlerinde 40°C ve %60 BN'de bekletilen PNP-30 formülasyonunda 417.8 nm

ile en yüksek parçacık büyüklüğü değerine ulaşılmıştır. Diğer kararlılık ortamlarında da başlangıç parçacık büyüklüğüne göre nanopartiküllerin parçacık büyüklüklerinin artmış olduğu görülmektedir (**Şekil 76**).

PNP-30 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay parçacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark ($p < 0.001$) olduğu görülmüştür.

3 ay sonunda PNP formülasyonlarının özellikle $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda daha çok olmakla birlikte parçacık büyüklüklerinde artış gözlenmiştir. Ancak tüm formülasyonların parçacık büyüklüğü nanometre aralığında kalmıştır.

Zeta potansiyel

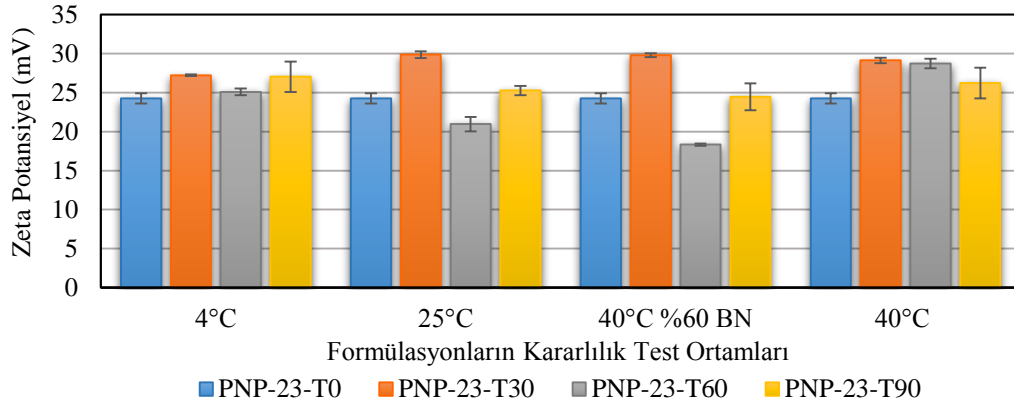
Zeta potansiyel nanopartikül kararlılığının belirlenmesinde çok önemli bir parametredir.

PNP-23 formülasyonunun 0.zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki zeta potansiyel değerleri **Çizelge 38**'de, karşılaştırmalı olarak **Şekil 77**'de yer almaktadır.

Çizelge 38. PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)
	ORT \pm SH
PNP-23-4C-T0	24.27 \pm 0.66
PNP-23-4C-T30	27.23 \pm 0.09
PNP-23-4C-T60	25.10 \pm 0.44
PNP-23-4C-T90	27.03 \pm 1.96
PNP-23-25C-T0	24.27 \pm 0.66
PNP-23-25C-T30	29.87 \pm 0.44
PNP-23-25C-T60	20.97 \pm 0.92
PNP-23-25C-T90	25.27 \pm 0.58
PNP-23-40C60BN-T0	24.27 \pm 0.66
PNP-23-40C60BN -T30	29.81 \pm 0.26
PNP-23-40C60BN -T60	18.33 \pm 0.13
PNP-23-40C60BN -T90	24.47 \pm 1.71
PNP-23-40C-T0	24.27 \pm 0.66
PNP-23-40C-T30	29.13 \pm 0.35
PNP-23-40C-T60	28.73 \pm 0.61
PNP-23-40C-T90	26.23 \pm 1.96

BN: Bağlı Nem, **ORT:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 77. PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

PNP-23 formülasyonunun hazırlanmasının ardından yapılan analizlerde, 24.267 ± 0.664 mV olan başlangıç zeta potansiyeli, 3. ayın sonunda 4°C ± 1°C’de saklanan formülasyonda 27.033 ± 1.964 mV, 25°C ± 1°C’de saklanan formülasyonda 25.267 ± 0.578 mV, 40°C ± 1°C ve %60 BN ortamında saklanan formülasyonda 24.467 ± 1.707 mV ve 40°C ± 1°C’de saklanan formülasyonda 26.233 ± 1.960 mV olarak belirlenmiştir (**Çizelge 38**).

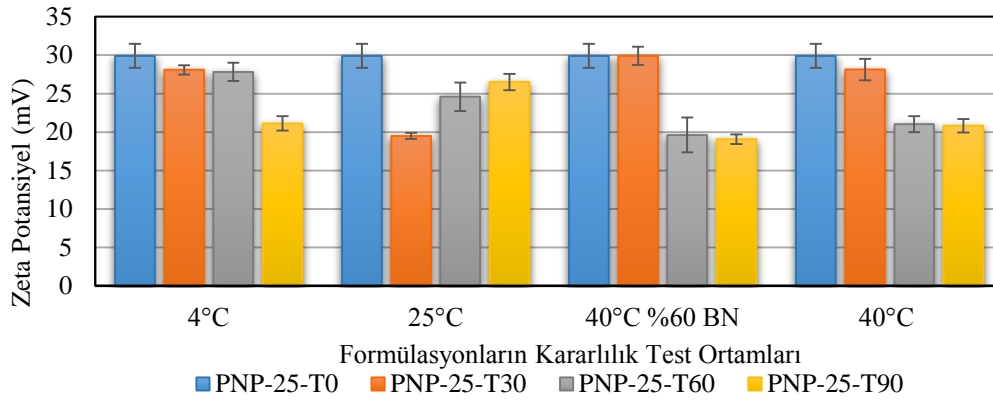
PNP-23 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve 4°C ± 1°C, 25°C ± 1°C ve 40°C ± 1°C ve 40°C ± 1°C ve %60 BN’de bekletilen formülasyonlarda önemli değişiklik (p>0.05) gözlenmemiştir.

PNP-25 formülasyonunun 0. zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki zeta potansiyel değerleri **Çizelge 39**’da, karşılaştırmalı olarak **Şekil 78**’de yer almaktadır.

Çizelge 39. PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)
	ORT ± SH
PNP-25-4C-T0	29.90 ± 1.56
PNP-25-4C-T30	28.10 ± 0.60
PNP-25-4C-T60	27.83 ± 1.19
PNP-25-4C-T90	21.13 ± 0.95
PNP-25-25C-T0	29.90 ± 1.56
PNP-25-25C-T30	19.50 ± 0.40
PNP-25-25C-T60	24.60 ± 1.85
PNP-25-25C-T90	26.52 ± 1.07
PNP-25-40C60BN-T0	29.90 ± 1.56
PNP-25-40C60BN -T30	29.90 ± 1.19
PNP-25-40C60BN -T60	19.63 ± 2.27
PNP-25-40C60BN -T90	19.07 ± 0.61
PNP-25-40C-T0	29.90 ± 1.56
PNP-25-40C-T30	28.13 ± 1.39
PNP-25-40C-T60	21.03 ± 1.04
PNP-25-40C-T90	20.83 ± 0.87

BN: Bağlı Nem, **ORT:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 78. PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

PNP-25 formülasyonunun hazırlanmasının ardından yapılan analizlerde, 29.900 ± 1.562 mV olan başlangıç zeta potansiyel değeri, 3. ayın sonunda $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 21.133 ± 0.953 mV, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 26.517 ± 1.065 mV, $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN ortamında saklanan formülasyonda 19.067 ± 0.612 mV ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 20.833 ± 0.867 mV olarak belirlenmiştir (**Çizelge 39**).

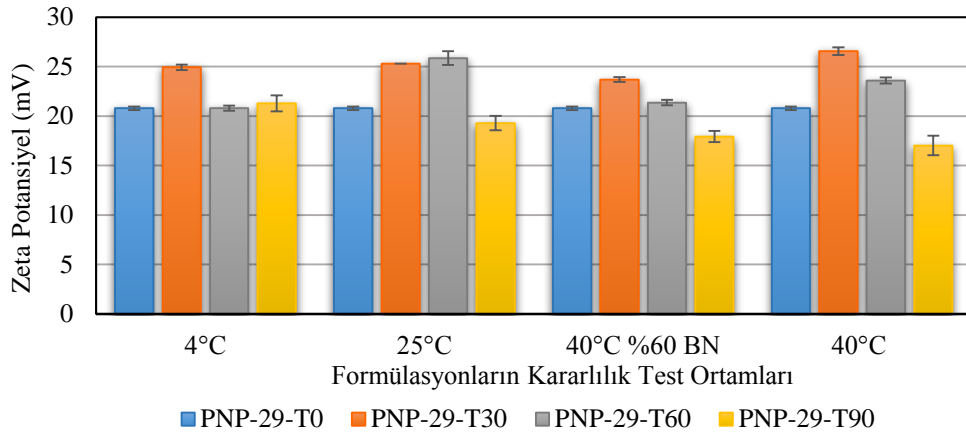
PNP-25 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda önemli fark olduğu ($p < 0.05$) gözlenmiş ancak $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de bekletilen formülasyonlarda önemli değişiklik ($p > 0.05$) gözlenmemiştir.

PNP-29 formülasyonunun 0. zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki zeta potansiyel değerleri **Çizelge 40**'da, karşılaştırmalı olarak **Şekil 79**'da yer almaktadır.

Çizelge 40. PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)
	ORT \pm SH
PNP-29-4C-T0	28.20 ± 1.48
PNP-29-4C-T30	24.93 ± 0.29
PNP-29-4C-T60	20.80 ± 0.25
PNP-29-4C-T90	21.30 ± 0.81
PNP-29-25C-T0	28.20 ± 1.48
PNP-29-25C-T30	25.30 ± 0.01
PNP-29-25C-T60	25.87 ± 0.70
PNP-29-25C-T90	19.30 ± 0.74
PNP-29-40C60BN-T0	28.20 ± 1.48
PNP-29-40C60BN-T30	23.70 ± 0.25
PNP-29-40C60BN-T60	21.37 ± 0.27
PNP-29-40C60BN-T90	17.93 ± 0.57
PNP-29-40C-T0	28.20 ± 1.48
PNP-29-40C-T30	26.57 ± 0.39
PNP-29-40C-T60	23.60 ± 0.30
PNP-29-40C-T90	17.03 ± 0.99

BN: Bağlı Nem, **ORT:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3. ay



Şekil 79. PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

PNP-29 formülasyonunun hazırlanmasının ardından yapılan analizlerde, 28.200 ± 1.480 mV olan başlangıç zeta potansiyeli, 3. ayın sonunda $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 21.300 ± 0.811 mV, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 19.300 ± 0.737 mV, $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN ortamında saklanan formülasyonda 17.933 ± 0.567 mV ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 17.033 ± 0.987 mV olarak belirlenmiştir (**Çizelge 40**).

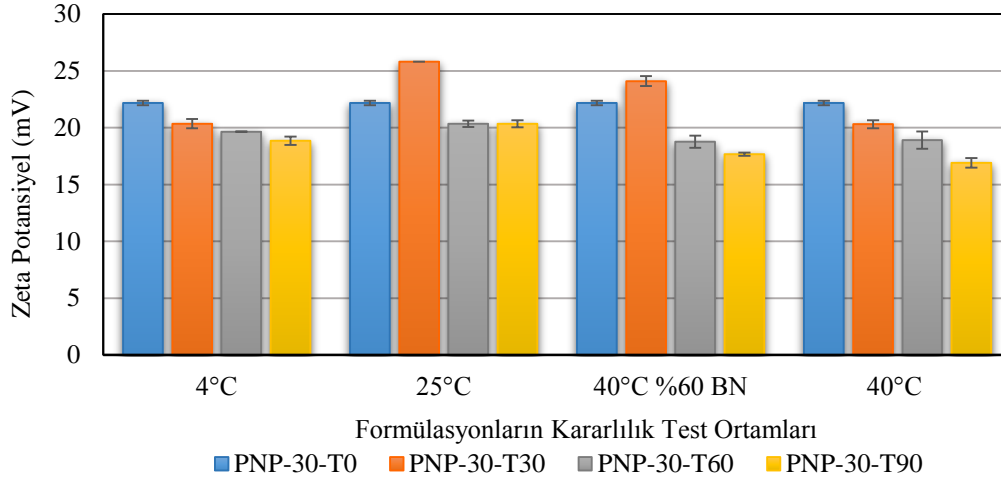
PNP-29 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de beklenen formülasyonlarda önemli fark olduğu ($p < 0.05$), $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN'de beklenen formülasyonlarda çok önemli fark ($p < 0.01$) olduğu görülmüştür.

PNP-30 formülasyonunun 0.zaman, 1., 2. ve 3. aylardaki zeta potansiyel değerleri **Çizelge 41**'de, karşılaştırmalı olarak **Şekil 80**'de yer almaktadır.

Çizelge 41. PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)
	ORT ± SH
PNP-30-4C-T0	22.17 ± 0.20
PNP-30-4C-T30	20.35 ± 0.41
PNP-30-4C-T60	19.65 ± 0.01
PNP-30-4C-T90	18.85 ± 0.37
PNP-30-25C-T0	22.17 ± 0.20
PNP-30-25C-T30	25.80 ± 0.06
PNP-30-25C-T60	20.33 ± 0.29
PNP-30-25C-T90	20.34 ± 0.31
PNP-30-40C60BN-T0	22.17 ± 0.20
PNP-30-40C60BN -T30	24.10 ± 0.44
PNP-30-40C60BN -T60	18.76 ± 0.52
PNP-30-40C60BN -T90	17.66 ± 0.15
PNP-30-40C-T0	22.17 ± 0.20
PNP-30-40C-T30	20.31 ± 0.35
PNP-30-40C-T60	18.90 ± 0.77
PNP-30-40C-T90	16.91 ± 0.42

BN: Bağlı Nem, **ORT:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 80. PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

PNP-30 formülasyonunun hazırlanmasının ardından yapılan analizlerde, 22.167 ± 0.203 mV olan başlangıç zeta potansiyel değeri, 3. ayın sonunda $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 18.853 ± 0.368 mV, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 20.337 ± 0.309 mV, $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN ortamında saklanan formülasyonda 17.660 ± 0.150 mV ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 16.907 ± 0.415 mV olarak belirlenmiştir (**Çizelge 41**).

PNP-30 formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark olduğu ($p < 0.01$), $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de bekletilen formülasyonlarda önemli fark ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür.

PNP-23 formülasyonu dışında tüm PNP formülasyonlarında saklama süresi boyunca zeta potansiyel değerlerinde görülen değişikliklerden dolayı, formülasyonların 3. ay sonunda kararlı yapıda kalmadığı söylenebilir.

pH ölçümü

PNP formülasyonlarının pH değerleri distile su ve PBS'de (pH 7.4) dağıtımlarının ardından ölçülmüştür. 3 aylık kararlılık çalışması süresince elde edilen veriler **Çizelge 42-46**'da sunulmuştur.

Çizelge 42. PNP-23 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri (n=3)

	pH (DS'de)	pH (PBS'de)
	ORT ± SH	ORT ± SH
PNP-23-4C-T0	5.56 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-23-4C-T30	5.50 ± 0.01	7.40 ± 0.01
PNP-23-4C-T60	5.49 ± 0.01	7.40 ± 0.01
PNP-23-4C-T90	5.50 ± 0.00	7.41 ± 0.01
PNP-23-25C-T0	5.56 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-23-25C-T30	5.55 ± 0.00	7.41 ± 0.01
PNP-23-25C-T60	5.56 ± 0.01	7.42 ± 0.00
PNP-23-25C-T90	4.94 ± 0.00	7.44 ± 0.00
PNP-23-40C60BN-T0	5.56 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-23-40C60BN -T30	5.52 ± 0.01	7.42 ± 0.00
PNP-23-40C60BN -T60	5.77 ± 0.00	7.42 ± 0.00
PNP-23-40C60BN -T90	5.80 ± 0.00	7.44 ± 0.00
PNP-23-40C-T0	5.56 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-23-40C-T30	5.52 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-23-40C-T60	5.73 ± 0.01	7.43 ± 0.01
PNP-23-40C-T90	4.82 ± 0.00	7.43 ± 0.00

BN: Bağlı Nem, **DS:** Distile Su, **PBS:** Fosfat Tamponu, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay

Çizelge 43. PNP-25 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri (n=3)

	pH (DS'de)	pH (PBS'de)
	ORT ± SH	ORT ± SH
PNP-25-4C-T0	5.55 ± 0.02	7.40 ± 0.02
PNP-25-4C-T30	5.55 ± 0.01	7.45 ± 0.01
PNP-25-4C-T60	5.80 ± 0.01	7.47 ± 0.01
PNP-25-4C-T90	5.20 ± 0.01	7.49 ± 0.01
PNP-25-25C-T0	5.55 ± 0.02	7.40 ± 0.02
PNP-25-25C-T30	5.54 ± 0.01	7.46 ± 0.01
PNP-25-25C-T60	5.78 ± 0.03	7.47 ± 0.01
PNP-25-25C-T90	4.80 ± 0.01	7.48 ± 0.00
PNP-25-40C60BN-T0	5.55 ± 0.02	7.40 ± 0.01
PNP-25-40C60BN -T30	5.56 ± 0.01	7.45 ± 0.00
PNP-25-40C60BN -T60	5.79 ± 0.01	7.47 ± 0.01
PNP-25-40C60BN -T90	5.92 ± 0.01	7.49 ± 0.00
PNP-25-40C-T0	5.55 ± 0.02	7.40 ± 0.01
PNP-25-40C-T30	5.57 ± 0.01	7.47 ± 0.00
PNP-25-40C-T60	5.82 ± 0.01	7.48 ± 0.01
PNP-25-40C-T90	4.90 ± 0.03	7.48 ± 0.00

BN: Bağlı Nem, **DS:** Distile Su, **PBS:** Fosfat Tamponu, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay

Çizelge 44. PNP-29 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri (n=3)

	pH (DS'de)	pH (PBS'de)
	ORT ± SH	ORT ± SH
PNP-29-4C-T0	4.43 ± 0.00	7.40 ± 0.01
PNP-29-4C-T30	4.42 ± 0.00	7.40 ± 0.00
PNP-29-4C-T60	4.41 ± 0.00	7.40 ± 0.00
PNP-29-4C-T90	4.01 ± 0.01	7.40 ± 0.00
PNP-29-25C-T0	4.43 ± 0.00	7.40 ± 0.01
PNP-29-25C-T30	4.43 ± 0.00	7.46 ± 0.00
PNP-29-25C-T60	4.38 ± 0.00	7.47 ± 0.01
PNP-29-25C-T90	3.85 ± 0.00	7.48 ± 0.00
PNP-29-40C60BN-T0	4.43 ± 0.00	7.40 ± 0.01
PNP-29-40C60BN -T30	4.43 ± 0.01	7.45 ± 0.00
PNP-29-40C60BN -T60	4.38 ± 0.00	7.47 ± 0.00
PNP-29-40C60BN -T90	3.84 ± 0.01	7.49 ± 0.00
PNP-29-40C-T0	4.43 ± 0.00	7.40 ± 0.01
PNP-29-40C-T30	4.40 ± 0.00	7.47 ± 0.00
PNP-29-40C-T60	4.30 ± 0.01	7.48 ± 0.01
PNP-29-40C-T90	3.95 ± 0.01	7.48 ± 0.00

BN: Bağlı Nem, **DS:** Distile Su, **PBS:** Fosfat Tamponu, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay

Çizelge 45. PNP-30 Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri (n=3)

	pH (DS'de)	pH (PBS'de)
	ORT ± SH	ORT ± SH
PNP-30-4C-T0	4.45 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-30-4C-T30	4.45 ± 0.01	7.41 ± 0.01
PNP-30-4C-T60	4.46 ± 0.00	7.42 ± 0.00
PNP-30-4C-T90	4.31 ± 0.01	7.43 ± 0.00
PNP-30-25C-T0	4.45 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-30-25C-T30	4.46 ± 0.01	7.43 ± 0.00
PNP-30-25C-T60	4.54 ± 0.01	7.45 ± 0.01
PNP-30-25C-T90	3.75 ± 0.01	7.47 ± 0.00
PNP-30-40C60BN-T0	4.45 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-30-40C60BN -T30	4.42 ± 0.01	7.42 ± 0.00
PNP-30-40C60BN -T60	4.44 ± 0.00	7.43 ± 0.01
PNP-30-40C60BN -T90	3.76 ± 0.00	7.44 ± 0.00
PNP-30-40C-T0	4.45 ± 0.00	7.41 ± 0.00
PNP-30-40C-T30	4.43 ± 0.00	7.43 ± 0.01
PNP-30-40C-T60	4.53 ± 0.01	7.45 ± 0.00
PNP-30-40C-T90	3.82 ± 0.00	7.42 ± 0.00

BN: Bağlı Nem, **DS:** Distile Su, **PBS:** Fosfat Tamponu, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay

PNP-23 formülasyonunun distile sudaki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark olduğu (p<0.001), 4°C ±1°C ve 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark (p<0.01) olduğu görülmüştür. PNP-23 formülasyonlarının PBS'deki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark olduğu (p<0.01), 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda önemli fark (p<0.05) olduğu görülmüş ancak 4°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda değişiklik (p>0.05) gözlenmemiştir.

PNP-25 formülasyonunun distile sudaki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 4°C ±1°C, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ve 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark olduğu (p<0.001), görülmüştür. PNP-23 formülasyonlarının PBS'deki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 4°C ±1°C, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ve 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark olduğu (p<0.01) olduğu görülmüştür.

PNP-29 formülasyonunun distile sudaki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 4°C ±1°C, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ve 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark olduğu (p<0.001) görülmüştür. PNP-23 formülasyonlarının PBS'deki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonda önemli fark olduğu (p<0.05) görülmüş ancak 4°C ±1°C, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda değişiklik (p>0.05) gözlenmemiştir.

PNP-30 formülasyonunun distile sudaki 0.zaman ve 3.ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ve 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark olduğu (p<0.001), 4°C ±1°C'de çok önemli fark olduğu (p<0.01) olduğu görülmüştür. PNP-30 formülasyonlarının PBS'deki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark olduğu (p<0.01), 4°C ±1°C'de bekletilen formülasyonda önemli fark olduğu (p<0.05) görülmüş ancak 40°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda değişiklik (p>0.05) gözlenmemiştir.

Distile suda ve PBS'de dağıtılan PNP formülasyonlarında, saklama süresi boyunca pH değerlerinde büyük değişiklikler olmadığı saptanmıştır. *In vivo* hayvan deneylerinde formülasyonların dağıtılmasında kullanılan PBS (pH 7.4) ortamında 3 aylık saklama süresince pH'nın fizyolojik pH aralığında olduğu görülmüştür.

Fiziksel görünüş

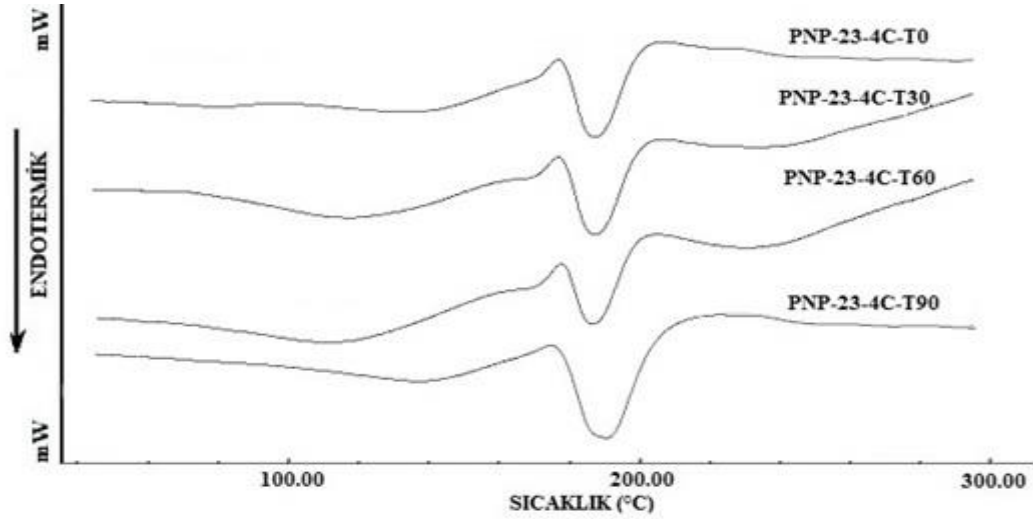
25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki fiziksel görünüşleri görsel olarak incelenmiştir. 25°C ±1°C ve 4°C ±1°C'lik ortamlarda bekletilen formülasyonlarda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen PNP-29 formülasyonunda kararlılık test süresi sonunda sararma görülmüştür. PNP-30 ve PNP-25 formülasyonlarında katı halde parçacıkların agrege yapılar oluşturduğu ancak distile suda kolayca dağıtılabilirdiği

saptanmıştır. PNP-23 formülasyonunun ise tüm kararlılık deney ortamlarında kararlı bir yapıda olduğu bulunmuş, formülasyonlarda fiziksel açıdan herhangi bir değişiklik görülmemiş ve hazırlandığı andan itibaren rengini ve tekdüze görünümünü koruduğu gözlenmiştir.

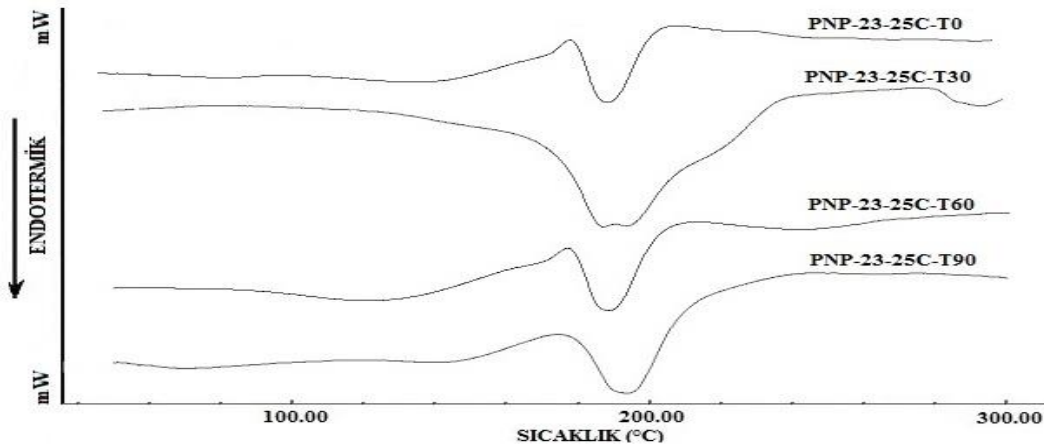
Termal analiz

Formülasyonlardaki kristal yapının incelenmesi ve termal davranışın aydınlatılması amacıyla termal analiz yapılmıştır. Endotermik ve ekzotermik piklerde meydana gelebilecek değişim formülasyon kararlılığı hakkında bilgi verebileceğinden bu pikler incelenmiştir.

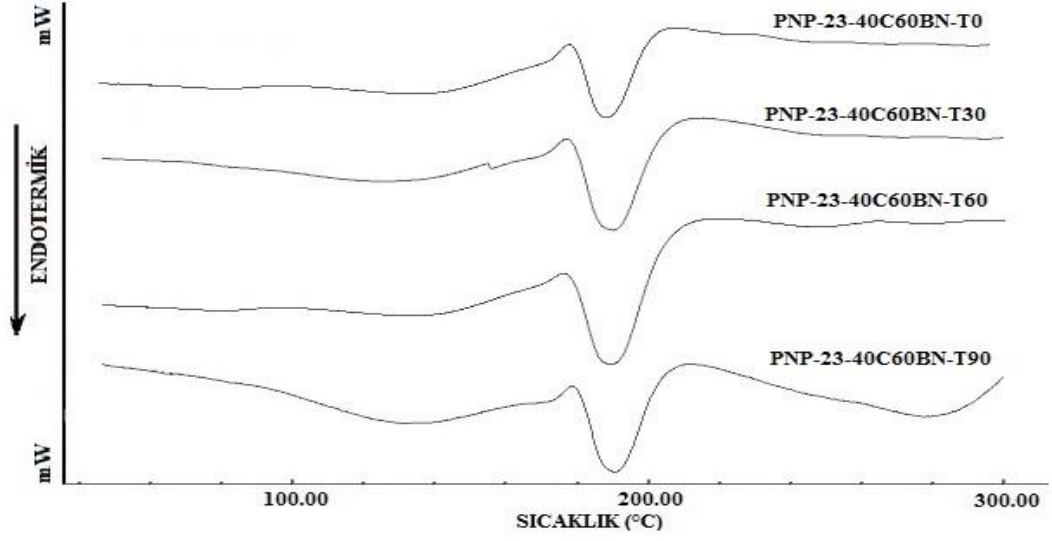
$25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-23 formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki termogramları ise karşılaştırmalı olarak Şekil 81-Şekil 84’de sunulmuştur.



