

**KARVEDİLOL İÇEREN KATI LİPİT NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI
ve *IN-VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Zeynep KİPRİYE

Eskişehir, 2017

**KARVEDİLOL İÇEREN KATI LİPİT NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI ve *İN VİTRO*
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Zeynep KİPRİYE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Mayıs, 2017

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1502S061 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Zeynep Kipriye'nin "Karvedilol İçeren Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması ve *İn-Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 24/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı-Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yard. Doç.Dr.Evrim YENİLMEZ	
Üye :	Doç.Dr. Müge KILIÇARSLAN	
Üye :	Prof. Dr. E. Yasemin YAZAN	

Prof. Dr. Dilek AK

Enstitü Müdürü

ÖZET

KARVEDİLOL İÇEREN KATI LİPİT NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI ve *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Zeynep KİPRİYE

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mayıs, 2017

Danışman: Yard. Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ

Bu tez çalışmasının amacı, oral olarak uygulanan katı lipit nanopartikül taşıyıcı sisteminin hazırlanması, seçici olmayan beta(β)-adrenerjik ve alfa1(α_1)-reseptör antagonisti özelliği olan, kalp yetmezliği (KY) ve miyokard infarktüsü (Mİ) sonrası tedavide klinik etkinliği kanıtlanmış bir etkin madde olan Karvedilol'ün sisteme eklenmesi, kontrollü salım gösteren yeni ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesi ve *in vitro* salım çalışmalarının yapılmasıdır.

Karvedilol, α_1 , β_1 ve β_2 adrenerjik reseptör blokajı özelliği olan bir adrenerjik reseptör blokörüdür. Karvedilolün organ koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Karvedilol etkili bir antioksidandır ve reaktif oksijen radikallerini ortadan kaldırır. Karvedilol rasemiktir ve hem R (+), hem de S (-) izomerlerinin α_1 adrenerjik reseptör blokajı ve antioksidan özellikleri vardır. Karvedilolün insan damar düz kas hücreleri üzerine antiproliferatif etkisi vardır. Hafif veya ciddi kalp yetmezliği hastalarında ventrikül fonksiyonunu düzelttiği, mortalite ve morbiditeyi azalttığı çalışmalarda kanıtlanmıştır. Bu nedenle kalp yetmezliği hastalarında standart tedavi seçeneği olarak düşünülmelidir.

Bu çalışmada, Karvedilol içeren katı lipit nanopartikül (KLN) sistemi geliştirilmiştir. Formülasyonda, katı lipit olarak Dynasan[®] 114, yüzey etkin madde olarak Tween[®] 80 kullanılmıştır. KLN sistemlerinde lipit yapıların değişmediği X-ışını kırınım (XRD), diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), infrared (IR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) analizleri ile kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karvedilol, Katı Lipit Nanopartikül, Antihipertansif, Sürekli Salım

ABSTRACT
PREPARATION and *IN VITRO* EVALUATION of
SOLID LIPID NANOPARTICLE FORMULATIONS
CONTAINING CARVEDILOL

Zeynep KİPRIYE

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, May, 2017

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Evrim YENİLMEZ

The aim of this thesis study is to prepare orally applicable solid lipid nanoparticle (SLN) delivery system, to add the carvedilol which is a drug substance proven clinical effectiveness after heart failure (HF) and myocardial infarction (MI) to the system, to improve of new drug delivery system which is showing controlled release and to do *in vitro* release studies.

Carvedilol is an α_1 , β_1 and β_2 adrenergic receptor with an adrenergic blocking properties. Carvedilol has been shown that the organ protective effects. Carvedilol eliminates an effective antioxidant and reactive oxygen radicals. Carvedilol is racemic, and both R (+) and S (-) isomer of the α_1 adrenergic receptor blockade and has antioxidant properties. Carvedilol has antiproliferative effects on human vascular smooth muscle cells. Mild or severe heart failure improves ventricular function in patients that have been proven in studies to reduce mortality and morbidity. It must therefore be considered as the standard treatment option for patients with heart failure.

In this study, SLN system containing carvedilol was developed. In the SLN system, Dynasan[®] 114 was used as the solid lipid, while Tween[®] 80 was used as the surfactant. Lipid structures of SLNs were verified to be unchanged by the X-ray diffraction (XRD), differential scanning calorimetry (DSC), infrared (IR) and nuclear magnetic resonance (NMR) analyses.

Key Words: Carvedilol, Solid Lipid Nanoparticle, Antihypertensive, Sustained Release

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde, teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara dek bütün süreçlerde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, bana büyük bir anlayışla yaklaşan, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, sadece çalışmalarım boyunca değil tez çalışmalarımın dışında da benden yardımlarını, bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Yard.Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ'e,

Yüksek lisansıma başladığım ilk günden itibaren her türlü olanağı sağlayan, bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof.Dr. Yasemin YAZAN'a,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarım sırasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Prof.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e ve çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm değerli hocalarım, Yard.Doç.Dr. Gülay BYKKROğLU'na, Doç.Dr. Ebru BAşARAN'a, Yard.Doç.Dr. Murat Sami BERKMAN'a, Yard.Doç.Dr. Gsel YURTDAş KIRIMLIOğLU'na,

Sitotoksisite çalışmasında bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen çok sevgili hocam Araş.Gör.Dr. Behiye şENEL'e ,

Çalışmalarımda bana çok destek olan, bilgi birikiminden ve tecrübelerinden yararlandığım arkadaşım Araş.Gör. Ahmet Alper ÖZTÜRK'e

Beni bugünlere getiren ve hiçbir zaman yalnız bırakmayan, maddi manevi her türlü imkanı sağlayan, her koşulda yanımda olarak beni destekleyen ve yreklendiren, anlayışlı ve fedakar aileme,

Çalışmalarım boyunca ilgisini ve anlayışını benden hiç esirgemeyen, bu zorlu sürecimde yanımda olarak bana her zaman büyük bir anlayışla destek ve yardımcı olan eşime,
sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Zeynep KİPRIYE

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Katı Lipit Nanopartiküller.....	2
2.1.1. Tanımı ve genel özellikleri	2
2.1.2. KLN'lerin üstünlükleri.....	3
2.1.3. KLN'lerin sakıncaları.....	3
2.1.4. KLN'lerin genel içerikleri	4
2.1.5. KLN'lerin hazırlanma yöntemleri.....	6
2.1.5.1. Yüksek basınçta homojenizasyon yöntemi	6
2.1.5.1.1. Sıcak homojenizasyon.....	6
2.1.5.1.2. Soğuk homojenizasyon	7

2.1.5.2. Mikroemülsiyon yöntemi	7
2.1.5.3. Çözücüyle çöktürme yöntemi	8
2.1.5.4. Yüksek hızda karıştırma (yüksek devirli homojenizasyon) veya ultrasonikasyon yöntemi.....	8
2.1.6. KLN'lerin hazırlanmasında karşılaşılabilen problemler	9
2.1.7. KLN'lerin kararlılığı	9
2.1.7.1. Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon).....	9
2.1.7.2. Püskürterek kurutma	10
2.1.8. KLN'lerin karakterizasyonu.....	10
2.1.8.1. Partikül boyutu	10
2.1.8.2. Zeta potansiyel	11
2.1.8.3 . Lipit matrisin yapısı, tekrar kristallenme özellikleri ve dispersiyondaki diğer kolloidal yapıların varlığı.....	11
2.1.9. KLN'lere etkin madde yüklenmesi ve yükleme kapasitesi.....	12
2.1.9.1. Eritilmiş lipit içinde etkin maddenin çözünürlüğü	13
2.1.9.2. Katı lipit matrisin kimyasal yapısı	13
2.1.9.3. Lipit matrisin polimorfik yapısı	13
2.1.10. KLN'lerden etkin madde salımı	13
2.1.11. KLN'lerin sterilizasyonu	14
2.1.12. KLN'lerin toksisitesi	14
2.1.13. KLN'lerin oral uygulanması	15
2.2. Karvedilol	15
2.2.1. Farmakolojik özellikleri	16
2.2.2. Farmakokinetik özellikleri.....	16
2.2.3. KL'nin kimyası	17

2.2.4. Antihipertansif etki ve KL	20
2.2.4.1. Kullanılışı ve maksimum doz sınırları	21
2.2.4.2. Gebelik kategorisi	22
2.2.4.3. Uyarılar	22
3. GEREÇLER	23
3.1. Kullanılan maddeler	23
3.2. Kullanılan cihazlar	24
4. YÖNTEMLER	26
4.1. Formülasyon geliştirme	26
4.1.1. Önformülasyon çalışmaları.....	26
4.1.2. KL yüklü KLN formülasyon çalışması	30
4.1.3. KL ve diğer maddeler ile yapılan çalışmalar	31
4.1.3.1. Termal analiz.....	31
4.1.3.2. X-ışını kırınım analizi	31
4.1.3.3. İnfrared (FT-IR) analizi	31
4.1.3.4. NMR	32
4.1.3.5. Parçacık şekli ve yüzey özelliği	32
4.2. Analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları	32
4.2.1. Analitik yöntem geliştirme	32
4.2.2. Validasyon çalışmaları	33
4.2.2.1. Doğrusallık	33
4.2.2.2. Kesinlik	33
4.2.2.3. Doğruluk	33
4.2.2.4. Seçicilik	33
4.2.2.5. Duyarlılık	34

4.2.3. KLN karakterizasyonuna ait çalışmalar	34
4.2.3.1. Parçacık boyutu ve dağılımı analizi	34
4.2.3.2. Zeta potansiyel	34
4.2.3.3. Parçacık şekli ve yüzey özellik.....	35
4.2.3.4. Termal analiz.....	35
4.2.3.5. X-Işını kırınımı	35
4.2.3.6. İnfrared (FT-IR) analizi	35
4.2.3.7. NMR.....	35
4.2.3.8. Formülasyonda etkin madde miktar tayini	35
4.2.3.9. <i>İn vitro</i> salım çalışması	36
4.2.3.10. Kararlılık çalışması.....	37
4.2.3.11. Farmakokinetik model çalışması.....	37
4.2.3.12. Sitotoksisite çalışması	37
5. BULGULAR.....	39
5.1. KL ve yardımcı maddeler ile yapılan çalışmalar	39
5.1.1. Termal analiz.....	39
5.1.2. X-ışını kırınım analizi.....	39
5.1.3. İnfrared (FT-IR) analizi.....	40
5.1.4. NMR.....	41
5.1.5. Parçacık şekli ve yüzey özelliği	43
5.2. KL miktar tayini için YBSK.....	43
5.2.1. Doğrusallık	43
5.2.2. Kesinlik	45
5.2.3. Doğruluk.....	47
5.2.4. Duyarlılık.....	49

5.2.5. Seçicilik	49
5.3. KLN özelliklerine ait çalışma.....	51
5.3.1. KL'nin katı lipitte çözünürlük çalışması	51
5.3.2. Parçacık boyutu ve dağılım analizi	53
5.3.3. Zeta potansiyel	53
5.3.4. Formülasyonda etkin madde miktar tayini.....	54
5.3.5. <i>İn vitro</i> salım çalışması	54
5.4. Kararlılık çalışması.....	55
5.4.1. Parçacık boyutu ve dağılım analizi	55
5.5. Farmokokinetik model çalışması.....	56
5.6. <i>İn vitro</i> sitotoksisite çalışması.....	56
6. TARTIŞMA	59
6.1. Formülasyon hazırlanmasında kullanılan maddelerle ve formülasyonlarla yapılan çalışmalar.....	59
6.2. Analitik yöntem geliştirme ve validasyon.....	61
6.3. Kararlılık çalışması ve enkapsülasyon oranı	62
6.4. <i>İn vitro</i> salım çalışması ve kinetik modelleme	62
6.5. Sitotoksisite çalışması	63
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKÇA.....	66
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	KLN formülasyonunda sıklıkla kullanılan lipitler	4
Çizelge 2.2.	KLN formülasyonunda sıklıkla kullanılan YEM ve yardımcı YEM'ler.....	5
Çizelge 2.3.	Beta-reseptör blokörü olan KL'nin farmakolojik profili	16
Çizelge 2.4.	KL'e ait bazı bilgiler	19
Çizelge2. 5.	KL içeren ticari müstahzarlara örnekler	19
Çizelge 2.6.	KL için günlük olağan doz sınırları ve günde kaç kez verileceği	21
Çizelge 2.7.	KL için maksimum doz sınırları	21
Çizelge 2.8.	KL için dikkat edilmesi gereken uyarılar	22
Çizelge 4.1.	Dynasan® 114 içeren KLN önformülasyon çalışmasındaki formülasyon	27
Çizelge 4.2.	Stearik Asit/Compritol® ATO 888 içeren KLN önformülasyon çalışmasındaki formülasyon	28
Çizelge 4.3.	KL yüklü Dynasan® 114 içeren KLN formülasyonu	30
Çizelge 4.4.	Optimum plasebo ve KL yüklü Dynasan® 114 içeren KLN formülasyonu	31
Çizelge 4.5.	YBSK çalışma koşulları	32
Çizelge 5.1.	Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler ve alan değerleri.....	43
Çizelge 5.2.	50 µg.mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları.....	44
Çizelge 5.3.	100 µg.mL ⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları.....	45
Çizelge 5.4.	150 µg.mL ⁻¹ Derişim için Kesinlik Sonuçları.....	45
Çizelge 5.5.	KL'nin YBSK ile elde edilen doğruluk değerleri	47
Çizelge 5.6.	Etkin maddeli/maddesiz KLN formülasyonunun ortalama parçacık	

boyutu ve dağılımı	52
Çizelge 5.7. F3 formülasyonunun ortalama zeta potansiyel değeri.....	53
Çizelge 5.8. KLN formülasyonuna ait % Enkapsülasyon Etkinliği	53
Çizelge 5.9. F3 formülasyonuna ait kararlılık çalışması sonuçları.....	54
Çizelge 5.10. Saf etkin madde ve formülasyonlara ait salım kinetikleri.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Üç etkin madde yükleme modeli.....	12
Şekil 2.2. KL'nin moleküler yapısı	18
Şekil 2.3. KL'nin 3D moleküler yapısı.....	18
Şekil 5.1. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin termogramları.....	38
Şekil 5.2. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin X-Işını kırınım profilleri	39
Şekil 5.3. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin FT-IR spektrumları	40
Şekil 5.4. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin ¹ H-NMR spektrumları.....	41
Şekil 5.5. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin SEM görüntüleri	42
Şekil 5.6. KL'nin YBSK analizine ait standart eğri ve doğrusallık eşitliği.....	43
Şekil 5.7. KL'ye ait YBSK kromatogramı	48
Şekil 5.8. Hareketli faza ait YBSK kromatogramı	49
Şekil 5.9. Salım ortamına ait YBSK kromatogramı	49
Şekil 5.10. Plasebo formülasyona ait YBSK kromatogramı	50
Şekil 5.11. <i>İn vitro</i> salım çalışması.....	54
Şekil 5.12. KL yüklü KLN'lerin sitotoksosite profilleri.....	56

GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 5.1. KL'nin Dynasan® 114'deki çözünürlük denemesi	51
Görsel 5.2. KL'nin Compritol® ATO 888'deki çözünürlük denemesi	51
Görsel 5.3. KL'nin Stearik asit'deki çözünürlük denemesi	52

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AF	: Atriyal fibrilasyon
AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
AIC	: Akaike bilgi kriteri
$CDCl_3$: Dötero kloroform
CL	: Carvedilol
Compritol [®] 888 ATO	: Gliserol Dibehepat
dk	: Dakika
DLVO	: Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek Teorisi
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
Dynasan [®] 114	: Trimiristin
ESR	: Elektron Spin Rezonans
F1	: 1. formülasyon
F2	: 2. formülasyon
F3	: 3. formülasyon
F4	: 4. formülasyon
FBS	: Fötal Sığır Serumumu
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
GI	: Gastrointestinal
GRAS	: Genellikle Güvenli Kabul Edilen
HF	: Heart Failure
HLB	: Hidrofilik-Lipofilik Denge
IR	: İnfrared (Kızılötesi)
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
İSE	: İntrinsik Sempatomimetik Etkinlik (Parsiyel Agonist Etki)
i.v.	: İntravenöz
k	: Hız Sabiti
KL	: Karvedilol
KLN	: Katı Lipit Nanopartikül

kV	: Kilovolt
KY	: Kalp Ketersizliği
LD	: Lazer Işığı Kırınımı Cihazı
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Miktar Tayini Sınırı
M	: Molar
m	: Eğim
mA	: Miliamper
MHz	: Megahertz
mg	: Miligram
Mİ	: Miyokard İnfarktüsü
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MTT	: Tetrazolyum Tuzu Testi
mV	: Milivolt
NLT	: Nano-yapılı Lipit Taşıyıcı
ng	: Nanogram (10^{-9} g)
nm	: Nanometre (10^{-9} m)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PCS	: Foton Korelasyon Spektroskopisi
PDI	: Polidisperslik İndisi
PEG	: Polietilenglikol
pH	: Hidrojen Gücü (Power of Hydrogen)
PVP	: Polivinilprolidon
r^2	: Determinasyon Katsayısı
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	: Standart Hata
SIF	: Simüle Edilmiş Bağırsak Vasatı
SLN	: Solid Lipid Nanoparticle
SS	: Standart Sapma
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
Tween [®] 80	: Polioksietilensorbitan monooleat

UV	: Ultraviyole
VY	: Veri Yok
XRD	: X-ışını Kırınımı
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
YEM	: Yüzey Etkin Madde
Y/S	: Su içinde yağ
α	: Alfa
β	: Beta
Θ	: Teta
μg	: Mikrogram (10^{-6} g)
μl	: Mikrolitre (10^{-6} L)
μm	: Mikrometre (10^{-6} m)
μs	: Mikro Siemens
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat Derece
%EE	: Enkapsilasyon Etkinliği
$^1\text{H NMR}$: Proton Nükleer Manyetik Rezonans

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kontrollü ilaç salımı için yaygın olarak araştırılan kolloidal taşıyıcı sistemler yapılarına özel çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptirler. Polimer yapılı nanopartiküller yavaş bozunmaları, üretimleri sırasında kullanılan organik çözücüler, endüstriyel ölçekte üretimlerinin sınırlı olması ve otoklav ile sterilizasyonlarının sınırlı olması gibi olumsuzluklara sahiptir; lipozomlar ise, nispeten daha düşük fizikokimyasal kararlılığa sahiptirler ve büyük ölçekte üretimleri için uygun yöntem de bulunmamaktadır.

Son yıllarda, KLN'lerin diğer kolloidal taşıyıcı sistemlere alternatif bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımları için pek çok çalışma gerçekleştirilmektedir. Kolloidal taşıyıcıların avantajlarını bir arada barındıran ve dezavantajlarını en aza indiren katı lipit nanopartiküllerin kolloidal taşıyıcı sistem olarak kullanımları giderek artmaktadır.