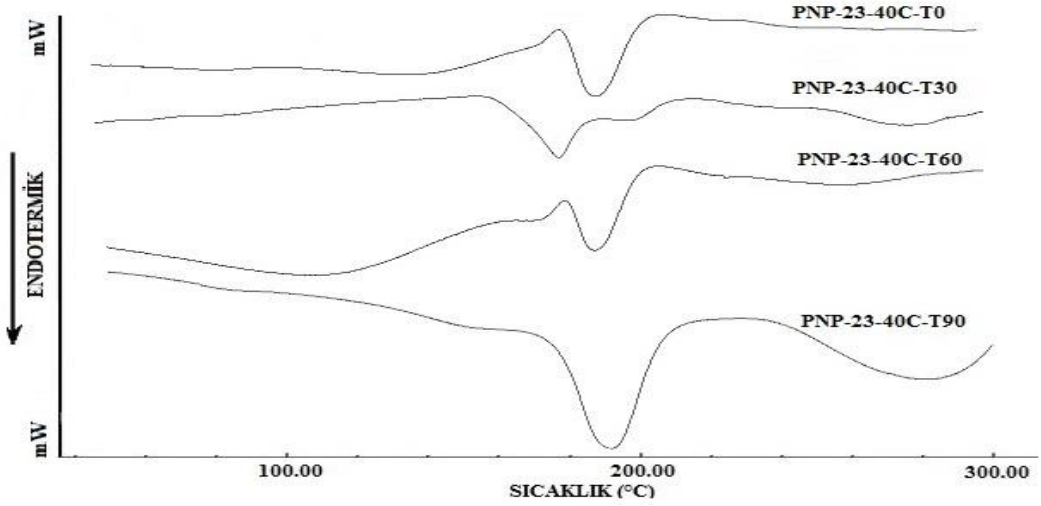
Şekil 81. PNP-23 Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ’deki Termogramları



Şekil 82. PNP-23 Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ’deki Termogramları



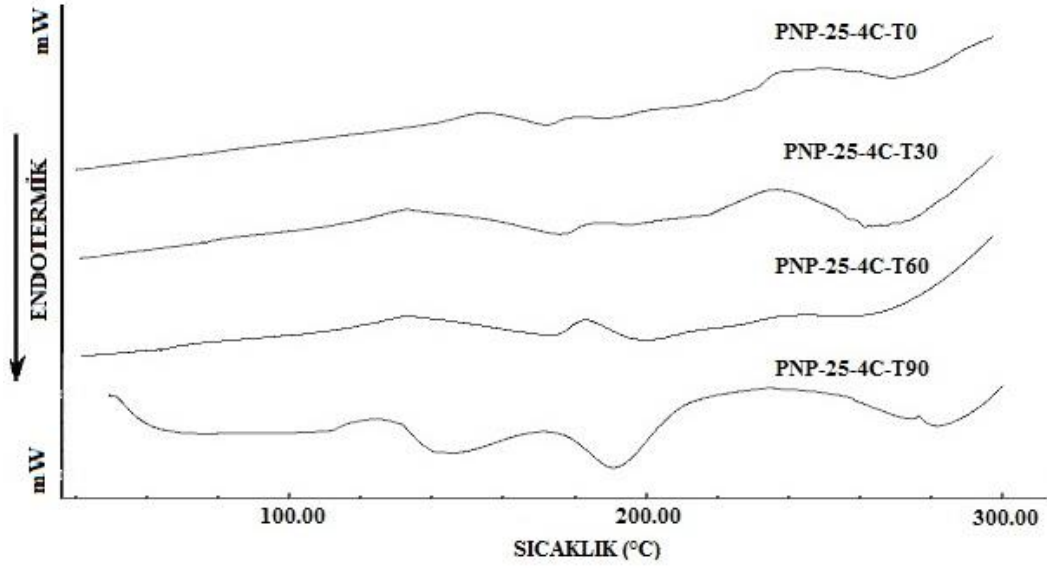
Şekil 83. PNP-23 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki Termogramları



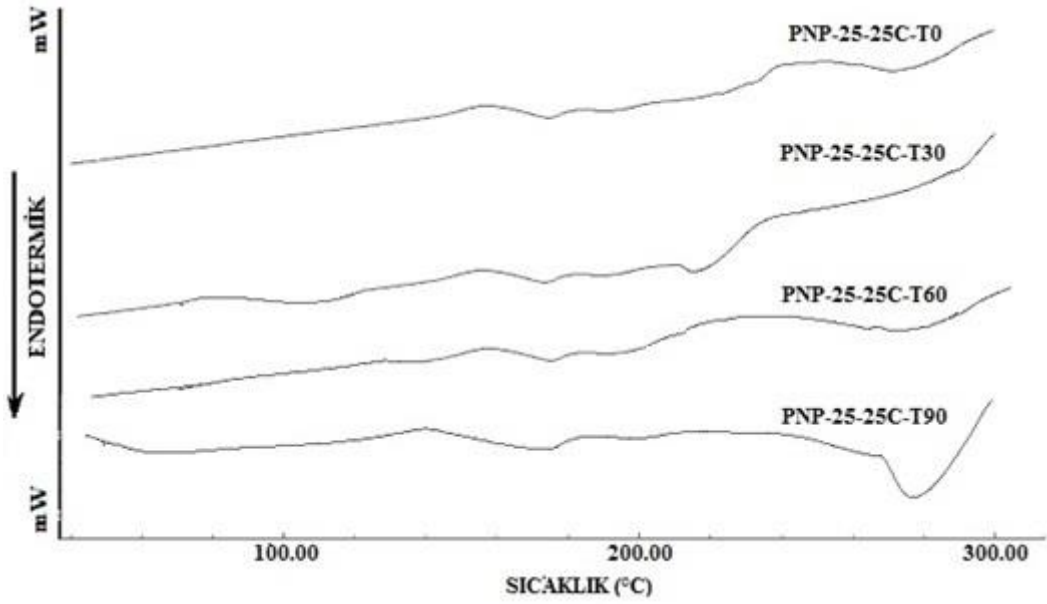
Şekil 84. PNP-23 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki Termogramları

4°C ±1°C ve 25°C ±1°C'de saklanan PNP-23 formülasyonunun DSC termogramlarında 3. ay sonunda değişim gözlenmezken (Şekil 81- Şekil 82), 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonların 3. ay termogramlarında 280°C'de geniş pik oluşumu saptanmıştır (Şekil 83 – Şekil 84). Termogramlardaki değişimin sıcaklık etkisi ile yapısı bozulan formülasyonlardan kaynaklandığı düşünülmüştür.

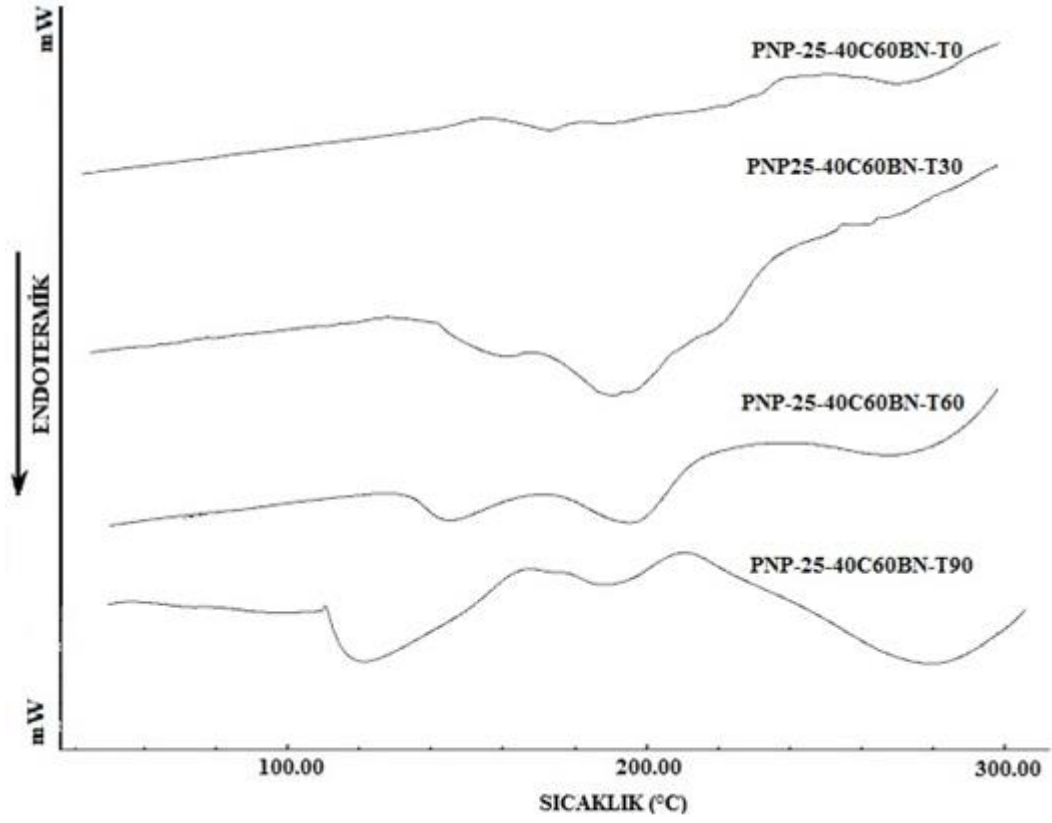
25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-25 formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki termogramları ise karşılaştırmalı olarak Şekil 85 - Şekil 88'de sunulmuştur.



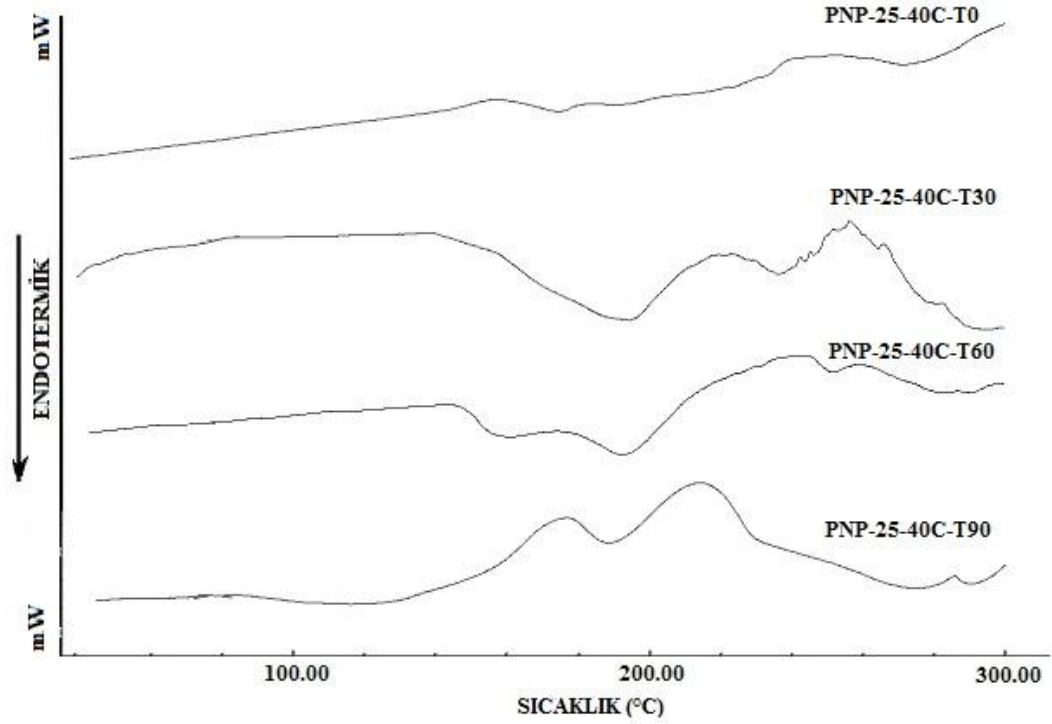
Şekil 85. PNP-25 Formülasyonunun $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları



Şekil 86. PNP-25 Formülasyonunun $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları



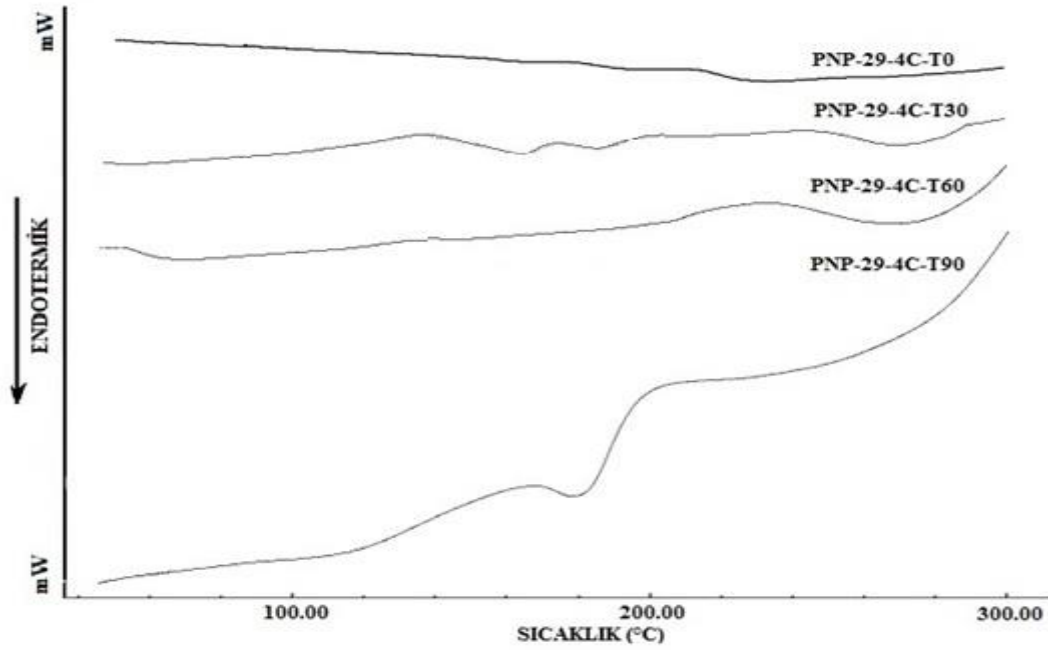
Şekil 87. PNP-25 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları



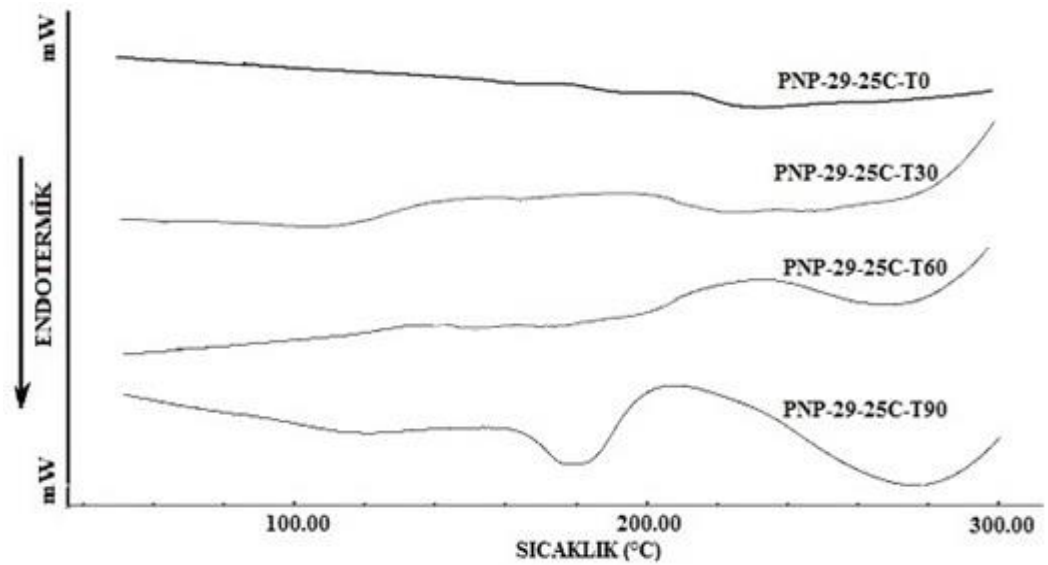
Şekil 88. PNP-25 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları

4°C ±1°C ve 25°C ±1°C'de saklanan PNP-25 formülasyonlarının 3. ay termal analizlerinde değişim gözlenirken (Şekil 85-Şekil 86), 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonların 1. ay termogramlarından itibaren 0. zamandan farklı pikler gözlenmiştir (Şekil 87-Şekil 88). Formülasyonların sıcaklıktan etkilenmiş olabileceği düşünölmüştür.

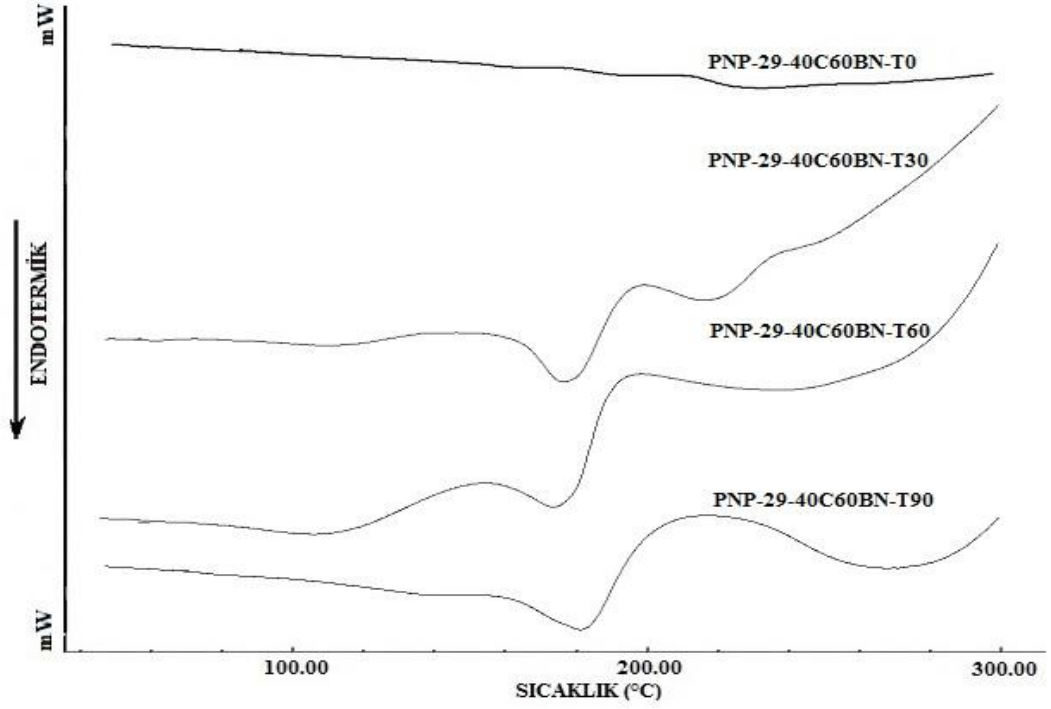
25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-29 formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki termogramları ise karşılaştırmalı olarak Şekil 89-Şekil 92'de sunulmuştur.



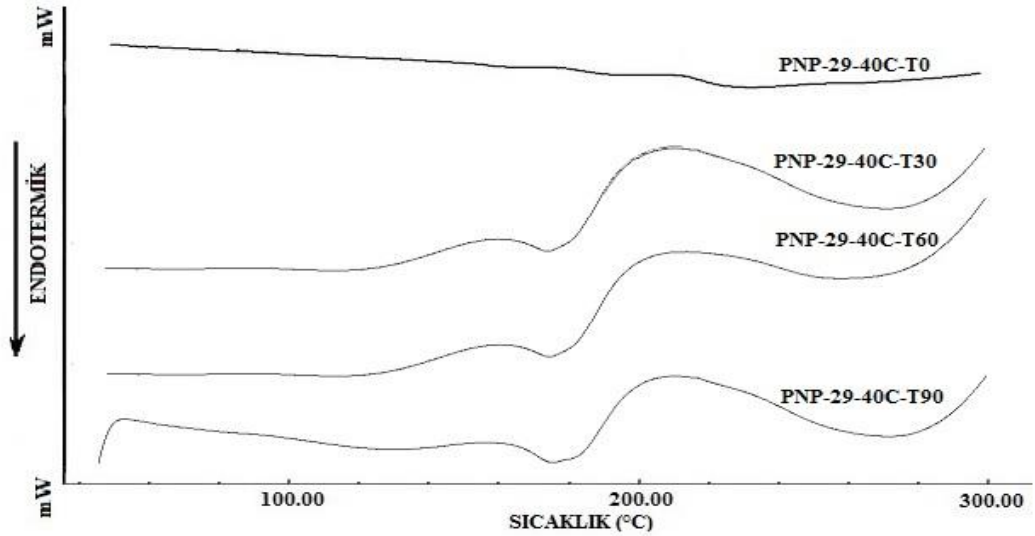
Şekil 89. PNP-29 Formülasyonunun 4°C ±1°C'deki Termogramları



Şekil 90. PNP-29 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki Termogramları



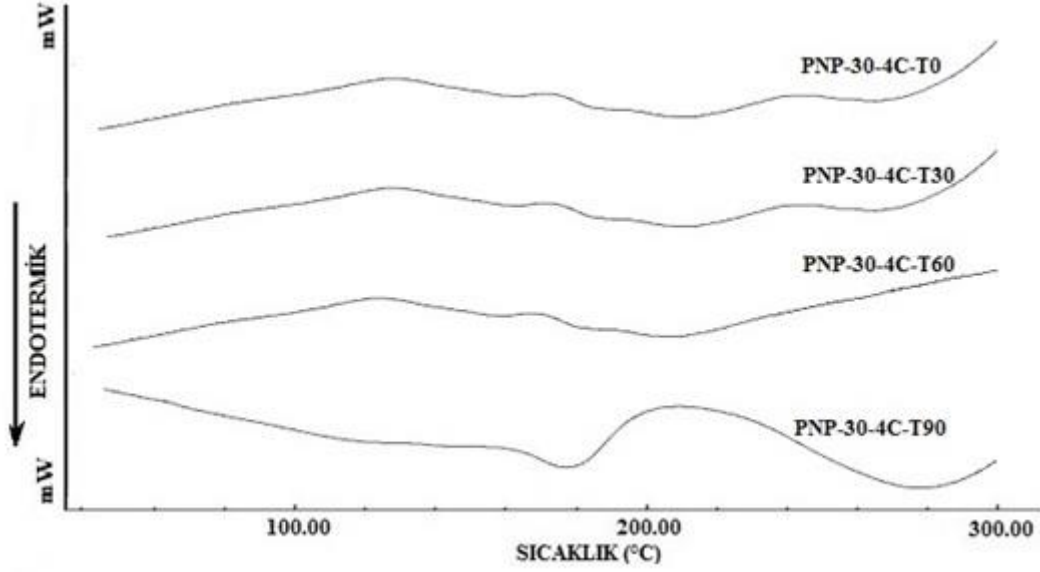
Şekil 91. PNP-29 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları



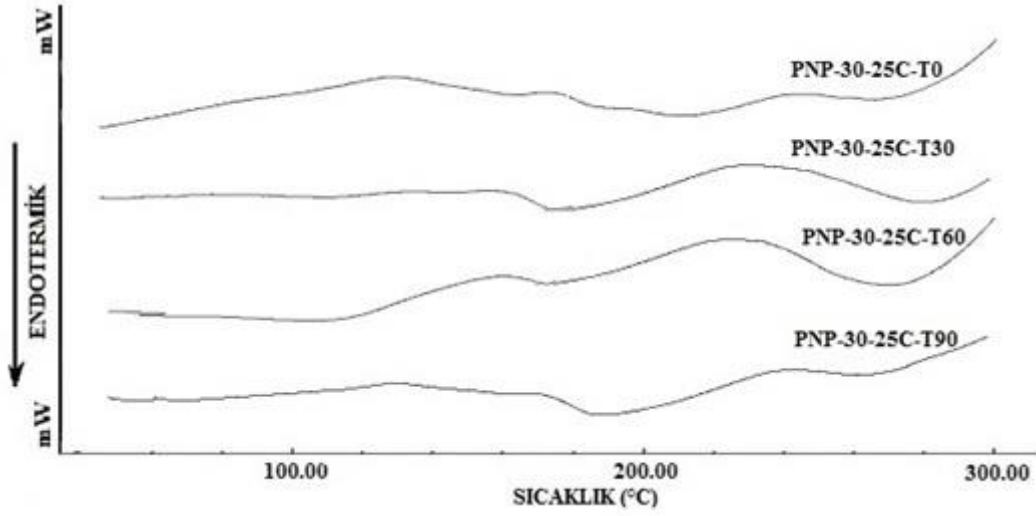
Şekil 92. PNP-29 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları

$4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan PNP-29 formülasyonu termogramlarında 3. ay analizine kadar önemli farklılıklar gözlenmemiştir (Şekil 89-Şekil 90). Ancak $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda küçük kaymalarla birlikte 181°C 'de endotermik pik ortaya çıkmıştır (Şekil 91-Şekil 92). Bu test koşullarında 3 aylık test sonucunda fiziksel görünüm açısından hafif sararma, zeta potansiyelde 10 mV'luk düşüş ve parçacık boyutunda da artış görülen PNP-29 formülasyonunun termal kararlılığının düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

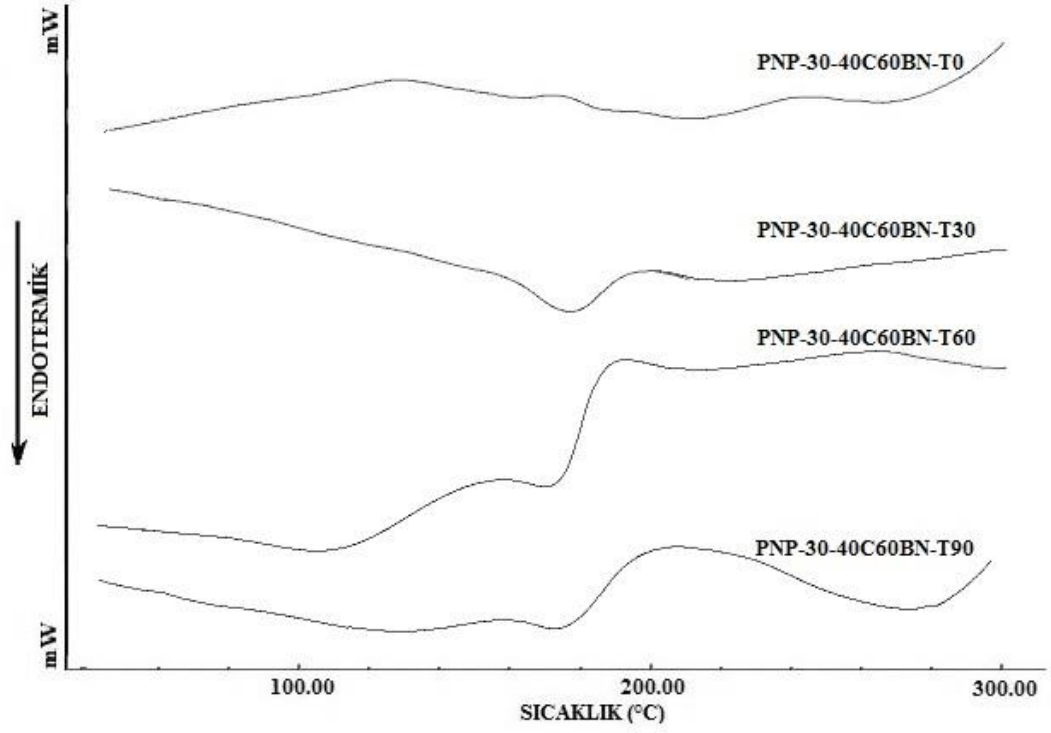
25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-30 formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki termogramları ise karşılaştırmalı olarak Şekil 93-Şekil 96'da sunulmuştur.