Karvedilol seçici olmayan β -bloke edici maddedir ve aynı zamanda reseptörde bloke edici özelliğinden dolayı vazodilatördür. Karvedilol hipertansiyonlu hastalarda yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra anjin ve konjestif kalp yetmezliği olan hastalarda da etkindir. İyi tolere edilebilir ve nispeten az sayıda yan etkisi mevcuttur. Diğer beta-bloker ilaçlarla karşılaştırıldığı zaman karvedilol daha olumlu sonuçlar elde edilmesine yardımcı olabilecek özellikleri de mevcuttur. Karvedilolün etkinliği, yalnızca kalp yetmezliğinde değil bunun yanında koroner arter hastalığı, inme, böbrek yetersizliği, diabetes mellitus ve atriyal fibrilasyon (AF) gibi hastalıklarda da kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada, kontrollü salım özelliğine sahip β -adrenerjik ve α_1 -reseptör antagonisti özelliği olan, KY ve Mİ sonrası tedavide klinik etkinliği bulunan yeni bir ilaç formülasyonu geliştirmek amaçlanmıştır. Düşük biyoyaralanıma ve kısa yarı ömüre sahip etkin maddenin KLN'ler ile kontrollü salım yapması hedeflenmektedir. Hazırlanacak formülasyonların karakterizasyonları, kararlılıkları, sitotoksiteleri ve *in vitro* salımları yapılarak formülasyon etkinlikleri değerlendirilecektir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Katı Lipit Nanopartiküller

2.1.1. Tanımı ve genel özellikleri

KLN'ler, 1991 yılında mevcut olan kolloidal sistemlere alternatif olarak bulunan, yağ/su emülsiyonundaki sıvı yağın katı lipitle değiştirilmesi sonucu oluşan katı nanopartiküllerdir [1,2]. KLN'ler kolloit boyutta olan ve yüzeylerinde tek tabaka halinde fosfolipit molekülü bulunduran bir katı hidrofobik çekirdekten oluşan, yapı olarak lipozom ve nanopartikül arasında olan, etkin madde taşıyıcısı olarak kullanılan ve yüksek basınçla homojenizasyon (sıcak ve soğuk homojenizasyon), mikroemülsiyon, çözücüyle çöktürme ve yüksek hızda karıştırma (ultrasonikasyon) yöntemleriyle hazırlanabilen katı parçacıklardır [3,4].

KLN'ler, parenteral, oral, oküler ve topikal olarak uygulanabilen, parçacık boyutu 50-1000 nm arasında olan, otoklavda sterilize edilebilen, fiziksel kararlılığı yüksek olan, kontrollü ve sürekli salım sağlayan taşıyıcılardır [4]. Nanometre boyutundaki partiküller olan KLN'ler, oda ve vücut sıcaklığında katı halde olan lipitler ile hazırlanırlar ve yüzey etkin maddeler (YEM) ile kararlı hale getirilirler [5, 6]. YEM olarak kullanılan maddelere lesitinler, poloksamerler, etoksillenmiş monogliseridler ve polisorbantlar örnek olarak verilebilir [1, 7]. KLN'lerin avantajlarına, kolloidal büyüklükte olmaları, biyolojik olarak uyumlu olmaları, hidrofilik ve hidrofobik etkin maddelerin yüklenebilmesini, üretim için gerekli aletlerin basit olması, sterilize edilmesinde problem oluşmaması, dondurarak kurutulabilir olmaları, organik çözücülerin genellikle kullanılmamasından dolayı biyotoksitesinin olmaması, büyük ölçekli üretimi, kolay hazırlanabilir olması ve maliyeti düşük formülasyon ajanlarına sahip olması sayılabilir. Dezavantajlarına ise, hazırlama yöntemi olarak kullanılan sıcak homojenizasyon tekniğindeki yüksek sıcaklığın her etkin madde için uygun olmayışı, hazırlanan yüksek konsantrasyonlarda YEM ve yardımcı YEM kullanım ihtiyacı olması sayılabilir [4,7].

KLN'ler fizyolojik lipitlerden oluştuğu için polimerik nanopartiküllerde gözlenen akut ve kronik toksisite riski azaldığı gibi metabolize olmaları ve uzaklaştırılmaları için organizmada uygun yollar bulunmaktadır. KLN'lerin üretiminde kullanılan lipitler ve YEM'ler, tablet, pellet ve kapsül gibi konvansiyonel ilaç

şekillerinde de kullanılmaktadır ve güvenli (GRAS (Generally Recognized As Safe) olarak kabul edilmektedirler [8].

2.1.2. KLN'lerin üstünlükleri

KLN'ler; diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerin sağladığı avantajları içerirler. Yağ emülsiyonlarının avantajlarından olan toksik organik çözücü kalıntısı içermemeleri ve endüstriyel ölçekte üretimlerinin olması; lipozomların avantajlarından olan dokulara etkin madde hedeflenebilmesi; katı polimerik nanopartiküllerin avantajlarından olan katı lipit matrisleri sayesinde kontrollü etkin madde salımı ve kimyasal bozunmaya karşı etkin maddenin korunması gibi avantajlara da sahiptirler [1, 9].

Avantajları:

- Sulu dispersiyonları kararlıdır ve diğer kurutma yöntemlerine ek olarak dondurarak veya püskürterek kurutulabilir,
- Hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar içerisine hapsedilebilir,
- Sterilizasyonlarında problem oluşmaz,
- Hazırlama sırasında fizyolojik bileşiklerin kullanılması nedeniyle toksikolojik olarak kabul edilebilirdir,
- Biyotoksisiteye sahip değildir, akut ve kronik toksisite göstermez,
- Üretimde organik çözücü kullanılmadığı için organik çözücü kalıntısı içermez,
- Kolloidal büyüklüktedir,
- Büyük ölçekte üretimleri gerçekleştirilebilir,
- Kontrollü salım ve ilaç hedeflemesi gerçekleştirilebilir,
- Etkin madde kararlılığı yüksektir,
- Toplam üretim maliyeti diğer ilaç taşıyıcı sistemlere göre düşük olduğu için ekonomik olarak kabul edilebilir [1, 4, 7, 10, 11].

2.1.3. KLN'lerin sakıncaları

Dezavantajları:

- İlaç yükleme kapasiteleri nispeten düşüktür,
- Saklanma esnasında polimorfik geçişler olabilir ve böylece ilaç katı lipitten dışarı sızabilir,
- Ortamda farklı kolloidal yapılar da bulunabilir [6, 7, 12].

2.1.4. KLN'lerin genel içerikleri

KLN'ler katı lipit, YEM ve su fazından oluşmaktadırlar. KLN'lerin "Nano-yapılı Lipit Taşıyıcılar" (NLT) adında yeni nesil bir lipit nanopartikül türeği geliştirilmiştir. NLT'lerde 3 farklı yapılanmadan sözedilebilir. Katı ve sıvı yağların yapılarındaki farklılık ve kristalizasyon sürecinde oluşan düzensiz matriks yapı, ilaç molekülleri için boşluk oluşturmaktadır (Tip 1). Genel olarak, sıvı yağlarda ilaç çözünürlüğü katı lipitlere göre daha yüksektir. Sıvı yağ/katı lipit/su modelinde ilacın sıvı yağdaki çözünürlüğü artarken, katı lipit kısmında da ilaç lokalizasyonu sağlanır (Tip 2). Lipit yapının amorf halde olmasının kristalizasyon sonucu etkin maddenin matriksten dışarı sızmasını önlediği de gösterilmiştir (Tip 3) [13-15].

Lipit terimi trigliseritleri, kısmi gliseritleri, yağ asitlerini, steroidleri ve mumları içermektedir. Sıvı yağ olarak miglyol, oleik asit, soya yağı gibi sıvı yağlar kullanılmaktadır.

Yüklerine ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak tüm YEM sınıfları lipit dağılımını dayanıklı hale getirmek için kullanılabilir. YEM seçiminin, sistemin veriliş yoluna da bağlı olduğu saptanmıştır [11, 16]. KLN dispersiyonları % 10–20 lipit, % 1–5 YEM ve gerekli ise sulu fazda koruyucu içerir. Hidrofobik etkin maddeler ile hapsedilme oranı % 0.8 - % 9.8 arasındadır [1].

Yaygın olarak kullanılan lipit çeşitleri Çizelge 2.1'de, YEM ve yardımcı YEM çeşitleri ise Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. KLN formülasyonunda sıklıkla kullanılan lipitler

Lipit
Trigliserit
Trikaprin
Trilaurin
Tripalmitin
Tristearin
Hidrojenize koko-gliseridi (Softisan® 142)
Katı yağ
Witepsol® W 35
Witepsol® H 35
Witepsol® H 42

Çizelge 2.1. (Devam) KLN formülasyonunda sıklıkla kullanılan lipitler

Witepsol® E 85
Gliseril monostearat (Imwitor® 900)
Gliseril dibehenat (Compritol® 888 ATO)
Gliseril palmitostearat (Precirol® ATO 5)
Setil palmitat
Stearik asit
Palmitik asit
Dekanoik asit
Behenik asit

Kaynak: [11].

Çizelge 2.2. KLN formülasyonunda sıklıkla kullanılan YEM ve yardımcı YEM'ler

YEM ve yardımcı YEM
Soya lesitini (Lipoid® S 75, Lipoid® S 100)
Yumurta lesitini (Lipoid® E 100)
Fosfotidilkolin (Epikuron® 170, Epikuron® 200)
Poloksamer® 188, 182, 407
Poloksamin® 908
Hidrojenize koko-gliseridi (Softisan® 142)
Tiloksapol
Polisorbat® 20, 60, 80
Sodyum kolat, Sodyum glikolat
Taurokolik asit sodyum tuzu
Butanol
Butirik asit
Monooktilfosforik asit sodyum

Kaynak: [16].

Compritol® 888 ATO, gliserol monobehenat (% 12-18 a/a), gliserol dibehenat (% 45-54 a/a) ve gliserol tribehenat (% 28-32 a/a) karışımından oluşan katı bir lipittir. Erime sıcaklığı 69-74°C arasındadır. Hidrofilik-Lipofilik Denge (HLB) değeri yaklaşık

olarak 2'dir. Fiziksel olarak ince beyaz toz ya da yarı katı pellet halinde bulunur. Compritol® 888 ATO, etkin madde enkapsülasyonunda, tablet ya da kapsül formülasyonunda kaydırıcı olarak ve matris tablette sürekli salım sağlayan madde olarak kullanılır [17].

Dynasan® 114, katı lipiti piyasada hazır olarak bulunan di- ve trigliseridin kimyasal karışımıdır. Dynasan® 114 (trimiristin, gliseril trimristat) % 4-5 digliserit ve % 95 trigliserit karışımından oluşur. Fiziksel olarak ince beyaz toz halinde olan maddenin erime sıcaklığı 55-58°C arasındadır. Dynasan® 114 modifiye veya sürekli salım yapan ilaç taşıyıcı sistemde ve tablet ya da kapsül formülasyonunda kaydırıcı olarak kullanılır [18].

2.1.5. KLN'lerin hazırlanma yöntemleri

KLN'ler, yüksek basınçta homojenizasyon (sıcak ve soğuk homojenizasyon), mikroemülsiyon, çözücüyle çöktürme ve yüksek hızda karıştırma (ultrasonilasyon) yöntemleriyle hazırlanabilirler [4,19].

2.1.5.1. Yüksek basınçta homojenizasyon yöntemi

Bu yöntemde yüksek basınçlı homojenizatörler kullanılır ve bu homojenizatörler sıvıya mikron büyüklüğündeki delikten geçmesi için yüksek basınç (100-2000 bar) uygulayarak sıvıyı iterler ve böylece sıvı kısa mesafede çok yüksek hıza (1000 km/saat'in üzerinde) sahip olur. Çok yüksek kayma stresi ve kaviteasyon kuvvetlerinden dolayı parçacıklar mikron altı büyüklüğe parçalanırlar. Homojenizasyon yöntemi ile KLN üretimi için kullanılan lipit miktarı % 5 ile % 10 arasında değişir [7,11].

2.1.5.1.1. Sıcak homojenizasyon

Bu yöntem, lipitin erime derecesinin üzerindeki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Böylece emülsiyonun homojenizasyonu gerçekleşir. Lipit erime sıcaklığının 5-10 °C üzerine getirilir ve etkin madde bu lipit içerisinde dağıtılır ya da çözündürülür. Etkin madde içeren bu eriyik, aynı sıcaklığa getirilen sıcak su ile karıştırılmış YEM içerisinde dağıtılır. Hazırlanan önemülsiyona homojenizatör işlemi uygulanır. Bu uygulama sonrasında elde edilen sıcak su içinde yağ (Y/S) nanoemülsiyonu oda sıcaklığında soğutulur. Oda sıcaklığında soğutulan lipit katılaştır (rekristalize) ve böylece KLN'ler elde edilir [19,20]. Tekrar kristallenme liyofilizasyon ile ve püskürterek kurutma

yöntemleriyle de başlatılabilir. KLN'lerin sulu dispersiyonları püskürterek kurutma yöntemi ile kuru toz haline getirilerek daha uzun süre saklanabilir [21].

Sıcak homojenizasyon tekniğinin en büyük dezavantajı yüksek sıcaklık uygulanması nedeniyle yüksek sıcaklığa duyarlı maddelere uygulanamamasıdır. Maddeler homojenizatörden geçerken oluşan sürtünme kuvvetlerinin etkisiyle sistem yaklaşık 10 °C daha fazla ısınır ve böylece etkin madde bozunmasına bağlı olarak kararlılık sorunları oluşabilir. Bu nedenle bu maddeler soğuk homojenizasyon tekniğiyle hazırlanırlar. Yüksek sıcaklığa duyarlılığı düşük maddeler, yüksek sıcaklığa maruz kalınan sürenin çok kısa olması nedeniyle bu yöntemle hazırlanabilirler [2,4,15].

2.1.5.1.2. Soğuk homojenizasyon

Bu yöntemde etkin madde içeren lipit eriği soğutulur, 50-100 µm boyutunda mikropartiküller halinde öğütülür ve soğuk halde bulunan YEM çözeltisi içerisinde dağıtılır. Elde edilen ön-süspansiyon oda sıcaklığında veya oda sıcaklığının altında homojenize edilir. Sonuçta KLN'ler elde edilir [15]. Bu yöntem lipitin erimesini önler veya en aza indirirken, hidrofilik ilaçların sulu fazda kaybını da engeller. Hidrofilik ilaçların kaybını daha da azaltmak için ilacın çözünürlüğünü azaltan yağ ve polietilenglikol (PEG) 600 kullanılır [4].

Her iki homojenizasyon tekniği de %40'a kadar lipit içeren işlem yapmak için uygundur ve genel olarak bu yöntem dar parçacık büyüklüğü dağılımları vermektedir [22].

2.1.5.2. Mikroemülsiyon yöntemi

Mikroemülsiyonlar berrak, YEM'in yanında yardımcı YEM içeren, hidrofilik ve hidrofobik fazlardan oluşan sistemlerdir. Mikroemülsiyonlar suya eklenince lipit faz küçük partiküller halinde dibe çöker. Mikroemülsiyonların bu özelliğinden yararlanılarak KLN hazırlama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde önce oda sıcaklığında katı halde bulunan lipit erime sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta eritilir. Su, YEM ve yardımcı YEM karışımı lipitle aynı sıcaklığa getirilir ve erimiş lipite karıştırılarak eklenir. Böylece termodinamik olarak dayanıklı, ışığı geçiren mikroemülsiyon oluşturulur. Oluşan mikroemülsiyon, aşırı miktardaki soğuk sulu (2-3 °C) ortamda dağıtılarak KLN'ler oluşturulur [15,19].

2.1.5.3. Çözücüyle çöktürme yöntemi

Bu yöntemde; lipit, sulu fazda emülsifiye edilmiş, su ile karışmayan organik bir çözücüde (toluen, kloroform, sikloheksan vb) çözündürülür. Kullanılan organik çözücü vakum altında uçurulur ve lipit nanopartikül dağılımları oluşarak sulu fazda çöker [6,15]. Bu yöntemle 25-100 nm boyutlarına sahip partiküler sistemler elde edilir. Çöktürme yönteminin bir üstünlüğü, hazırlanma sırasında sıcaklık uygulanmamasıdır. Bu nedenle, yüksek sıcaklıkta bozulma olasılığı olan etkin maddelerin yüklenmesi için uygun bir yöntemdir. Yöntemin dezavantajı ise, organik çözücü kullanılmasıdır [15]. Buna ek olarak, bu yöntem ile üretimin ölçek büyütme işleminin gerçekleştirilmesinde de problemler ortaya çıkmaktadır. Bu yöntem ile elde edilen ürünün ortalama parçacık büyüklüğü, organik fazdaki lipitin konsantrasyonuna bağlıdır [7].

Trotta vd. çalışmalarında çözücü difüzyon tekniğini kullanmışlardır. Bu teknik ile düşük toksisiteye sahip çözücüleri ve YEM'leri kullanmışlar ve gliserin monostearat nanopartiküllerini hazırlamışlardır. Benzil alkol veya bütül laktat kullanılarak çözücüyle çöktürme yöntemiyle KLN üretimini gerçekleştirmişlerdir [23].

2.1.5.4. Yüksek hızda karıştırma (yüksek devirli homojenizasyon) veya ultrasonikasyon yöntemi

Bu yöntemde, lipit ve etkin madde birlikte, lipitin erime sıcaklığından 5-10 °C daha yüksek bir sıcaklıkta eritilir ve bu eriyen lipit etkin madde karışımı aynı sıcaklıktaki sulu YEM çözeltisiyle yüksek devirde karıştırılır [15]. Genellikle bu yöntemler birlikte kullanılmaktadır [19]. Bu yöntemin en büyük avantajı yaygın olarak kullanılabilir olması ve basit olmasıdır. Yöntemin dezavantajlarına ise, hazırlama esnasında oluşabilen mikropartiküllerin parçacık büyüklüğü dağılımını genişletmesi sonucunda saklama esnasında partikül büyümesi gerçekleşmesi, buna bağlı olarak da fiziksel dayanıklılığın bozulması ve kullanılan karıştırıcıdan dolayı metal kontaminasyonunu gözlenebilirliği sayılabilir [15,19]

Hou ve ark. yaptıkları çalışmada, KLN üretiminde kullanmak için, modifiye yüksek hızda homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntem organik çözücüye olan ihtiyacı ortadan kaldırmıştır ve böylece üretilen KLN'lerin kalitesi artarak, basit ve uygun bir yöntem geliştirmişlerdir [24].

2.1.6. KLN'lerin hazırlanmasında karşılaşılabilen problemler

Karşılaşılabilecek başlıca problemlere,

- Yüksek basınçta homojenizasyon yönteminde gerçekleşebilen, yüksek basınçla indüklenen etkin maddenin bozunması,
- Lipitin aşırı soğutulması, lipit polimorfları arası geçişlerin oluşması, lipit nanopartiküllerinin şekil değişimi veya KLN dispersiyonunun viskoz bir jele dönüşmesi sonucu lipitin kristalizasyonu,
- Bir çok koloidal türün bir arada bulunabilmesi sayılabilir [19].

2.1.7. KLN'lerin kararlılığı

KLN'ler uzun süreli fiziksel ve kimyasal kararlılığından dolayı koloidal ilaç taşıyıcı olarak kullanılmaktadırlar [25]. Yapılan çalışmalarda optimize edilen KLN'lerin parçacık büyüklüklerinin 12-36 ay boyunca değişmediği gösterilmiştir. Fakat, bu sonuç tüm KLN dispersiyonları için geçerli değildir. Bazı durumlarda kısa sürede parçacık büyüklüğünde artış olabilmektedir [7]. Ayrıca, hidrolize hassas etkin maddelerde kimyasal kararlılık sorunları gözlenmektedir [25].

İlacın saklanması sıvı koloidal dispersiyon formunun kuru toz formuna dönüştürülmesi, katı haldeki ürünün daha iyi kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahip olmasından dolayı yararlıdır. Bununla birlikte, KLN granülleri katı dozaj şekli olarak kullanılabilir, tablet haline basılabilirler veya pelletler içine hapsedilebilirler [19-21].

KLN dispersiyonu iki şekilde kuru toz formuna dönüştürülebilir [19]:

1. Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon)
2. Püskürterek kurutma

2.1.7.1. Dondurarak kurutma (Liyofilizasyon)

KLN formülasyonu içerisindeki maddelerin kimyasal dayanıklılığa sahip olması ve kristal büyümesine engel olacak dar partikül boyutu aralığına sahip olması istenmektedir. KLN dispersiyonlarının deney aşamasında en az 6 ay kararlı olması gerekmektedir. Fakat, bir çok KLN formülasyonunun bu süre içerisinde bozunduğu, çok kısa sürede de partikül boyutunda büyümenin gerçekleştiği gözlenmektedir [15].