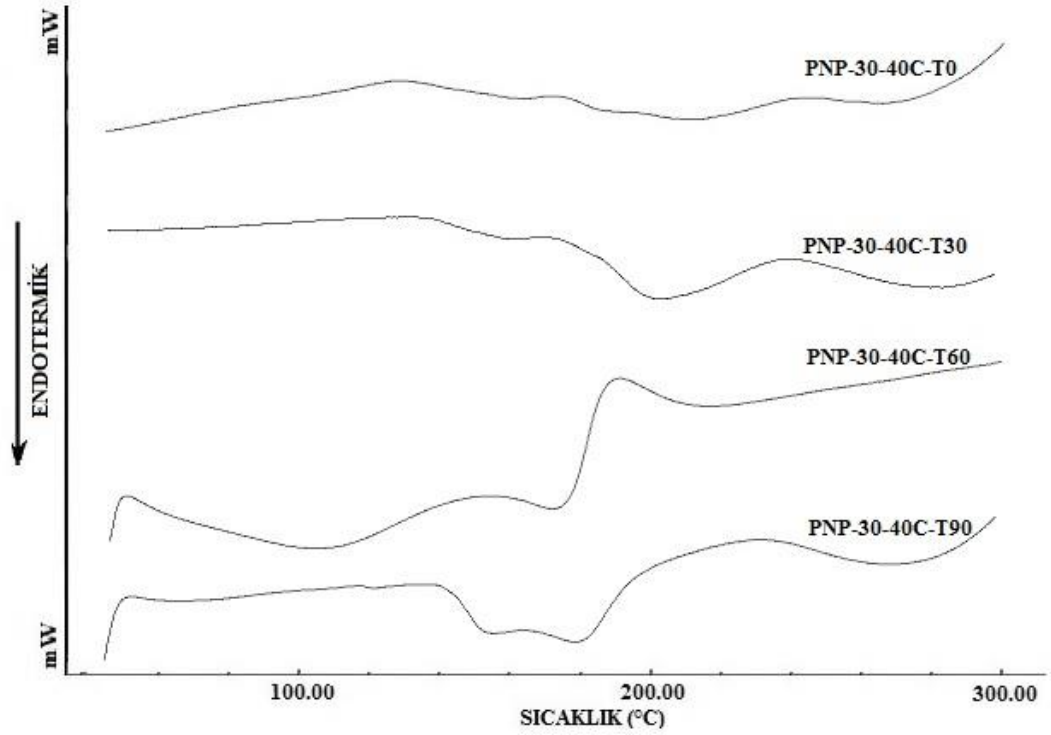
Şekil 93. PNP-30 Formülasyonunun 4°C ±1°C'deki Termogramları



Şekil 94. PNP-30 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki Termogramları



Şekil 95. PNP-30 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'deki Termogramları



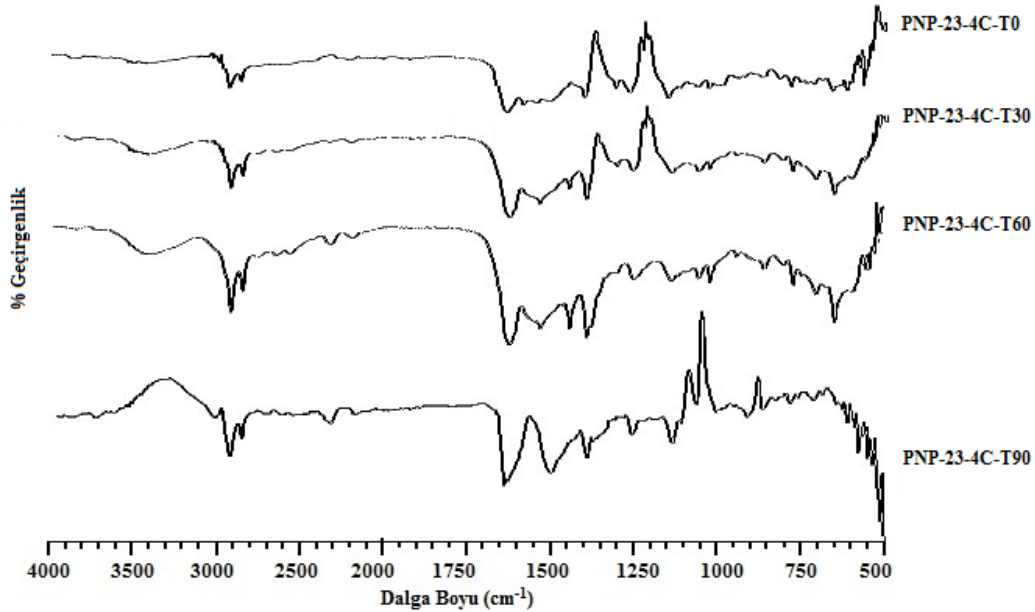
Şekil 96. PNP-30 Formülasyonunun $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki Termogramları

4°C ±1°C ve 25°C ±1°C’de bekletilen PNP-30 formülasyonunun termogramlarında 3 aylık kararlılık çalışması süresince önemli farklılık gözlenmemiştir (**Şekil 93-Şekil 94**). 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarındaki PNP-30 formülasyonunun termogramlarında ise değişim gözlenmiştir (**Şekil 95-Şekil 96**). 0. zaman termogramından farklı olarak yeni pik oluşumunun sıcaklık etkisi ile yapısı bozulan formülasyondan kaynakladığı düşünülmüştür. Elde edilen termogramlar doğrultusunda tüm PNP formülasyonlarının sıcaktan olumsuz etkilendiği düşünülmüştür.

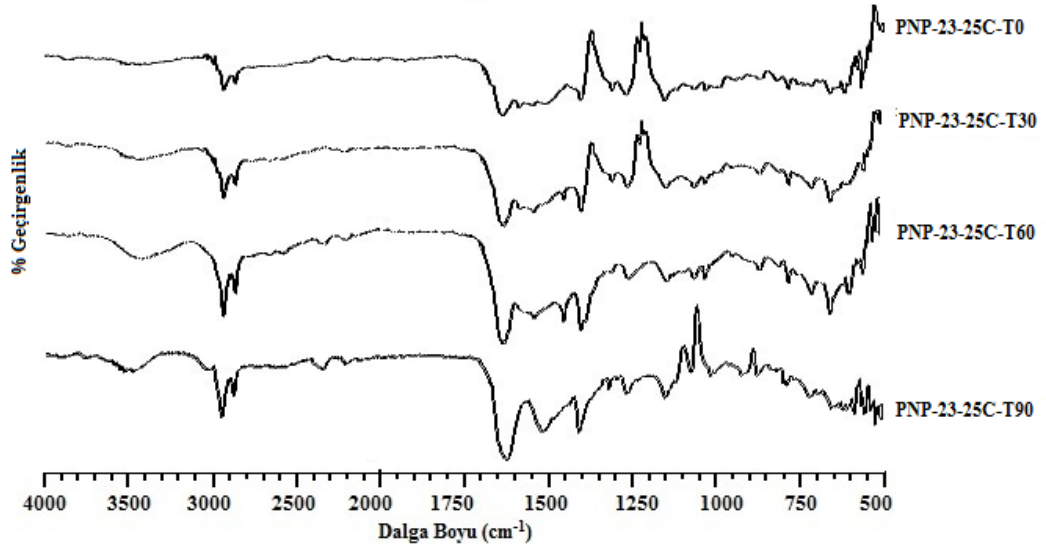
Infrared analizi

İlaç taşıyıcı sistem tasarımında en önemli kriterlerden birisi de kararlılıktır. Farmasötik formülasyonların kararsızlığı bazı durumlarda fiziksel görünüş, renk, koku, tat ve yüzey dokusu farklılıkları ile tayin edilebilmektedir. Oysa, formülasyonda görünüşte belli olmayan kimyasal değişiklikler meydana gelebilir ve bu değişiklikler ancak kimyasal analizler yardımı ile tespit edilebilmektedir. Formülasyonların kimyasal kararlılığının değerlendirilmesinde kullanılan tekniklerden birisi de infrared analizdir (Wilson ve ark., 2008).

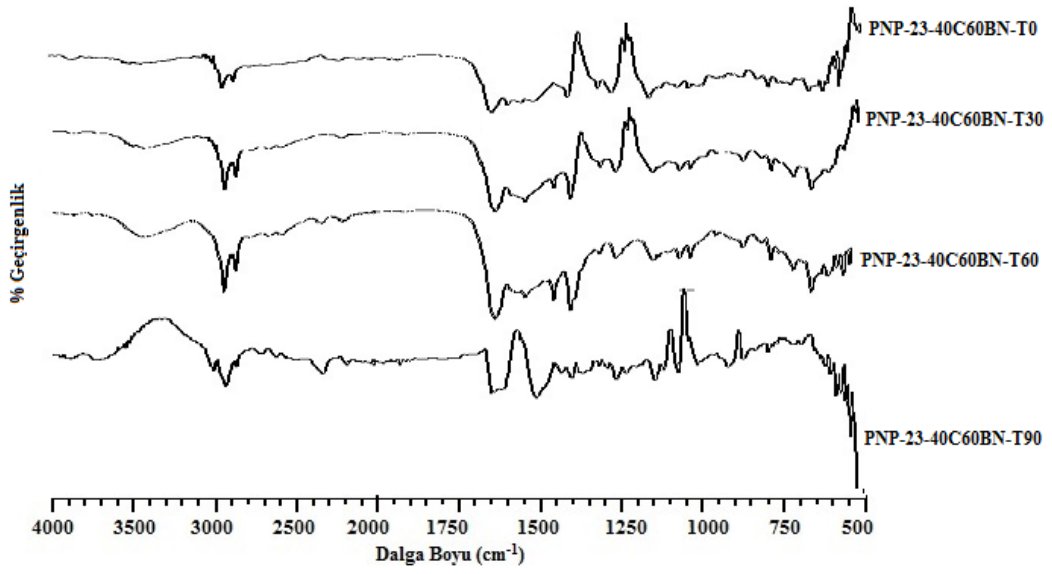
25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-23 formülasyonunun, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak **Şekil 97-Şekil 100**’de sunulmuştur.



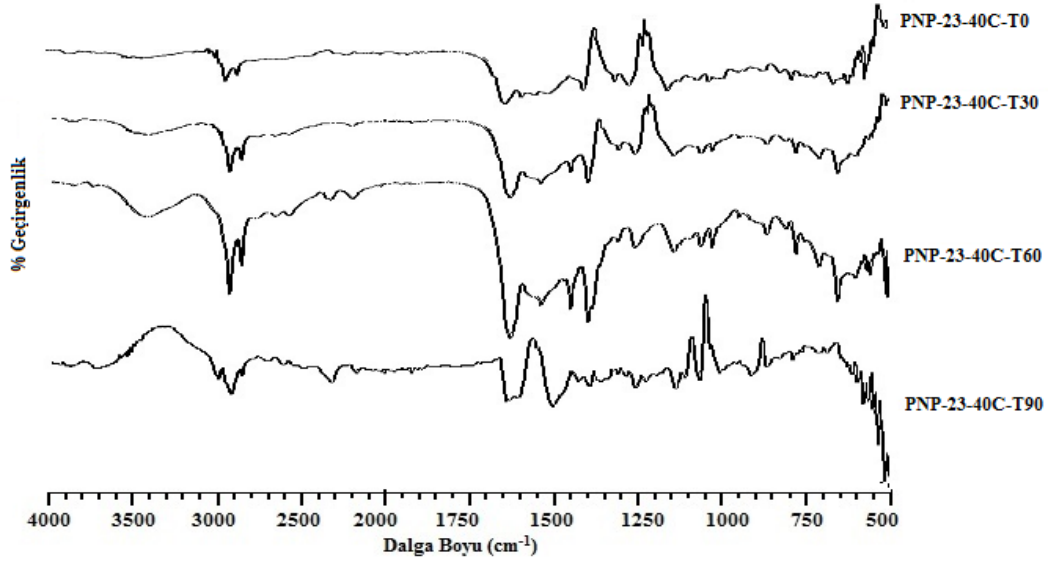
Şekil 97. PNP-23 Formülasyonunun 4°C ±1°C’deki FTIR Spektrumları



Şekil 98. PNP-23 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları



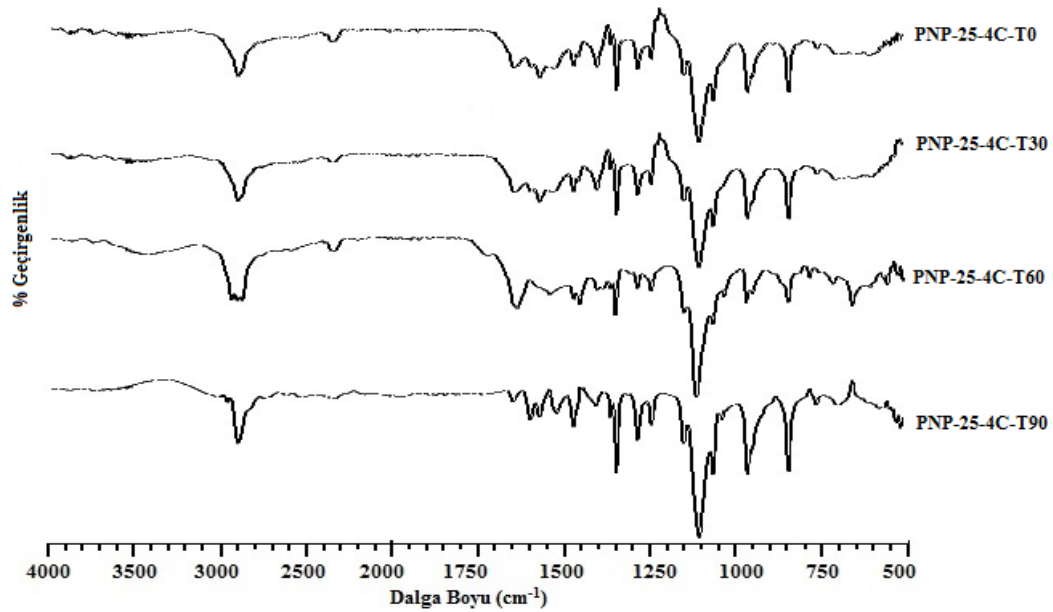
Şekil 99. PNP-23 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları



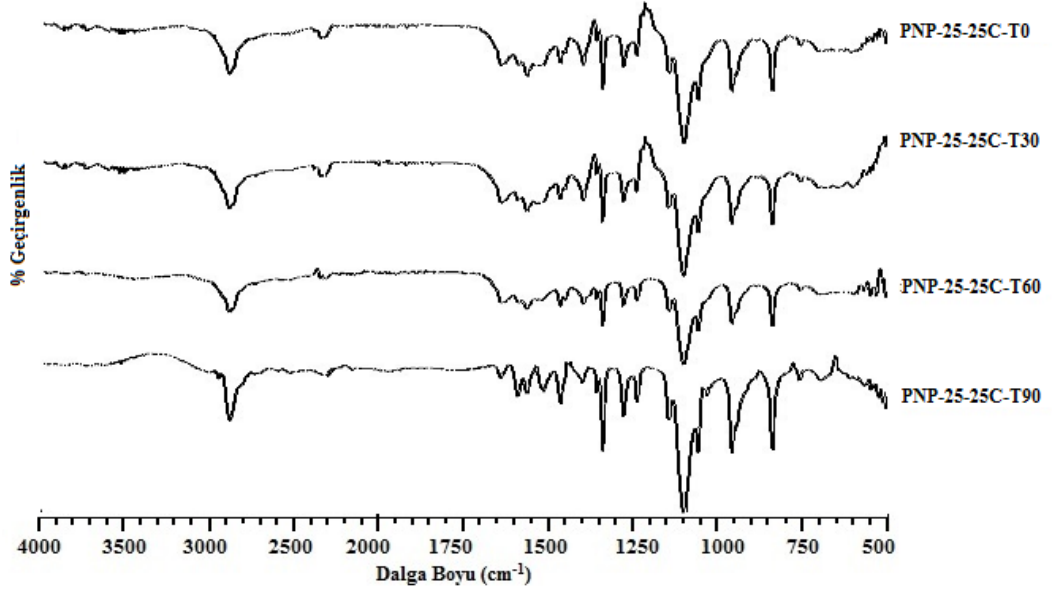
Şekil 100. PNP-23 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları

3 ay süresince 25°C ±1°C ve 4°C ±1°C'de bekletilen PNP-23 formülasyonunun karakteristik FTIR piklerinde kayma ya da bozunma gözlenmemiştir (Şekil 97-Şekil 98). 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamında bekletilen PNP-23 formülasyonunun amid grubu karbonil pikinde morfoloji bozukluğu ve şiddet azalması saptanmıştır (Şekil 99- Şekil 100).

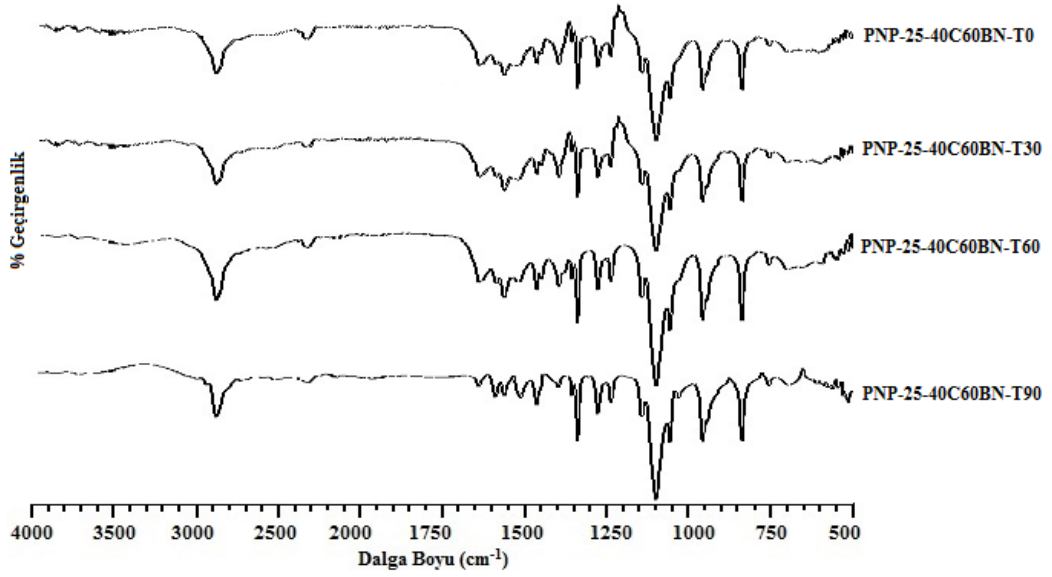
25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-25 formülasyonunun, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 101-Şekil 104'te sunulmuştur.



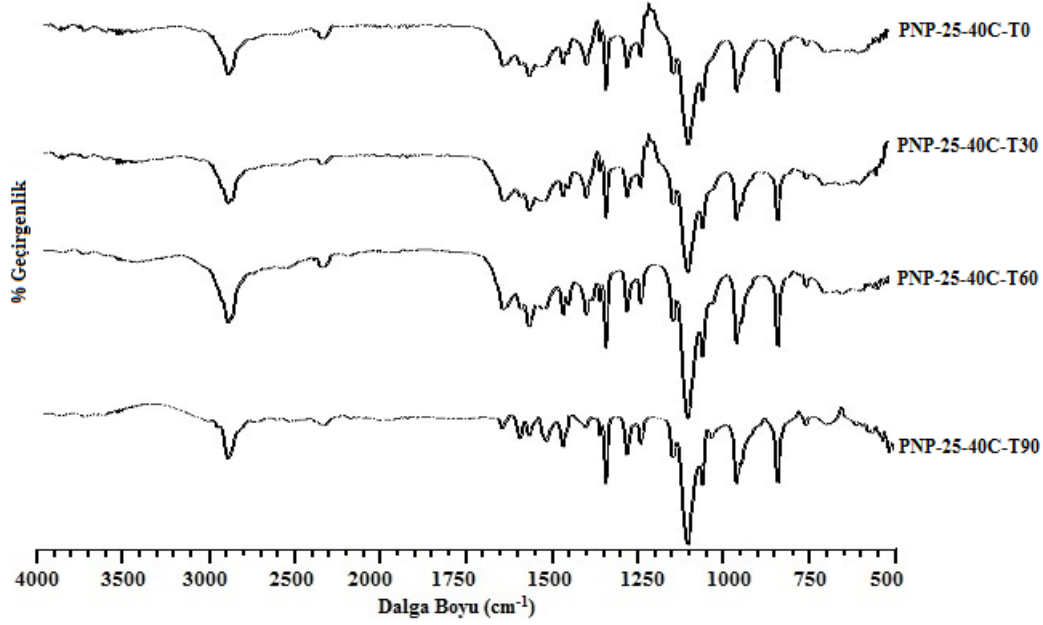
Şekil 101. PNP-25 Formülasyonunun 4°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları



Şekil 102. PNP-25 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları



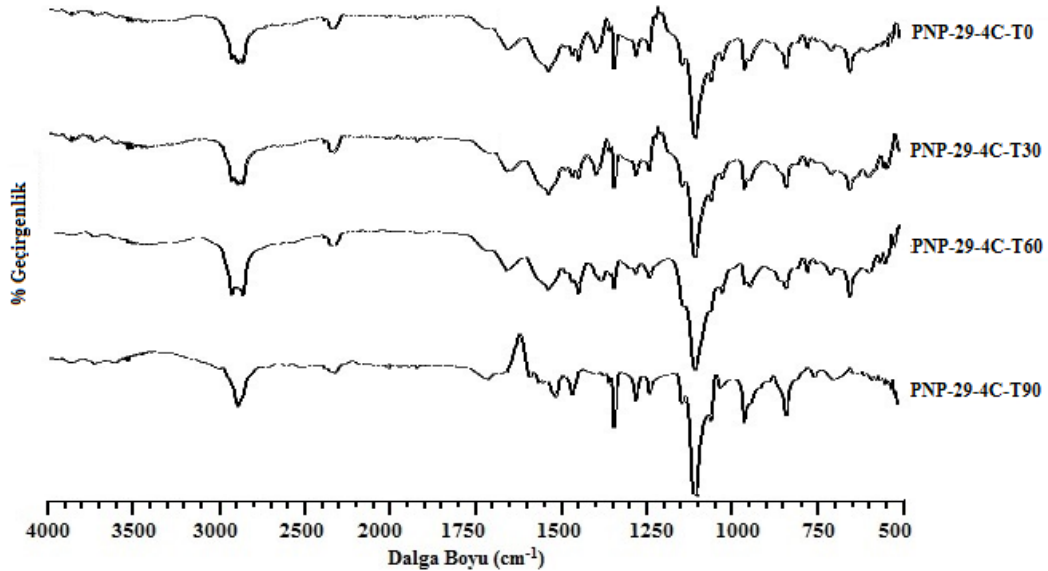
Şekil 103. PNP-25 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları



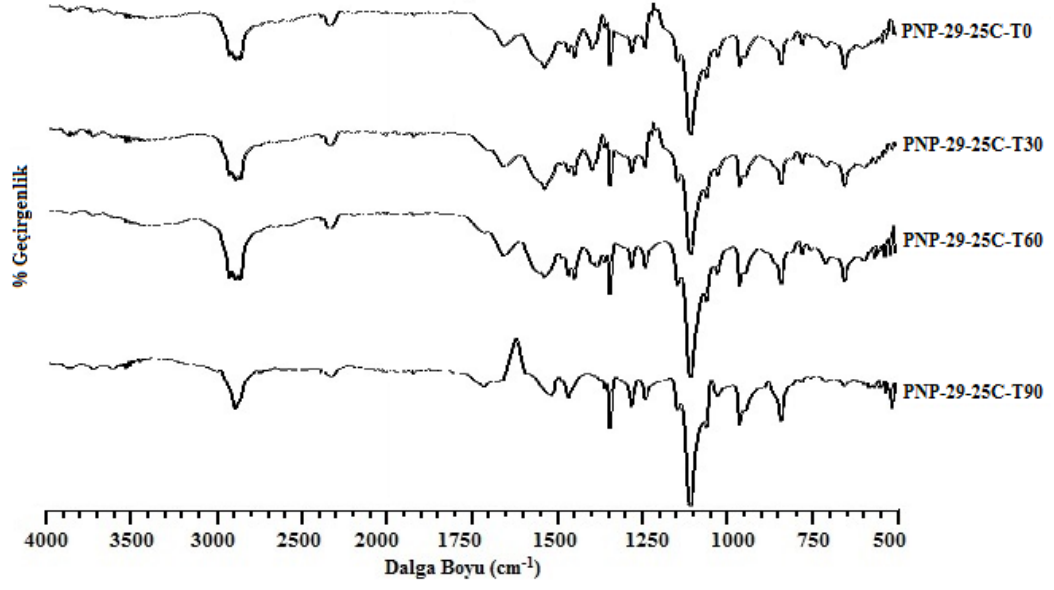
Şekil 104. PNP-25 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları

Kararlılık test ortamlarında bekletilen PNP-25 formülasyonuna ait FTIR piklerinde kayma gözlenmemiştir. Yalnızca 3. ay spektrumunda karbonil grubu pikinde şiddet azalması mevcuttur (Şekil 101-Şekil 104).

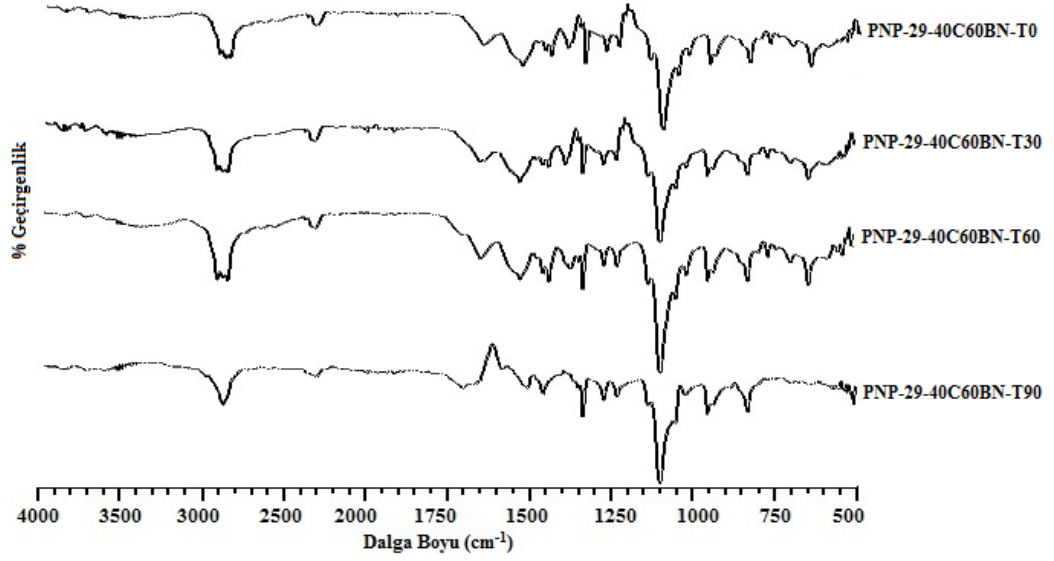
25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-29 formülasyonunun, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 105 – Şekil 108'de sunulmuştur.



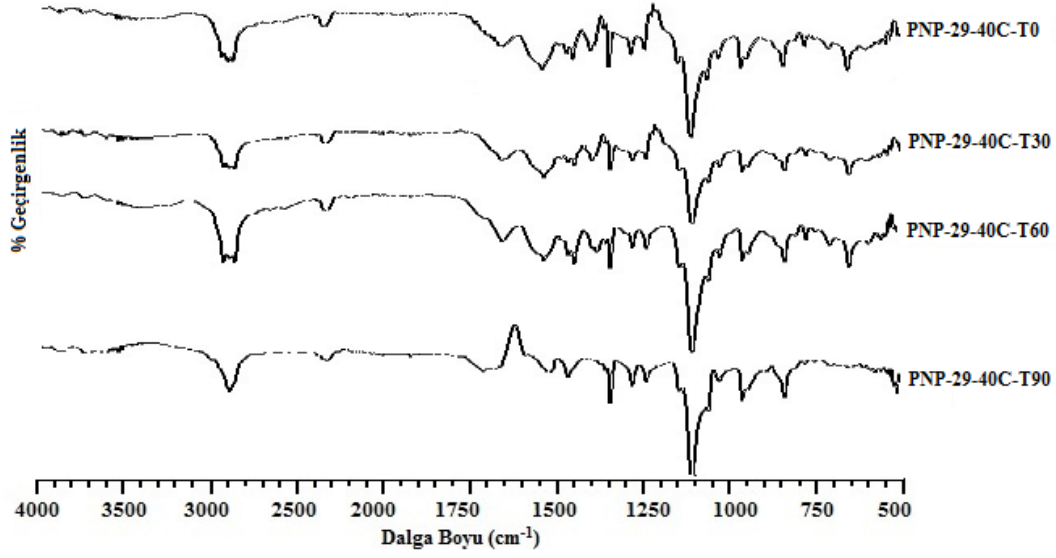
Şekil 105. PNP-29 Formülasyonunun 4°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları



Şekil 106. PNP-29 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları



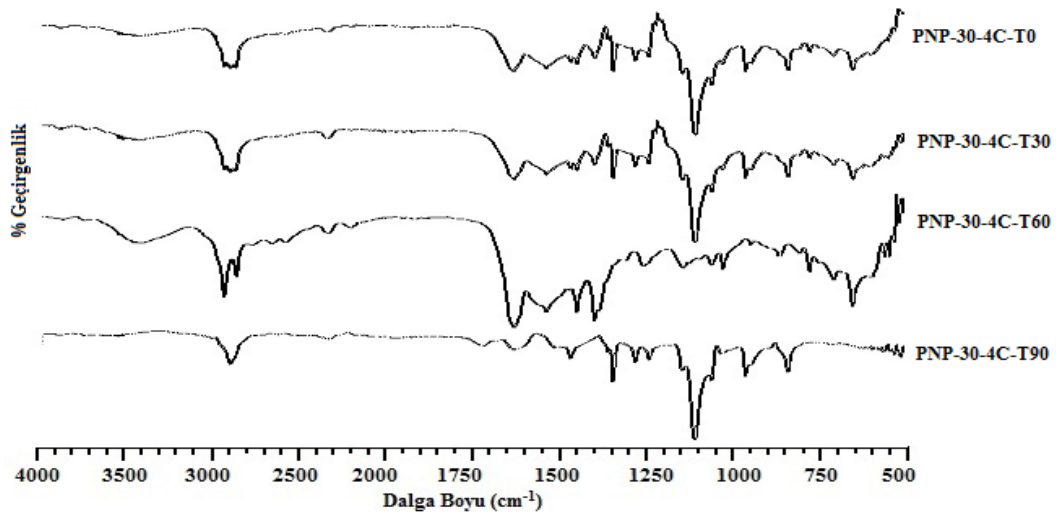
Şekil 107. PNP-29 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları



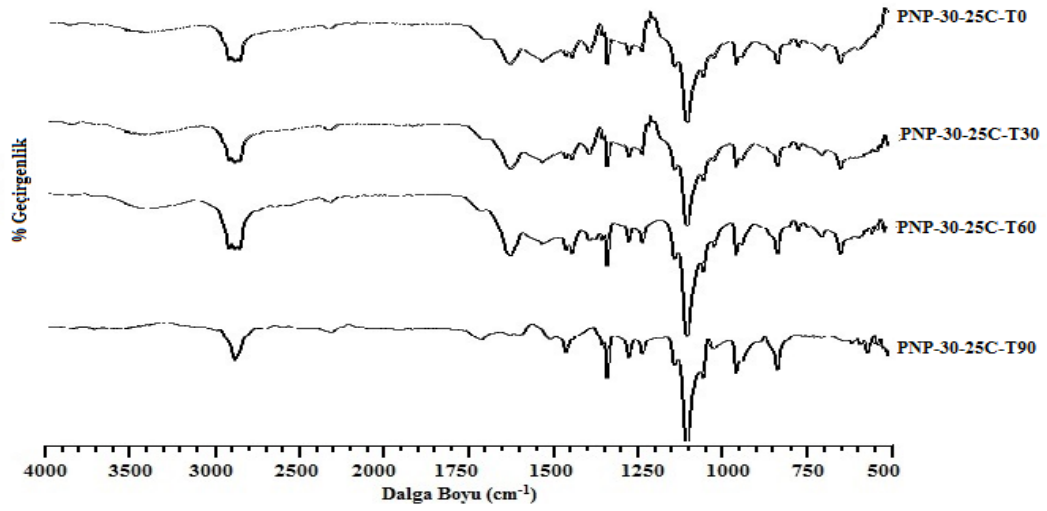
Şekil 108. PNP-29 Formülasyonunun 40°C ± 1°C'deki FTIR Spektrumları

PEG 1000 MA kullanılarak hazırlanan PNP-29 formülasyonunun 3 ay 4°C ± 1°C ve 25°C ± 1°C'de saklanması ile elde edilen FTIR spektrumlarında 0. zamanda gözlenen karakteristik piklerde herhangi bir değişim olmamıştır. 40°C ± 1°C ve 40°C ± 1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda 3. ayda amid C=O grubu pikinin kaybolduğu ve yerine 1712.79 cm⁻¹'de -COOH grubu karboniline ait pik oluştuğu görülmüştür. Bu durum formülasyonun sıcaklıkta kararlılık sorunu olduğu düşündürmüştür (Şekil 105-Şekil 108).