KLN'lerin saklama sırasında fiziksel ve kimyasal kararlılığını arttırmak için liyofilizasyon yöntemi kullanılmaktadır. KLN'leri katı forma dönüştürmek parçacıkların büyümesine engel olmakta ve hidroliz reaksiyonlarını engellemektedir [12,15]. Lipit içeriğinin %5'i geçmemesi liyofilizasyon ile partikül boyutunun artmaması için önemlidir [19].

Partikül büyüklüğünde oluşacak büyümeyi engellemek için kullanılacak kriyoprotektan (koruyucu) maddelere örnek olarak sorbitol, mannitol, trehaloz, glikoz, polivinilprolidon (PVP) ve dekstran sayılabilmektedir [15].

2.1.7.2. Püskürterek kurutma

Püskürterek kurutma yöntemi liyofilizasyona alternatif olarak geliştirilen bir yöntemdir. Liyofilizasyona göre daha ucuz bir yöntem olmasına rağmen püskürterek kurutma yönteminin yüksek sıcaklık ve kayma kuvveti içermesi ve buna bağlı olarak partiküllerin çarpışma hızlarının artması ve agregasyon eğiliminin yüksek olması KLN formülasyonunun kurutulmasında çok fazla tercih edilmemektedir [19].

2.1.8. KLN'lerin karakterizasyonu

2.1.8.1. Partikül boyutu

Partikül boyutu koloidal taşıyıcı sistemler için çok önemli bir fizikokimyasal özelliktir. KLN hazırlarken izlenen yöntem basamakları partikül büyüklüğünü etkiler [19]. Partikül büyüklüğünün tayininde, Foton Korelasyon Spektroskopisi (PCS) ve Lazer Işığı Kırınımı (LD) kullanılan en etkili yöntemlerdir. Partikül boyutu tayininde Coulter sayacı da kullanılsa da, bu yöntemde kullanılan elektrolitlerin koloidal dispersiyonların kararlılığını düşüreceğinden çok fazla tercih edilmemektedir [15].

PCS ve LD yöntemleri partikülleri doğrudan ölçmemektedir. Işığın dağılımına bağlı olarak partikül boyutu hesaplar. Fakat Taramalı ya da transmisyon elektron mikroskopları (SEM ya da TEM) ise boyut hakkında doğrudan bilgi vermektedir [2,15].

KLN'lerin şekillerinin belirlenmesinde Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM) ve Elektron Mikroskopu kullanılabilir [1].

2.1.8.2. Zeta potansiyel

Zeta potansiyel, koloidal dispersiyonun saklanması sırasındaki kararlılığı hakkında bilgi vermektedir. Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) teorisi'ne göre, koloidal bir dağılımda partiküller üzerinde elektrostatik itme ve van der Waals çekme kuvvetleri vardır. Elektrostatik itme kuvvetleri parçacığın yüzey potansiyeline bağlıdır ve zeta potansiyel ile doğru orantılıdır. Partiküller yüksek negatif ya da pozitif zeta potansiyele sahiplerse birbirlerini itme eğilimi gösterirler. Böylece agregat oluşumu daha az olup dispersiyon daha dayanıklı olmaktadır [12,15].

Zeta potansiyel ölçülmesi için zeta potansiyel analiz cihazı ya da zetametre kullanılabilir. KLN dispersiyon örneğinin zeta potansiyel ölçümü için KLN dispersiyonunu dispersiyon ortamı ile 50 kat seyreltmek gerekmektedir. Zeta potansiyel ölçümü saklama koşulundaki kararlılığın araştırmasında önemlidir [12].

2.1.8.3 . Lipit matrisin yapısı, tekrar kristallenme özellikleri ve dispersiyondaki diğer koloidal yapıların varlığı

Yapılan çalışmalarda KLN kalitesini belirlemek için, parçacık boyutu analizi tek başına yeterli bir parametre değildir. Lipit matrisin modifikasyonu ve lipitin kristalizasyon durumu da önemlidir [6-11]. Çünkü lipitin yapısındaki değişiklik, lipit matristeki etkin madde enkapsülasyonunu ve etkin maddenin salım hızını doğrudan ilgilendirir [6,12].

Partiküllerin boyutuna ve YEM'lerin varlığına bağlı olarak, lipit kristalizasyonu ve polimorflar arası geçiş geciktirilebilmektedir. DSC ve XRD, lipitin durumunu incelemek için sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. DSC, lipit modifikasyonlarının farklı erime noktalarına ve farklı enerjilere sahip olması esasına dayanır. XRD yöntemi ile lipit yapısındaki kısa ve uzun boşluklar belirlenebilmektedir [11, 15, 26]. Bu yöntemler dışında lipitlerin yapısal özelliklerini araştırmak için IR Spektroskopisi ve Raman spektroskopisi yöntemleri de kullanılmaktadır. Ayrıca sadece lipit değil, etkin maddenin fiziksel durumu ve yerleşimi de DSC ve XRD cihazları ile tayin edilebilmektedir. Etkin madde içeriğinin lipitin kristal özelliklerine etkisi, özellikle XRD cihazı ile incelenebilmektedir [1,7].

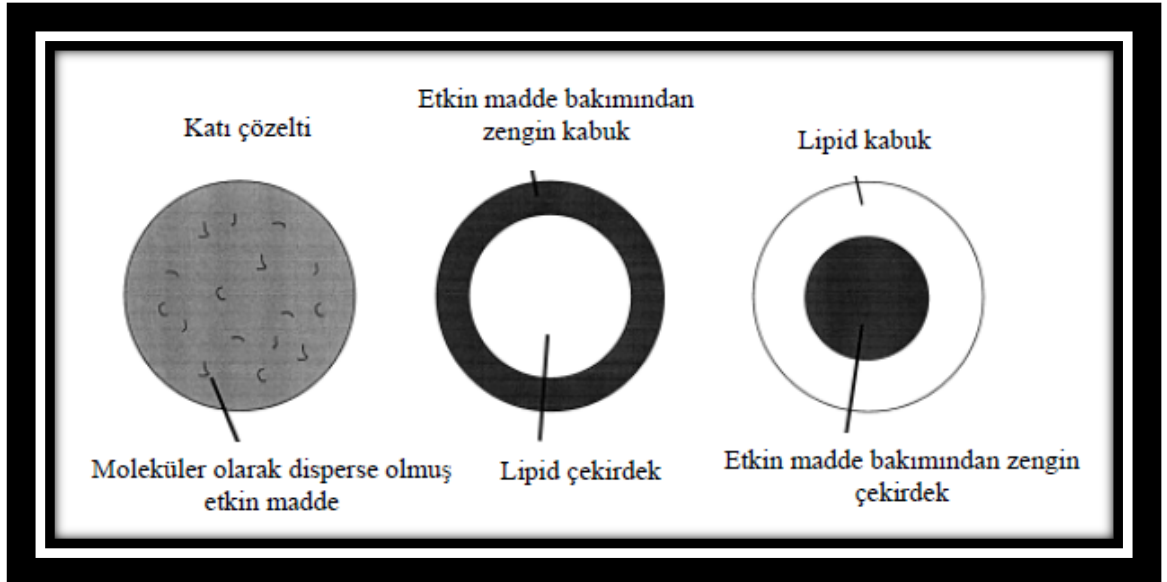
Dispersiyondaki farklı kolloidal türlerin tayini için NMR spektroskopisi ve Elektron Spin Rezonans (ESR) yöntemleri kullanılmaktadır [12].

2.1.9. KLN'lere etkin madde yüklenmesi ve yükleme kapasitesi

İlaç taşıyıcı sistemin uygunluğunu belirleyen önemli etkenlerden biri yükleme kapasitesidir. Yükleme kapasitesini belirleyen faktörler ise; ilacın erimiş lipitteki çözünürlüğü ya da dispersiyonu, katı lipid matrisin kimyasal ve fiziksel yapısı, lipid materyalin polimorfik durumudur. İyi bir yükleme kapasitesi için etkin maddenin, erimiş lipitte yüksek oranda çözünmesi gerekmektedir. Bunun için etkin maddenin çözünürlüğünü arttıran maddeler kullanılabilir. Lipitin yapısında mono ve digliseritlerin bulunması da çözünürlüğü arttırmaktadır [15, 27].

Yapılan çalışmalarda lipid nanopartiküllerde 3 çeşit etkin madde yükleme yolu olduğu saptanmıştır [15]:

- Katı çözelti oluşumu,
- Etkin madde oranı yüksek kabuk oluşumu,
- Etkin madde oranı yüksek çekirdek oluşumu.



Şekil 2.1. Üç etkin madde yükleme modeli

Kaynak: [19].

Etkin maddenin KLN içerisine yüklenmesini etkileyen faktörler vardır. Bunlar:

- Eritilmiş lipit içinde etkin maddenin çözünürlüğü,
- Katı lipitin kimyasal yapısı,
- Lipit matrisin polimorfik yapısı [19].

2.1.9.1. Eritilmiş lipit içinde etkin maddenin çözünürlüğü

Etkin maddenin çözünürlüğünün yüksek olması gerekir. Çünkü lipit eritildikten sonra soğutulurken çözünürlük azalır [2, 6, 14, 19].

2.1.9.2. Katı lipit matrisin kimyasal yapısı

Etkin maddelerin katı lipite hapsedilmesi; etkin maddenin lipitin yağ asidi zincirleri arasına yerleşmesi, lipit tabakaları arasına yerleşmesi ve lipitin kristal kafesindeki kristal noksanlık bölgelerine yerleşmesi şeklinde olmaktadır. Lipitin yapısının çok düzenli kristal kafes yapısını içermesi, hapsedilen etkin madde miktarını da arttırmaktadır. Lipitin benzer moleküllerden oluşması kristal kafesteki noksanlık bölgelerinin sayısını azaltır ve düzenli kristal yapı oluşumunu sağlar. Bu nedenle mono, di ve trigliseridlerin karışımları olan ve farklı zincir uzunluklarında yağ asitleri içeren daha karmaşık lipitlerin kullanılması çok fazla kristal noksanlık bölgesi içeren daha az düzenli kristallerin oluşmasına neden olur. Böylece hapsedilen etkin madde alanı artar ve daha fazla etkin madde yüklenmesi gerçekleşir [7,11,24].

Jenning ve Gohla'nın yaptıkları çalışma, düzenli kristal yapıya sahip KLN'lerde katılaşma olabileceğini ve etkin maddenin lipitten dışarı sızabileceğini göstermektedir [28].

2.1.9.3. Lipit matrisin polimorfik yapısı

Lipit nanopartikülleri üretimlerinden sonra daha çok noksanlık bölgesine sahip olan ve daha yüksek enerjili α polimorfunda tekrar kristalize olmaktadır. Saklama esnasında α polimorfundan β formuna polimorfik geçiş meydana gelebilir. Eğer böyle bir durum oluşursa daha düzenli yapıların oluşacak olmasından dolayı kristal noksanlık bölgelerinin sayısı azalır. Bu durumda etkin madde lipit matristen dışarı sızma gerçekleştirilmektedir [7,11,24].

2.1.10. KLN'lerden etkin madde salımı

KLN'lerden etkin madde salımı aşınma ya da difüzyonla gerçekleşir. Çalışmalarda en çok karşılaşılan etkin madde salım problemi ani salım etkisidir. İlaç dış çeperde ise ani salım, çekirdeğe yerleşmiş ise uzatılmış salım görülmektedir. Salımı

etkileyen temel faktörler, üretim parametreleri ve lipitin yapısıdır. Kolloidal yapıya sahip olan KLN'lerden etkin madde salımının belirlenmesinde filtrasyon, santrifüj ya da diyaliz gibi farklı ayırma yöntemleri kullanılmaktadır [29].

KLN'lerden etkin maddenin salınması lipitin yapısına, YEM'in konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlı olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [30].

2.1.11. KLN'lerin sterilizasyonu

KLN'lerin sterilizasyonunun pulmoner, parenteral ve oküler uygulamalarda çok önemli bir yeri vardır. KLN'lerin sterilizasyonunda aseptik üretim, filtrasyon, gama radyasyon ve otoklav gibi yöntemler kullanılabilir [1,15,19]. Bu yöntemlerin kendilerine özgü avantajlarının olduğu gibi dezavantajları da vardır. Filtrasyonla sterilizasyonda dispers sistemler için aşırı basınç gerekir ve 0.2 µm'den büyük partiküllere uygulanamamaktadır. Sıcaklığa hassas KLN formülasyonları için otoklav ile sterilizasyon yerine gama ışınları ile sterilizasyon tercih edilebilir. Fakat gama ışınları ile sterilizasyonda gama ışınlarının yüksek enerjisi nedeniyle formülasyonda serbest radikal oluşumu gözlenebilir. Oluşan radikaller yeniden bir araya gelerek KLN'lerin yapısında farklı kimyasal yapılar meydana getirebilir. Bu KLN yapısında hasara neden olmaz, fakat kimyasal yapı değişikliği istenmeyen bir durumdur [15,19].

2.1.12. KLN'lerin toksisitesi

KLN'lerin fizyolojik bileşenlerden oluşması ve vücutta metabolik olarak yolaklarının bulunması nedeniyle KLN'ler canlı sistemlerle uyumludur ve iyi tolere edilebilirler. Fakat bu biyolojik uyum için YEM'lerin de toksisitelerine dikkat edilmelidir. Bu nedenden dolayı uygun YEM'lerin seçilmesi önemlidir.

Parçacık büyüklüğünün µm boyutundan büyük olması intramüsküler enjeksiyon, subkutan enjeksiyon, oral veya topikal uygulamalarda toksik etkiye neden olmaz fakat intravenöz (i.v.) enjeksiyonlarda toksik etkiye neden olabilmektedir [12].

Oral olarak uygulanan KLN formülasyonlarında tablet, pellet ve kapsüllerde kullanılabilen tüm lipitler ve YEM'ler kullanılabilir. Ayrıca GRAS özellikte olan veya gıda endüstrisinde kullanılmasında sakınca olmayan tüm maddeler ile KLN formülasyonları oluşturulabilmektedir [7].

2.1.13. KLN'lerin oral uygulanması

KLN'lerin oral veriliş yollu, sulu dispersiyonları ya da tablet, pellet, kapsül, kaşe gibi klasik ilaç dozaj formlarını içermektedir [15, 31].

KLN'lerin partikül boyutlarının küçük olması nedeniyle biyoyararlanımı arttırdıkları gösterilmiştir. Bu artışın çözünürlük/çözünme hızının artırılmasına, lenfatik drenajla doğrudan sistemik dolaşıma katılmalarına ve gastrointestinal (GI) sistemde daha fazla kalmalarını sağlayan doğal biyoadezif karakterlerine bağlı olduğu belirtilmiştir [15, 31]. Yapılan çalışmalarda, insülin ve siklosporin gibi peptit ve proteinlerin oral olarak verilmesinde KLN'ler önemli bir alternatif oluştururlar. Floresan bir madde ile işaretli KLN'lerin oral ve i.v. verişlerinin arasındaki farkı gözlemek için yapılan bir çalışmada, GI sistemde absorpsiyonun lenfatik yol ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca metotreksat, transretinoik asit gibi maddelerle yapılan çalışmalarda da KLN'lerin lenfatik yol ile taşınarak absorbe olduğu görülmüştür. KLN'lerin, birçok maddenin alışılagelmiş süspansiyon formuna kıyasla etkin maddenin absorpsiyonu arttırdığı ve etkisini uzattığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. KLN'lerin boyutunun 200 nm'den küçük olması karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramamasına neden olmaktadır. Ayrıca KLN'lerde YEM'lerin kullanımının GI sistemde intestinal membran permeabilitesini artırdığı ya da lipit partiküller ile intestinal membran arasında biyoadezyon oluşturabileceği belirtilmiştir. KLN'lerin, etkin maddeyi enzimatik bozunmalardan koruyarak *in vivo* metabolizasyonunu geciktirdiği ve bu şekilde biyoyararlanımının artırıldığı da gösterilmiştir [15, 27, 31].

2.2. Karvedilol

Karvedilol (KL), (\pm)-1-(karbazol-4-iloksi)-3-((2-(o-metoksifenoksi) etil) amino)-2-propanol, seçici olmayan β -bloke edici maddedir ve aynı zamanda reseptörde bloke edici özelliğinden dolayı vazodilatördür [32, 33]. KL hipertansiyonlu hastalarda yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra anjin ve konjestif KY olan hastalarda ve MI sonrası tedavide de etkindir. Canlı sistemlerde iyi tolere edilebilir ve nispeten az sayıda yan etkisi mevcuttur [33].

2.2.1. Farmakolojik özellikleri

KL üçüncü nesil, vazodilatör özelliği olan β -blokerdir ve üç önemli adrenerjik reseptör üzerinde etkisi vardır (β_1 , β_2 ve α_1) [34,35]. Kronik KY'de kalp debisi ve sistemik basıncın devamını sağlamak amacıyla sempatik sinir sistemi ve renin-angiotensin-aldosteron sisteminin aktivitesi artmıştır [36,37]. Ancak bu dengeleyici mekanizmalar uzun dönemde kalp fonksiyonlarında kötüleşmeye neden olabilir [38].

KL artmış sempatik aktiviteyi diğer β -antagonist özellikte olan etkin maddelerden farklı olarak neredeyse tamamen bloke eder. Ayrıca, KL'nin vazodilatör etkinliği kronik KY'de artan periferik vasküler direnci ve sol ventrikül ard yükünü en aza indirir [39]. KL'nin KY hastalarında kanıtlanmış etkinliğine ek olarak antioksidan, antiaritmik, antiapoptotik, antiproliferatif özellikler de sayılabilir [37, 40].

KL'nin farmakolojik profili Çizelge 2.3'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Beta-reseptör blokörü olan KL'nin farmakolojik profili

Selektivite	İSE	Lipofiliklik	Oral biyoyararlanım	Membran stabilizasyonu	Beta- blokaj	Eliminasyon
$\beta_1+\beta_2+\alpha$	+	orta	% 25-35	++	VY	7-10(K)

İSE: İntinsik semptomimetik etkinlik (parsiyel agonist etki), VY:veri yok, K:Karaciğer

Kaynak: [41].

2.2.2. Farmakokinetik özellikleri

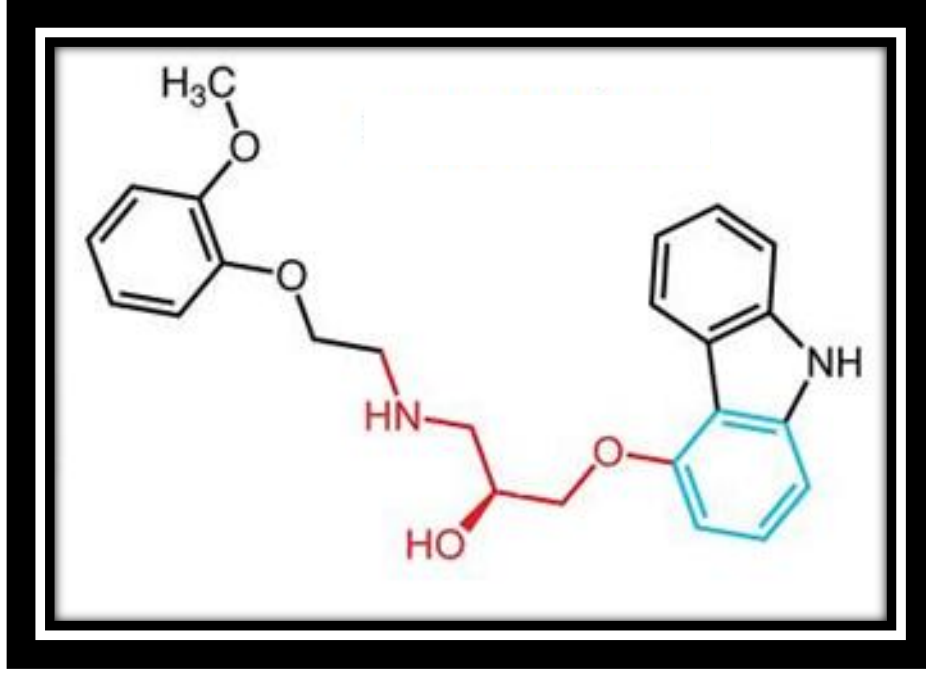
Oral yol konvansiyonel ilaç taşınmasında en çok tercih edilen yoldur. KL, oral alımından sonra hızla emilir ve pik plazma konsantrasyonuna 1-2 saat içinde ulaşır [37, 42, 43]. Ancak yiyeceklerle birlikte alınması durumunda emilimi 1-2 saat gecikir. Plazma yarı ömrü 7-10 saat kadardır. 25 mg tek doz sonrası 50-100 ng/ml ulaşır. Bu doz doğrusal kinetik patern gösterir. KL hızlı bir şekilde ve büyük bir oranda metabolize edilir, idrarda etkin maddenin < %2'si tespit edilebilir. KL hemen hemen sadece karaciğer tarafından metabolize edilir. Bu metabolitlerin yaklaşık %60'ı safraya salınır ve feçesle atılır. Karaciğer hastalığı olan bireylerde KL'nin farmakokinetiği belirgin derecede değişir [37].

Oral taşıyıcı sistemlerin dağılım ve emilimini etkileyen pek çok faktör vardır. Düşük biyoyararlanım düşük çözünürlük veya yüksek lipofilisite sebebiyle lümende ilacın degrade olmasına bağlı olabilmektedir [44, 45]. Geniş ilk geçiş metabolizması nedeniyle, KL'nin mutlak oral biyoyararlılığı %23 civarındadır [46-48]. KL öncelikle aromatik halka oksidasyonu yoluyla sitokrom P450 tarafından metabolize edilir. Biyoyararlanımı arttırmak için bukkal ve transdermal yolların denendiği çalışmalar bulunmaktadır [32, 48]. KL diğer sık kullanılan β -blokörlerden daha yüksek bir antioksidan etkinliğe sahiptir. Bu antioksidan etkisi de antihipertansif olması ve konjestif KY'de kullanım alanı oluşturmuştur [49].

2.2.3. KL'nin kimyası

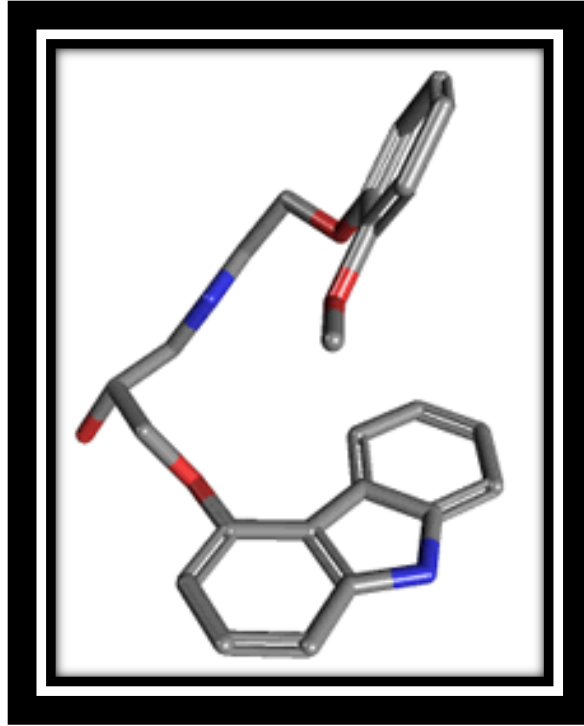
β -bloke edici ilaçların etkileri stereoselektif özellik göstermektedir ve (S)-enantiyomerlerin (R)'ye oranla 100 defa daha aktif olduğu bilinmektedir. Yan zincirde hidroksil grubunun bağlı olduğu karbon atomu ilacın β -reseptörlerle etkileşmesinde büyük rol oynar. Yapılan çalışmalar, farmakolojik olarak daha aktif olan enansiyomerin, reseptörle agonistlerin etkileştiği noktadan reaksiyona girdiğini ortaya koymuştur. Ayrıca antagonistin aromatik kısmının reseptörle aktivasyon inhibe edecek şekilde etkileştiği bilinmektedir. β -antagonist etkiden hemen hemen tümüyle bir enansiyomerin sorumlu olduğu bilinmesine karşın β -blokör ilaçlar klinikte rasemik karışım halinde kullanılmaktadır [50].

KL, hem α hem de selektif olmayan β -blokörü etkileri olan bir adrenerjik reseptör blokörüdür. Ticari KL preparatları her biri klinik etki bakımından önemli iki R(+) ve S(+) enantiyomerlerinin rasemik bir karışımıdır [51].



Şekil 2.2. KL'nin moleküler yapısı

Kaynak: [52].



Şekil 2.3. KL'nin 3D moleküler yapısı

Kaynak: [53].

Çizelge 2.4. KL'e ait bazı bilgiler

IUPAC ismi	(±)-1-(karbazol-4-iloksi)-3-((2-(o-metoksifenoksi) etil) amino)-2-propanol
Molekül formülü	$C_{24}H_{26}N_2O_4$
Kimyasal isimleri	· Carvedilol · 72956-09-3 · (±)-1-(karbazol-4-iloksi)-3-((2-(o-metoksifenoksi) etil) amino)-2-propanol
Moleküler ağırlığı	406.47424 (g/mol)

Kaynak: [53].

KL piyasada tablet preparatı olarak bulunmaktadır. Oral olarak kullanılan ticari müstahzarlar Çizelge 2.5'de sunulmuştur.

Çizelge 2.5. KL içeren ticari müstahzarlara örnekler

Müstahzar İsmi ve Farmasötik Şekil	Firma
ARLEC® Tablet, 12,5 mg, 28 tablet/kutu	ALİ RAİF
ARLEC® Tablet, 6,25 mg, 28 tablet/kutu	ALİ RAİF
CALBİCOR® Tablet, 12,5 mg, 30 tablet/kutu	SANTA-FARMA
CALBİCOR® Tablet, 6,25 mg, 30 tablet/kutu	SANTA-FARMA
CARVESAN® Tablet, 12,5 mg 30, tablet/kutu	SANTA-FARMA
CARVESAN® Tablet, 25 mg, 30 tablet/kutu	SANTA-FARMA

Çizelge 2.5. (Devam) KL içeren ticari müstahzarlara örnekler

CARVEXAL® Tablet, 25 mg, 30 tablet/kutu	SANDOZ
CORONİS® Tablet, 12,5 mg, 28 tablet/kutu	BİLİM
CORONİS® Tablet, 25 mg, 84 tablet/kutu	BİLİM
CORONİS® Tablet, 6,25 mg, 28 tablet/kutu	BİLİM
DİLATREND® Tablet, 25 mg, 30 tablet/kutu	ROCHE
DİLATREND® Tablet, 6,25 mg, 30 tablet/kutu	ROCHE
KİNETRA® Tablet, 12,5 mg, 30 tablet/kutu	SANOVEL
KİNETRA® Tablet, 25 mg, 30 tablet/kutu	SANOVEL
KİNETRA® Tablet, 6,25 mg, 30 tablet/kutu	SANOVEL

Kaynak: [51].

2.2.4. Antihipertansif etki ve KL

Hipertansiyon, sistemik arteriyel kan basıncının devamlı yükselmesi ile kendini gösteren bir kalp-damar hastalığıdır. Hipertansiyon, zaman içinde kalpte ve arterlerde geridönüşümü olamayan değişiklikler yaparak ciddi kardiyovasküler hastalıklara yol açması ve görülme sıklığının artması nedeniyle önemli bir klinik sorun ve sağlığı bozucu önemli bir etken sayılır [54].

Antihipertansif ilaçlar, vazodilatör etkilerini oluşturma mekanizmalarını ve primer etki yerlerini dikkate alarak 8 gruba ayrılırlar:

1. Diüretikler,
2. Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiotensin reseptör blokörleri,
3. Kalsiyum kanal blokörleri,

4. Adrenerjik reseptör blokörleri,
5. Adrenerjik nöron blokörleri,
6. Santral etkili sempatotolitik ilaçlar ve diğer sempatotolitikler,
7. Direkt etkili vazodilatörler ve potasyum kanalı açıcı ilaçlar
8. Sadece hipertansif kriz tedavisinde kullanılan ilaçlar [54].

KL seçici olmayan β -bloke edici maddedir [31, 32]. Hem kalp hücrelerinde bulunan ve sempatik etkinliğin kalbe ulaşmasından sorumlu olan β_1 tipi reseptörleri, hem de damar, bronş ve diğer bazı yerlerde bulunan ve düz kasların gevşemesinde rol oynayan β_2 tipi adrenerjik reseptörleri kolaylıkla bloke eder [54].

2.2.4.1. Kullanılışı ve maksimum doz sınırları

β -blokörler 60 yaşın altındaki hafif ve orta şiddetteki hipertansiyon olgularında kullanılırlar. Yaşlı hastalarda β -blokörlerin antihipertansif etkisine karşı duyarlılıkları azalmış olduğundan bu yaş grubunda kullanmaları pek tavsiye edilmez [51, 54].

KL için günlük olağan doz sınırları Çizelge 2.6'da verilmiştir;

Çizelge 2.6. *KL için günlük olağan doz sınırları ve günde kaç kez verileceği*

İlaç	Günlük doz (mg)	Kaç kez verileceği
KL	12,5-25	2

Kaynak: [41, 54].

KL için maksimum doz sınırları Çizelge 7'de verilmiştir;

Çizelge 2.7. *KL için maksimum doz sınırları*

Yetişkinler	50 mg/gün hipertansiyon ve MI sonrasında; 100 mg/gün KY'de
Yaşlılar	50 mg/gün hipertansiyon ve MI sonrasında; 100 mg/gün KY'de

Çizelge 2.7. (Devam) KL için maksimum doz sınırları

Adolesanlar	Güvenilir ve etkin kullanımı kanıtlanmamıştır.
Çocuklar	Güvenilir ve etkin kullanımı kanıtlanmamıştır.

Kaynak: [51].

2.2.4.2. Gebelik kategorisi

Tüm gebelik süresince C kategorisine sahiptir [51].

2.2.4.3. Uyarılar

KL için dikkat edilmesi gereken uyarılar Çizelge 2.8’de sunulmuştur.

Çizelge 2.8. KL için dikkat edilmesi gereken uyarılar

	Dikkatle Kullanılmalıdır. β-blokörler emziren annede kullanıldığında bebek yakından izlenmelidir; toksisite olasılığı vardır ancak çoğu β-blokörlerin anne sütüne geçen miktarı bebeği etkilemeyecek kadar düşüktür.
Emzirme	
Karaciğer Yetmezliği	KL şiddetli karaciğer bozukluğu olan hastalarda kullanılmamalıdır.
Böbrek Yetmezliği	Kullanımdan Kaçınılmalıdır. Şiddetli yetmezlikte renal kan akışı azalabilir böbrek fonksiyonları advers olarak etkilenebilir.
Diyaliz	Aralıklı Hemodiyalizde KL’nin yüksek derecede plazma proteinlerine bağlanması nedeniyle hemodiyalizle uzaklaştırılması olası değildir; Ek doza gerek yoktur.
Diyabet	Dikkatli Kullanılmalıdır.

Kaynak: [44, 51, 54].

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan maddeler

Asetonitril	Sigma-Aldrich	Almanya
Carvedilol	Santa-Farma	Türkiye
Compritol® ATO 888	Gattefosse	Fransa
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck	Almanya
DMEM	Sigma-Aldrich	Almanya
Dötero kloroform (CDCl ₃)	Merck	Almanya
Dynasan® 114	Condea	Almanya
Fötal sığır serumu (FBS)	Sigma-Aldrich	Almanya
Metanol	Merck	Almanya
MTT boyası	Appllichem	Almanya
Mutlak Alkol	Merck	Almanya
Polietilenglikol 400	Merck	Almanya
Penisilin/Streptomisin	Gibco	İngiltere
Potasyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich	Almanya
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	Almanya
Sodyum klorür	Merck	Almanya
Stearik Asit	Merck	Almanya
Tripsin EDTA	Sigma-Aldrich	Almanya
Tween® 80	Merck	Almanya

3.2. Kullanılan cihazlar

Cihaz adı

Firma adı

Buzdolabı

Arçelik, Türkiye

Diferansiyel taramalı kalorimetri

Shimadzu DSC-60, Japonya

Distile su cihazı

MilliQ Millipore, Fransa

Etüv

Nüve, FN 500, Türkiye

Hassas terazi

Mettler AM 100, Amerika

İnfrared spektrofotometresi

Shimadzu IR-Prestige-21,
Japonya

Kararlılık kabini

Meter D96R, Türkiye

Karbondiyoksitli etüv

BINDER, Almanya

Kondüktometre

Hanna Instruments HI8820,

Portekiz

Manyetik karıştırıcı

Jeitech MS-53M, Güney
Kore

Mikrosantrifüj

Eppendorf Centrifuge

5417R, Almanya

NMR spektrofotometresi

Ultra Shield CP MAS NMR,

Almanya

Parçacık boyutu analiz cihazı

Zetasizer Nano Series,
İngiltere

pH metre

WTW Profi Lab. pH 597,
Almanya

Plaka okuyucu

Cytation 5 Biotek, Amerika

Prob sonikatör	Sonics, Amerika
Püskürterek kurutma cihazı	Nano Spray-Dryer B-90, Büchi,İsviçre
Taramalı elektron mikroskobu	FESEM SUPRATM 50 VP, Almanya
Ultrasonik banyo	Elma T470/H, Singen, Almanya
Vorteks karıştırıcı	Jeitech VM96B, Kore
X-Işını kırınım cihazı	XRD-Rikagu Rint 2000, Japonya
YBSK kolonu	LiChrospher® 100, Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Shimadzu 20-A, Japonya
Zeta potansiyel analiz cihazı	Zetasizer Nano Series, İngiltere

4. YÖNTEMLER

4.1. Formülasyon geliştirme

Bu bölümde, KL etkin maddesi içeren KLN formülasyonlarının geliştirilmesi, hazırlanışı ve bu hazırlanan formülasyonların *in vitro* değerlendirilmesi anlatılacaktır.

4.1.1. Önformülasyon çalışmaları

KLN sistem formülasyonu için yüksek devirli homojenizasyon ardından ultrasonikasyon tekniği kullanılmıştır. KLN hazırlamada kullanılan katı lipit, erime derecesinin yaklaşık 5-10 °C üzerine ısıtılmıştır. Etkin madde bu eriyikte çözündürülmüştür. YEM içeren sulu faz da aynı sıcaklığa getirilmiş ve önemüsiyon elde edilmiştir. Önemüsiyondan sekiz tane hazırlanmıştır. Bu önemüsiyonlardan ikisi sonikatörde %60 güçte 5 dk (1. grup), diğer ikisi sonikatörde %60 güçte 10 dk (2. grup), diğer ikisi yüksek devirli karıştırıcıda 14000 rpm'de 10 dk (3. grup) ve diğer ikisi de sonikatörde %40 güçte 10 dk (4. grup) homojenize edilmiştir. Elde edilen karışımlardan 1., 2., 3. ve 4. gruplardaki birer karışım oda sıcaklığında soğutulmuş, diğer karışımlar da 0 °C'de (buzda) soğutulmuştur. Lipitin kristalleşmesinin ardından KLN'ler oluşmuştur.

Elde edilen KLN'lerin parçacık boyutları karşılaştırılmıştır. Parçacık boyutu, %40 güçte 10 dk sonike edilen (4. grup) formülasyona göre 14000 rpm'de yüksek devirli karıştırıcıda 10 dk (3. grup) homojenize edilen formülasyonunki daha büyük bulunmuştur. 3. ve 4. grup formülasyonlardan oda sıcaklığında soğutulan formülasyonun parçacık boyutu ile buzda soğutulan formülasyonun parçacık boyutu arasında büyük bir fark bulunmamıştır. %60 güçte 5 dk sonike edilen (1. grup) ve %60 güçte 10 dk sonike edilen (2. grup) formülasyonun parçacık boyutları arasında büyük fark bulunmamıştır. Fakat, %40 güçte sonike edilen formülasyonun parçacık boyutu, %60 güçte sonike edilen formülasyonun boyutuna göre daha büyük bulunmuştur. Bu nedenle önformülasyon çalışmalarına %60 güçte 5 dk sonikasyon işlemi uygulanarak ve ardından oda sıcaklığında soğutma işlemi uygun görülerek devam edilmiştir. Önformülasyon çalışmaları, Dynasan® 114, Compritol® ATO 888 ve stearik asit lipitleri kullanılarak yapılmıştır. YEM olarak Tween® 80 kullanılmıştır. Stearik asit içeren formülasyonlarda istenilen parçacık boyutu elde edilememiştir. Compritol® ATO 888 içeren formülasyonlarda ise nanometre boyutuna inilememiştir. Dynasan® 114 içeren formülasyonların parçacık boyutu uygun bulunmuştur. Uygun parçacık boyutu elde

edilen sisteme etkin madde eklenmiştir. Etkin madde, katı lipit eridikten sonra yağlı faza eklenmiştir.

Hazırlama yönteminin seçilmesinin ardından farklı oranlardaki katı lipit, YEM ve distile su içeren formülasyonlar hazırlanmıştır. Dynasan[®] 114 içeren KLN'nin önformülasyon çalışmasında denenen formülasyon oranları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Dynasan[®] 114 içeren KLN önformülasyon çalışmasındaki formülasyon

Dynasan [®] 114 (% a/a)	Tween [®] 80 (% a/a)	Distile su (% a/a)
% 10	% 10	% 80
% 10	% 9	% 81
% 10	% 8	% 82
% 10	% 7	% 83
% 10	% 6	% 84
% 10	% 5	% 85
% 9	% 10	% 81
% 9	% 9	% 82
% 9	% 8	% 83
% 9	% 7	% 84
% 9	% 6	% 85
% 9	% 5	% 86
% 8	% 10	% 82
% 8	% 9	% 83
% 8	% 8	% 84
% 8	% 7	% 85
% 8	% 6	% 86
% 8	% 5	% 87
% 7	% 10	% 83

Çizelge 4.1. (Devam) Dynasan® 114 içeren KLN önformülasyon çalışmasındaki formülasyon

% 7	% 9	% 84
% 7	% 8	% 85
% 7	% 7	% 86
% 7	% 6	% 87
% 7	% 5	% 88
% 5	% 5	% 90
% 5	% 4	% 91
% 5	% 3	% 92
% 5	% 2	% 93
% 5	% 1	% 94

Önformülasyon çalışması farklı bir lipit olan stearik asit ile sürdürülmüştür. % 10 Stearik asit/Compritol® ATO 888, % 10 Tween® 80 ve % 80 distile su içeren formülasyon ile başlanan önformülasyon çalışmalarında değişik oranlardaki stearik asit/compritol, YEM ve distile su kullanılarak 10 dk % 60 güçte sonikasyon uygulanmıştır. Stearik asit/Compritol® ATO 888 içeren KLN önformülasyon çalışmasında denenen formülasyon oranları Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Stearik Asit/Compritol® ATO 888 içeren KLN önformülasyon çalışmasındaki formülasyon

Stearik asit/ Compritol® ATO 888 (% a/a)	Tween® 80 (% a/a)	Distile su (% a/a)
% 10	% 10	% 80
% 10	% 9	% 81
% 10	% 8	% 82
% 10	% 7	% 83

Çizelge 4.2. (Devam) Stearik Asit/Compritol® ATO 888 içeren KLN önformülasyon çalışmasındaki formülasyon

% 10	% 6	% 84
% 10	% 5	% 85
% 9	% 10	% 81
% 9	% 9	% 82
% 9	% 8	% 83
% 9	% 7	% 84
% 9	% 6	% 85
% 9	% 5	% 86
% 8	% 10	% 82
% 8	% 9	% 83
% 8	% 8	% 84
% 8	% 7	% 85
% 8	% 6	% 86
% 8	% 5	% 87
% 7	% 10	% 83
% 7	% 9	% 84
% 7	% 8	% 85
% 7	% 7	% 86
% 7	% 6	% 87
% 7	% 5	% 88
% 5	% 5	% 90
% 5	% 4	% 91
% 5	% 3	% 92
% 5	% 2	% 93
% 5	% 1	% 94

Stearik asit ile hazırlanan formülasyonlarda oda sıcaklığına soğutma sonrasında hafif kıvam artışı gözlenmiştir. Compritol® ATO 888 ile hazırlanan formülasyonlarda kıvam artışı gözlenmemiş, lakin nanometre boyutuna inilememiştir. Soğutma işleminin ardından parçacık boyutu ile zeta potansiyel ölçümleri yapılmış, hazırlanan formülasyonlar için yüksek parçacık boyutu elde edilmiştir. Stearik asit ile yapılan tüm önformülasyon çalışmasında kremalaşma ve yüksek parçacık boyutu belirlendiğinden, bu katı lipit ile çalışmama kararı alınmıştır.