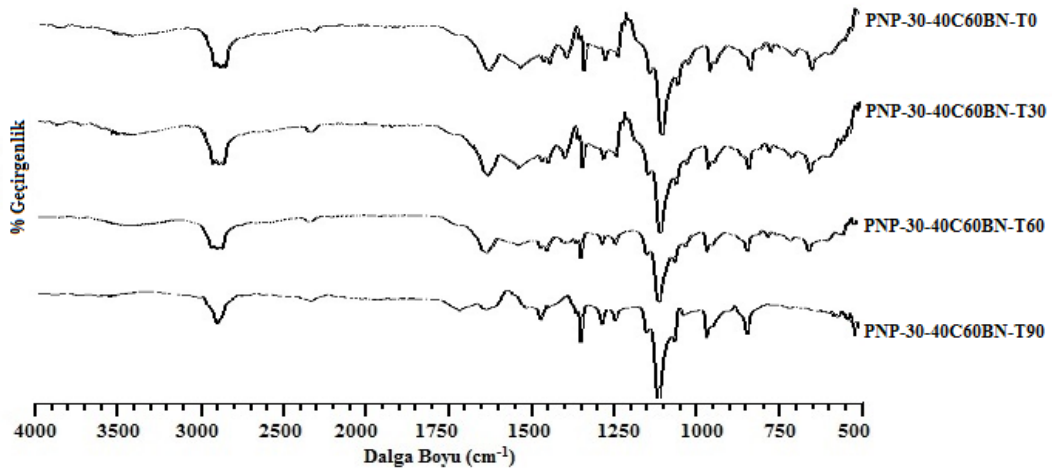
25°C ± 1°C, 4°C ± 1°C, 40°C ± 1°C ve 40°C ± 1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP-30 formülasyonunun, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 109-Şekil 112'da sunulmuştur.



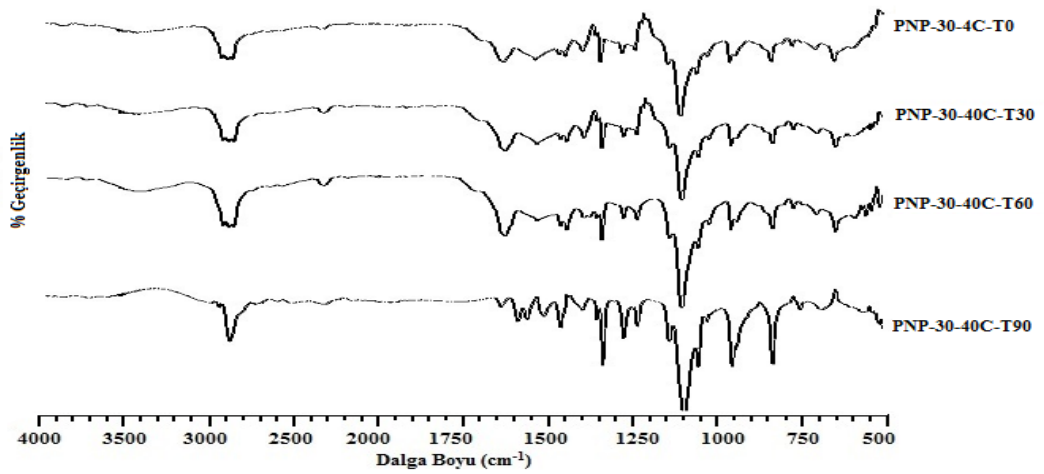
Şekil 109. PNP-30 Formülasyonunun 4°C ± 1°C'deki FTIR Spektrumları



Şekil 110. PNP-30 Formülasyonunun 25°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları



Şekil 111. PNP-30 Formülasyonunun 40°C ±1°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları



Şekil 112. PNP-30 Formülasyonunun 40°C ±1°C'deki FTIR Spektrumları

3 ay süresince 25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen PNP-30 formülasyonunun karakteristik FTIR piklerinde kayma ya da bozunma gözlenmemiştir (Şekil 108-112). 3. ay sonunda 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamında bekletilen PNP-30 formülasyonunun C=O grubu pik şiddetinde azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 111-112).

Etkin madde miktar tayini analizi

25°C ±1°C, 4°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN ortamlarında bekletilen PNP formülasyonlarının 0. zaman, 30., 60. ve 90. Günlerde elde edilen etkin madde miktarları Çizelge 46'da sunulmuştur.

Çizelge 46. Kararlılık Test Ortamlarında Saklanan PNP Formülasyonlarında Etkin Madde Miktarları (n=3)

	% Etkin Madde Miktarı ± SH			
	T0	T30	T60	T90
PNP-23-4C	16.622 ±0.012	16.893 ±0.541	16.012 ±0.705	15.886 ±1.832
PNP-23-25C	16.622 ±0.012	16.045 ±0.732	16.012 ±0.065	15.564 ±1.743
PNP-23-40C60BN	16.622 ±0.012	16.425 ±0.203	16.034 ±1.230	15.601 ±1.342
PNP-23-40C	16.622 ±0.012	16.073 ±0.828	15.834 ±1.103	15.554 ±2.457
PNP-25-4C	11.193 ±0.002	10.875 ±0.054	10.765 ±1.042	10.554 ±1.876
PNP-25-25C	11.193 ±0.002	11.076 ±0.128	10.950 ±0.762	10.572 ±1.003
PNP-25-40C60BN	11.193 ±0.002	11.065 ±0.306	10.640 ±0.593	9.371 ±2.815
PNP-25-40C	11.193 ±0.002	11.206 ±0.209	10.956 ±0.739	9.409 ±1.401
PNP-29-4C	15.074 ±0.007	14.534 ±0.549	14.630 ±0.721	14.023 ±1.004
PNP-29-25C	15.074 ±0.007	14.620 ±0.312	14.047 ±0.884	13.850 ±1.238
PNP-29-40C60BN	15.074 ±0.007	14.053 ±0.605	13.526 ±0.927	12.543 ±1.919
PNP-29-40C	15.074 ±0.007	14.270 ±0.407	13.481 ±1.264	12.008 ±1.076
PNP-30-4C	15.180 ±0.019	15.004 ±0.661	14.726 ±1.176	14.301±1.904
PNP-30-25C	15.180 ±0.019	14.886 ±0.286	15.328 ±1.509	14.206 ±1.553
PNP-30-40C60BN	15.180 ±0.019	14.874 ±0.773	14.701 ±1.690	14.003 ±1.744
PNP-30-40C	15.180 ±0.019	14.698 ±0.865	14.665 ±1.703	14.236 ±0.972

BN: Bağıl Nem, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. Zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay

PNP-23, PNP-25, PNP-29 ve PNP-30 formülasyonlarında 0. zaman ve 3. ayda bulunan etkin madde miktarının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve 4°C ±1°C, 25°C ±1°C, 40 °C ±1°C ve 40 °C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda önemli değişiklik (p>0.05) gözlenmemiştir.

Halosit nanotüp formülasyonu hazırlama çalışmaları

Halosit nanotüp formülasyonu ön formülasyon çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında GABA içeren nanotüp hazırlanması işleminde vakum uygulanarak birçok formülasyon denemesi gerçekleştirilmiş, bu formülasyonlar arasında hazırlama prosesinde köpürme, yapışma, vb. parametreler ile verim, parçacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri esas alındığında en iyi sonuçlar 1:1 molar oranda HNT:GABA içeren 100 mmHg basınç altında hazırlanan nanotüpler ile elde edilmiştir.

Sıcaklık uygulanarak hazırlanan formülasyonlarda 1 ve 2 saatlik formülasyon süreleri denenmiş, yüklenme etkinliği açısından farklılık gözlenmediğinden ve GABA'nın yüksek sıcaklıkta bozunma riski olduğundan 1 saatlik hazırlama süresi seçilmiştir. Gerçekleştirilen ön formülasyon denemeleri sonucunda 1:1 ve 1:2 oranlarında HNT:GABA oranlarının kullanılmasına karar verilmiştir.

Halosit nanotüp formülasyonu çalışmaları

HNT'nin ön formülasyonlarında belirlenen bileşenlere sahip formülasyonlar, Sayfa 52'de "*Halosit nanotüp formülasyonu çalışmaları*" bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Formülasyonların bileşenleri ve hazırlama şekilleri **Çizelge 47**'de sunulmuştur. Hazırlanan HNT formülasyonlarının karakterizasyon ve *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara bağlı olarak kararlılık ve hayvan deneyleri çalışmaları için formülasyonlar seçilmiştir.

Çizelge 47. GABA içeren Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Kod ve Bileşenleri

	HNT:GABA	Hazırlama Şekli
HNT-GABA VAC	1:1	Vakum (100 mmHg)
HNT-GABA ISI 1	1:1	Isı + Yıkama + Santrifüj
HNT-GABA ISI 2	1:2	Isı + Yıkama + Santrifüj
HNT-GABA ISI 3	1:1	Isı + Dondurarak Kurutma

Rakamsal değerler mol'ü ifade etmektedir.

Zeta potansiyel değeri negatif olan nanotüp formülasyonlarına pozitif yük kazandırabilmek için katyonik lipid olan oktadesilamin kullanılmıştır. HNT-GABA ISI 1 formülasyonu diklorometan içerisinde çözündürülmüş oktadesilamin ile muamele edilmiş ve vakum altında diklorometan uçurulmuştur. Pozitif zeta potansiyel değerine erişilmesine karşın, mikron boyutunda parçacık büyüklüğü değerleri elde edilmiştir. Aynı zamanda formülasyona oktadesilamin katılması, katı kütlelerin artmasına ve formülasyondaki etkin madde oranının azalmasına neden olmuştur. Parçacık boyutunun mikron düzeyinde olması ve etkin madde içeriğinin düşük olması nedeni ile oktadesilamin içeren HNT formülasyonları tercih edilmemiştir.

Formülasyonların sterilizasyonu

HNT formülasyonları 15 dk süresince UV ışınları ile sterilize edilmiştir.

Halosit nanotüp formülasyonlarının özelliklerine ait çalışmalar

Parçacık büyüklüğü ve dağılımı analizi

HNT formülasyonlarının parçacık büyüklüğü değerleri göz önüne alındığında en yüksek parçacık büyüklüğü 807.7 ±10.721 nm ile HNT-GABA ISI 3 formülasyonunda, en düşük parçacık büyüklüğü ise 444.2 ±2.356 nm ile HNT-GABA ISI 1 formülasyonunda gözlenmiştir (**Çizelge 48**). Vakum kullanılarak hazırlanan formülasyonun parçacık büyüklüğünün ise 554.2 nm ±25.179 nm olduğu bulunmuştur.

Çizelge 48. Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Parçacık Boyut ve Dağılımı (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
HNT-GABA VAC	554.2 ± 25.179	0.670 ± 0.019
HNT-GABA ISI 1	444.2 ± 2.356	0.265 ± 0.095
HNT-GABA ISI 2	530.7 ± 5.062	0.445 ± 0.072
HNT-GABA ISI 3	807.7 ± 10.721	0.677 ± 0.085
HNT (plasebo)	446.80 ± 23.710	0.417 ± 0.063

ORT: Ortalama, **PDI:** Polidisperslik indisi, **SH:** Standart hata

Parçacık büyüklüğü dağılımını değerlendirmek için 0-1 arasında değerler alan polidisperslik indisi verileri de kullanılmıştır. Sıfıra yakın değerlerin tekdüzelik gösterdiği polidisperslik indisi verileri değerlendirildiğinde, en iyi sonuçların HNT-GABA ISI 1 formülasyonu ile edildiği **Çizelge 48**'de görülmektedir. HNT-GABA VAC ve HNT-GABA ISI 3 formülasyonlarının ölçümlerinde sırasıyla 0.670 ±0.019 ve 0.677 ±0.085 olarak elde edilen PDI değerleri diğer formülasyonlara göre oldukça yüksektir.

Zeta potansiyel analizi

HNT formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri **Çizelge 49**'da sunulmuştur.

Çizelge 49. Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

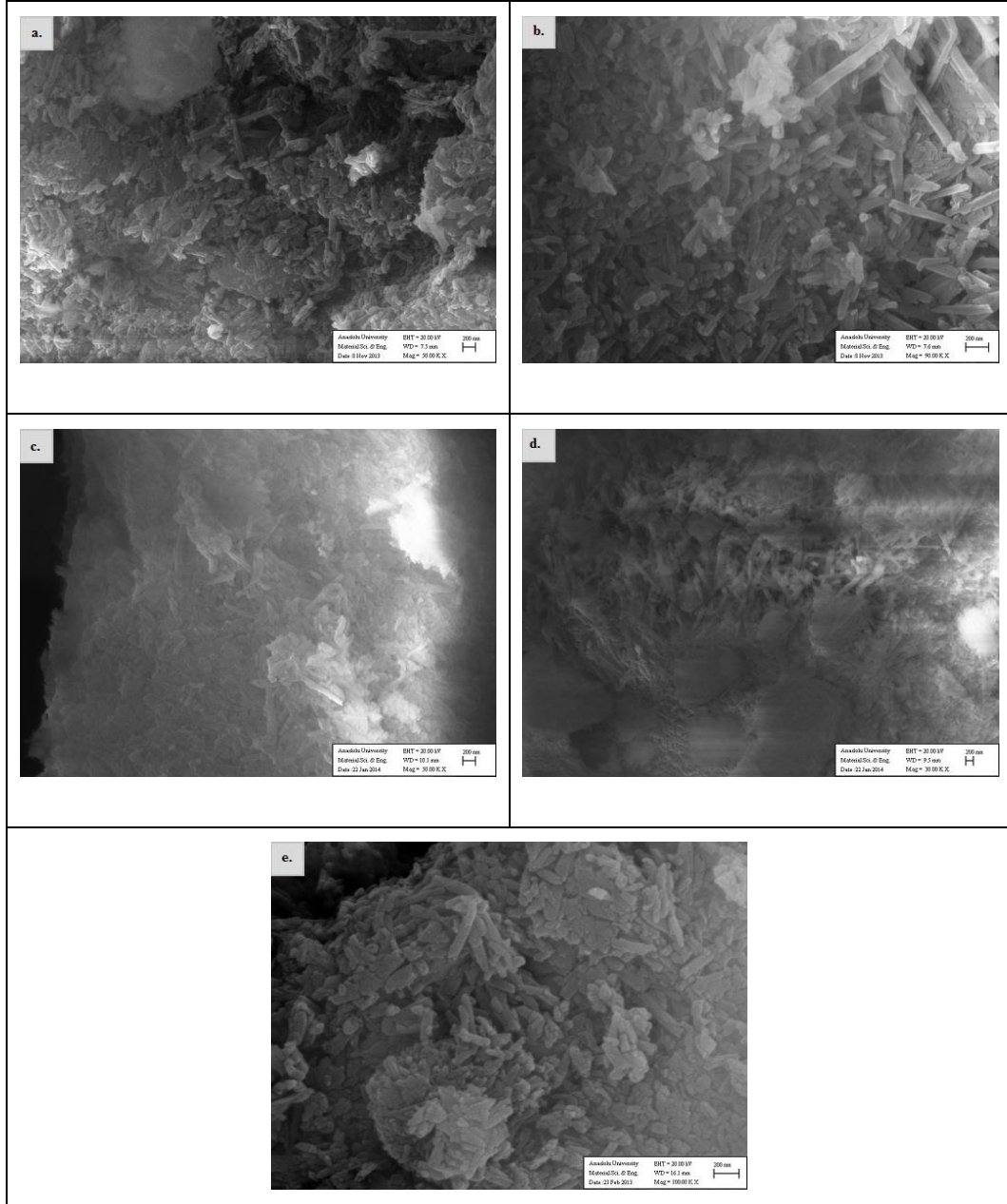
	Zeta Potansiyel (mV)
	ORT± SH
HNT-GABA VAC	-32.72 ± 0.58
HNT-GABA ISI 1	-28.77 ± 0.38
HNT-GABA ISI 2	-25.30 ± 2.78
HNT-GABA ISI 3	-30.17 ± 2.44
HNT (plasebo)	-22.31 ± 0.09

ORT:Ortalama, **SH:** Standart hata

GABA içeren HNT formülasyonlarının zeta potansiyel değerinin -25 mV ile -32 mV aralığında dağılım gösterdiği bulunmuştur. En düşük zeta potansiyel -32.171 ±0.580 mV ile HNT-GABA VAC formülasyonunda, en yüksek zeta potansiyel ise -25.302 ±2.784 mV ile HNT-GABA ISI 2 formülasyonunda elde edilmiştir (**Çizelge 49**). Plasebo HNT formülasyonunun -22.312 ±0.088 mV olarak bulunan zeta potansiyel değeri literatür ile paralellik göstermektedir (Guo ve ark., 2012). Plasebo formülasyonunun zeta potansiyel değerinin GABA içeren formülasyonlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Parçacık şekli ve yüzey özellikleri

GABA içeren HNT'lerin ve plasebo HNT'lerin SEM görüntüleri Şekil 113'te sunulmuştur.

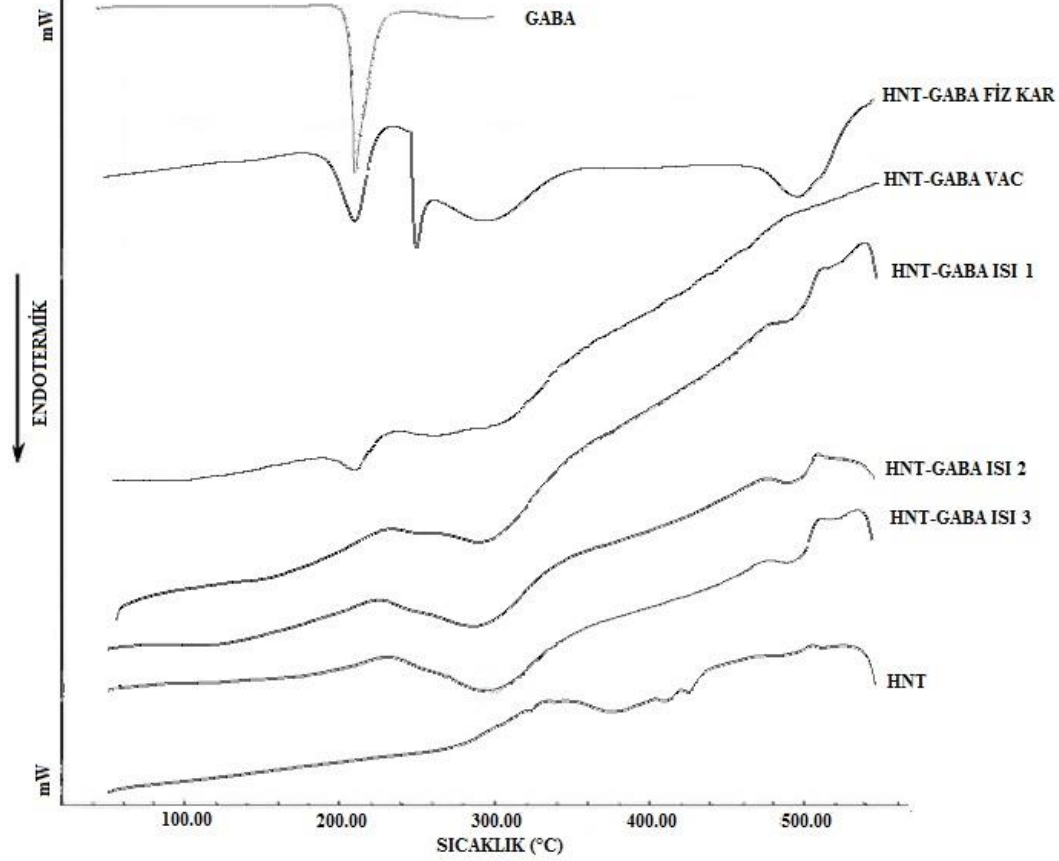


Şekil 113. Halosit Nanotüp Formülasyonlarının SEM Görüntüleri (a: HNT-GABA VAC, b: HNT-GABA ISI 1, c: HNT-GABA ISI 2, d: HNT-GABA ISI 3, e: HNT; a ve d x50.000, b x90000, d x30000, e x100000)

Tübül yapısında parçacık şekilleri ve PCS verileri ile uygunluk gösteren parçacık büyüklüğü değerleri elde edilmiştir (Şekil 113). SEM analizi sonucunda nanotüplerin şekilleri ve büyüklükleri hakkında açıklayıcı ve literatür ile uygunluk gösteren bilgilere ulaşılmıştır (Levis ve Deasy, 2002; Viseras ve ark., 2009; Ghebaour ve ark., 2012; Xi ve ark., 2013).

Termal analiz

HNT formülasyonlarına ilişkin termal analiz verileri **Şekil 114**'te sunulmuştur.



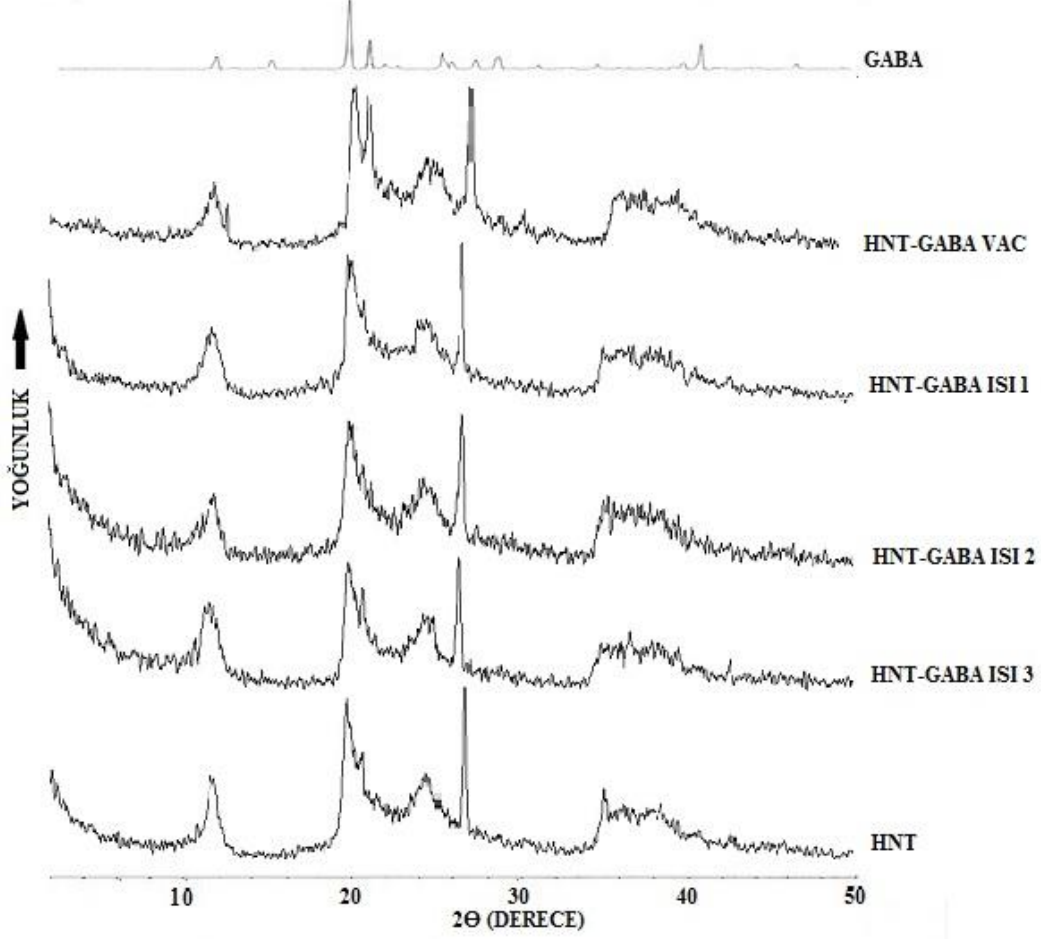
Şekil 114. Hazırlanan Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Termogramları

Termal analizlerde, ekzotermik veya endotermik bir pikin kaybolması veya yeni bir pikin ortaya çıkması, etkileşme ve/veya geçimsizlik olarak değerlendirilmektedir (Bulut ve Dinçol, 1991). 202.78°C gözlenen GABA'ya ait endotermik erime pikinin, HNT ve GABA fiziksel karışımında ve daha az şiddetli olarak vakum ile hazırlanan HNT-GABA formülasyonlarında mevcut olduğu görülmektedir. HNT-GABA VAC formülasyonunun DSC eğrisinde izlenen düşük şiddetli GABA piki HNT ile GABA arasında zayıf etkileşim olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık uygulanarak hazırlanan benzer oranda GABA ve HNT içeren formülasyonların termogramları saf etkin madde termogramı ile karşılaştırıldığında GABA'ya ait endotermik pikin kaybolduğu görülmektedir. Sıcaklık uygulanarak hazırlanan formülasyonlarda 300°C'de yayvan pik oluşumu GABA'nın HNT'lere başarılı şekilde yüklendiği şeklinde yorumlanabilir.

X-ışını kırınım analizi

HNT formülasyonlarının XRD profilleri **Şekil 115**'te sunulmuştur.



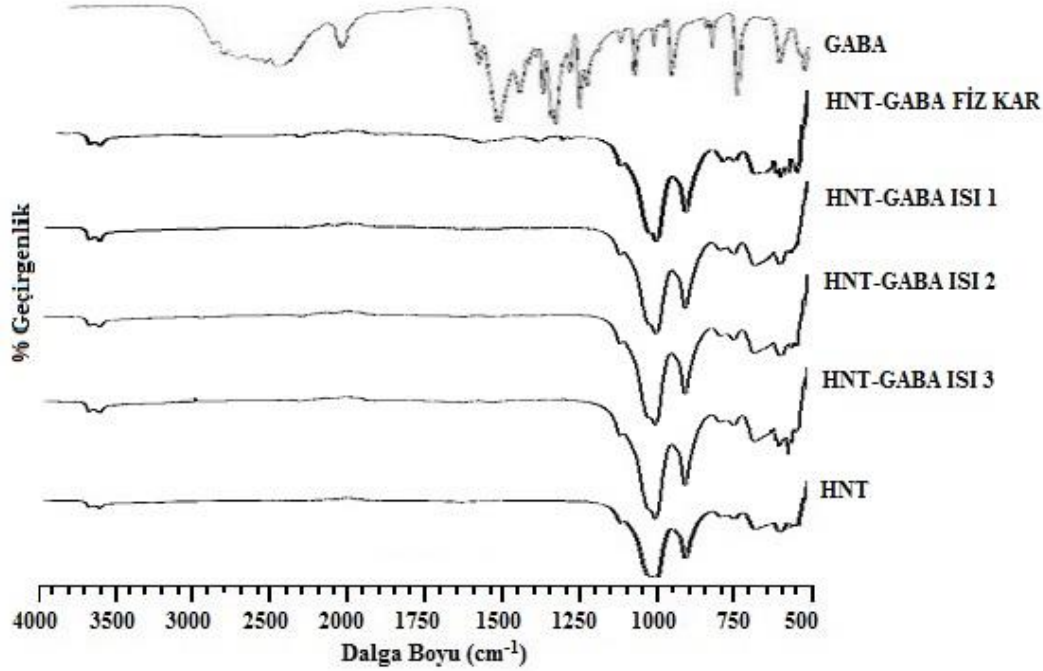
Şekil 115. Hazırlanan Halosit Nanotüp Formülasyonlarının X-İşını Kırınım Profilleri

XRD profillerinde gözlenen piklerin neredeyse tümünün saf HNT'ye ait olduğu görülmektedir. Bu sonuç hem GABA ile HNT arasındaki etkileşimin hem de uygulanan formülasyon hazırlama sürecinde HNT yapısının zarar görmediğini açıklamaktadır. Ancak diğer taraftan formülasyonlara yüklenen GABA miktarı azlığı nedeni ile GABA piklerinin HNT pikleri tarafından örtülmesi de söz konusu olabilir.