4.1.2. KL yüklü KLN formülasyon çalışması

KLN'ler, yüksek devirli homojenizasyon ve ardından ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Tam tartılan lipit miktarı yaklaşık 75°C'de (lipit erime noktasının 10°C üstünde) eritilmiş ve berrak bir solüsyonu elde ettikten sonra etkin madde ilave edilmiştir. Sulu fazın içinde YEM dağıtılmış ve aynı sıcaklıkta yağ fazı ile karıştırılmıştır. Yağlı faza sıcak sulu faz eklenmiş ve 5 dakika boyunca ultratoraks (8000 rpm'de ve sıcaklık 75°C'de) ile homojen hale getirilmiştir. Sıcak su içinde yağ emülsiyonu elde edildikten sonra karışım bir sonikatör kullanılarak % 60 güçte 5 dakika sonike edilmiştir. KL yüklü KLN'ler, sıcak nanoemülsiyonun oda sıcaklığına soğumasına izin verilerek elde edilmiştir. 4 farklı oranda etkin madde yüklenmiş formülasyon hazırlanmış ve Çizelge 4.3'de verilmiştir

Çizelge 4.3. KL yüklü Dynasan® 114 içeren KLN formülasyonu (% a/a)

	Dynasan® 114	Karvedilol	Tween® 80	Distile Su
F1	% 5	% 0.5	% 5	% 89.5
F2	% 4.5	% 0.5	% 5	% 90
F3	% 5	% 0.5	% 4	% 90.5
F4	% 4.5	% 0.5	% 4	% 91

Çizelge 4.3'de gösterilen tüm formülasyonlar hazırlandıktan sonra parçacık boyutu, polidisperslik indisi (PDI) ve zeta potansiyel ölçümü yapılmış ve optimum etkin

madde içeren formülasyona karar verilmiştir. Çizelge 4.4’de optimum formülasyon içeriği verilmiştir.

Çizelge 4.4. *Optimum plasebo ve KL yüklü Dynasan® 114 içeren KLN formülasyonu (% a/a)*

Kod	Dynasan® 114	Karvedilol	Tween® 80	Distile Su
Plasebo	% 5	-	% 4	% 91,0
F3	% 5	% 0.5	% 4	% 90.5

4.1.3. KL ve Diğer Maddeler ile Yapılan Çalışmalar

KL ve KLN formülasyonunda kullanılacak olan Dynasan® 114’ün saflığını ve kalitesini belirlemek üzere karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

4.1.3.1. Termal analiz

Maddelerin termal analizi DSC (Schimadzu DSC-60, Japonya) cihazı ile basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabı, 50 mL·dk⁻¹ azot gazı akış hızı ve 30-300°C aralığında 10°C·dk⁻¹ ısı artışı kullanılarak alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.1.3.2. X-ışını kırınım analizi

Maddelerin XRD analizinde 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2θ açısı ve 2°C·dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya) kullanılmıştır.

4.1.3.3. İnfrared (FT-IR) analizi

Maddelerin IR analizi FT-IR (Schimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.3.4. NMR

Maddelerin dötero kloroform (CDCl₃) içinde çözündürülerek hazırlanan çözeltisinin ¹H-NMR analizi NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

4.1.3.5. Parçacık şekli ve yüzey özelliği

Maddelerin parçacık şekli ve yüzey özelliği karbon bandı üzerine yayılıp altın ile kaplandıktan sonra SEM (Zeiss Ultra Plus Fesem, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir.

4.2. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

4.2.1. Analitik yöntem geliştirme

İn vitro çalışmalarda KL'nin miktar tayini Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırması ve yapılan denemeler sonrasında karar verilen ve analiz çalışmalarında kullanılan YBSK'nin çalışma koşulları Çizelge 4.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. YBSK çalışma koşulları

Cihaz	Shimadzu-20 A
Kolon	250×4.6 mm LiChrospher® 100 RP-18 oktadesil silan kolon, 5 µm
Fırın Sıcaklığı	30°C
Hareketli Faz	0.03M potasyum dhydrojen fosfat tamponu (pH 3.0) : asetonitril : metanol (60:50:10)
Dedektör	Floresan Dedektör
Çalışılan Dalga Boyu	242 nm
Akış Hızı	1.0 mL·dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Kaynak: [55].

4.2.2. Validasyon çalışmaları

Analitik yöntem validasyonunun amacı kullanılacak yöntemin uygunluğunu kanıtlamaktır. Miktar tayini validasyonunda doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri esas alınmıştır. Çalışmamızda, Uluslararası Harmonizasyon Kongresi'nin 'Analitik İşlem Validasyon Yöntemi' kullanılmıştır [56].

4.2.2.1. Doğrusallık

Standart eğrinin belirlenmesi için, KL mobil fazda çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. 30 mg KL 100 mL mobil fazda çözülmüş ve $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ stok elde edilmiştir. Bu stok çözültiden hareketle, 25-150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında 6 adet çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiler YBSK'ya enjekte edilerek pik alanları bulunmuştur. Doğrusal regresyon yöntemi ile doğru denklemi elde edilmiştir. İşlemler 6 tekrar ardından ortalama değerler üzerinden yapılmıştır.

4.2.2.2. Kesinlik

Mobil faz ortamında etkin maddenin üç farklı konsantrasyonda (50 μL , 100 μL , 150 μL) çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin pik alanlarına göre konsantrasyonları YBSK enjeksiyonu sonrasında belirlenmiştir. Her konsantrasyon için deney 6 kez tekrarlanmış ve 1. gün yapılan çalışmalar 2., ve 3. günde tekrar edilmiştir (k=3). Kesinlik ile ilgili gün-içi kesinlik ve günler-arası tekraredilebilirlik değerleri kullanılarak yöntemin kesinliği hesaplanmıştır.

4.2.2.3. Doğruluk

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

4.2.2.4. Seçicilik

Etkin maddesiz formülasyonların mobil faz ile ekstraksiyonun ardından YBSK enjeksiyonu yapılmış ve kromatogramlar elde edilmiştir. Elde edilen kromatogramlara

dayanarak etkin maddenin seçiciliği değerlendirilmiştir. Yöntemin seçiciliği, etkin maddesiz analiz ve etkin madde miktar tayininde kullanılan çözücüler kullanılmıştır.

4.2.2.5. Duyarlılık

Kullanılan yöntemin, derişimdeki küçük değişimleri saptama kapasitesi ve düşük konsantrasyonları saptama yeteneğini belirlemek için, saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Hesaplamada kullanılan eşitlikler aşağıda verilmiştir [56].

$$LOD = \frac{3.3 \times SS}{m} \quad (4.1)$$

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

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

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

4.2.3. KLN karakterizasyonuna ait çalışmalar

4.2.3.1. Parçacık boyutu ve dağılımı analizi

Hazırlanan KLN formülasyonunun parçacık boyutu ve dağılımı NaCl ile 50 µS iletkenliğe ayarlanan distile suda disperse edilerek ölçülmüştür. Parçacık boyutu ve dağılımı Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

4.2.3.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan KLN formülasyonunun zeta potansiyel değerleri Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm, tek kullanımlık katlanmış kılcal zeta hücresinde, 25°C oda sıcaklığında ve distile su ile seyreltilerek

gerçekleştirilmiştir. Distile suyun iletkenliğinin neden olabileceği ufak değişimin ölçüm sonucunu etkilememesi amacıyla distile suyun iletkenliği ölçümden önce NaCl ile 50 μs 'e ayarlanmıştır.

4.2.3.3. Parçacık şekli ve yüzey özelliği

Taze hazırlanan KLN formülasyonunun parçacık şekli ve yüzey özelliği karbon bandı üzerine yayılıp altın ile kaplandıktan sonra SEM (Zeiss Ultra Plus Fesem, Almanya) cihazı ile belirlenmiştir.

4.2.3.4. Termal analiz

KLN formülasyonunun termal analizi DSC (Schimadzu DSC-60, Japonya) cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 50 mL.dk⁻¹ azot gazı akış hızında ve 30-300°C aralığında 10°C.dk⁻¹ sıcaklık artış hızı ile alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.5. X-Işını kırınımı

KLN formülasyonunun XRD analizi 2-40°C aralığında, 40 kV voltaj, 30 mA akım şiddeti, 2 θ açısı ve 2°C.dk⁻¹ ilerleme hızında Rikagu jeneratör (XRD Rikagu Rint 2000, Japonya) yardımıyla yapılmıştır.

4.2.3.6. İnfrared (FT-IR) analizi

KLN formülasyonunun FT-IR spektrumu FT-IR (Schimadzu IR Prestige-21, Japonya) cihazı kullanılarak 4000-500 cm⁻¹ dalga boyu aralığında saptanmıştır.

4.2.3.7. NMR

CDCl₃ içinde çözündürülerek hazırlanan KLN formülasyonunun ¹H-NMR analizi NMR (Bruker 500 MHz UltraShield NMR, Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

4.2.3.8. Formülasyonda etkin madde miktar tayini

Dynasan[®] 114 ile hazırlanan KLN formülasyonunda yüzeyde kalan etkin madde miktar tayini için KL'nin çözündüğü ancak Dynasan[®] 114'ün çözünmediği çözücü olan hareketli faz kullanılmıştır. Çalışmada tam olarak tartılmış 5 mg Dynasan[®] 114-KL

formülasyonu 2.5 mL'lik tüpe alınmış ve üzerine 2 mL hareketli faz eklenmiştir. Ultrasonik banyoda 5dk tutulduktan sonra 10 dk 11.000 rpm'de santrifüj edilerek üstte kalan saydam kısım alınmış ve selüloz asetat filtreden süzülerek gerekli seyreltmelerin ardından analiz edilmiştir.

Hapsedilen etkin maddenin analizi için dipte kalan parçacık üzerine KL'nin çözüldüğü ancak Dynasan® 114'ün çözünmediği çözücü olan hareketli fazdan 2 mL eklenmiştir. Ultrasonik banyoda lipitin erime derecesinin 10°C üzerindeki sıcaklığa (70-80°C) ısıtılarak 5 dk tutulduktan sonra 10 dk 11.000 rpm'de santrifüj edilerek üstte kalan saydam kısım alınmış ve selüloz asetat filtreden süzülerek gerekli seyreltmelerin ardından analiz edilmiştir. Deney her formülasyon için 3 kez tekrarlanmıştır. Süpernatandaki serbest ilaç miktarı, 242 nm dalga boyundaki YBSK kullanılarak analiz edilmiştir [57, 58].

Enkapsülasyon etkinliği hesabı 4.3'de verilen eşitlik ile gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = \frac{(\text{Formülasyondaki etkin madde derişimi}) - (\text{Süpernatandaki etkin madde derişimi})}{(\text{Formülasyondaki etkin madde derişimi})} \times 100$$

(4.3)

4.2.3.9. *In vitro* salım çalışması

KL'nin optimize edilmiş KLN formülasyonlarından salımı selüloz diyaliz membranı ile 100 rpm karıştırma hızında ve 37 ± 1 °C sıcaklıkta yapılmıştır. KL'nin pH 1.1 ve pH 7.5'de çözünmemesinden dolayı *in vitro* salım çalışmaları pH 6.8'de simüle edilmiş bağırsak vasatı (SIF) ve %30 PEG 400 içeren fosfat tamponu olarak (pH 6.8) iki ayrı ortamda yürütülmüştür. Öncelikle 5 mg KL içeren KLN formülasyonu selüloz diyaliz membrana dikkatlice yerleştirilmiş ve üzerine 1mL salım ortamı eklenerek sıkıca sızdırmayacak şekilde kapatılmıştır. Hazırlanan 50 ml diyaliz ortamı 37 ± 1 °C'deki manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırılmıştır. Önceden belirlenmiş (5. dk, 10. dk, 15. dk, 30. dk ve 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat, 6. saat, 7. saat, 8. saat, 12. saat ve 24. saat) zaman aralıklarında sırasıyla çözüldürme ortamından 1 ml örnek alınmış ve eksilen miktar 1 ml salım ortamı ile tamamlanmıştır. Alınan örneklerdeki

etkin madde miktarı YBSK cihazında 242 nm'de analiz edilmiştir. Farklı zamanlarda salınan KL miktarları belirlenerek, formülasyon için % kümülatif salınan KL değerinin zamana karşı grafiği çizilmiştir. Her KLN formülasyonu için deney 6 kez tekrarlanmıştır.

4.2.3.10. Kararlılık çalışması

Hazırlanan KLN formülasyonunun kararlılık çalışması kapsamında formülasyonlar $4 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, kararlılık kabinlerine yerleştirilmiştir. Formülasyonların kararlılık testi belirli periyotlarda (0. zaman, 1. ay, 2. ay, 3. ay) tekrarlanmıştır. Formülasyonlarda fiziksel görünüş, parçacık boyutu ve dağılımı, zeta potansiyel ve etkin madde miktar tayini yapılmıştır.

4.2.3.11. Farmakokinetik model çalışması

Hazırlanan KLN formülasyonu ve saf etkin maddenin 2 farklı ortamda salım çalışması yapılmıştır. Veriler farklı kinetik modellere (sıfırıncı derece kinetik, birinci derece kinetik, Higuchi, Hixson-Crowell, Hopfenberg ve Korsmeyer-Peppas) uygulanmıştır. En uygun kinetik modelin seçimi amacıyla formülasyonların hız sabiti (k), determinasyon katsayısı (r^2) ve Akaike bilgi kriteri (AIC) ile değerlendirilmiştir [59].

4.2.3.12. Sitotoksosite çalışması

KL içeren KLN formülasyonunun *in vitro* sitotoksitesi 3T3 fare embriyo fibroblast hücre dizileri kullanılarak Tetrazolyum Tuzu Testi (MTT) ile incelenmiştir. Kısaca, hücreler (2×10^4), RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Almanya) ortamı ile bir 96 oyuklu plakaya (Greiner, Sigma-Aldrich, Almanya) ekilmiştir. RPMI 1640 ortamına % 10 Fötal Sığır Serum (FBS) ve % 1 antibiyotikler (penisilin / streptomisin) ilave edilmiştir. Hücreler 37°C 'de 24 saat boyunca % 5 CO_2 içeren nemli bir atmosferde inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun sonunda, formülasyonlar hücre kültürü ortamı ile belirlenen oranlarda hücrelere ilave edilmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat inkübasyon için bırakılmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda formülasyonlar kuyulardan çekilmiştir ve 20 μL MTT boya (5 mg / mL konsantrasyon için PBS ile seyreltilmiş) solüsyonu ilave edilmiştir. Plakalar, daha önce bahsedilen aynı koşullar altında 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, elde edilen formazan kristallerinin

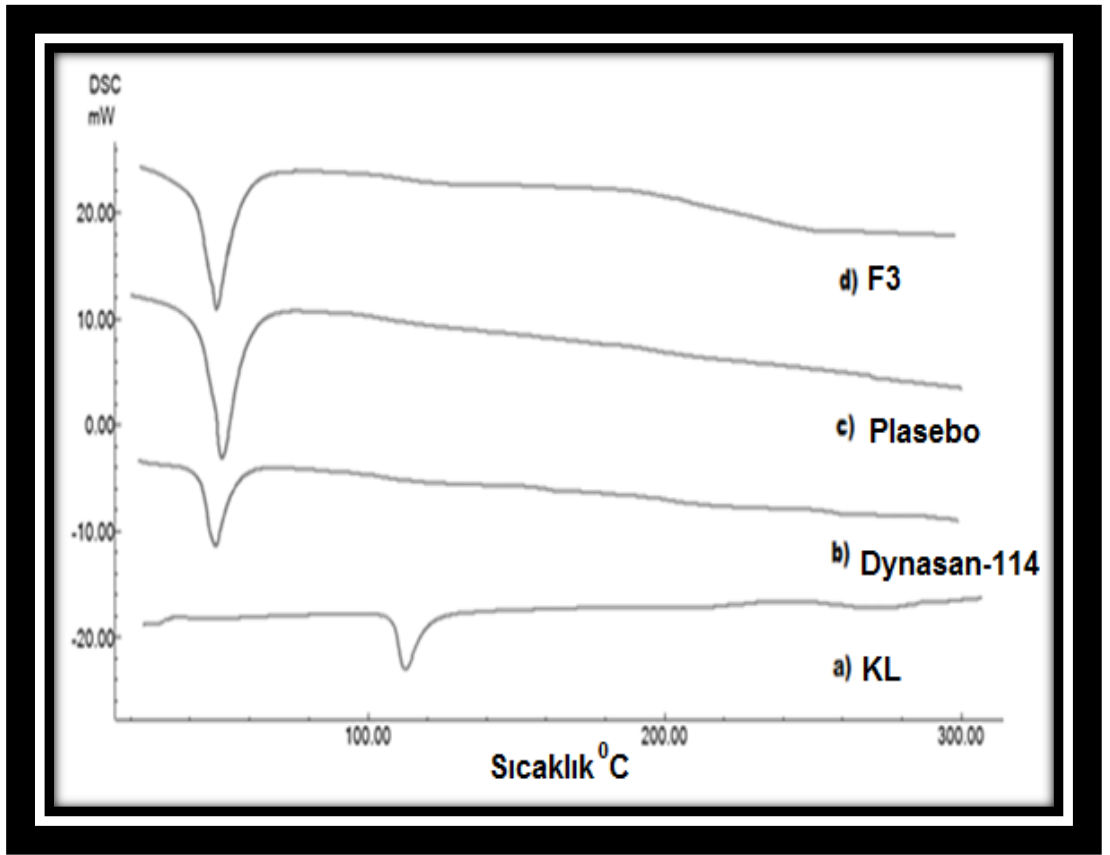
özölmesi için 200 µL spektrofotometrik dimetilsülfoksit (DMSO) her oyuğa ilave edilmiştir. 30 dakikalık inkübasyondan sonra plakaların absorbanısı, çok modlu bir mikropkaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de ölçölmüştür. Kontrol hücrelerindeki canlılık % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Formölasyonlara ait yaklaşık IC₅₀ (hücre çoğalmasında % 50 azalmaya neden olan inhibitör derişimi) değeri 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda saptanmıştır [60, 61].

5. BULGULAR

5.1. KL ve yardımcı maddeler ile yapılan çalışmalar

5.1.1. Termal analiz

KL, etkin maddesiz formülasyon (plasebo), katı lipit ve F3 formülasyonuna ait termogramlar Şekil 5.1'de sunulmuştur. KL'ye ait spesifik erime piki 116.5 °C'de gözlenmiştir.

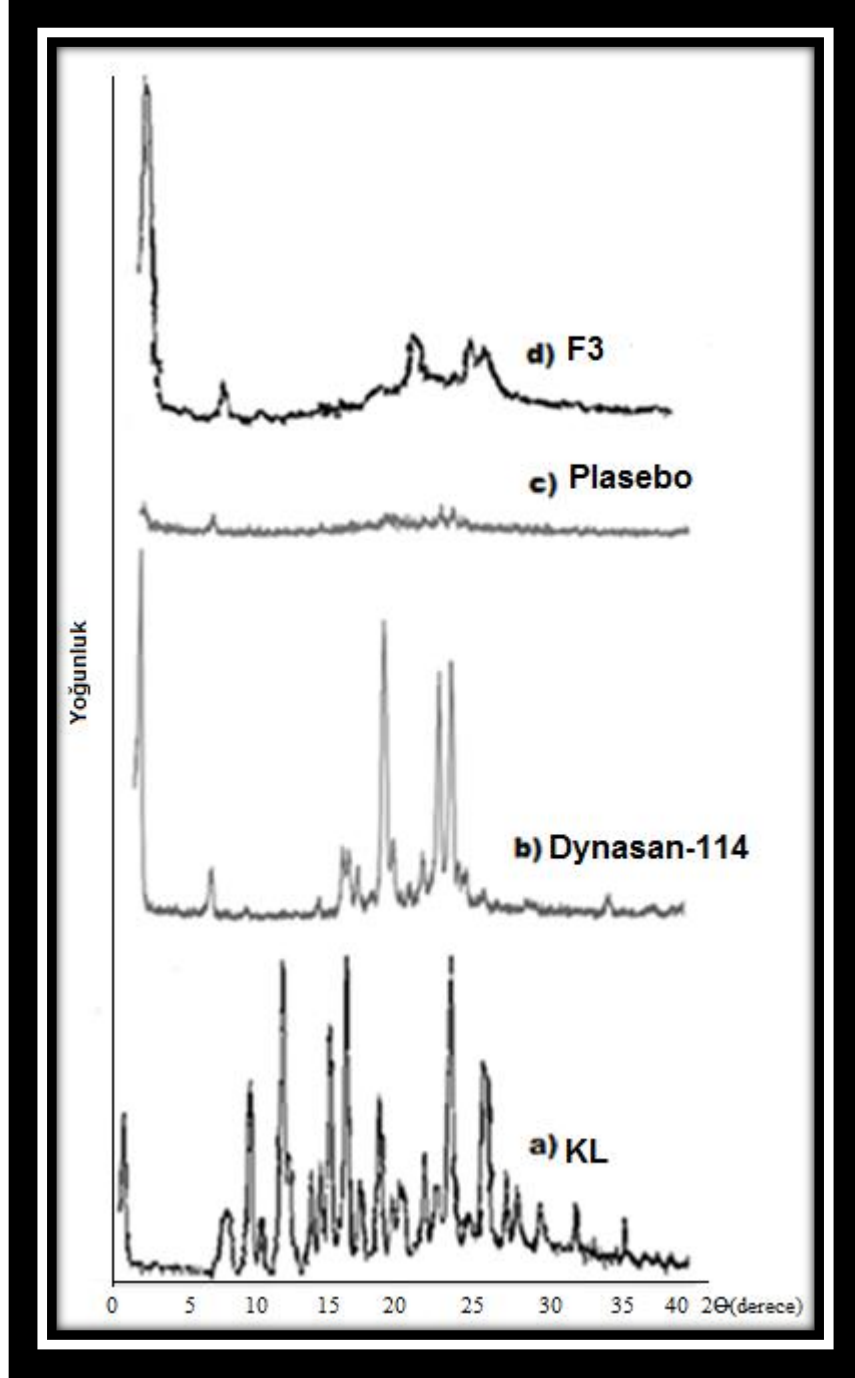


Şekil 5.1. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin termogramları

a: KL, b: Katı lipit (Dynasan® 114), c: Etkin maddesiz formülasyon, d: F3 formülasyonu

5.1.2. X-ışını kırınım analizi

KL, etkin maddesiz formülasyon, katı lipit ve F3 formülasyonuna ait X-ışını kırınım profilleri Şekil 5.2'de sunulmuştur.

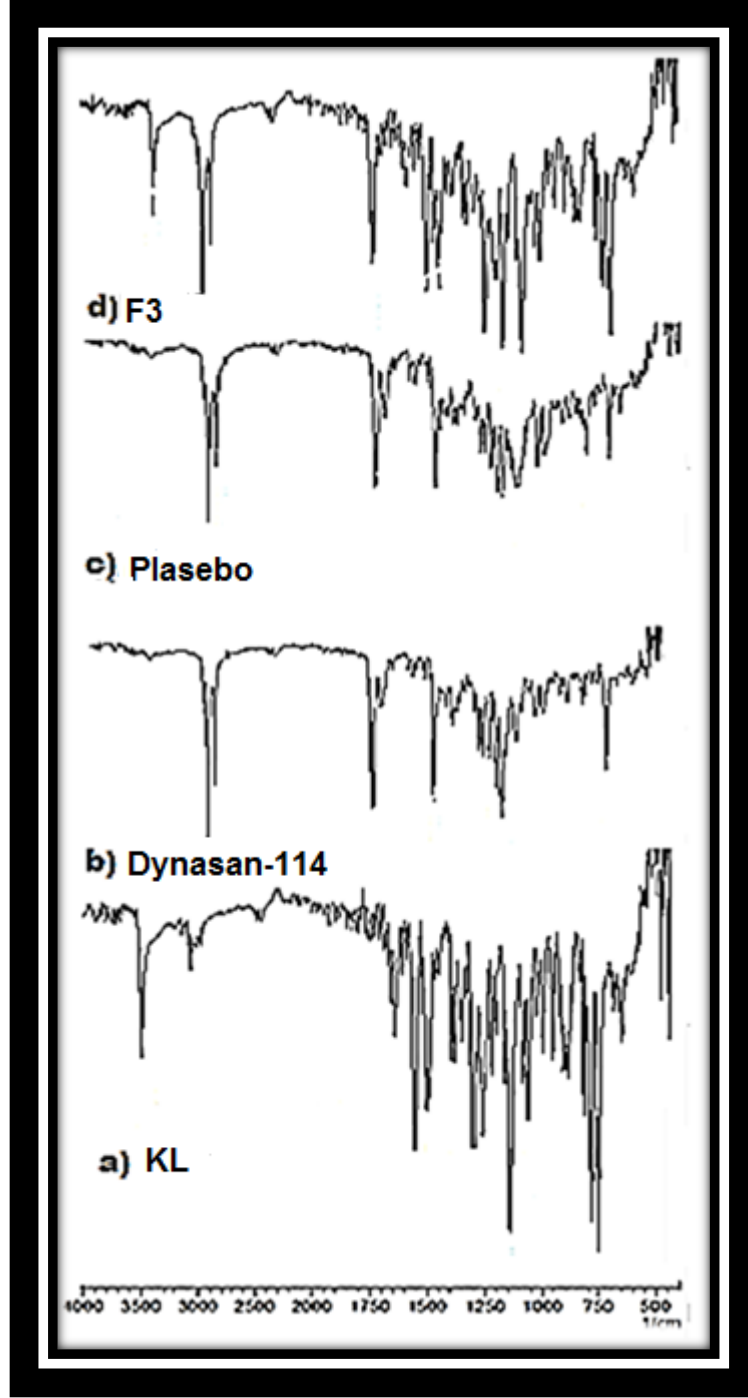


Şekil 5.2. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin X-Işını kırınım profilleri

a: KL, b: Katı lipid (Dynasan® 114), c: Etkin maddesiz formülasyon, d: F3 formülasyonu

5.1.3. İnfrared (FT-IR) analizi

KL, etkin maddesiz formülasyon, katı lipid ve F3 formülasyonuna ait FT-IR spektrumları Şekil 5.3.'de sunulmuştur.

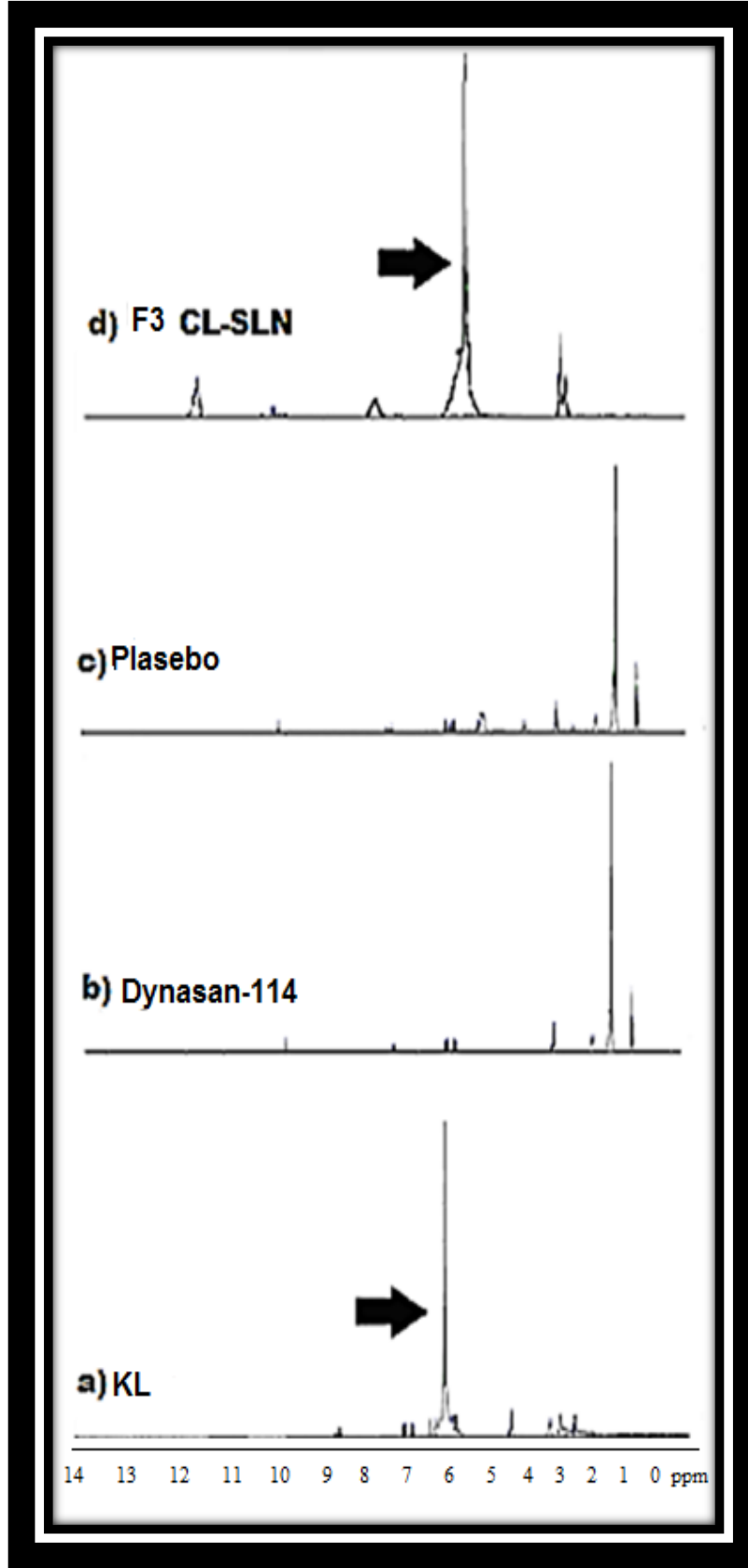


Şekil 5.3. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin FT-IR spektrumları

a: KL, b: Katı lipit (Dynasan[®] 114), c: Etkin maddesiz formülasyon, d: F3 formülasyonu

5.1.4. NMR

KL, etkin maddesiz formülasyon, katı lipit ve F3 formülasyonuna ait ¹H-NMR spektrumları Şekil 5.4.'de sunulmuştur.

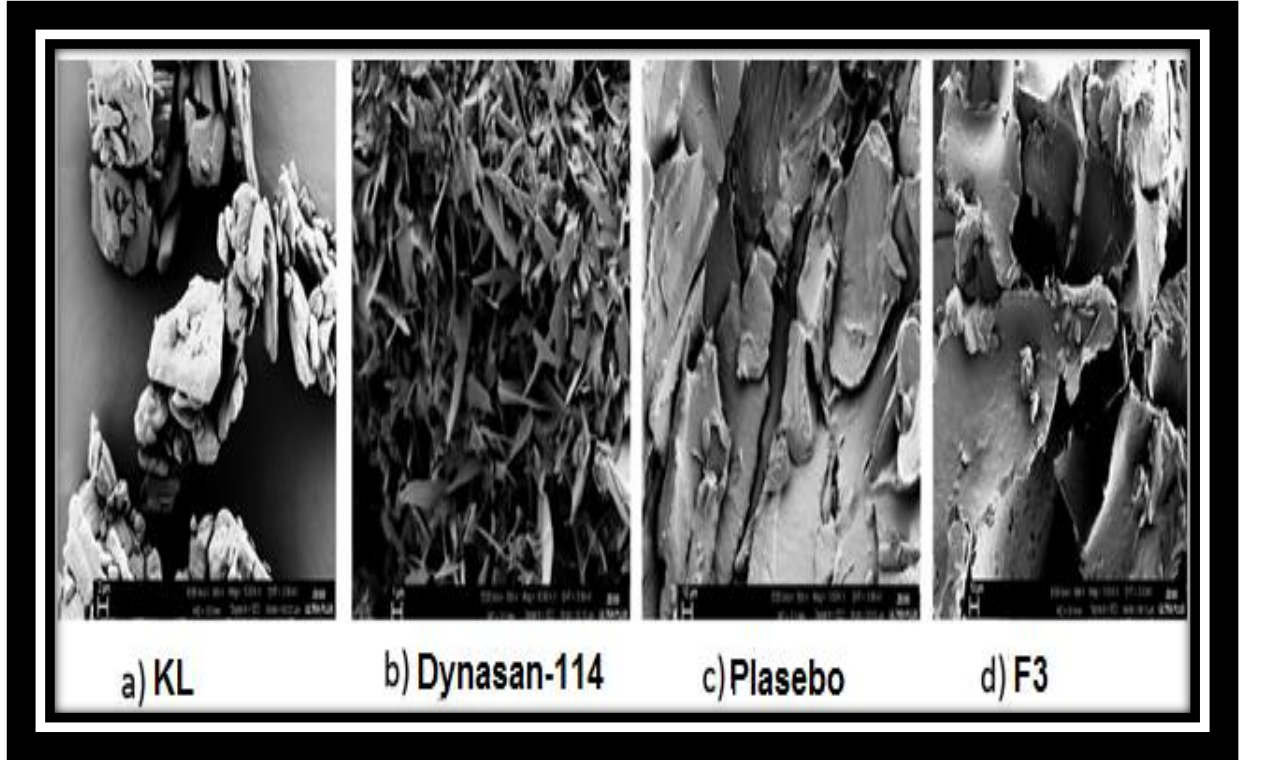


Şekil 5.4. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları

a: KL, b: Katı lipit (Dynasan[®] 114), c: Etkin maddesiz formülasyon, d: F3 formülasyonu

5.1.5. Parçacık şekli ve yüzey özelliği

KL, etkin maddesiz formülasyon, katı lipid ve F3 formülasyonuna ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri Şekil 5.5.'de sunulmuştur.



Şekil 5.5. KL, formülasyon ve formülasyondaki maddelerin SEM görüntüleri

a: KL, b: Katı lipid (Dynasan® 114), c: Etkin maddesiz formülasyon, d: F3 formülasyonu

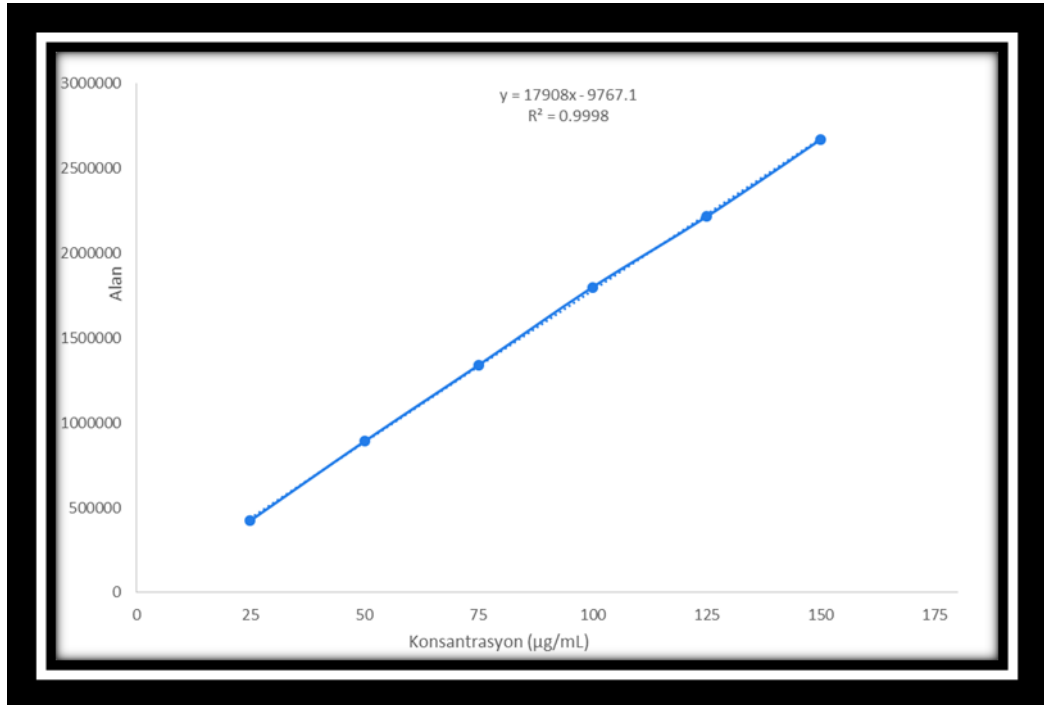
5.2. KL miktar tayini için YBSK

5.2.1. Doğrusallık

25-150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim aralığında 6 farklı derişimde 6 kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından YBSK ile analiz edilmiştir. Derişime karşılık gelen alan değerleri Çizelge 5.1'de sunulmuştur. Alan değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğrusallık eşitliği Şekil 5.6'da sunulmuştur.