HNT-GABA VAC ve HNT-GABA ISI 3 formülasyonlarının XRD profillerinde GABA'ya ait birkaç kristalin pik görülmektedir (**Şekil 115**). HNT-GABA 1 ve HNT-GABA 2 formülasyonları ise saf HNT profiline daha yakındır. Bu durum GABA'nın HNT'nin tübüler boşluklarını doldurarak HNT'lere başarılı şekilde yüklendiğini açıklamaktadır (Fu ve ark., 2014).

İnfrared analizi

Halosit nanotüp formülasyonlarının FTIR spektrumları Şekil 116'da verilmiştir.



Şekil 116. Halosit Nanotüp Formülasyonlarının FTIR Spektrumları

Boş HNT'lerin FTIR spektrumunda 3695.61 cm⁻¹ ve 3624.25 cm⁻¹'de iç yüzeydeki -OH gruplarının gerilme titreşimleri, 1028.06 cm⁻¹ ve 1004.91 cm⁻¹'de Si-O-Si gerilme titreşimlerine ait pikler ve 908.47 cm⁻¹'de Al₂OH tekli eğilme bandına ait pikler görülmektedir. (Viseras ve ark., 2009; Bordepong ve ark., 2011; Ghebaour ve ark., 2012; Guo ve ark., 2012).

HNT formülasyonu spektrumlarında gözlenen pikler genellikle anlamlı değişiklikler göstermemektedir. Çoğunlukla Si-O ve Al-O bantlarına ait pikler görülmektedir (Bordepong ve ark., 2011). Formülasyon ve fiziksel karışım spektrumu ile HNT ve GABA'nın ayrı ayrı spektrumları dikkatle incelendiğinde, GABA'ya ait karakteristik piklerden karboksilat grubuna ait 1574.55 cm⁻¹'de gözlenen pikin fiziksel karışım spektrumunda var olduğu ancak formülasyon spektrumlarında kaybolduğu görülmektedir. GABA'ya ait pikin kaybolması HNT ve GABA arasındaki olası etkileşimin göstergesidir (Viseras ve ark., 2009).

HNT-GABA ISI 2 ve HNT-GABA ISI 3 formülasyonlarında iç yüzey hidroksil gruplarına ilişkin gerilmeler ve Si-O-Si gerilmelerine ait titreşimler işlenmemiş HNT FTIR spektrumu ile aynı pik değerlerini yansıtmaktadır. HNT-GABA ISI 1 formülasyonunda ise iç yüzey -OH bandı gerilmeleri 3695.61 cm⁻¹ ve 3622.32 cm⁻¹'de, Si-O-Si gerilme pikleri ise 1026.05 cm⁻¹ ve 1004.91 cm⁻¹'de gözlenmiştir. GABA'ya ait karakteristik piklerin kaybolması ve HNT piklerinde oluşan kaymalar etkileşimin en çok olduğu formülasyonun HNT-GABA ISI 1

formülasyonu olduğunu onaylamaktadır (Viseras ark., 2009; Zou ve ark., 2012; Wang ve ark., 2014).

Halosit nanotüp formülasyonlarında etkin madde miktar tayini

Sıcaklık uygulanarak hazırlanan GABA içeren nanotüplerdeki etkin madde miktarı tayini analizi sonuçları **Çizelge 50**'de sunulmuştur. Sıcaklık ile hazırlanan nanotüplerden HNT-GABA 1 (1:1 molar oranda HNT:GABA) formülasyonundaki yüklenme miktarı HNT-GABA 2 (1:2 molar oranda HNT:GABA) formülasyonuna göre daha yüksektir. Hazırlama sırasında yıkama işlemi gerçekleştirildiği için yüklenen GABA miktarının %1.720 ile sınırlandırıldığı düşünülmüştür. HNT-GABA ISI 3 formülasyonunda tepkime sonrası yıkama işlemi gerçekleştirilmediği için formülasyonda bulunan etkin madde miktarı daha yüksektir. Ancak gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında en yoğun etkileşimin HNT-GABA ISI 1 formülasyonunda olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 50. Halosit Nanotüp Formülasyonlarında Etkin Madde Miktarı (n=3)

	% Etkin madde miktarı ± SH
HNT-GABA ISI 1	1.720 ± 0.030
HNT-GABA ISI 2	0.733 ± 0.007
HNT-GABA ISI 3	8.543 ± 0.106

SH: Standart hata

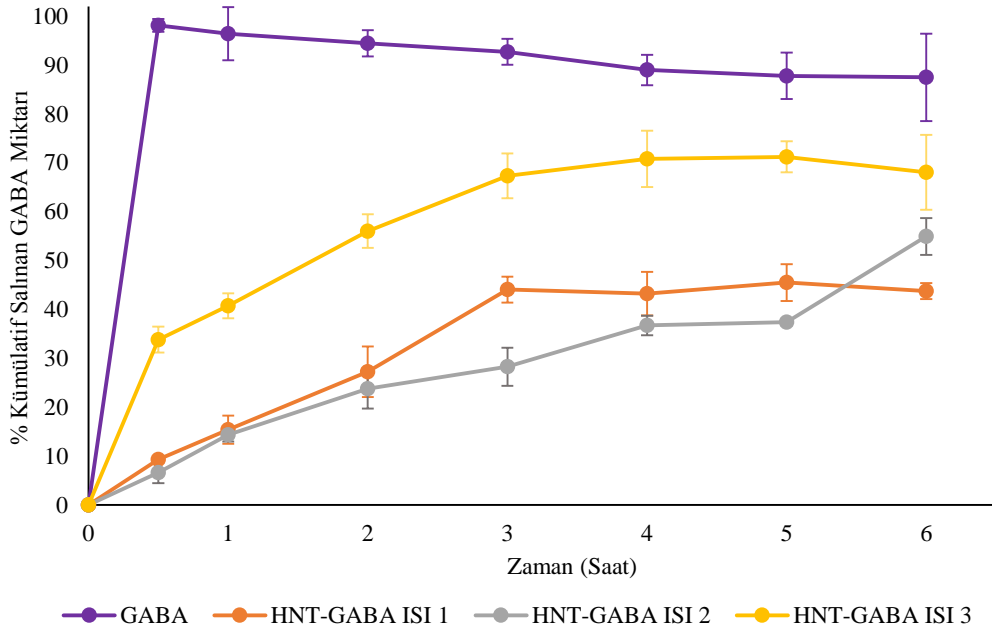
İn vitro salım çalışmaları

Sıcaklık uygulanarak hazırlanan HNT formülasyonlarının karakterizasyon analizleri sonucunda seçilen üç formülasyonda *in vitro* salım çalışması gerçekleştirilmiştir ve veriler **Çizelge 51**'de, elde edilen salım profilleri **Şekil 117**'de sunulmuştur.

Çizelge 51. GABA ve Sıcaklık ile Hazırlanan HNT Formülasyonlarına ait İn Vitro Salım Verileri (n=6)

Örnek Zamanı (Saat)	% Kümülatif Salınan GABA Miktarı (ORT ± SH)			
	Toz GABA	HNT-GABA ISI 1	HNT-GABA ISI 2	HNT-GABA ISI 3
0.5	98.11 ± 1.33	9.31 ± 0.20	6.62 ± 2.12	33.84 ± 2.63
1	96.43 ± 5.43	15.43 ± 2.89	14.39 ± 1.38	40.77 ± 2.56
2	94.44 ± 2.67	27.26 ± 5.19	23.83 ± 4.06	56.05 ± 3.45
3	92.69 ± 2.66	44.07 ± 2.67	28.29 ± 3.87	67.35 ± 4.56
4	88.99 ± 3.11	43.22 ± 4.45	36.75 ± 1.98	70.82 ± 5.78
5	87.80 ± 4.73	45.53 ± 3.77	37.43 ± 0.65	71.23 ± 3.20
6	87.48 ± 8.96	43.78 ± 1.65	54.94 ± 3.77	68.06 ± 7.65

ORT: Ortalama, SH: Standart Hata

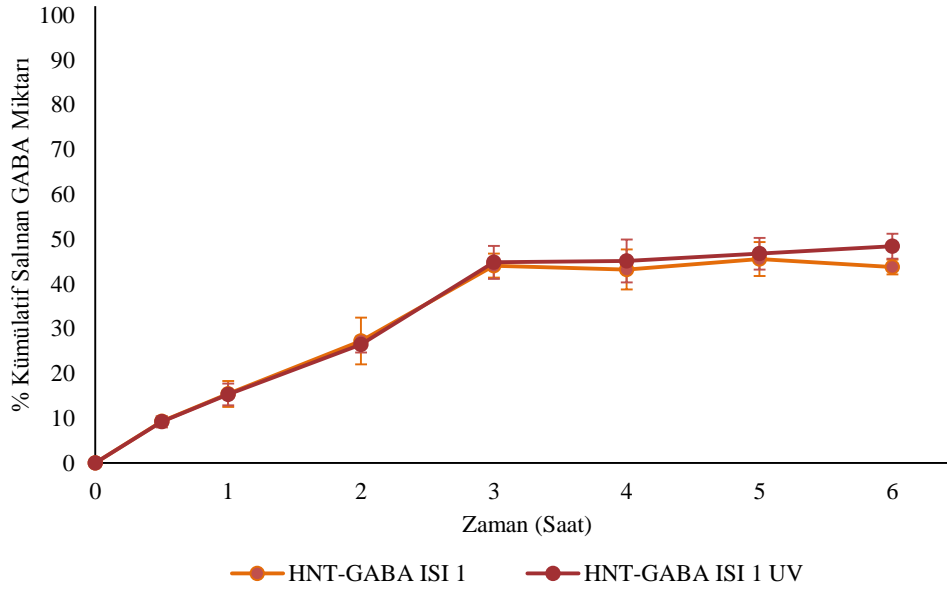


Şekil 117. GABA ve Sıcaklık ile Hazırlanan HNT Formülasyonlarına ait *İn Vitro* Salım Profili (n=6)

GABA içeren HNT formülasyonlarına ait salım profilleri incelendiğinde, nanotüp formülasyonları PBS (pH 7.4) içerisinde sürekli salım özelliği gösterdiğinden zamana bağlı salım davranışı sergilediği düşünülmüştür (Guo ve ark., 2012).

İn vitro salım çalışması ile 6 saat sonunda HNT-GABA ISI 1 ve HNT-GABA ISI 2 formülasyonları ile GABA'nın yaklaşık %50'sinin, HNT-GABA ISI 3 formülasyonunda ise %70'inin salındığı görülmüştür. HNT-GABA ISI 3 formülasyonunda 30. dk'da salınan GABA miktarının çok yüksek olması nedeni ile *in vivo* çalışmalarda tercih edilmemiştir. Literatürde yer alan HNT çalışmalarında benzer *in vitro* salım profilleri elde edilmiştir (Ghebaur ve ark., 2012; Guo ve ark., 2012).

DSC ve FTIR verilerine dayanarak GABA ve HNT arasındaki etkileşimin en yoğun olduğu düşünülen ve diğer HNT formülasyonlarına göre en ufak parçacık büyüklüğüne sahip olan HNT-GABA ISI 1 formülasyonu *in vivo* deneyler için seçilmiş ve UV radyasyon ile sterilize edilmiştir. UV sterilizasyon sonrası HNT formülasyonu üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmaları sonucunda elde edilen salım salım profili **Şekil 118**'de sunulmuştur.



Şekil 118. UV Sterilizasyon Sonrası HNT Formülasyonunun *In Vitro* Salım Profili (n=6)

Halosit nanotüp formülasyonlarına ait kararlılık çalışmaları

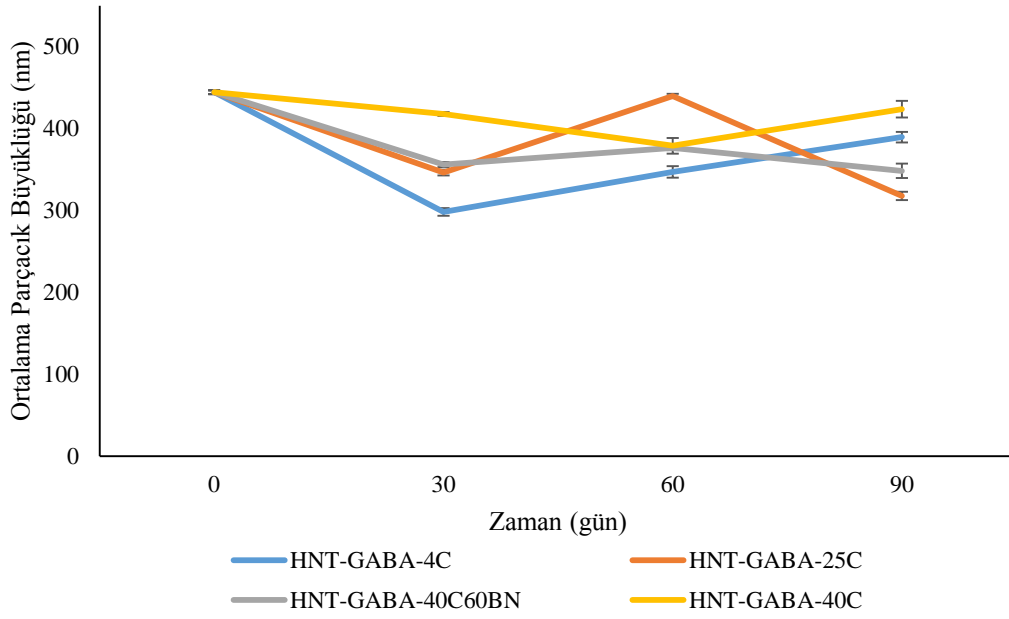
Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

GABA içeren HNT formülasyonlarının ortalama parçacık büyüklükleri, hazırlanmalarının ardından ve 3 aylık kararlılık çalışmaları sonrasında PCS yardımı ile ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 52’de ve karşılaştırmalı olarak Şekil 119’da gösterilmiştir.

Çizelge 52. GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına Ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri (n=3)

	Parçacık Büyüklüğü (nm)	
	ORT ± SH	PDI ± SH
HNT-GABA-4C-T0	444.2 ± 2.356	0.265 ± 0.095
HNT-GABA-4C-T30	298.1 ± 4.751	0.088 ± 0.023
HNT-GABA-4C-T60	347.0 ± 7.062	0.282 ± 0.052
HNT-GABA-4C-T90	389.5 ± 6.507	0.230 ± 0.086
HNT-GABA-25C-T0	444.2 ± 2.356	0.265 ± 0.095
HNT-GABA-25C-T30	346.2 ± 3.433	0.569 ± 0.040
HNT-GABA-25C-T60	439.7 ± 2.499	0.444 ± 0.047
HNT-GABA-25C-T90	317.6 ± 5.133	0.366 ± 0.057
HNT-GABA-40C60BN-T0	444.2 ± 2.356	0.265 ± 0.095
HNT-GABA-40C60BN-T30	356.0 ± 3.266	0.269 ± 0.071
HNT-GABA-40C60BN-T60	376.4 ± 2.775	0.353 ± 0.106
HNT-GABA-40C60BN-T90	348.2 ± 8.757	0.311 ± 0.054
HNT-GABA-40C-T0	444.2 ± 2.356	0.265 ± 0.095
HNT-GABA-40C-T30	417.8 ± 2.259	0.352 ± 0.040
HNT-GABA-40C-T60	378.9 ± 9.583	0.386 ± 0.085
HNT-GABA-40C-T90	423.5 ± 10.194	0.248 ± 0.155

BN: Bağlı Nem, ORT: Ortalama, PDI: Polidisperslik İndisi SH: Standart Hata, T0: 0. zaman, T30: 1. ay, T60: 2. ay, T90: 3.ay



Şekil 119. GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Parçacık Büyüklüğü Değerleri(n=3)

HNT-GABA formülasyonunun 444.2 ± 2.356 nm (PDI: 0.265 ± 0.095) olan başlangıç parçacık büyüklüğünün 3. ayın sonunda $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 389.5 ± 6.507 nm (PDI: 0.230 ± 0.086), $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 317.6 ± 5.133 nm (PDI: 0.366 ± 0.057), $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN'de saklanan formülasyonda 348.2 ± 8.757 nm (PDI: 0.311 ± 0.054) ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda 423.5 ± 10.194 nm (PDI: 0.248 ± 0.155) olduğu belirlenmiştir.

HNT-GABA formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay parçacık büyüklüğü bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark olduğu ($p < 0.01$) ancak $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de bekletilen formülasyonlarda fark ($p > 0.05$) olmadığı görülmüştür.

$40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de bekletilen formülasyon dışında tüm saklama koşullarında parçacık boyutunun yaklaşık 100 nm azaldığı görülmüştür. Bu durum tübüler yapının saklama koşullarından etkilenerek zarar görmüş olabileceğini düşündürmüştür.

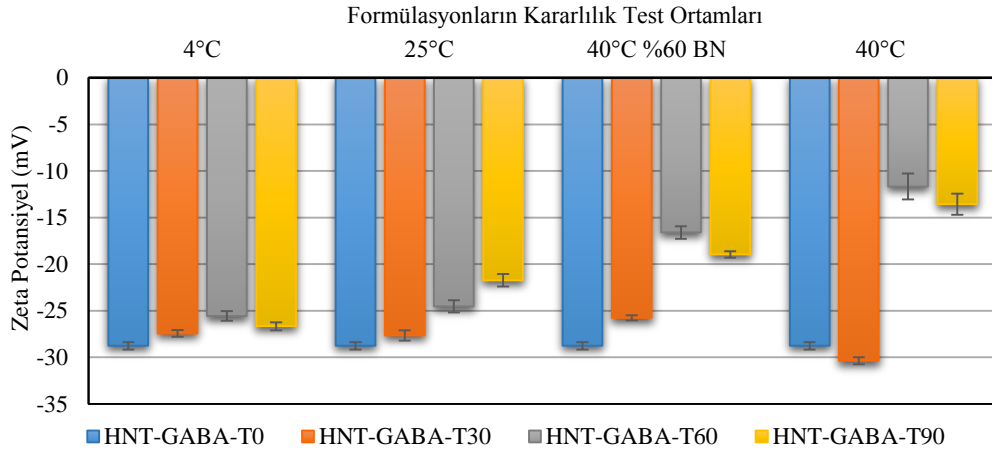
Zeta potansiyel

GABA içeren HNT formülasyonlarının zeta potansiyel analizleri, hazırlanmalarının ardından ve 3 aylık kararlılık çalışmaları sonrasında ölçülmüş ve elde edilen sonuçlar **Çizelge 53**'te ve karşılaştırmalı olarak **Şekil 120**'de gösterilmiştir.

Çizelge 53. GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

	Zeta Potansiyel (mV)	
	ORT	±SH
HNT-GABA-4C-T0	-28.77	± 0.38
HNT-GABA-4C-T30	-27.43	± 0.35
HNT-GABA-4C-T60	-25.57	± 0.52
HNT-GABA-4C-T90	-26.67	± 0.44
HNT-GABA-25C-T0	-28.77	± 0.38
HNT-GABA-25C-T30	-27.67	± 0.55
HNT-GABA-25C-T60	-24.53	± 0.68
HNT-GABA-25C-T90	-21.73	± 0.67
HNT-GABA-40C60BN-T0	-28.77	± 0.38
HNT-GABA-40C60BN-T30	-25.77	± 0.27
HNT-GABA-40C60BN-T60	-16.60	± 0.68
HNT-GABA-40C60BN-T90	-18.97	± 0.35
HNT-GABA-40C-T0	-28.77	± 0.38
HNT-GABA-40C-T30	-30.37	± 0.38
HNT-GABA-40C-T60	-11.67	± 1.39
HNT-GABA-40C-T90	-13.57	± 1.13

BN: Bağlı Nem, **ORT:** Ortalama, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3.ay



Şekil 120. GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Zeta Potansiyel Değerleri (n=3)

HNT-GABA formülasyonunun hazırlanmasının ardından yapılan analizlerde, -28.767 ± 0.384 mV olan başlangıç zeta potansiyeli, 3. ayın sonunda $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda -26.667 ± 0.437 mV, $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda -21.733 ± 0.669 mV, $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 BN ortamında saklanan formülasyonda -18.967 ± 0.353 mV ve $40^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 'de saklanan formülasyonda ise -13.567 ± 1.132 mV olarak saptanmıştır (**Çizelge 53**).

HNT-GABA formülasyonunun 0. zaman ve 3. ay zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve 25°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda çok önemli fark olduğu (p<0.01), 4°C ±1°C'de bekletilen formülasyonlarda önemli fark (p<0.05) olduğu görülmüştür.

pH ölçümü

GABA içeren HNT formülasyonlarının pH değerleri distile su ve PBS'de (pH 7.4) dağıtımlarının hemen ardından ve 3 aylık süre boyunca çalışması süresince ölçülerek sonuçlar **Çizelge 54**'te sunulmuştur.

Çizelge 54. GABA İçeren HNT Formülasyonunun Kararlılık Çalışmasına ait Distile Su ve Fosfat Tamponundaki (pH 7.4) pH Değerleri (n=3)

	pH (DS'de)	pH (PBS'de)
	ORT ± SH	ORT ± SH
HNT-GABA-4C-T0	5.44 ± 0.00	7.42 ± 0.01
HNT-GABA-4C-T30	5.37 ± 0.00	7.43 ± 0.00
HNT-GABA-4C-T60	5.28 ± 0.01	7.46 ± 0.01
HNT-GABA-4C-T90	4.94 ± 0.01	7.48 ± 0.00
HNT-GABA-25C-T0	5.44 ± 0.00	7.42 ± 0.01
HNT-GABA-25C-T30	5.39 ± 0.00	7.45 ± 0.00
HNT-GABA-25C-T60	5.31 ± 0.01	7.46 ± 0.00
HNT-GABA-25C-T90	4.76 ± 0.01	7.47 ± 0.00
HNT-GABA-40C60BN-T0	5.44 ± 0.00	7.42 ± 0.01
HNT-GABA-40C60BN -T30	5.39 ± 0.00	7.44 ± 0.01
HNT-GABA-40C60BN -T60	5.50 ± 0.01	7.44 ± 0.00
HNT-GABA-40C60BN -T90	4.86 ± 0.00	7.47 ± 0.00
HNT-GABA-40C-T0	5.44 ± 0.00	7.42 ± 0.01
HNT-GABA-40C-T30	5.37 ± 0.01	7.43 ± 0.01
HNT-GABA-40C-T60	5.63 ± 0.02	7.47 ± 0.01
HNT-GABA-40C-T90	4.79 ± 0.01	7.46 ± 0.00

BN: Bağlı Nem, DS: Distile Su, ORT: Ortalama, PBS: Fosfat Tamponu, SH: Standart Hata, T0: 0. zaman, T30: 1. ay, T60: 2. ay, T90: 3.ay

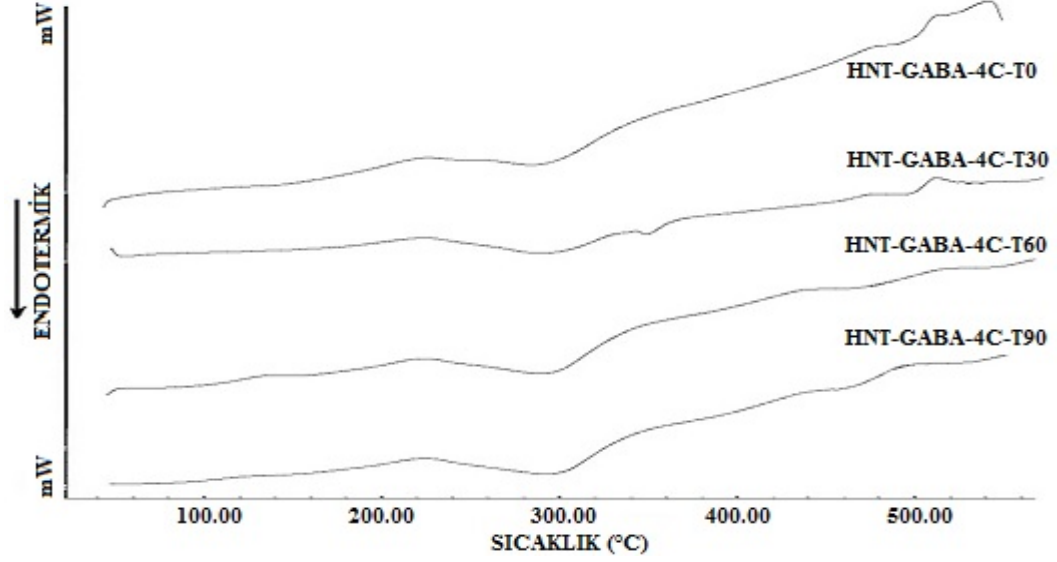
HNT-GABA formülasyonunun distile sudaki 0. zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 4°C ±1°C, 25°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda ileri düzeyde önemli fark (p<0.001) olduğu görülmüştür. HNT-GABA formülasyonunun PBS'deki 0.zaman ve 3. ay pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış, 4°C ±1°C'de çok önemli fark olduğu (p<0.01), 25°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda önemli fark (p<0.05) olduğu görülmüştür.

Fiziksel görünüş

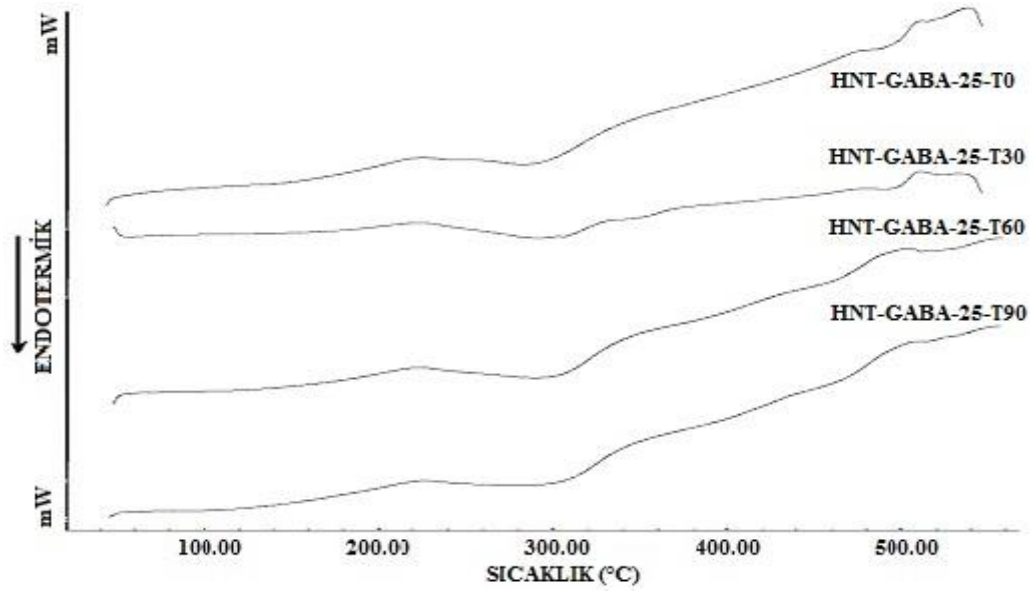
4°C ±1°C, 25°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN içeren ortamlarda bekletilen HNT formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerde görsel olarak incelenmesi sonucunda hazırlanan formülasyonlarda fiziksel açıdan herhangi bir değişiklik görülmemiş ve hazırlandığı andan itibaren rengini ve tekdüze görünümünü koruduğu gözlenmiştir.