Çizelge 5.1. Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler ve alan değerleri (n=6)

KL (µg/mL)	Alan Değerleri						
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	4. Seri	5. Seri	6. Seri	Ortalama
25.0	434752	441312	429208	398220	412183	461195	423866
50.0	881491	865955	876785	892743	892364	888250	891119
75.0	1315368	1310540	1320081	1368650	1322189	1331427	1340755
100.0	1769963	1775888	1777243	1820921	1785216	1795272	1800470
125.0	2247099	2268330	2251538	2207939	2216570	2223370	2215959
150.0	2690650	2697143	2699817	2650811	2648719	2713217	2670915



Şekil 5.6. KL'nin YBSK analizine ait standart eğri ve doğrusallık eşitliği (n=6)

5.2.2. Kesinlik

KL'nin 50, 100, 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişimde 3 farklı çözeltilisi hazırlanmıştır. Her bir derişim için 6 tekrar analizi art arda 3 gün yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen eşitlik yardımıyla hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik için kabul edilebilirlik sınırı varyasyon katsayısının % 2 değerinden az olmasıdır. Kesinlik çalışması sonuçları Çizelge 5.2, Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4'de sunulmuştur. Bulguların kabul edilebilirlik sınırı içinde olması yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

Çizelge 5.2. 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim için kesinlik sonuçları

50 $\mu\text{g/mL}^{-1}$			
	1. Gün (Alan)	2. Gün (Alan)	3. gün (Alan)
	2822663	2824833	2900569
	2845698	2745699	2845716
	2798659	2812659	2874516
	2848596	2798623	2868412
	2818956	2826955	2900058
	2865456	2875656	2888746
	1. Gün (Derişim)	2. Gün (Derişim)	3. gün (Derişim)
	50.4253	50.4478	51.8344
	50.8005	49.0039	50.8167
	49.9542	50.2014	51.3577
	50.8517	49.9692	51.2337
	50.3440	50.4853	51.7767
	51.1815	51.3296	51.6092
Standart Sapma	0.4369	0.7607	0.3835
Varyasyon Katsayısı	0.8636	1.5142	0.7456
% 95 Güven Aralığı	0.4585	0.7983	0.4025

Çizelge 5.3. $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim için kesinlik sonuçları

100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$			
	1. Gün (Alan)	2. Gün (Alan)	3. gün (Alan)
	55469850	83758620	55885230
	55462360	83651240	55689410
	56023630	83461850	56004710
	55984120	82987890	55721340
	55594630	82874290	55362560
	55769820	82674690	55164320
	1. Gün (Derişim)	2. Gün (Derişim)	3. gün (Derişim)
	99.3805	99.5635	100.0254
	99.3042	99.5305	99.7401
	100.1448	100.1434	100.2063
	100.1062	99.7595	99.7021
	99.3821	99.3253	99.0950
	99.7251	100.1251	98.6483
Standart Sapma	0.3793	0.3342	0.5889
Varyasyon Katsayısı	0.3805	0.3351	0.5914
% 95 Güven Aralığı	0.3980	0.3507	0.6180

Çizelge 5.4. $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ derişim için kesinlik sonuçları

150 $\mu\text{g/mL}^{-1}$			
	1. Gün (Alan)	2. Gün (Alan)	3. gün (Alan)
	83884520	83758620	83156320
	83136580	83651240	83451790
	82745920	83461850	83441730

Çizelge 5.4. (Devam) 150 µg.mL⁻¹ derişim için kesinlik sonuçları

	1. Gün (Derişim)	2. Gün (Derişim)	3. gün (Derişim)
	82765820	82987890	82887810
	83843120	82874290	83174390
	82671370	82674690	82774590
	151.2596	151.0334	149.9032
	150.0120	150.8888	150.4821
	149.2617	150.5002	150.4641
	149.2018	149.6007	149.5647
	151.2822	149.4925	150.0318
	149.0800	149.1337	149.3133
Standart Sapma	1.0255	0.8007	0.4711
Varyasyon Katsayısı	0.6836	0.5334	0.3141
% 95 Güven Aralığı	1.0762	0.8403	0.4944

5.2.3. Doğruluk

Doğruluğun belirlenebilmesi için 3 farklı derişimde (50 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹, 150 µg.mL⁻¹) KL içeren stok çözelti hazırlanmış ve her bir derişim için 6 tekrar analizi yapılmıştır. Elde edilen derişim değerleri doğrusalılık çalışmasında elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu ‘% geri kazanım’ olarak hesaplanmıştır. Doğruluk çalışması için kabul edilebilirlik sınırı % 98-102 (±% 2) aralığındadır. Yöntemin geri kazanım ve doğruluğu elde edilen sonuçlara göre kanıtlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.5’de sunulmuştur.

Çizelge 5.5. KL'nin YBSK ile elde edilen doğruluk değerleri (n=6)

Eklenen Derişim			
	50 µg.mL ⁻¹	100 µg.mL ⁻¹	150 µg.mL ⁻¹
	28039710	56519660	83681800
	28122910	55676960	83218570
Elde edilen alan	28057480	55767420	82152780
	28189800	55594560	83401650
	28033180	55752140	82387210
	28269540	56263830	83822210
	50.4106	101.7678	150.8470
	50.5426	100.3226	150.1112
Bulunan Derişim	50.4263	100.4527	148.0059
	50.4708	99.3820	150.2475
	50.3672	99.7885	148.5694
	50.7553	100.7952	151.1477
	100.8211	101.7678	100.5647
	101.0852	100.3226	100.0742
% Geri Kazanım	100.8526	100.4527	98.6706
	100.9416	99.3820	100.1650
	100.7344	99.7885	99.0463
	101.5107	100.7952	100.7651
Ortalama % Geri Kazanım	100.9909	100.4182	99.8810
Standart Sapma	0.2811	0.8300	0.8401
Standart Hata	0.1148	0.3388	0.3430
Varyasyon Katsayısı	0.2784	0.8265	0.8411
% 95 Güven Aralığı	0.2950	0.8710	0.8816

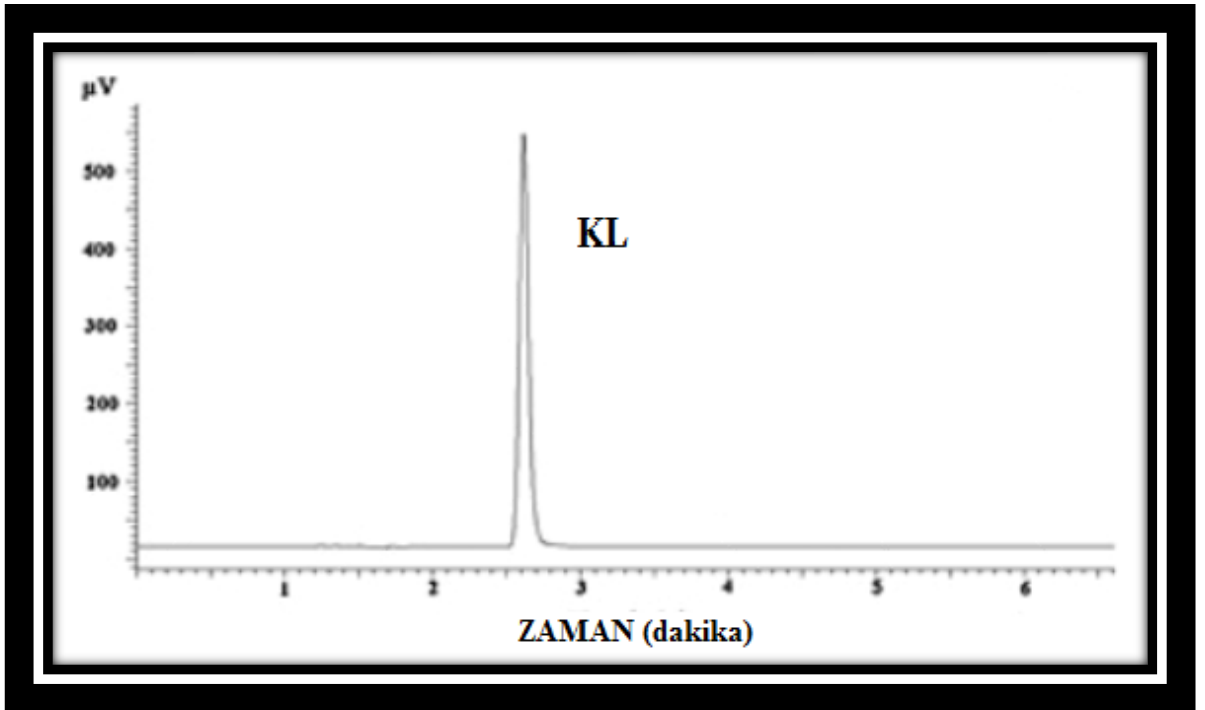
5.2.4. Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri '4.2.1.5. Duyarlılık' bölümünde söz edilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmış ve sırasıyla $0.0001 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ve $0.0005 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olduğu bulunmuştur.

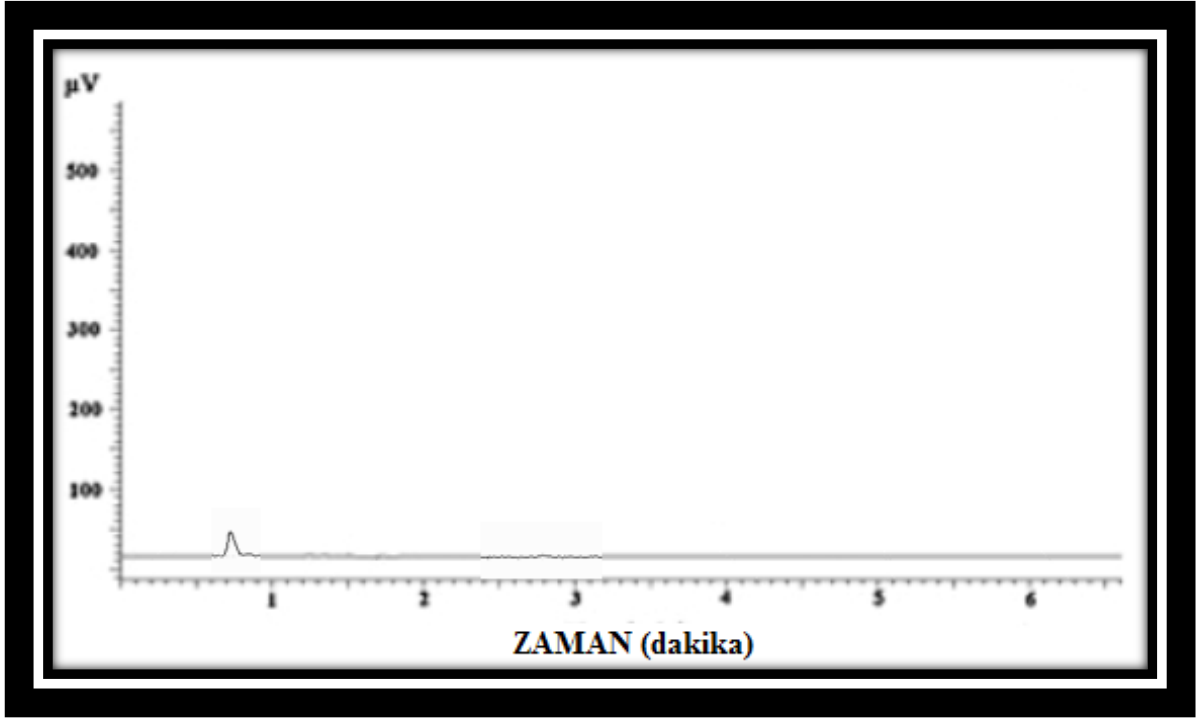
Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en küçük derişim $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olup hesaplanan LOD ve LOQ değerleri bu değerin çok altında bulunmuştur. Bu sonuçlar yöntemin duyarlılığını ispat etmektedir.

5.2.5. Seçicilik

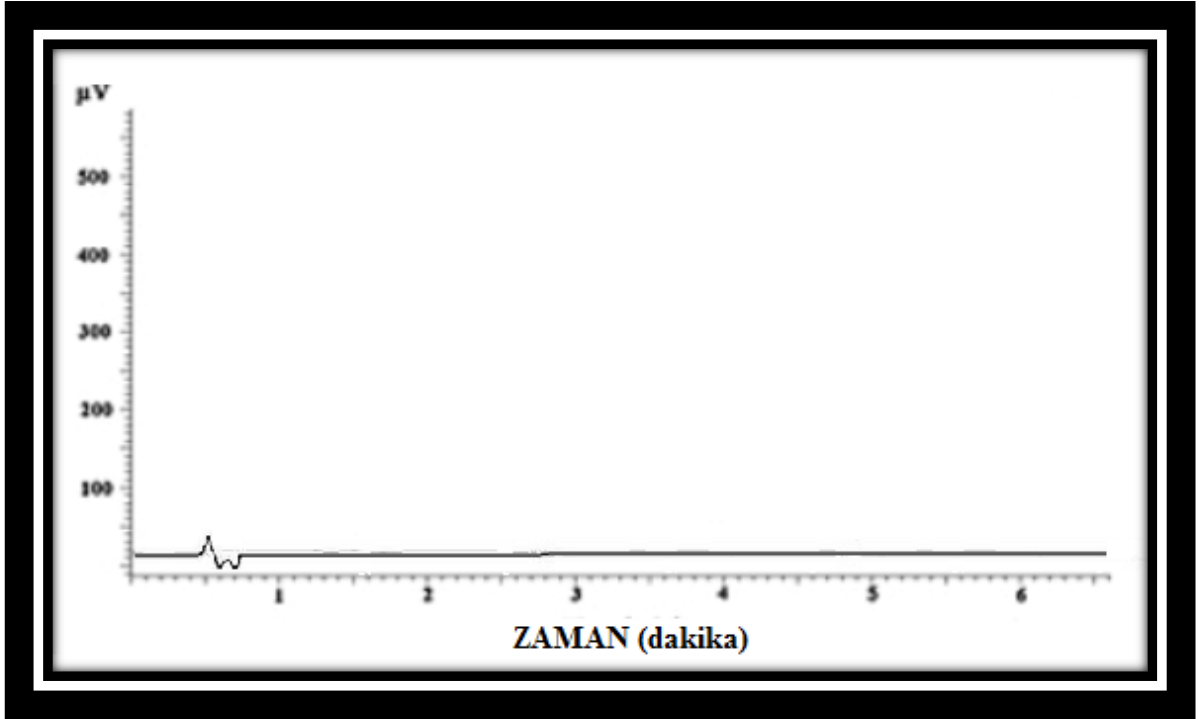
Seçicilik çalışması için KL, hareketli faz ve salım ortamları için elde edilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 5.7., Şekil 5.8., ve Şekil 5.9'da sunulmuştur. Çalışmada etkin madde içermeyen plasebo formülasyon da aynı koşullarda analiz edilmiş formülasyona ait kromatogram Şekil 5.10'da sunulmuştur. Elde edilen kromatogramlar KL'nin iyi biçimde ayrıldığını göstermektedir.



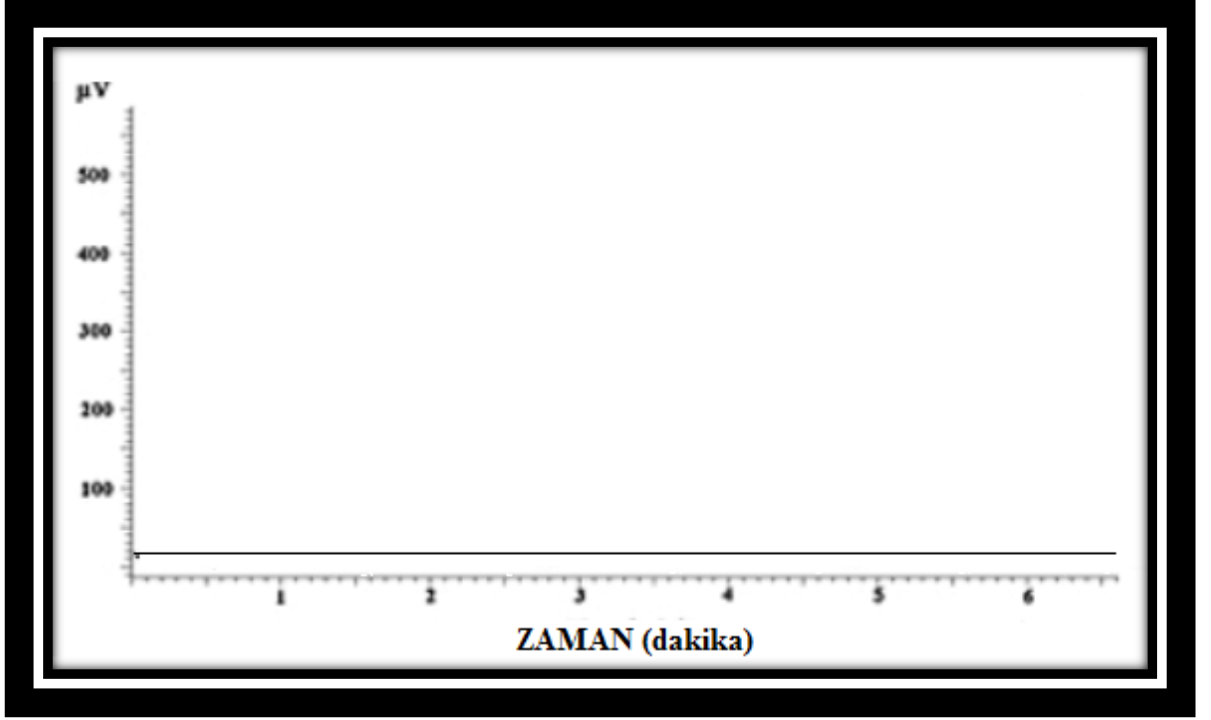
Şekil 5.7. KL'ye ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.8. Hareketli faza ait YBSK kromatogramı



Şekil 5.9. Salın ortamına ait YBSK kromatogramı

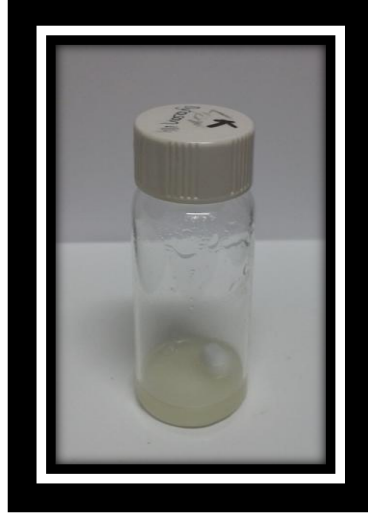


Şekil 5.10. *Plasebo formülasyona ait YBSK kromatogramı*

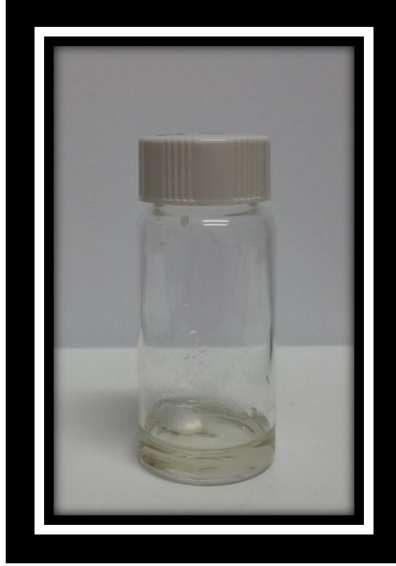
5.3. KLN özelliklerine ait çalışma

5.3.1. KL'nin katı lipitte çözünürlük çalışması

Formülasyonlar hazırlanmadan önce KL'nin katı lipitler içerisindeki çözünürlüğü denenmiştir. KL'nin Dynasan[®] 114'deki çözünürlüğü Görsel 5.1'de, Compritol[®] ATO 888'deki çözünürlüğü Görsel 5.2'de ve Stearik asit'deki çözünürlüğü Görsel 5.3'de gösterilmiştir.



Görsel 5.1. *KL'nin Dynasan® 114'deki çözünürlük denemesi*



Görsel 5.2. *KL'nin Compritol® ATO 888'deki çözünürlük denemesi*



Görsel 5.3. *KL'nin Stearik asit'deki çözünürlük denemesi*

5.3.2. Parçacık boyutu ve dağılım analizi

Dynasan[®] 114 ile hazırlanmış etkin maddeli formülasyonların ortalama parçacık boyutu ve dağılımı (PDI) Çizelge 5.6.'da sunulmuştur.

Çizelge 5.6. *Etkin maddeli KLN formülasyonunun ortalama parçacık boyutu ve dağılımı (PDI) (n=3, Ort±SH)*

Kod	Ortalama Parçacık Boyutu (nm) ± SH	PDI ± SH
F3	130.70 ± 1.80	0.197 ± 0.030

5.3.3. Zeta potansiyel

Dynasan[®] 114 ile hazırlanmış etkin maddeli formülasyonların ortalama zeta potansiyel değerleri Çizelge 5.7.'de sunulmuştur.