Termal analiz

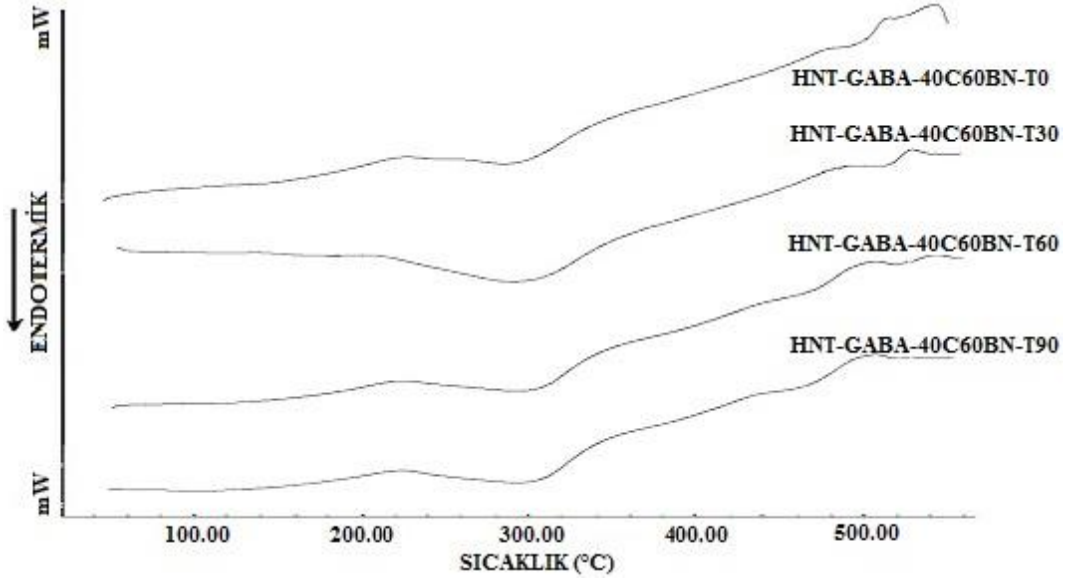
4°C ±1°C, 25°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN içeren ortamlarda bekletilen HNT formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki termogramları Şekil 121-Şekil 124'te sunulmuştur.



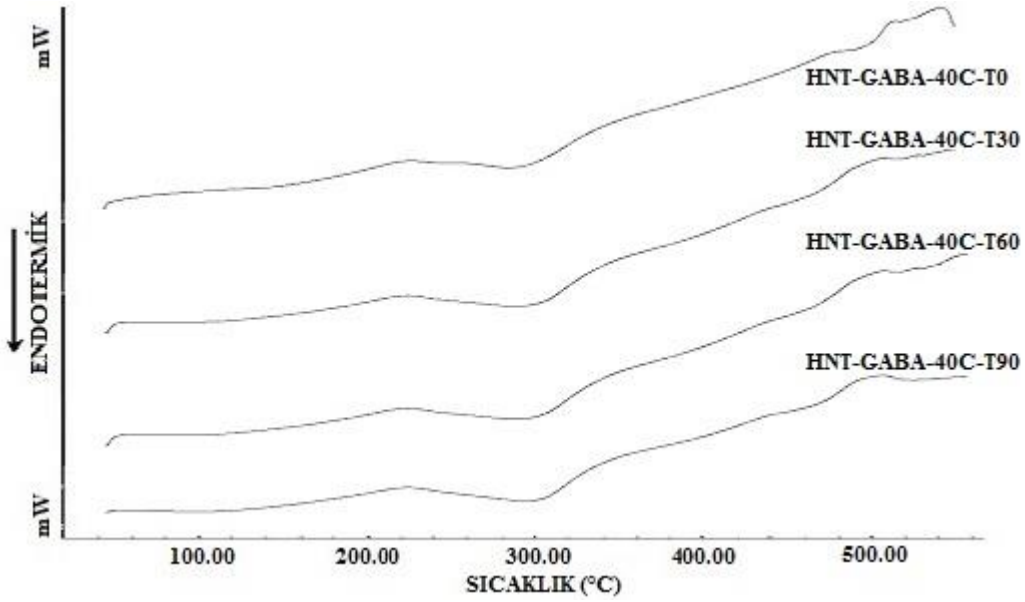
Şekil 121. GABA İçeren HNT Formülasyonunun 4°C'deki Termogramları



Şekil 122. GABA İçeren HNT Formülasyonunun 25°C'deki Termogramları



Şekil 123. GABA İçeren HNT Formülasyonunun 40°C ve %60 BN'deki Termogramları

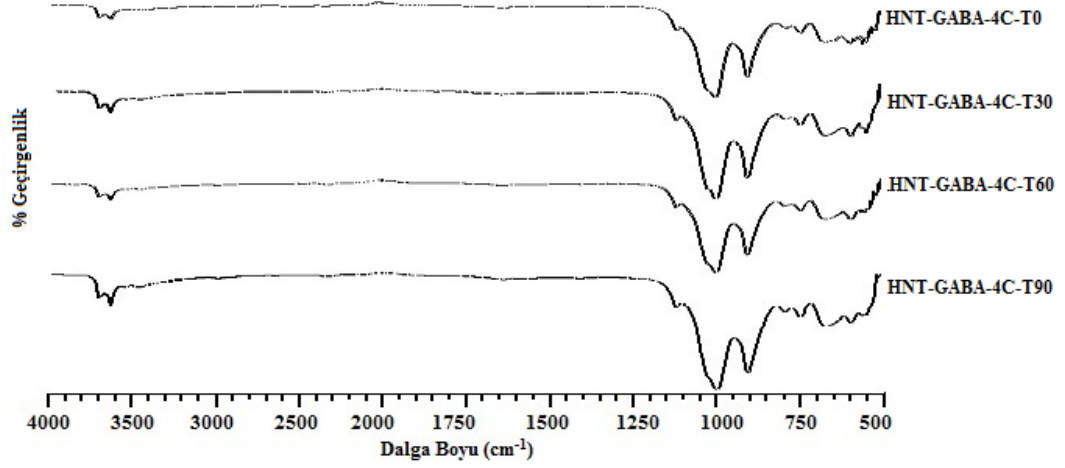


Şekil 124. GABA İçeren HNT Formülasyonunun 40°C'deki Termogramları

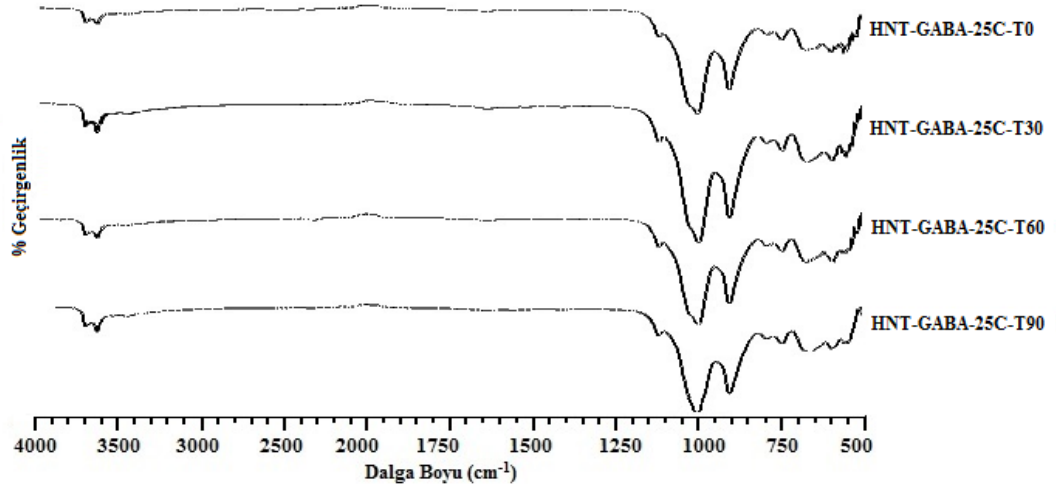
Tüm test koşullarında saklanan formülasyonların termogramları incelendiğinde, piklerde meydana gelen küçük morfolojik değişimler dışında önemli fark gözlenmemiştir. Bu nedenle hazırlanan GABA içeren HNT formülasyonlarının 3 ay süresince kararlılığını koruduğu düşünülmüştür.

Infrared analizi

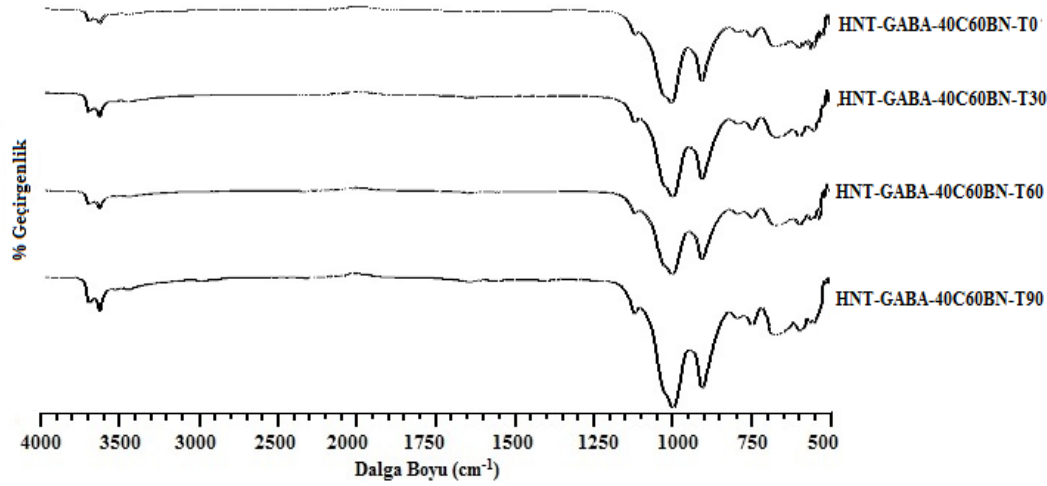
4°C ±1°C, 25°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN içeren ortamlarda bekletilen HNT formülasyonlarının, 0. zaman, 30., 60. ve 90. günlerdeki FTIR spektrumları Şekil 125-Şekil 128’de sunulmuştur.



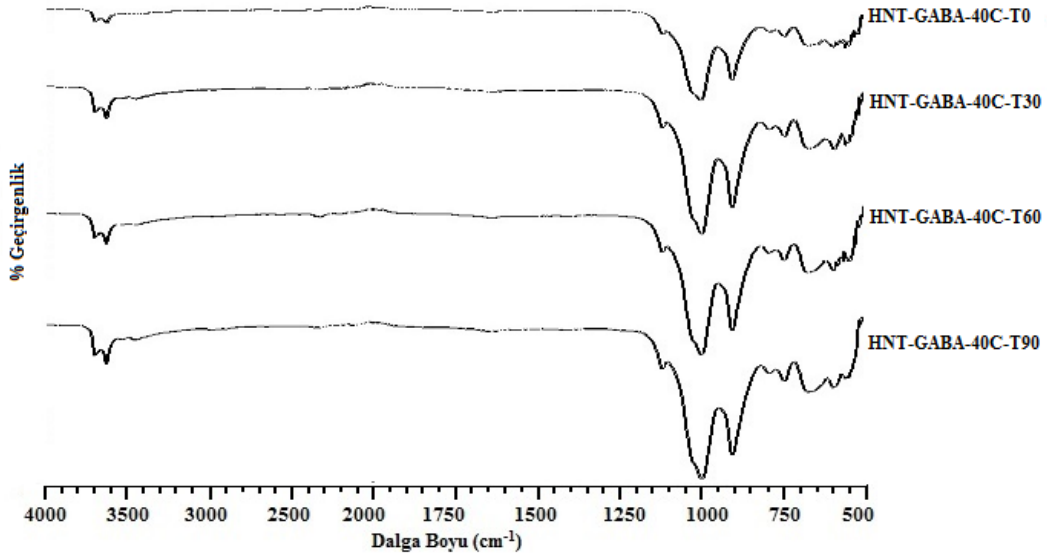
Şekil 125. GABA İçeren Halosit Nanotüp Formülasyonunun 4°C’deki FTIR Spektrumları



Şekil 126. GABA İçeren Halosit Nanotüp Formülasyonunun 25°C’deki FTIR Spektrumları



Şekil 127. GABA İçeren Halosit Nanotüp Formülasyonunun 40°C ve %60 BN'deki FTIR Spektrumları



Şekil 128. GABA İçeren Halosit Nanotüp Formülasyonunun 40°C'deki FTIR Spektrumları

Tüm test ortamlarında saklanan formülasyonlar incelendiğinde piklerin pozisyonu, 3. ay analizlerinde 3100-3500 cm^{-1} aralığında görülen omuzlanma hariç 0. zaman HNT-GABA formülasyonu spektrumu ile benzerlik göstermektedir (White ve ark., 2012). HNT-GABA formülasyonu spektrumlarının birbiri ile örtüşmesi nedeni ile nanotüp formülasyonlarının 3 aylık sürede kararlılığını koruduğu düşünülmüştür.

Etkin madde miktar tayini analizi

4°C ±1°C, 25°C ±1°C, 40°C ±1°C ve 40°C ±1°C ve %60 BN içeren kararlılık ortamlarında saklanan GABA içeren HNT formülasyonlarında yapılan etkin madde miktarları **Çizelge 55**'te sunulmuştur.

Çizelge 55. Farklı Koşullarda Saklanan GABA içeren Halosit Nanotüp Formülasyonlarının Etkin Madde Miktarı (n=3)

	% Etkin Madde Miktarı ± SH			
	T0	T30	T60	T90
HNT-GABA-4C	1.720 ±0.030	1.715 ±0.027	1.724 ±0.068	1.721 ±0.032
HNT-GABA-25C	1.720 ±0.030	1.701 ±0.107	1.722 ±0.023	1.715 ±0.045
HNT-GABA-40C 60BN	1.720 ±0.030	1.713 ±0.063	1.705 ±0.109	1.613 ±0.023
HNT-GABA-40C	1.720 ±0.030	1.718 ±0.023	1.719 ±0.035	1.601 ±0.082

BN: Bağıl Nem, **SH:** Standart Hata, **T0:** 0. zaman, **T30:** 1. ay, **T60:** 2. ay, **T90:** 3. ay

HNT-GABA formülasyonunda 0. zaman ve 3. ayda bulunan etkin madde miktarının istatistiksel karşılaştırılması yapılmış ve 4 °C ±1°C, 25 °C ±1°C, 40 °C ±1°C ve 40 °C ±1°C ve %60 BN'de bekletilen formülasyonlarda önemli değişiklik (p>0.05) gözlenmemiştir.

İn vitro toksisite testleri

Gerçekleştirilen MTT test sonuçları **Çizelge 56**'da gösterilmiştir.

Çizelge 56. İn vivo Deneylerde Kullanılan Formülasyonların ve Plasebolarının MTT Testi Verileri (n=7)

	MTT		
	% Canlılık	SH	İstatistiksel Analiz
Kontrol	100	0.000	-
PBS	87.175	4.773	-
GABA	48.701	8.830	***
PNP-23	78.734	6.034	*
PNP-34 (plasebo)	79.491	0.767	Fark yok
PNP-25	68.885	5.324	***
PNP-31 (plasebo)	82.955	4.575	*
PNP-29	83.171	4.955	*
PNP-32 (plasebo)	74.675	1.825	***
PNP-30	63.095	6.878	***
PNP-33 (plasebo)	79.654	6.358	*
HNT-GABA	70.184	8.786	*
HNT (plasebo)	93.669	4.941	Fark yok

SH: Standart Hata, **Fark yok:** p>0.05, *: p<0.05 (önemli fark), **:p<0.01 (çok önemli fark), ***:p<0.001 (ileri düzeyde önemli fark)

MTT test sonuçları student t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrole göre en anlamlı fark toz GABA'da gözlenmiştir. Formülasyonlar göz önüne alındığında; PNP-25, PNP-30 ve plasebo formülasyon olan PNP-32 nanopartiküllerinde de ileri düzeyde önemli fark olduğu görülmüştür ($p < 0.001$).

Hayvan deneylerinde kullanılan diğer formülasyonların fark anlamlılığının daha düşük düzeyde olduğu bulunmuştur.

Toz GABA'da hücre canlılığı %48.701 iken, hem GABA içeren formülasyonlarda hem de plasebo formülasyonlarda uygulama sonrası hücre canlılığı daha yüksek düzeydedir.

GABA içeren formülasyonlar hücre canlılığı açısından değerlendirildiğinde; *PNP-29 > PNP-23 > HNT-GABA > PNP-25 > PNP-30 > GABA* sıralaması elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre PNP-29 formülasyonu %83.171 hücre canlılığı değeri ile ilk sırada yer alırken, PNP-30 formülasyonu %63.095 canlılık değeri ile etkin madde yüklü formülasyonlar arasında en sonda yer almaktadır.

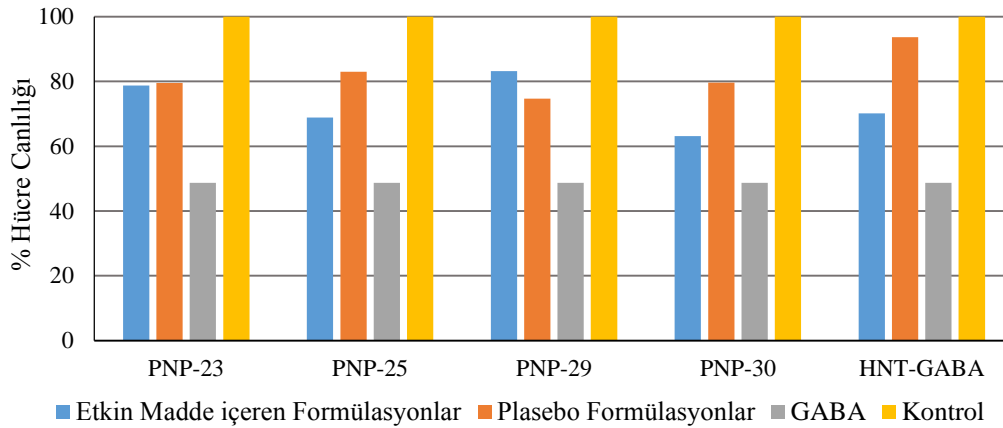
Plasebo formülasyonlar incelendiğinde ise *HNT (plasebo) > PNP-31 > PNP-33 > PNP-34 > PNP-32* sıralaması elde edilmiştir. HNT kodlu plasebo HNT formülasyonu %93.669 hücre canlılığı ile ilk sırada, PNP-29 formülasyonunun plasebosu olan PNP-32 formülasyonu ise %74.675 hücre canlılığı değeri ile plasebo formülasyonlar arasında en sonda yer almaktadır. Aynı zamanda PNP-25 hariç GABA içeren tüm formülasyonlardaki % hücre canlılığı değerlerinin plasebo formülasyonlardan daha düşük olduğu belirlenmiştir.

HNT formülasyonlarının sitotoksitesinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. HNT'nin yüksek düzeyde biyouyumlu olduğu literatürde yer almaktadır (Sanchez-Fernandez ve ark., 2014).

Guo ve arkadaşları (Guo ve ark., 2012) doksorubisin yüklü folik asit-Fe₃O₄ bağlanmış HNT'ler ile Hela servikal karsinoma hücreleri kullanarak gerçekleştirdikleri MTT analizi sonucunda, partiküllerin doksorubisinin inhibitör aktivitesini etkilemediğini, etkin maddenin etkinliğinin hazırlanan sistem ile korunduğunu belirtmiş ve HNT'lerin kanser tedavisinde ilaç taşınması için umut verici aday olduğunu öne sürmüşlerdir.

Meme kanseri hücreleri (MCF-7) ve serviks kanseri hücreleri üzerinde, 100 µg.mL⁻¹ konsantrasyona kadar HNT'lerin hücre dizileri üzerinde toksik etki göstermediği ancak 48 saatten fazla maruziyet sonucunda 1000 µg.mL⁻¹ konsantrasyona çıkılması ile hücre canlılığında azalma olduğu belirtilmiştir (Vergaro ve ark., 2010).

Bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler ile GABA'nın hücreler üzerine olan toksitesinin azaltıldığı söylenebilir (**Şekil 129**).



Şekil 129. *İn Vivo* Deneylerde Kullanılan Formülasyonların ve Plasebolarının MTT Testi Verileri (n=7)

***İn Vivo* Çalışmalar**

Formülasyonların uygulanması, izlenmesi ve örneklerin alınması

“*Formülasyonların Uygulanması, İzlenmesi ve Örneklerin Alınması*” konusunda (Sayfa 55) anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen enjeksiyonların ardından deney grupları 30 dk süre ile gözlenmiştir. İzlenen nöbet parametrelerine ilişkin veriler **Çizelge 57**'de yer almaktadır. Formülasyonlara ait verilerin PBS ve GABA çözeltilisine göre paralel t testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmenin sonuçları **Çizelge 58**'de sunulmuştur.

Nöbet parametrelerine ilişkin veriler ışığında formülasyonlar latense göre değerlendirildiğinde, PBS'ye ve GABA çözeltilisine göre PNP-23, PNP-25, PNP-29 ile çok ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$), PNP-30 ileri düzeyde anlamlı fark ($p<0.01$), HNT-GABA ile ise anlamlı fark ($p<0.05$) olduğu bulunmuştur. Tüm formülasyonların PBS ve GABA ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde farklı olarak latens süresini uzatmış oldukları görülmüştür (**Çizelge 58**).

Konvülziyonun sona erdiği an açısından değerlendirme yapıldığında, PBS'e göre GABA çözeltilisi, PNP-30, HNT-GABA formülasyonları anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. Aynı parametre GABA ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, PNP-30 çok ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$), PNP-23 ve HNT-GABA ileri düzeyde anlamlı ($p<0.01$), PNP-25 ve PNP-29 ise anlamlı düzeyde ($p<0.05$) farklı olduğu bulunmuştur (**Çizelge 58**).

Deney gruplarında gözlenen şiddetli konvülziyon süreleri göz önüne alındığında, PBS'ye göre PNP-23, PNP-25 ve PNP-29 çok ileri düzeyde ($p<0.001$), PNP-30, HNT-GABA ve GABA çözeltilisi ileri düzeyde ($p<0.01$) anlamlı fark görülmüştür. Şiddetli konvülziyon süreleri GABA çözeltilisi ile karşılaştırıldığında ise PNP-23, PNP-25 ve PNP-29 ile ileri düzeyde anlamlı ($p<0.01$), PNP-30 ve HNT-GABA ile ise anlamlı ($p<0.05$) fark bulunmuştur.

Çizelge 57. Hayvan Deneysel Gruplarında İzlenen Nöbet Parametrelerine İlişkin Veriler (dakika) (n=7)

Gruplar	Latens ± SS	Konvülsiyonun Bittiği An ± SS	Şiddetli Konvülsiyon Süresi ± SS	Ölüm Anı ± SS	Ölüm Oranı
PBS (pH 7.4)	01:12 ± 00:18	21:21 ± 08:51	04:25 ± 01:57	12:42	3/7
GABA çözeltisi	01:13 ± 00:13	25:35 ± 04:43	02:37 ± 01:34	10:58	4/7
PNP-23	02:02 ± 00:30	20:29 ± 06:10	01:16 ± 00:51	-	0
PNP-25	03:53 ± 01:52	21:28 ± 06:28	00:39 ± 00:33	-	0
PNP-29	02:09 ± 00:50	23:10 ± 02:49	01:16 ± 00:46	22:15	1/7
PNP-30	02:10 ± 00:53	16:33 ± 06:51	01:41 ± 01:13	16:40	1/7
HNT-GABA	01:31 ± 00:48	17:59 ± 09:36	01:35 ± 01:02	-	0

PBS: Fosfat Tamponu, **SS:** Standart Sapma

Çizelge 58. Hayvan Deneyi Gruplarında İzlenen Nöbet Parametrelerinin Bağlımlı Örneklem T Testine Göre İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Gruplar	PBS			GABA		
	Latens	Konvülsiyonun Bittiği An	Şiddetli Konvülsiyon Süresi	Latens	Konvülsiyonun Bittiği An	Şiddetli Konvülsiyon Süresi
PBS (pH 7.4)	-	-	-	Fark yok	*	**
GABA çözeltisi	Fark yok	*	**	-	-	-
PNP-23	***	Fark yok	***	***	**	**
PNP-25	***	Fark yok	***	***	*	**
PNP-29	***	Fark yok	***	***	*	**
PNP-30	**	*	**	**	***	*
HLT-GABA	*	*	**	*	**	*

PBS: Fosfat Tamponu, **SS:** Standart Sapma, **Fark yok:** $p > 0.05$, *: $p < 0.05$ (önemli fark), **: $p < 0.01$ (çok önemli fark), ***: $p < 0.001$ (ileri düzeyde önemli fark)

Ölüm oranı PBS uygulanan grupta 3/7 ve GABA çözeltisi uygulanan grupta 4/7 iken, PNP-23, PNP-25 ve HNT-GABA formülasyonlarında ölüm görülmemiş, PNP-29 ve PNP-30'da 1/7 oranındadır. PBS'de ölüm ortalama 12 dk 42 sn'de, GABA'da ise 10 dk 58 sn 'de görülmüştür. PNP-29'da 22 dk 15 sn'de ve PNP-30'da 16 dk 40 sn'de ölüm görülmesi ile ölüm oranının azaltıldığı ve yaşam süresinin uzatıldığı görülmektedir.

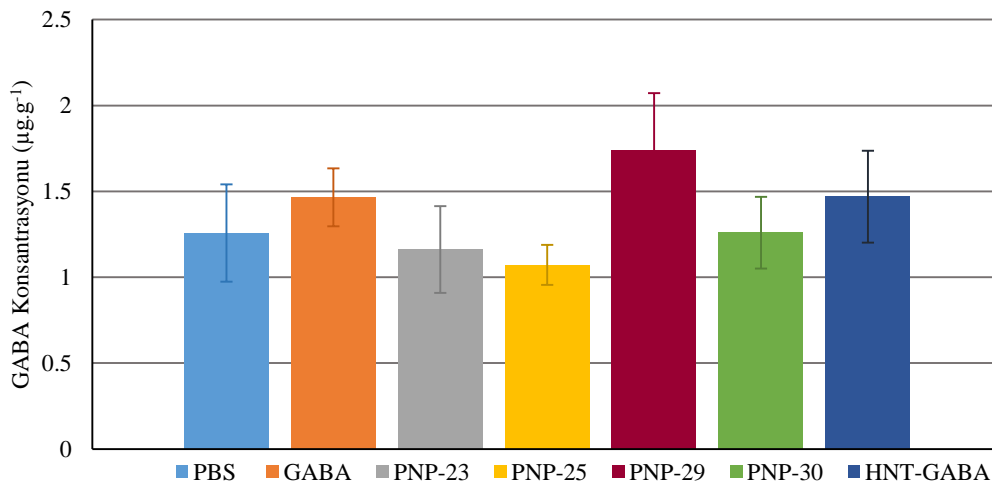
30 dakika süresince nöbet izlenmesinin ardından sıçanların beyinleri eter anestezi altında çıkarılmış ve *Stratum corsatum* izole edilerek ayrılmıştır.

Stratum corsatum örneklerinde GABA miktar tayini

“Formülasyonların Uygulanması, İzlenmesi ve Örneklerin Alınması” konusunda (Sayfa 55) anlatılan şekilde alınan ve analize kadar -20°C'de dondurularak saklanan doku örneklerindeki GABA miktarları “CUSABIO Rat Gamma-Aminobutyric Acid” ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Mekanizma yarışmalı enzim inhibisyonu immün analiz tekniği ile GABA miktarının belirlenmesine dayanmaktadır ve serum, plazma ve doku homojenatlarındaki GABA miktarının saptanmasına olanak tanımaktadır (http-8).

İmmün analiz yöntemleri vücut sıvıları içerisinde bulunan biyojenik aminlerin doğru ve hızlı olarak tayin edilmesinde klinikte ve araştırmalarda sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. İdrarda GABA, glisin ve agmatin gibi inhibitör özellikli nörotransmitter ve β -fenilettilamin, taurin gibi nöromodülatör özellikli ajanların tayininde HPLC yöntemi ile benzer validasyon sonuçları veren ELISA kiti yardımı ile gerçekleştirilen immün analiz yöntemi kullanılmıştır (Huisman, 2010).

Kit kılavuzunda da belirtildiği şekilde dondurulan doku örneklerindeki hücre membranlarını yıkmak için donma-çözülme döngüsü iki kez uygulanmıştır. Kit kullanım kılavuzunda belirtilen santrifüj; Biotin-antikor, HRP-avidin, TMB substrat reaktifi eklenmesi; inkübasyon; yıkama gibi işlem basamaklarının ardından sonuç çözeltisi eklenmiş ve ELISA okuyucu yardımı ile GABA miktarları belirlenmiştir. Dokulardaki GABA miktarları **Şekil 130**'da gösterilmiştir.



Şekil 130. *Stratum Corsatum*'da Belirlenen GABA miktarları (n=7)

Sistemlerin etkinlikleri açısından değerlendirilebilmeleri için, formülasyonlar hayvanlara aynı konsantrasyonda GABA içerecek şekilde *i.p.* yoldan uygulanmıştır.

GABA miktarları açısından, en yüksek değer $1.738 \pm 0.335 \mu\text{g.g}^{-1}$ değeri ile PNP-29 formülasyonunda saptanmıştır. GABA çözeltisi ve PBS ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında her ikisi için de PNP-29 formülasyonunun GABA düzeyini anlamlı ($p < 0.05$) olarak arttırdığı bulunmuştur. 30 dakikalık nöbet izleme süresi içerisinde elde edilen parametrelerin istatistiksel değerlendirmesi sırasında da PNP-29 formülasyonunun nöbet üzerine etkinliğinin farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Uygulanan diğer formülasyonlarda *Stratum corsatum*'daki GABA değeri, PBS ve GABA çözeltisi uygulanan gruplardan daha düşük, aynı ya da anlamlı olamayacak kadar yüksek bulunmuştur. Nöbet parametreleri açısından formülasyonlar GABA çözeltisi ya da PBS ile karşılaştırıldığında tüm formülasyonların PTZ ile tetiklenen epileptik mekanizmaya müdahale ettiği görülmüştür. Doku örnekleri GABA'nın en çok bulunduğu *Stratum corsatum*'dan alınmıştır. Bazı deney gruplarında nöbetlerin izlenmesi açısından anlamlı fark bulunmasına karşın, *Stratum corsatum*'daki GABA miktarlarının düşük kalması formülasyonların taşıdığı GABA'nın korteks vb. beyin farklı bölümlerinde toplanmış olabileceğini düşündürmüştür.

Nanopartiküller beyne ilaç taşınmasında sıklıkla kullanılan etkin yöntemlerden birisidir. Gabapentin yüklü albümin nanopartiküllerinin epilepsi tedavisi üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, maksimal elektroşok ve PTZ ile indüklenmiş konvülziyon modelleri kullanılmıştır (Wilson ve ark., 2014). 20 dk süre ile izlenen sıçanlarda, nanopartikül formülasyonları ile konvülziyonların önlendiği ya da konvülziyonların farklı fazlarının geciktirildiği gözlenmiş ve gabapentin ile karşılaştırıldığında albümin nanopartikülleri ile antikonvülsan etkinliğin arttırıldığı görülmüştür. Nanopartiküllerin uygulanmasından 1 saat sonra sıçan beyinlerinin çıkarılmasının ardından örneklerde gerçekleştirilen gabapentin tayini sonucunda, Polisorbat® 80 kaplı albümin nanopartikülleri ile elde edilen etkin madde düzeyi toz gabapentin uygulamasına göre anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur.

PTZ ile gerçekleştirilen akut epilepsi modeli kullanılarak gerçekleştirilen deneyler ışığında bu çalışmada hazırlanan formülasyonların nöbet üzerine etkileri incelendiğinde; nanopartikül ve nanotüp formülasyonlarının uygulandıktan 4 saat sonra da epileptik mekanizmaya müdahale edecek ölçüde GABA taşımış olduğunu ve kan-beyin engelini aşarak GABA'nın beyin içine taşınmasını sağladığını ortaya koymuştur.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmaya konu olan etkin madde ve kullanılan monomerlerin erime derecesi, termal, XRD ve FTIR analiz sonuçları literatür ile paralellik göstermiştir. Formülasyonların hazırlama yöntemleri ve sterilizasyon prosesi ile *in vitro* salım çalışmalarının yapılacağı ortam ve koşullar göz önüne alınarak GABA'nın bu ortam ve koşullardaki kararlılığı etkin madde miktar tayini analizi ile incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda PNP hazırlama koşulunda etkin maddenin 95.50 ± 1.24 , HNT hazırlama koşulunda 98.40 ± 0.36 , UV sterilizasyon koşulunda 99.50 ± 0.72 , 6 saat izlenen *in vitro* salım süresince 90.33 ± 3.00 'nün bozunmadan kaldığı bulunmuştur.

GABA'nın analitik miktar tayini için literatürde önerilen türevlendirme sonrası HPLC yönteminde modifikasyon yapılarak geliştirilen yöntemin doğrusal, kesin, doğru, hassas ve seçici olduğuna karar verilmiştir. Formülasyonlarda gerçekleştirilen etkin madde miktar tayini ve *in vitro* salım çalışmalarında GABA miktar tayini için sistem ayrı ayrı valide edilmiştir.

Tez kapsamında GABA içeren PNP ve HNT formülasyonları hazırlanmıştır. Farklı monomerlerin ve PEG türevlerinin ters emülsiyon polimerizasyonu ile çeşitli PNP formülasyonları ve farklı hazırlama yöntemlerinin kullanılması ile HNT formülasyonları hazırlanmıştır. Karakterizasyon ve diyaliz membranı ile gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmalarına dayanarak optimum formülasyonlar seçilmiştir. Sitotoksikite testi, kararlılık çalışması ve GABA çözeltisi ve PBS ile karşılaştırmalı olarak formülasyonların sıçanlardaki antiepileptik aktivitesinin araştırıldığı *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Ters emülsiyon polimerizasyonu sistemi ile hazırlanan nanopartiküllerde PYEM yüzdesi, GABA:PYEM molar oranı, Ac ya da DMAc monomerlerinin kullanılması, NMBAc oranı, karıştırıcı seçimi, PEG 2000 ya da PEG 1000/1500 MA kullanılması gibi farklı parametrelerin etkisi parçacık büyüklüğü, zeta potansiyel, parçacık şekli ve yüzey özellikleri, termal, x-ışını kırınımı, infrared, etkin madde miktar tayini analizleri ve *in vitro* salım çalışması ile incelenmiştir.

UT gibi yüksek hızlı karıştırıcı kullanılarak ön-emülsiyon oluşturulmasının ardından manyetik karıştırıcı ile polimerizasyon tepkimesi sonucunda hazırlanan sistemlerde daha küresel, FTIR spektrumunda kristalliğin daha da az olduğu, pozitif zeta potansiyele sahip ve daha uzun sürede salım yapan sistemler elde edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları doğrultusunda PNP-23 (DMAc içeren), PNP-25 (DMAc ve PEG 2000 içeren), PNP-29 ve PNP-30 formülasyonları *in vivo* çalışmalar için seçilmiştir.

HNT formülasyonları ise vakum altında ya da sıcaklık uygulanarak hazırlanmış, karakterizasyon ve *in vitro* salım çalışmaları sonucunda HNT GABA ISI 1 formülasyonu *in vivo* çalışmalarda kullanılmıştır.

Kararlılık çalışmalarına göre tüm formülasyonlar nanometre aralığında kaldığı belirlenmiştir. Fiziksel görünüm açısından yalnızca PNP-29 formülasyonunda sarı renklenme görülmüştür. Formülasyonların PBS'de dağılımları ile ölçülen pH değerleri fizyolojik aralıkta kalmıştır. Zeta potansiyel değerlerinde en çok 10 mV'luk düşüş görülmüştür. Termogramları ve FTIR spektrumları incelendiğinde GABA içeren HNT formülasyonlarında herhangi bir farklılık

gözlenmezken, $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'de saklanan formülasyonlarda pik farklılıkları ya da pik şiddetlerinde azalma saptanmıştır. Etkin madde miktar tayini analizinde $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve %60 BN'de saklanan formülasyonlarda GABA miktarının azaldığı HPLC ile tayin edilmiştir. PNP formülasyonlarının $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de daha kararlı olduğu, sıcaklık nedeniyle kararlılık problemleri söz konusu olabileceği düşünülmüştür.

MTT test sonuçları incelendiğinde, saf GABA'da hücre canlılığı %48.701 iken, hem GABA içeren formülasyonlarda hem de plasebo formülasyonlarda uygulama sonrası daha yüksek düzeyde hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir. Hazırlanan PNP ve HNT sistemleri ile GABA'nın sitotoksitesinin azaltıldığı görülmüştür.

In vivo çalışma sonuçları değerlendirildiğinde ise *in vivo* deneylerde kullanılan PNP ve HNT formülasyonlarının tümünde latens süresinin uzatıldığı, ölüm oranının azaltıldığı, konvülziyonların toplam süresinin ve şiddetli konvülziyon süresinin kısaltıldığı görülmüştür.

Nöbet parametreleri açısından tüm formülasyonlar PBS ve GABA ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında farklı düzeylerde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu çalışmada hazırlanan tüm formülasyonların PTZ ile tetiklenen epileptik mekanizmaya müdahale ettiği, ancak PNP formülasyonlarının HNT formülasyonlarından nöbet parametrelerini daha anlamlı düzeyde iyileştirdiği belirlenmiştir.

Stratum corsatum doku örneklerinde ELİSA okuyucu yardımı ile gerçekleştirilen analizde en yüksek değer $1.738 \mu\text{g.g}^{-1}$ değeri ile PNP-29 formülasyonunda elde edilmiş, GABA düzeyini anlamlı ölçüde artırmış olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer formülasyonlar uygulandığında doku örneklerindeki GABA miktarının, PBS ve saf GABA uygulanan gruplardan daha düşük, aynı ya da anlamlı olamayacak düzeyde yüksek bulunmuştur.

Çalışmada gerçekleştirilen *in vitro-in vivo* analiz sonuçları birlikte değerlendirildiğinde hazırlanan formülasyonların saf halde kan beyin engelini geçemeyen GABA'nın beyne taşınmasında umut vaat eden sistemler olduğu düşünülmüştür.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, GABA'nın farklı ilaç taşıyıcı sistemler ile hazırlanan formülasyonları ya da temin edilebilirse GABA-T tanıtilan boş MIP formülasyonlarının hazırlanması ve *in vivo* çalışmalarda kullanılmış olan PNP ve HNT formülasyonları ile karşılaştırılması yapılabilir.

KAYNAKLAR

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier, *Nat. Rev. Neurosci.*, 7, 41-53 (2006).

Abdullayev, E., Lvov, Y., Halloysite clay nanotubes as a ceramic “skeleton” for functional biopolymer composites with sustained drug release, *J. Mater. Chem.*, 1, 2894-2903 (2013).

Abdullayev, E., Price, R., Schukin, D., Lvov, Y., Halloysite nanotubes as nanocontainers for anticorrosion coating with benzotriazole, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 1(7), 1437-1443 (2009).

Akbari, B., Tavandashti, M.P., Zandrahimi, M., Particle size characterization of nanoparticles-A practical approach, *Iran. J. Mater. Sci. & Eng.*, 8 (2), 48-56 (2011).

Albanase, A., Tang, P.S., Chan, W.C.W., The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 14, 1-16 (2012).

Allemann, E., Gurny, R., Doelker, E., Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size, *Int. J. Pharm.*, 87, 247-253 (1992).

Avoli, M., Williamson, A., Functional and pharmacological properties of human neocortical neurons maintained in vitro, *Prog. Neurobiol.*, 48, 519-554 (1996).

Babič, M., Horák, D., Poly(N,N-dimethylacrylamide)-based microspheres prepared by heterogeneous polymerizations, *Macromol. React. Eng.*, 1, 86-94 (2007).

Barari, M., Abdollahi, M., Hemmati, M., Synthesis and characterization of high molecular weight polyacrylamide nanoparticles by inverse-emulsion polymerization, *Iran. Polym. J.*, 20 (1), 65-76 (2011).

Bauer, B., Schlichtiger, J., Pekcec, A., Hartz, A.M.S., The Blood-Brain Barrier in Epilepsy, In: *Clinical and Genetic Aspects of Epilepsy*, Z. Afawi (Ed), In Tech., 23-54 (2011).

Ben-Yaakov, G., Golan, H., Cell proliferation in response to GABA in postnatal hippocampal slice culture, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 21, 153-157 (2003).

Bennewitz, M.F., Saltzman, W.M., Nanotechnology for the delivery of drugs to the brain for epilepsy, *Neurotherapeutics*, 6(2), 323-336 (2009).

Bennour, S, Louzri, F., Study of properties and thermal behaviour of poly(N,N-dimethylacrylamide-co-maleic acid) based hydrogels, *Adv. Chem.*, 2014, 1-10 (2014).

Bhavna, S., Ali, M., Baboota, S., Sahni, J.K., Bhatnagar, A., Ali, J., Preparation, characterization, in vivo bioistribution and pharmacokinetic studies of donezepil-loaded PLGA nanoparticles for brain targeting, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 40(2), 278-287 (2014).

Blouza, L. I., Charcosset, C., Sfar, S., Fessi, H., Preparation and characterization of spironolactone loaded nanocapsules for paediatric use, *Int. J. Pharm.*, 325,124–131 (2006).

Bodor, N., Buchwald, P., Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, 36, 229-254 (1999).

Bordeepong, S., Bhongsuwan, D., Pungrassami, T., Bhongsuwan, T., Characterization of halloysite from Thung Yai District, Nakhon Si Thammarat Province, in Southern Thailand, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 33(5), 599-607 (2011).

Brannon-Peppas, L., Peppas, N., Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerler, In: *Kontrollü Salım Sistemleri*, A.Z. Gürsoy (Ed), i Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., İstanbul, 21-40, 2002.

Brodie, M.J., Schachter, S.C., Kwan, P.K.L., *Epilepsi (Fast Facts)*, Health Press, 2008.

Bulut, P., Dinçol, F., Oksolamin sitrat ile tablet yardımcı maddeleri arasındaki geçimsizliğin diferansiyel tarama kalorimetresi ile araştırılması, *FABAD Farm. Bil. Der.*, 16, 209-214 (1991).

Caldorera-Moore, M., Guimard, N., Shi, L., Roy, K., Designer nanoparticles: Incorporating size, shape, and triggered release into nanoscale drug carriers, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7(4), 479–495 (2010).

Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaële, D., D'Angelo, J., Noel, J., Georgin, D., Fattal, E., Andreux, J.P., Couvreur, P., Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery, *Pharm. Res.*, 18 (8), 1157-1166 (2001).

Carcaboso, Á.M., Chiappetta, D.A., Höcht, C., Blake, M.G., Boccia, M.M., Baratti, C.M., Sosnik, A., In-vitro/in-vivo characterization of melt-molded gabapentin-loaded poly(epsilon-caprolactone) implants for sustained release in animal studies, *Eur J Pharm Biopharm*, 70, 666-673 (2008).

Chen, Y., Liu, L., Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 640-665 (2012).

Chen, L., Yang, B., Wu, M., Synthesis and kinetics of microgel in inverse emulsion polymerization of acrylamide, *Prog. Org. Coat.*, 31, 393-399 (1997).

Clarke, G., O'Mahony, S., Malone, G., Dinan, T.G., An isocratic high performance liquid chromatography method for the determination of GABA and glutamate in discrete regions of rodent brain, *J. Neurosci. Meth.*, 160, 223-230 (2007).

Conti, F., Minelli, A., Melone, M., GABA transporters in the mammalian cortex: localization, development and pathological implications, *Brain Res. Rev.*, 45, 196-212 (2004).

Contineanu, I., Contineanu, M., Neacsu, A., Perisanu, S., A DSC study of γ -aminobutyric acid gamma irradiated, *An. Univ. Bucuresti. Chimie*, 19 (1), 79-86 (2010).

Crittenden, D. L., Chebib, M., Jordan, M. J. T., Stabilization of zwitterions in solution: γ -aminobutyric acid (GABA), *J. Phys. Chem. A*, 108, 203-211 (2004).

Çaban, S., Beyne Hedeflendirilmiş Kaspaz İnhibitörleri ve Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü (BFGF) Taşıyan Nanopartiküllerin Hazırlanması, Beyne Geçişinin ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye (2010).

Çapan, Y., Yemişçi, M., Nanotaşıyıcıların Beyne Hedeflendirilmesi, In: Nanofarmasötikler ve Uygulamaları, Ayla Z., G. (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 291-307, 2014.

Çelebi, N., Koloitler, In: Farmasötik Teknoloji, Ayla Z., G. (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 245-255 (2012).

Daubresse, C., Grandfills, C., Jérôme, Teyssiê, P., Enzyme immobilization in reactive nanoparticles produced by inverse microemulsion polymerization, *Colloid Polym. Sci.*, 274 (5), 482-489 (1996).

Dhana Lakshmi, P., Rahul Nair Chakrapani, M., Venkatkrishnakiran, P., Solid lipid nanoparticle systems for delivery of drugs to the brain, *Int. J. Biopharm.*, 3(2), 70-77 (2012).

Dichi, E., Sghaier, M., Fraisse, B., Bonhomme, F., Physico-chemical characterization of γ -Amino n-butyric acid nanoparticles, *Chem. Pharm. Bull.*, 59(6), 703-709 (2011).

Dikpati, A., Madgulkar, A.R., Khirsagar, S.J., Bhalekar, M.R., Chahal, A.S., Targeted drug delivery to CNS using nanoparticles, *J. Adv. Pharm. Sci.*, 2(1), 179-191 (2012).

Du, M., Guo, B., Jia, D., Newly emerging applications of halloysite nanotubes: a review, *Polym. Int.*, 29, 574-582 (2010).

Duarte, H.A., Lourenço, M.P., Heine, T., Guimarães, L., Clay Mineral Nanotubes: Stability, Structure and Properties, In: *Stoichiometry and Materials Science - When Numbers Matter*, Alessio I., Norlida K., Intech Publiher, 1-24 (2012).

Dunne M, Corrigan OI, Ramtoola Z. Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles, *Biomaterials*, 21, 1659-1668 (2000).

Dustgania, A., Farahania, E.V., Imanib, M., Preparation of chitosan nanoparticles loaded by dexamethasone sodium phosphate, *Iranian J. Pharma. Sci.*, 4(2), 111-114 (2008).

Esfandyari-Manesh, M., Javanbakht, M., Dinarvand, R., Atyabi, F., Molecularly imprinted nanoparticles prepared by miniemulsion polymerization as selective receptors and new carriers for the sustained release of carbamazepine, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 23, 963-972 (2012).

Eşkazan, E., Tarihte Epilepsi Epileptolojinin Kısa Tarihçesi, In: *Epilepsi*, Bora, İ., Yeni, S.N., Gürses, C. (Eds), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 3-27 (2008).

Fu, X., Ding, Z., Zhang, X., Weng, W., Xu, Y., Liao, J., Xie, Z., Preparation of halloysite nanotube-supported gold nanocomposite for solvent-free oxidation of benzyl alcohol, *Nanoscale Res. Lett.*, 9(1), 282-286 (2014).

Galindo-Rodriguez, S.A., Puel, F., Briancon, S., Allemann, E., Doelker, E., Fessi, H., Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 25, 357-367 (2005).

Geigerseder, C., Doepner, R.F.G, Thalhammer, A, Krieger, A., Mayerhofer, A., Stimulation of TM3 Leydig cell proliferation via GABAA receptors: a new role for testicular GABA, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2, 13-25 (2004).

Ghebaour, A., Garea, S.A., Lovu, H., New polymer-halloysite hybrid materials-potential controlled drug release system, *Int. J. Pharm.*, 436, 568-573 (2012).

Goddard, A. W., Mason, G. F., Almai, A., Rothman, D. L., Behar, K. L., Petroff, O. A. C., Charney, D. S., Krystal, J. H., Reductions in occipital cortex GABA levels in panic disorder detected with 1H-Magnetic resonance spectroscopy, *Arch. Gen. Psychiatry*, 58(6), 556-561 (2001).

Gu, J., Xia, F., Wu, Y., Qu, X., Yang, Z., Jiang, L., Programmable delivery of hydrophilic drug using dually responsive hydrogel cages, *J. Control. Release*, 117, 396-402 (2007).

Guo, M., Wang, A., Muhammad, F., Qi., W., Ren, H., Guo, Y., Zhu, G., Halloysite nanotubes, a multifunctional nanovehicle for anticancer drug delivery, *Chin. J. Chem.*, 30, 2115-2120 (2012).

Gürsoy, A.Z., Kontrollü salım sistemleri, In: *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, A.Z. Gürsoy, (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 409-421 (2012).

Haskell, R.J., Physical characterization of nanoparticles, In: Nanoparticle Technology for Drug Delivery, R.B. Gupta, U.B. Kompella (Ed), Taylor & Francis Group, New York, 103-138 (2006).

Hayakawa, K., Masayuki, K., Yamori, Y., Role of the renal nerves in γ -aminobutyric acid-induced antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 524, 120–125 (2005).

Honary, S., Zahir, F., Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-A review (Part1), *Trop. J. Pharm. Res.*, 12 (2), 255-264 (2013).

http-1 U.S. Environmental Protection Agency List 4A-Minimal Risk Inert Ingredients, http://www.epa.gov/oppr001/inerts/section25b_inerts.pdf (03.10.2014).

http-2 GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID GRAS NOTICE, http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/807973A.pdf (08.10.2012).

http-3 GABA(56-12-2), [http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetail/CB3184042_EN .htm](http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetail/CB3184042_EN.htm) (17.09.2012).

http-4 Glutamate and GABA analysis, http://www.esainc.com/docs/spool/70-5020P_Glutamate_and_Gaba.pdf (08.05.2014).

http-5 Organoneuro Cerebral, http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9823112013 & pIdAnexo=1872937 (06.06.2014).

http-6 Gamma-Aminobutyric Acid Pharmaceutical and Health Care Products, <http://www.catalog.md/drugs-ingredients/gamma-aminobutyric-acid.html> (06.06.2014).

http-7 RAMAN FTIR GABA, <http://www.sigmaaldrich.com/spectra/rair/RAIR011782.PDF> (06.06.2014).

http-8 Rat Gamma-aminobutyric Acid (GABA) Elisa Kit, [http://www.cusabio.com/Instructions/CSB-E08368r_Rat_Gamma_aminobutyric acid, GABA_ELISA_Kit.pdf](http://www.cusabio.com/Instructions/CSB-E08368r_Rat_Gamma_aminobutyric_acid_GABA_ELISA_Kit.pdf) (07.04.2014).

Huisman, H., Wynveen, P., Nichkova, M., Kellermann, G., Novel ELISAs for screening of the biogenic amines gaba, glycine, β -phenylethylamine, agmatine, and taurine using one derivatization procedure of whole urine samples, *Anal. Chem.*, 6526-6533, 82 (2010).

ICH Topic Q2B, Validation of analytical procedures: Methodology, The European Agency for the evaluation of medicinal products, CPMP/ICH/281/95, Step 4, Consensus Guideline, 6 Kasım 1996.

ILAE (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy), Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes, *Epilepsia*, 30 (4), 389–399 (1989).

Jacobs, C., Kayser, O., Müller, R.H., Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide, *Int. J. Pharm.*, 196, 161–164 (2000).

Jiang, B., Fu, Y., Zhang, T., Gamma Aminobutyric Acid, In: *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceutical*, Yoshinori, M., Eunice, L., Bo, J., Blackwell Publishing Ltd. and Institute of Food Technologists, 121-133 (2010).

Kale, R., The Treatment Gap, *Epilepsia*, 43 (S6), 31-33 (2002).

Kamble, R., Ghag, M., Gaikawad, S., Panda, B.K., Halloysite Nanotubes and Applications: A Review, *J. Adv. Sci. Res.*, 3(2), 25-29 (2012).

Kang, X., Xiao, J., Huang, X., Gu, Z., Optimization of dansyl derivatization and chromatographic conditions in the determination of neuroactive amino acids of biological samples, *Clin. Chim. Acta*, 366, 352-356 (2006).

Kaş, H.S., Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklük Dağılımı, In: *Farmasötik Teknoloji*, Ayla Z., G. (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 69-84 (2012).

Kaş, H. S., İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler, In: *Kontrollü Salım Sistemleri*, Ayla Z., G. (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 65-102 (2002).

Kayaalp, O., Dalkara, T., Antiepileptik İlaçlar, In: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Oğuz, K. (Ed), Pelikan Yayıncılık, Ankara, 884-900 (2009).

Kayaalp, O., Uzbay, T., Santral Sinir Sistemi Farmakolojisinin Temelleri, In: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Oğuz, K. (Ed), Pelikan Yayıncılık, Ankara, 623-659 (2009).

Kaul, S., Faiman, M.D., Lunte, C.E., Determination of GABA, glutamate, dopamine and carbamathione in brain microdialysis samples by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced florescence (MEKC-LIF), *Anal. Methods*, 3, 1514-1520 (2011).

Ke, Y., Cohen, B.M., Bang, J.Y., Yang, M., Renshaw, P.F., Assesment of GABA concentration in human brain using two dimensional proton magnetic resonance spectroscopy, *Psychiat. Res.*, 1000, 169-178 (2000).

Khuhawar, M.Y., Rajper, A.D., Liquid chromatographic determination of γ -aminobutyric acid in cerebrospinal fluid using 2-hydroxynaphthaldehyde as derivatizing reagent, *J. Chromatogr. B*, 788, 413-418 (2003).

Krause, I., Bockhardt, A., Neckermann, H., Henle, T., Klostermeyer, H., Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives, *J. Chromatogr. A*, 715 (1), 67-79 (1995).

Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen H., Begley, D.J., Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles, *Pharm. Res.*, 20, 409-416 (2003).

Kriwet, B., Walter, E., Kissel, T., Synthesis of bioadhesive poly(acrylic acid) nano- and microparticles using an inverse emulsion polymerization method for the entrapment of hydrophilic drug candidates, *J. Control Release*, 56, 149-158 (1998).

Kroll, R.A., Pagel, M.A., Muldoon, L.L., Roman-Goldstein, S., Fiamengo, S.A., Neuwelt, E.A., Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood tumor barriers, *Neurosurgery*, 43(4), 879-886; discussion 886-9 (1998).

Kurupparachchi, M., Savoie, H., Lowry, A., Alonso, C., Boyle, R.W., Polyacrylamide nanoparticles as a delivery system in photodynamic therapy, *Mol. Pharmaceutics*, 8, 920-931 (2011).

Lai, X., Agarwal, M., Lvov, Y.M., Pachpande, C., Varahramyan, K. Witzmann, F.A., Proteomic profiling of halloysite clay nanotube exposure in intestinal cell co-culture, *J. App.Toxicol.*, 33, 1316-1329 (2012).

Landfester, K., Willert, M., Antonietti, M., Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions, *Macromolecules*, 33, 2370–2376 (2000).

Lee, J., Cho, E.C., Cho, K., Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(d,l-lactide)-blockpoly(ethylene oxide) micelles, *J. Control. Release*, 94, 323-335 (2004).

Lecouvet, B., Horion, J., D'haese, C., Bailly, C., Nysten, B., Elastic modulus of halloysite nanotubes, *Nanotechnology*, 24, 1-10 (2013).

Levis, S., Deasy, P.B., Characterization of halloysite for use as a microtubular drug delivery system, *Int. J. Pharm.*, 243, 125-134 (2002).

Levis, S.R., Deasy, P.B., Use of coated microtubular halloysite for the sustained release of diltiazem hydrochloride and propranolol hydrochloride, *Int. J. Pharm.*, 253, 145-157 (2003).

Li, Z., Li, Q., Simon, S., Güven, N., Borges, K., Youan, B-B. C., Formulation of spray-dried phenytoin loaded poly(ϵ -caprolactone) microcarrier intended for brain delivery to treat epilepsy, *J. Pharm. Sci.*, 96 (5), 1018-1030 (2007).

Lvov, Y.M., Shchukin, D.G., Möhwald, H., Price, R.R., Halloysite Clay Nanotubes for Controlled Release of Protective Agents, *ACS Nano*, 2(5), 814-820 (2008).

Lu, X., Xie, C., Gu, Z., Optimisation of fermentative parameters for GABA enrichment by *Lactococcus lactis*, *Czech J. Food Sci.*, 27, 433–442 (2009).

Mainardes, R.M., Evangelista, R.C, Praziquantel-loaded PLGA nanoparticles: preparation and characterization, *J. Microencapsul.*, 22, 13–24 (2005).

Malmsten, M., Degradation of surfactants and polymers in drug delivery, In: *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, M.Martin (ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, 293-317 (2002b).

Malmsten, M., Polymer particles, In: Surfactants and Polymers in Drug Delivery, M.Martin (ed), Marcel Dekker Incorporated, New York, 261-291 (2002a).

Mandal, S., Mandal, S.D., Design and development of carbamazepine mucoadhesive microemulsion for intranasal delivery: an ex-vivo study, Int J Pharm Sci Review Research, 3 (1), 56-60 (2010).

Mello, V.A., Ricci-Junior, E., Encapsulation of naproxen in nanostructured system: Structural characterization and in vitro release studies, Quim. Nova, 34(6), 933-939 (2011).

Messersmith, E.K., Redburn, D.A., The role of GABA during development of the outer retina in the rabbit, Neurochem. Res., 18, 463-470 (1993).

Mohanraj, V. J., Chen, Y., Nanoparticles- A Review, Trop. J. Pharm. Res., 5(1), 561-573 (2006).

Moinard-Chécot, D., Chevalier, Y., Briancon, S., Beney, L., Fessi, H., Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process, J. Colloid Interface Sci.. 317, 458–468 (2008).

Molnár-Perl, I., Bozor, I., Comparison of the stability and UV and fluorescence characteristics of the *o*-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and *o*-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents and those of their amino acid derivatives, J. Chromatogr. A, 798 (1-2), 37-46 (1998).

Monge-Acuña, A. A., Fornaguera-Trías, J., A high performance liquid chromatography method with electrochemical detection of gamma-aminobutyric acid, glutamate and glutamine in rat brain homogenates, J. Neurosci. Methods, 183, 176-181 (2009).

Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods, 65, 55-63 (1983).

Mousah, H., Jacqmin, P., Lesne, M., The quantification of gamma-aminobutyric acid in the cerebrospinal fluid by a radioreceptor assay, Clin. Chim. Acta, 170(2-3), 151-159 (1987).

Niwa, O., Kurita, R., Horiuchi, T., Torimitsu, K., Small-volume on-line sensor for continuous measurement of gamma-aminobutyric acid, *Anal. Chem.*, 70 (1), 89-93 (1998).

Olivier, J.C., Drug transport to brain with targeted nanoparticles, *NeuroRx*, 2(1), 108-119 (2005).

Onat, F., Epilepsinin Deneysel Modelleri, In: *Epilepsi*, İ.Bora, S.N. Yeni, C. Gürses (Eds), Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 37-43 (2008).

Ouyang, L, Wang, L., Schork, Synthesis and nucleation mechanism of inverse emulsion polymerization of acrylamide by RAFT polymerization: A comparative study, *Polymer*, 52, 63-67 (2011).

Öner, F., Süspansiyonlar, In: *Farmasötik Teknoloji-Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, A.Zırh Gürsoy (Ed), Aktif Matbaa ve Reklam Hizmetleri, İstanbul, 257-271, 2012.,

Pagar, K., Vavia, P., Rivastigmine-loaded l-lactide-depsipeptide polymeric nanoparticles: decisive formulation variable optimization, *Sci. Pharm.*, 81, 865-885 (2013).

Palaty, J., Burton, R., Abbott, F.S., Rapid assay for gamma-aminobutyric acid in mouse brain synaptosomes using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 662 (1), 85-90 (1994).

Panayiotopoulos, C.P., Principles of Therapy in the epilepsies (Çeviri Editörü, O.O. Erdinç), Springer, Londra, 1-43, 2011.

Panyam, J., Dali, M.M., Sahoo, S.K., Ma, W., Chakravarthi, S.S., Amidon, G.L., Levy, R.J., Labhasetwar V. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(,-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles, *J. Control Release*, 92, 173-187 (2003).

Panyam , J., Labhasetwar, V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 329-347 (2003).

Parkash, J., Kaur, G., Potential of PSA-NCAM in neuron-glia plasticity in the adult hypothalamus: Role of noradrenergic and GABAergic neurotransmitters, *Brain Res. Bull.*, 74, 317-328 (2007).

Patel, K.C., Pramanik, S., Formulation and characterization of mefenamic acid loaded polymeric nanoparticles, *World J. Pharmacy Pharm.Sci. (WJPPS)*, 3(6), 1391-1405 (2014).

Perugini, P., Simeoni, S., Scalia, S., Genta, I., Modena, T., Conti, B., Pavanetto, F., Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate, *Int. J. Pharm.*, 246, 37–45 (2002).

Petroff, O.A.C., Rothman, D. L., Behar, K. L., Mattson, R. H., Low brain GABA level is associated with poor seizure control, *Ann. Neurol.*, 40, 908–911 (1996).

Potineni, A., Lynn, D.M., Langer, R., Amiji, M.M., Poly(ethylene oxide)-modified poly(α -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive biodegradable system for paclitaxel delivery, *J. Control. Release* 86, 223–234 (2003).

Rada, P., Tucci, S., Teneud, L., Paez, X., Perez, J., Alba, G., García, Y., Sacchettoni, S., Corral, J., Hernandez, L., Monitoring γ -aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B*, 735, 1-10 (1999).

Rainesalo, S., GABA and glutamate in Human Epilepsies Studies on the Platelet Model, *Doktora Tezi*, University of Tampere, Medical School Tampere University Hospital, Department of Neurology and Rehabilitation, Finlandiya (2004).

Rao, J. P., Geckeler, K. E., Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Prog. Polym. Sci.*, 36, 887-913 (2011).

Rawtani, D., Agrawal, Y.K., Multifarious application of halloysite nanotubes: A review, *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 30, 282-295 (2012).

Reis, C.P., Neufeld, R.J., Riberio, A.J., Veiga, F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2, 8-21 (2006).

Reisi, P., Alaei, H., Babri, S., Sharifi, M.R., Mohaddes, G., Soleimannejad, E., Determination of the extracellular basal levels of glutamate and GABA at dentate gyrus of streptozotocin-induced diabetic rats, *Pathophysiology*, 16, 63-66 (2009).

Rothman, D.L., Petroff, O.A.C., Behar, K.L., Mattson, R.H., Localized ^1H MNR measurements of γ -aminobutyric acid in human brain in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 5662-5666 (1993).

Salazar, C., Armenta, J.M., Shulaev, V., An UPLC-ESI-MS/MS assay using 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl carbamate derivatization for targeted amino acid analysis: Application to screening of *Arabidopsis thaliana* mutants, *Metabolites*, 2, 398-428 (2012).

Sanacora, G., Gueorguieva, R., Epperson, C. N., Wu, Y. T., Appel, M., Rothman, D. L., Krystal, J. H., Mason, G. F., Subtype-specific alterations of gamma-aminobutyric acid and glutamate in patients with major depression, *Arch. Gen. Psychiatry*, 61, 705-713 (2004).

Sanchez-Fernandez, A., Paras-Pena, L., Cue-Sampedro, R., Vidaltamayo, R., Mendoza, A., Riojas, P., Synthesization, characterization, and in vitro evaluation of cytotoxicity of biomaterials based on halloysite nanotubes, 1st International Electronic Conference on Materials, 26 May-10 June, Online Conference Switzerland, 1-8 (2014).

Sandberg, M., Weber, S.G., Techniques for neuropeptide determination, *Trends. Analyt. Chem.*, 22(8), 522-527 (2003).

Schmidt, D., Löscher, W., Plasma and cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid in neurological disorders, *J. Neurol. Neurosur. Ps.*, 45, 931-935 (1982).

Shah, R.B., Khan, M.A., Nanopharmaceuticals: Challenges and Regulatory Perspective, In: *Nanotechnology in Drug Delivery*, M.M. Viliers, P. Aramwit, G.S. Kwon (Eds), Springer AAPS Press, New York, 621-646 (2009).

Shameli, K., Ahmad, M.B., Jazayeri, S.D., Sedaghat, S., Shabanzadeh, P., Jahangirian, H., Mahdavi, M., Abdollahi, Y., Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method, *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 6639-6650 (2012).

Sherwin, A. L., Neuroactive amino acids in focally epileptic human brain: a review, *Neurochem. Res.*, 24(11), 1387-1395 (1999).

Shilpa, J., Roshni, B.T., Chinthu, R., Paulose, C.S., Role of GABA and serotonin coupled chitosan nanoparticles in enhanced hepatocyte proliferation, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 23(12), 2913-2921 (2012).

Shin, S-B., Cho, H-Y., Kim, D-D., Choi, H-G., Lee, Y-B., Preparation and evaluation of tacrolimus-loaded nanoparticles for lymphatic delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 74, 164-171 (2010).

Silva, D. M. F., Ferraz, V. P., Ribeiro, Â. M., Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain, *J. Neuro. Sci.*, 177, 289–293 (2009).

Sisodiya, S.M., Lin, W.R., Harding, B.N., Squier, M.V., Thom, M., Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy, *Brain*, 125, 22-31 (2002).

Solmaz, İ, Guinea-piglerde Pentilentetrazol ile Oluşturulan Epilepsi Modeli ve Melatoninin Antiepileptik Aktivitesi, Uzmanlık Tezi, Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara, Türkiye (2005).

Sun, W., Xie, C., Wang, H., Hu, Y., Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain, *Biomaterials*, 3065-3071 (2004).

Sun, W., Wang, H., Xie, C., Hu, Y., Yang, X., Xu, H., An attempt to directly trace polymeric nanoparticles in vivo with electron microscopy, *J. Control. Release*, 115 (3), 259-265 (2006).

Suresh, D.M., Sajan, D., Laladas, K.P., Joe, I.H., Jayakumar, V.S., Vibrational spectra of gamma-aminobutyric acid, *Proceedings of the AIP Conference*, 24-28 February, Thiruvananthapuram, 1075 (2008).

Şahiner, T., Epilepside Temel Mekanizmalar, In: *Epilepsi*, Bora, İ., Yeni, S.N., Gürses, C. (Eds), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 29-36 (2008).

Tırnaksız, F., Sterilizasyon, In: *Modern Farmasötik Teknoloji*, Füsün A., İlbeyi, A., Nevin, Ç., Tuncer, D., Zelihagül, D., Tanver, D., Sevgi, T., Figen. T., (Eds), Fersa Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 63-87 (2009).

Tosi, G., Costantino, L., Rivasi, F., Ruozi, B., Leo, E., Vergoni, A.V., Tacchi, R., Bertolini, A., Vandelli, M.A., Forni, F., Targeting the central nervous system: In vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with Loperamide and Rhodamine-123, *J. Control. Release*, 122, 1-9 (2007).

Tunç, S., Duman, O., The effect of different molecular weight of poly(ethylene glycol) on the electrokinetic and rheological properties of Na-bentonite suspensions, *Colloids. Surf. A. Physicochem. Eng. Asp.*, 37, 93-99 (2008).

Ueda, Y., Doi, T., Nagatomo, K., Tokumaru, J., Takaki, M., Willmore, L.J., Effect of levetiracetam on molecular regulation of hippocampal glutamate and GABA transporters in rats with chronic seizures induced by amygdalar FeCl₃ injection, *Brain Res.*, 1151, 55-61 (2007).

Vamecq, J., Feutelais, Y., Maurois, P., Sghaier, M., Dichi, E., German-Fattal, M., Herrenknecht, C., Gressens, P., Cecchelli, R., Dehouck, L., Stables, J. P., Pagès, N., Legendre, B., Bac, P., Engineering a GABA endowed with pharmacological CNS activity when given by an extracerebral route, *Med. Chem. Res.*, 18(4), 255-267 (2008).

Vanderhoff, J.W., El Aasser, M.S., Ugelstad, J., Polymer emulsification process, US Patent 4,177,177 (1979).

Vasanits, A., Molna' r-Perl, I., Temperature, eluent flow-rate and column effects on the retention and quantitation properties of phenylthiocarbamyl derivatives of amino acids in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 832, 109-122 (1999).

Veerabadran, N.G., Mongayt, D., Torchilin, V., Price, R.R., Lvov, Y.M., Organized shells on clay nanotubes for controlled release of macromolecules, *Macromol. Rapid Commun.*, 30, 99-103 (2009).

Veerabadran, N.G., Price, R.R., Lvov, Y.M., Clay nanotubes for encapsulation and sustained release of drugs, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2(2), 115-120 (2007).

Vergaro, V., Abdullayev, E., Lvov, Y.M. Zeitoun, A., Cinolani, R., Rinaldi, R., Leoportti, Cytocompatibility and uptake of halloysite clay nanotubes, *Biomacromolecules*, 820-826 (2010).

Vergaro, V., Lvov, Y.M., Leoporatti, S., Halloysite Clay Nanotubes for Resveratrol Delivery to Cancer Cells, *Macromol. Biosci.*, 12, 1265-1271 (2012).

Vergoni, A.V., Tosi, G., Tacchi, R., Vandelli, M.A., Bertolini, A., Constantino, L., Nanoparticles as drug delivery agents specific for CNS: in vivo biodistribution, *Nanomed.-Nanotechnol.*, 5, 369-377 (2009).

Vino, S., Abinaya, A., Diva, V., Ghosh, A.R., Controlled release of phenytoin sodium from casein microparticles, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 5(2), 233-241 (2014).

Viseras, M.-T., Aguzzi, C., Cerezo, P., Cultrone, G., Viseras, C., Supramolecular structure of 5-aminosalicylic acid/halloysite composites, *J. Microencapsul.*, 26 (3), 279-286 (2009).

Wang, Q., Zhang, J., Zheng, Y., Wang, A., Adsorption and release of ofloxacin from acid- and heat-treated halloysite, *Colloid. Surface B.*, 113, 51-58 (2014).

Wei, W., Minullina, R., Abdullayev, E., Fakhrullin, R., Mills, D., Lvov, Y., Enhanced efficiency of antiseptics with sustained release from clay nanotubes, *RSCAdv.*, 4, 488-492 (2014).

Wen, Z., Yan, Z., Hu, K., Pang, Z., Cheng, X., Guo, L., Zhang, Q., Jiang, X., Fang, L., Lai, R., Odorranalectin-conjugated nanoparticles: Preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on Parkinson's disease following intranasal administration, *J. Control Release*, 151, 131-138 (2011).

White, R.D., Bavykin, D.V., The stability of halloysite nanotubes in acidic and alkaline aqueous suspensions, *Nanotechnology*, 23(6), 1-10 (2012).

Wong, H.L., Wu, X.Y., Bendayan, R., Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64(7), 686-700 (2011).

Wilson, B., Lavanya, Y., Priyadarshini, S.R.B., Ramasamy, M., Jenita, J.L., Albumin nanoparticles for the delivery of gabapentin: Preparation, characterization and pharmacodynamic studies, *Int. J. Pharm.*, 473, 73-79 (2014).

Wilson, B., Samanta, M.K., Santhi, K., Kumar, K.P.S., Parakrishnan, N., Suresh, B., Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles, *Eur J Pharm Biopharm*, 70, 75-84 (2008).

Yadav, H.K.S., Nagavarma, B.V.N., Ayaz, A., Vasudha, L.S, Shivakumar, H.G, Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review, Asian J. Pharm. Clin. Res., 5(3), 16-23 (2012).

Yang, W., Lei, Z., Hu, Y., Chen, X., Fu, S., Investigations of the thermal properties, nucleation kinetics, and growth of γ -aminobutyric acid in aqueous ethanol solution, Ind. Eng. Chem. Res., 49, 11170-11175 (2010).

Yeni, S.N., Epilepsi İnsidansı, Prevelansı ve Risk Faktörleri, In: Epilepsi, Bora, İ., Yeni, S.N., Gürses, C. (Eds), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 65-72 (2008).

Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., Enstrümental Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 177-201, 1997.

Zhang, G., Brown, A.W., The rapid determination of γ -aminobutyric acid, Phytochemistry, 44, 1007-1009 (1997).

Zhang, G., Niu, A., Peng, S., Jiang, M., Tu, Y., Li, M., Wu, C., Formation of novel polymeric nanoparticles, Acc. Chem. Res., 34, 249-256 (2001b).

Zhang, Q., Shen, Z., Nagai, T., Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats, Int. J. Pharm, 218, 75-80 (2001a).

Zhang, D., Song, X., Liang, F., Li, Z., Liu, F., Stability and phase behaviour of acrylamide-based emulsions before and after polymerization, J. Phys. Chem. B, 110, 9079-9084 (2006a).

Zhang, Z., Grijpma, D.W., Feijen, J., Poly(trimethylene carbonate) and monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles for the controlled release of dexamethasone, J. Control. Release, 111, 263-270 (2006b).

Zhao, X.-E., Suoa, Y.-R., Simultaneous determination of monoamine and amino acid neurotransmitters in rat endbrain tissues by pre-column derivatization with high-performance liquid chromatographic fluorescence detection and mass spectrometric identification, Talanta, 76, 690-697 (2008).

Zou, M., Du, M.L., Zhu, H., X., C.S., F., Y.Q., Green synthesis of halloysite nanotubes supported Ag nanoparticles for photocatalytic decomposition of methylene blue, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 45 (32), 1-7 (2012).



T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIBBİ VE CERRAHİ DENEYSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ
(TİCAM)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 05. 04. 2012
TOPLANTI SAYISI	: 46
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 265
KARAR NUMARASI	: 265
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof.Dr. E. Yasemin YAZAN
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Araş.Gör. Gülsel YURTDAS Prof.Dr. Yusuf MENCELOĞLU Prof.Dr. Kevser EROL Yrd. Doç.Dr. Engin YILDIRIM
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: Wistar (erkek)

Anadolu Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Prof.Dr. E. Yasemin YAZAN**'ın araştırma yürütücüsü olduğu 265/2012 kayıt numaralı ve “**Epileptik mekanizmaya müdahale edecek nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve in vivo davranışının değerlendirilmesi**” konulu çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerekçede belirtildiği şekilde yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNES (Üye)

Prof. Dr. Ömür ELÇİOĞLU (Üye)

Prof. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

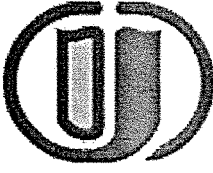
Yrd. Doç. Dr. Ünal OZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani DEMİRCİ (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)



GEREKÇE

Anadolu Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi **Prof.Dr. E. Yasemin YAZAN**'ın araştırma yürütücüsü olduğu 265/2012 kayıt numaralı ve "Epileptik mekanizmaya müdahale edecek nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi ve in vivo davranışının değerlendirilmesi" konulu çalışma; tarafımızdan değerlendirilmiştir.

Çalışmada Ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen 40 adet Rattus norvegicus (Wistar) kullanılacaktır.

In vivo hayvan deneyleri ile formülasyonların etkinliği değerlendirilecektir.

Çalışmada epilepsi oluşturmak için, pentilentetrazol (PTZ) kullanılacaktır. Gerçekleştirilecek in vivo deneyler literatürde çoğunlukla rastlandığı gibi sıçanlar üzerinde yapılacaktır (2,3). Hayvanlar havalandırma, ısıtma ve 12 saat gece-12 saat gündüz olacak şekilde ışığı ayarlanmış hayvan bakım odasında tel kafeslerde 22°C oda sıcaklığında barındırılacaklardır. Hayvanlarda yapılan tüm işlemler hijyenik koşullarda gerçekleştirilecektir. Kafeslerde 4 hayvan olacak şekilde barındırılacaklar ve yeteri kadar standart yem ve su almaları sağlanacaktır. PTZ intraperitoneal olarak 60 mg/kg dozda uygulanarak konvülsiyon oluşturulacaktır (4). Kullanılacak GABA, GABA baskılanmış MIP ve GABA-T baskılanıp uzaklaştırılmış boş MIP, PTZ uygulamasından 60 dakika önce intraperitoneal yolla verilecektir. PTZ uygulandıktan sonra hayvanlar 30x30x40 cm'lik pleksiglas kutulara alınarak 30 dakika süreyle izlenecektir. Konvülsiyonların değerlendirilmesi açısından, myoklonik sıçramaların başlama latensi, jeneralize tonik klonik konvülsiyonların süresi ve kıvrınma refleksi kaybı değerlendirilecektir.

Deney grupları:

• **Pozitif kontrol grubu:** % 0.9 sodyum klorür

• **Kontrol (negatif) grubu:** Boş MIP

• **Grup 1:** GABA

• **Grup 2:** GABA baskılanmış MIP'ler

• **Grup 3:** GABA-T baskılanmış ve ardından uzaklaştırılmış boş MIP'ler'in uygulanması şekli ile tasarlanmıştır.

Çalışma sonunda hayvanlar hafif eter anestezisi altında dekapite edilerek beyinleri çıkarılacak ve sıvı azot içine alınarak biyokimyasal analiz için -80°C de saklanacaktır. Daha sonra beyin dokusunda biyokimyasal değerlendirme yapılacaktır. Gruplardan örnekler mikrodializ yöntemi ile toplanacaktır (5). GABA-T'nin analizi ELİSA kitleri yardımıyla plate okuyucuda gerçekleştirilecektir. GABA analizi ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) ile gerçekleştirilecektir (6).

In vitro toksisite testleri için primer nöron kültürü sistemi kullanılacak ve toksisite MTT testi ile değerlendirilecektir. Primer serebellar granül hücreleri 1 günlük Sprague Dawley sıçanlardan hazırlanacaktır. Yavru dekapite edildikten sonra serebellum çıkarılacak ve 5 mL kalsiyumsuz Hank's dengeli tuz (HBSS) çözeltisi içine alınacaktır. Buna 2 mL tripsin %25-EDTA %0.02 eklenerek 37°C de 40 dakika inkübe edilecektir (7). Fetal sıçır serumu içeren 5 mL DMEM çözeltisi eklenerek tripsinin etkisi sonlandırılacaktır. 3 dakika 800 rpm'de santrifüj edildikten sonra süspansiyon bir kez 5 mL DMEM ile yıkandıktan sonra pastör pipetiyle homojenize edilip Poli-D-lizin kaplı DMEM içeren besi ortamına ekilerek hücrelerin tutunması sağlanacaktır.

2-3 gün sonra ortama 10µM sitozin arabinozid eklenerek non-nöronal hücrelerin uzaklaştırılması için 24 saat inkübe edildikten sonra tekrar besi yeri değiştirilerek nöronal hücrelerin üremesi sağlanacaktır. Bu şekilde üretilen hücreler iki hafta sonra tripsin ile toplanıp santrifüj edildikten sonra DMEM içinde tekrar Poli-D-lizin kaplı 96'lık plaklara ekilerek 2-3 gün burada yerleşip üremesi sağlandıktan sonra toksisite testi için MTT testi uygulanacaktır. Sonuçlar ELISA ile değerlendirilecektir.

Kullanılan yöntemler uluslararası standardı olan yöntemlerdir. Gerekli literatürler verilmiştir. Çalışmanın yapılmasında, Komisyonumuzun olumsuz görüşü bulunmamaktadır.

EK 2

17th International Pharmaceutical Technology Symposium

September 8 - 10, 2014
The Marmara Hotel
Antalya // Turkey

Pharmaceutical Nanotechnology:
Innovations, Therapeutic Possibilities,
Technological Challenges

Current Status, Future Directions and
Regulatory Aspects of
Biotechnology and Biosimilar
Products
Dry Powder Inhalers
Medical Devices & CE Authorization



Special Industry Session

Reimbursement of Pharmaceuticals

P 77

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF GABA LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES

G. Yurtdaş Kırımlıoğlu¹, Y. Menceloğlu²,
Y. Yazan¹

¹ Anadolu University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Technology, Eskişehir
² Sabancı University, Faculty of Engineering and
Natural Sciences, İstanbul

INTRODUCTION

Epilepsy is one of the most common neurological diseases worldwide. Generalized or paroxysmal focal reaction of brain is called "epilepsy" (1). In the studies performed on epilepsy, inhibition of γ -aminobutyric acid (GABA) synthesis, blockage of release or postsynaptic reaction were determined to provoke convulsions. Decrease in GABA concentration was determined in both the cerebrospinal fluid and brain nerve terminals even in febril convulsions and patient-resistant epilepsy treatment. It was also reported that convulsion, coma and death can be observed by means of reduction in the concentration of GABA (1,2).

Even though there are different approaches for the treatment of epilepsy, incorporation of GABA into unique polymeric nanoparticles (PNP) prepared with reverse emulsion polymerization was aimed in this study depending on the most recent theory related to GABA. In other words, development of brain-targeted, nanosized, nontoxic, biocompatible, highly specific and high affinity formulations was the purpose of the study.

In the present study, GABA loaded nanoparticles were prepared using N,N-methylenebisacrylamide (NMBAC) and polymeric surfactant by inverse emulsion polymerization method. Furthermore, *in vitro* characterization studies were performed on polymeric nanoparticles including particle size, thermal (DSC) studies, X-ray diffraction (XRD) analysis and drug loading studies.

MATERIALS AND METHODS

Materials

GABA was purchased from Sigma. Polymeric surfactant with a quat group was synthesized uniquely using a confidential method. All other chemicals used were analytical grade.

Preparation of Polymeric Nanoparticles

Reverse emulsion polymerization method was used to load GABA into PNPs. GABA loaded nanoparticles were synthesized by mixing aqueous solution (2 mL) containing NMBAC and GABA with n-hexan solution containing the polymeric surfactant. Nanoparticle synthesis was initiated by azobisisobutyronitrile (AIBN). Emulsion was then stirred under nitrogen for 30 min and the reaction was continued for 3 hours at 60°C. Following completion of polymerization, solvent was removed and the particles were washed twice with n-hexan. After filtration, nanoparticles were dried at an oven of 50°C.

Formulations were prepared using different amounts of the surfactant and keeping other components constant. Formulation components and ratios are summarized in Table 1. Dispersions containing 1 %, 2 %, 3 %, 0.25 % and 0.5 % polymeric surfactant were used for polymerization and formulations were named as PNP-4, PNP-5, PNP-6, PNP-7 and PNP-8, respectively.

Table 1. Components and molar ratios of GABA loaded polymeric nanoparticles

Formulation components	Molar ratio
Active agent (GABA)	0.2
Crosslinking agent (NMBAC)	0.2
Polymeric surfactant	1

Characterization of Polymeric Nanoparticles

Particle Size Analysis

Mean particle size of PNPs was measured at room temperature by photon correlation spectroscopy (PCS). GABA loaded PNP formulations were diluted with demineralized water. Accordingly, results were given as mean diameters and polydispersity indices (PDI) as a measure of particle size distribution.

Thermal Analysis

DSC analysis was used to characterize the thermal behavior of the GABA, empty polymeric nanoparticles and GABA loaded polymeric nanoparticles. DSC thermograms were obtained using an automatic thermal analyzer system DSC-60 (Shimadzu, Japan). Samples were crimped in standard aluminum pans and heated from 50°C to 300°C at a heating rate of 10°C/min under constant nitrogen flow of 30 mL/min. An empty pan, sealed in the same way as the sample, was used as a reference.

X-Ray Diffraction Analysis

XRD patterns were determined for GABA, empty polymeric nanoparticles and GABA loaded polymeric nanoparticles. Samples were exposed to a monochromatic nickel-filtered copper radiation (40kV, 30 mA) in a wide-angle X-ray diffractometer with 2θ angle.

Drug Loading

PNP formulations were dissolved in 50 % methanol. Following 30 min of ultrasonication at 50°C and extraction procedure, the mixture was filtered through a 0.22 mm polyamide filter. Derivation reaction was performed on the supernatant prior to injection to HPLC (Schimadzu 20-A, Japan) column to analyze GABA.

RESULTS AND DISCUSSION

Particle Size Analysis

Mean particle sizes and PDIs of polymeric nanoparticles prepared are shown in Table 2.

Table 2. Mean particle sizes and PDIs of polymeric nanoparticles (SE: Standard Error) (n=3)

Polymeric Nanoparticles	Mean Particle Size ± SE	PDI ± SE
PNP-4	169.400 ± 15.041	0.420 ± 0.051
PNP-5	236.500 ± 8.806	0.230 ± 0.010
PNP-6	334.500 ± 7.360	0.560 ± 0.070
PNP-7	283.200 ± 13.585	0.475 ± 0.030
PNP-8	250.500 ± 9.469	0.410 ± 0.030
PNP-14 (empty)	154.500 ± 15.561	0.326 ± 0.047

Thermal Analysis

DSC thermograms obtained are given in Figure 1.

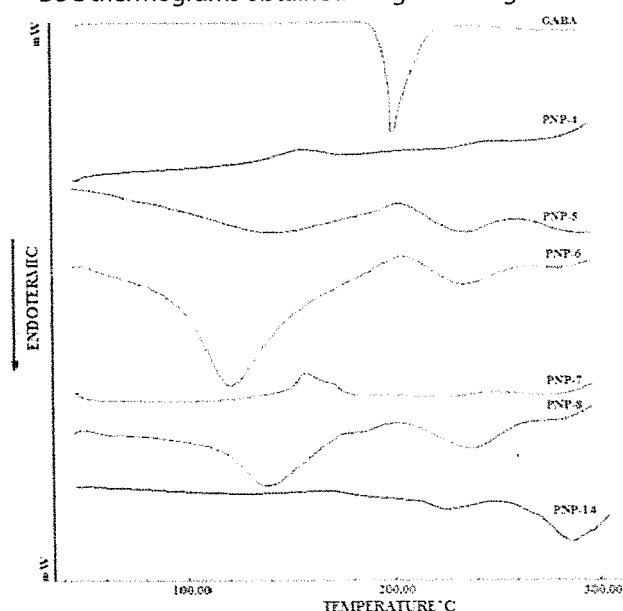


Figure 1. DSC thermograms of GABA, empty and loaded polymeric nanoparticles

X-Ray Diffraction Analysis

X-ray diffraction patterns of GABA, empty and loaded polymeric nanoparticles are demonstrated in Figure 2.

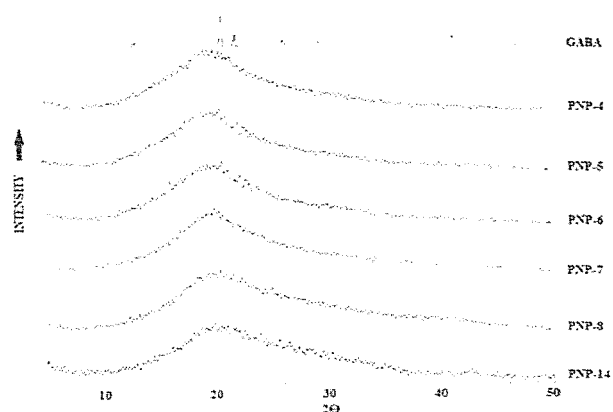


Figure 2. X-ray diffraction patterns GABA, empty and loaded polymeric nanoparticles

Drug Loading

Drug loading efficiencies of the formulations prepared are shown in Table 3.

Table 3. Drug loading efficiencies of polymeric nanoparticle formulations (SE: Standard Error) (n=3)

Polymeric Nanoparticles	Drug Loading (%) ± SE
PNP-4	2.177 ± 0.256
PNP-5	2.006 ± 0.347
PNP-6	1.894 ± 0.457
PNP-7	2.185 ± 0.512
PNP-8	2.182 ± 0.313

CONCLUSION

GABA loaded polymeric nanoparticles were prepared by reverse emulsion polymerization method. Particle size of all formulations were found to be in the nanoscale range. Drug loading of 2 % was obtained for the formulations prepared. DSC and XRD studies did not reveal any crystalline drug material in the freshly prepared nanoparticles.

In this context, surface morphology, cytotoxicity and *in vitro* release of GABA from polymeric nanoparticles prepared are being investigated for further analyses.

REFERENCES

- Şahiner, T., Epilepside Temel Mekanizmalar, In: Epilepsi, Bora, İ., Yeni, S.N., Gürses, C. (Eds), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 29-36 (2008).
- Brodie, M.J., Schachter, S.C., Kwan, P.K.L., Epilepsy (Fast Facts), Health Press, 2008.