Çizelge 5.7. F3 formülasyonunun ortalama zeta potansiyel değeri ($n=3$, $Ort \pm SH$)

Kod	Zeta Potansiyel (mV) \pm SH
F3	-22.70 \pm 1.76

5.3.4. Formülasyonda etkin madde miktar tayini

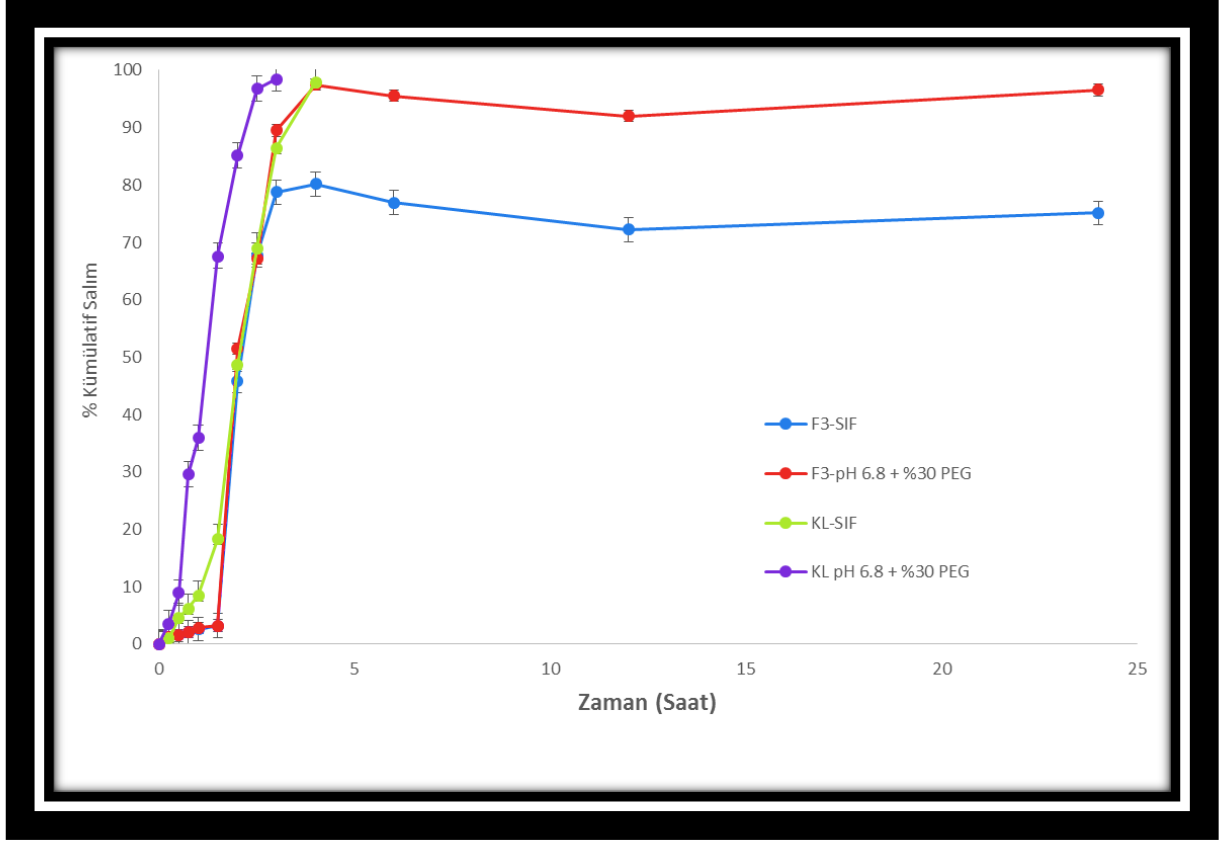
Enkapsülasyon etkinliği hesapları ‘4.2.3.8. Formülasyonda etkin madde miktar tayini’ bölümünde verilen eşitlik ile gerçekleştirilmiş ve enkapsülasyon etkinliği değeri Çizelge 5.8.’de sunulmuştur.

Çizelge 5.8. KLN formülasyonuna ait % Enkapsülasyon Etkinliği ($Ort \pm SH$)

Formülasyon Kodu	Enkapsülasyon Etkinliği (%) \pm SH
F3	96.031 \pm 0.130

5.3.5. *In vitro* salım çalışması

Elde edilen veriler kullanılarak F3 formülasyonu ve saf etkin maddeye ait *in vitro* salım profilleri Şekil 5.11’de sunulmuştur.



Şekil 5.11. *In vitro* salım çalışması

5.4. Kararlılık çalışması

5.4.1. Parçacık boyutu ve dağılım analizi

Seçilen F3 kodlu optimum formülasyonun parçacık boyutu, dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon oranı ölçümleri 0. zaman, 1. ay, 2. ay, 3. ayda tekrarlanmıştır. Verileri Çizelge 5.9'da karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Çizelge 5.9. F3 formülasyonuna ait kararlılık çalışması sonuçları

Gün	25°C + % 60 ± 5 RN				4°C			
	Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mV)	PDI	% EE	Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mV)	PDI	% EE
0	130.70	-22.70	0.197	96.031	130.70	-22.70	0.197	96.031
	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.80	1.76	0.030	0.130	1.80	1.76	0.030	0.130

Çizelge 5.9. (Devam) F3 formülasyonuna ait kararlılık çalışması sonuçları

30	132.73	-21.20	0.185	94.123	130.90	-22.10	0.195	94.988
	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.40	1.66	0.060	0.170	1.60	0.96	0.010	0.210
60	176.45	-20.60	0.189	94.115	132.60	-21.80	0.193	94.852
	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.80	1.96	0.130	0.100	1.10	1.56	0.110	0.180
90	188.96	-19.80	0.176	93.456	138.70	-20.90	0.191	94.785
	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.80	1.22	0.030	0.210	1.30	1.41	0.230	0.140

5.5. Farmakokinetik model çalışması

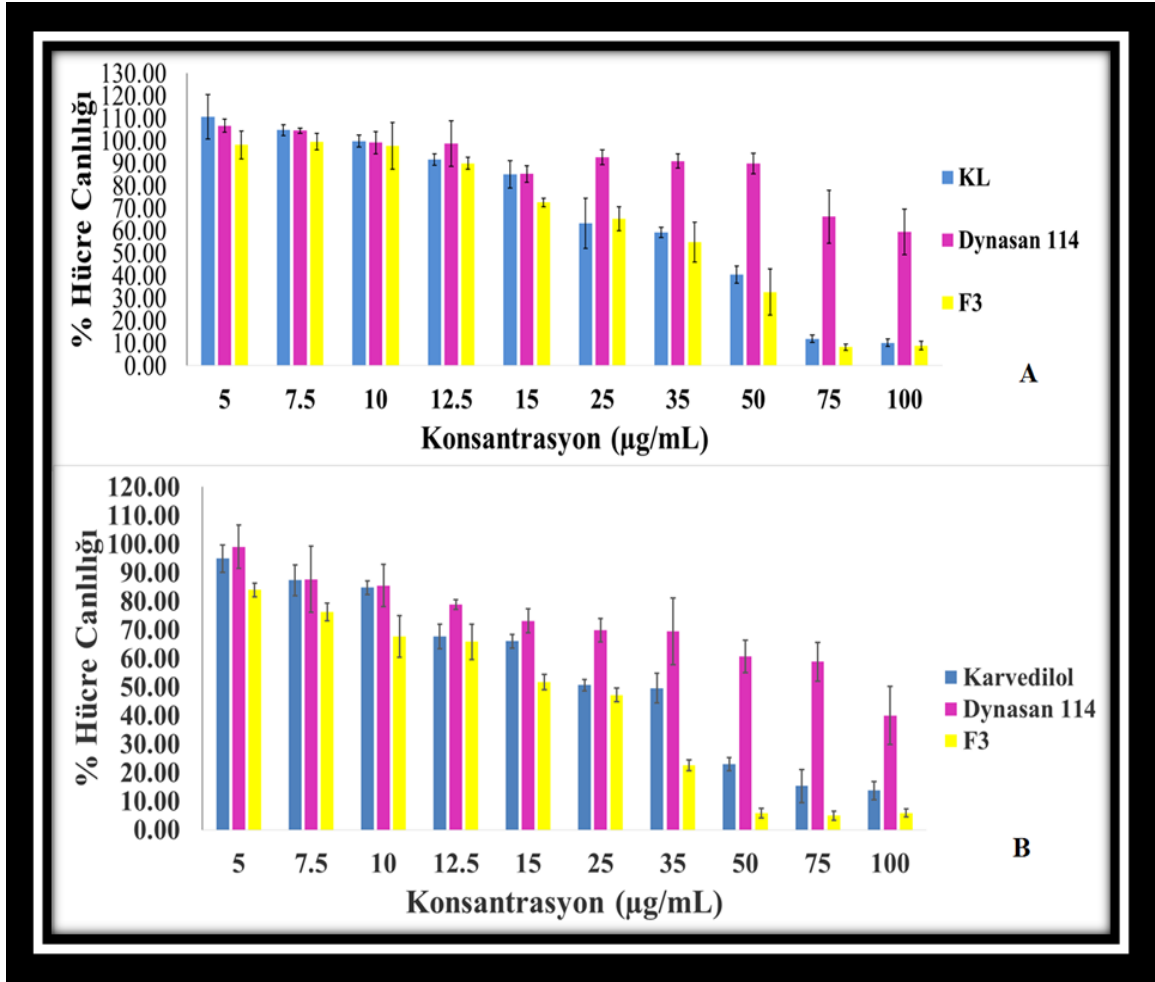
F3 formülasyonu ve saf etkin madde için pH 6.8 + %30 PEG 400 ve SIF'da yapılan salım çalışması verileri farklı kinetik modellere uygulanmış ve formülasyonlara ait k , r^2 ve AIC verileri Çizelge 5.10'da sunulmuştur.

Çizelge 5.10. Saf etkin madde ve formülasyonlara ait salım kinetikleri

Formülasyonlar	Birinci Derece			Higuchi		
	k_1	r	AIC	k_H	r	AIC
KL (pH 6.8 + %30 PEG)	1.172	0.697	76.495	51.844	0.830	71.306
KL (SIF)	0.664	0.520	89.432	36.337	0.680	85.374
F3 (SIF)	0.137	0.583	116.744	22.352	0.547	117.797
F3 (pH 6.8 + %30 PEG)	0.294	0.820	110.759	27.218	0.622	120.399

5.6. *In vitro* sitotoksosite çalışması

Sitotoksosite çalışmasına ait sonuçların zamana ve derişime bağılı olarak sitotoksitesisi Şekil 5.12.'de verilmiştir.



Şekil 5.12. KL yüklü KLN'lerin sitotoksosite profilleri,

A) 24 saat B) 48 saat.

Sitotoksosite çalışması 24 ve 48 saat süreyle MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücreler, farklı konsantrasyonlarda KLN'ler ve etkin madde ile temas ettirilmiştir. Sitotoksosite, 5 µg / mL ila 100 µg / mL arasındaki konsantrasyonların hücrelere uygulanması ile incelenmiştir. 24 ve 48 saat sonra fibroblast hücrelerine KLN ve KL uygulamasından elde edilen sonuçlar Şekil 5.12.'de sunulmuştur.

24 saatlik sitotoksosite test sonuçlarına göre (Şekil 5.12 (A)), Dynasan® 114 en yüksek dozlarda dahi % 50'nin üzerinde hücre canlılığını (% 59.50 ± 1.54) göstermiştir. KL ve KL yüklü katı lipid nanoparçacıkları, 25 µg / mL'den daha yüksek dozlarda (IC₅₀: 41.3 ± 2.30 µg / mL ve IC₅₀: 38.5 ± 1.32 µg / mL, KL ve KL yüklü KLN'den sonra) yüksek sitotoksosite göstermeye başladığı belirlenmiştir.

48 saatlik sitotoksosite test sonuçlarına göre (Şekil 5.12. (B)), tüm formülasyonların sitotoksosite gösterdiği belirlenmiştir. KL ve KL yüklü KLN

formülasyonlarının % 50 büyüme inhibisyonu (IC₅₀) değerleri sırasıyla 25.68 ± 3.33 µg / mL ve 15.48 ± 1.85 µg / mL konsantrasyonda iken Dynasan® 114 için 88.21 ± 6.80 µg / mL olarak bulunmuştur.

6. TARTIŞMA

Bu bölümde yüksek lisans tez çalışması kapsamında kullanılan etkin madde ve yardımcı maddelerin özelliklerine ait elde edilen bulgular ve hazırlanan formülasyona ait *in vitro* çalışmaların bulguları tartışılacaktır.

6.1. Formülasyon hazırlanmasında kullanılan maddelerle ve formülasyonlarla yapılan çalışmalar

Dünya çapında kardiyovasküler kaynaklı hastalıklarla yaşamını sürdürmeye çalışan birçok kişi bulunmaktadır. Son verilere göre Dünya Sağlık Örgütü yaklaşık 2 milyon kişinin kardiyovasküler hastalıkları önlemek ve tedavi etmek amacıyla ilaç kullandığını belirtmektedir. KL seçici olmayan β -adrenerjik ve α_1 -reseptör antagonisti özelliği olan, KY ve Mİ sonrası tedavide klinik etkinliği kanıtlanmış bir etkin maddedir [62].

Konvansiyonel dozaj şekillerinin kullanıldığı tedavi şekillerinde etkin madde plazma düzeyini terapötik pencere aralığında tutmak için gün içinde birkaç kez etkin madde dozunu tekrarlamak gerekmektedir ve bu durum plazma konsantrasyon-zaman grafiğinde dalgalanmalara neden olmaktadır. Kontrollü salım sistemleri, hemen salan dozaj şekillerinin bu sakıncalarını azaltmak amacıyla geliştirilmektedir. Yan etkilerin azaltılması, hasta uyuncunun artırılması ve dozlama sıklığının düşürülmesi gibi pek çok üstünlük literatüre girmiş durumdadır [63].

Bu tez çalışmasında hipertansiyon tedavisinde etkili bir ilaç olan KL'nin, sahip olduğu çözünürlük ve biyoyararlanım problemlerine çözüm sağlamak amacıyla KLN formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Etkin maddenin sudaki ve lipitteki çözünürlük değeri gibi fizikokimyasal özelliklerinin yanında üretim sırasında kullanılacak lipit materyalin çözünürlük özellikleri, KLN'lerin hazırlanabilmesinde etkin olan en önemli basamaklar arasında olduğu için, belirlenen bu kriterler ışığında tez çalışmamızın temel amacı olarak, dar bir parçacık dağılımının, nanometre boyutunun ve yüksek enkapsülasyon etkinliğinin elde edilebileceği bir üretim yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir [3,21]. Yüksek devirli homojenizasyon ve takiben ultrasonikasyon tekniklerinin bir arada kullanıldığı bir üretim yöntemi kullanılmasına karar verilmiştir.

Etkin maddenin ve lipitin DSC, XRD, FT-IR ve NMR analizleri yapılmış ve SEM ile morfolojik yapıları aydınlatılmıştır.

Saf KL, 116.5 °C' de tek bir keskin endotermik erime piki (Bkz. Şekil 5.1) göstermektedir, bu da KL'nin kristal özellikte olduğunu ifade etmektedir. Bu pik KLN formülasyonlarında KL'nin kristal halde olmadığını, daha çok amorf halde olduğunu ve ilacın katı lipit içinde tamamen tuzağa düştüğünü göstermektedir [64].

Formülasyonlarda KL'nin fiziksel durumunu bulmak için XRD'nin ortaya çıkardığı bulgular incelenmiştir. KL'nin kırınım profiline bakıldığında (Bkz. Şekil 5.2.) görünen başlıca karakteristik kırınımlar literatüre bağlı olarak özel pikler izlenmiş ve saf etkin maddenin oldukça kristal yapılı olduğu gözlenmiştir. F3 formülasyonunun XRD profili incelendiğinde ise saf KL'ye oranla amorf bir yapı gözlenmiştir. Doğada katı lipit varlığına bağlı olabilecek bazı keskin pikler saf lipit yapısında da gözlenmiştir. F3 formülasyonundaki KL'nin kaybolmuş bazı pik yapıları, etkin maddenin lipit kristal kafesi parçaları arasına yerleşmiş olduğunu literatüre bağlı kalarak düşünülmektedir [7, 61].

KL ile lipit arasındaki entegrasyonu karakterize etmek için, ¹H NMR ölçümleri yapılmıştır (Bkz. Şekil 5.4) . Katı lipitin protonları ile KL'nin protonları arasındaki spin difüzyon modeli gözlemlenmekte olup, bu da saf KL'nin katı lipit içerisine girdiğini göstermektedir [65]. Basit ¹H-NMR spektroskopisi, lipit protonlarının düşük çizgi genişliklerine bağlı olarak aşırı soğutmalı eriyiklerin kolay ve hızlı bir şekilde tespit edilmesine izin verir. Aynı zamanda, katı ve sıvı lipitlerin harmanlarından yapılmış olan son geliştirilen lipit parçacıklarındaki sıvı nanokompartmanların tanımlanmasına izin verir [66]. ¹H NMR araştırmaları hem nanopartikül sisteminin hem de hapsedilen etkin maddenin hareketliliği ve yapısı hakkında bilgi elde etmek için kullanılır. Etkin maddesiz KLN formülasyonuna ait pikler dağılmış lipit fazının hareketsizleştirilmiş moleküllerinin oluşumunu teyit etmiştir. Plasebo KLN formülasyonundan YEM ve su sinyalleri egemendir. Bu sonuçlar ışığında etkin maddenin üretim prosesinden sonra kolloidal şekilde dağılan lipitin süper-soğutmalı eriyiklerinin oluşumu sırasında lipite başarılı şekilde yüklendiğini göstermektedir [7, 48, 62].

Saf KL'nin IR spektrumu literatüre uygun olarak, N-H gerilmesini 3344.88 cm⁻¹ bantında göstermiştir (Bkz. Şekil 5.3.). Hetero-aromatik yapı, etken maddenin karakteristik bölgesi olan C-H germe titreşimlerinin varlığını 2924 cm⁻¹ bantında ifade etmektedir. Bu bantlar aynı şekilde F3 formülasyonlarında da görülmektedir. Bantlar keskin, yoğunluğa saf etkin maddeye göre zayıftır. IR spektroskopisi temel olarak farklı

atomlar arasındaki etkileşimler hakkında bilgi verir ve hidrojen bağları hakkında bilgi görüntülemek için çok yararlıdır [62].

Formülasyonların ortalama parçacık boyutu, 130.7 ± 1.8 'den 154.4 ± 2.4 nm arasında değişirken (Bkz. Çizelge 5.9), düşük PDI'ları dar parçacık boyutu dağılımını göstermektedir. YEM'in konsantrasyonunun % 1'den % 4'e yükseltilmesinin parçacık boyutunda belirgin bir azalmaya neden olduğu açıkça gözlenmiştir [59]. Parçacıkların ortalama çapı, Peyer yamalarındaki M hücrelerinin GI absorpsiyonunu sağlamak için uygundur [48]. Homojen bir boyut dağılımının ölçütü olarak kullanılan PDI, tüm formülasyonlar için kabul edilebilir sınırlarda bulunmuştur. Genellikle, küçük bir PDI değeri homojen bir popülasyonu gösterirken, daha büyük bir PDI, parçacık boyutunda yüksek bir heterojenite anlamına gelmektedir [7, 48].

Zeta potansiyeli, koloidal dispersiyonların kararlılığını değerlendirmek için önemli bir faktördür [7, 67]. Sonuçlardan tasvir edildiği üzere, F3 formülasyonu negatif yüklü bulunmuştur, bu da nispeten iyi bir kararlılık ve kaliteye işaret etmektedir.

Morfolik incelemeye göre saf KL düzensiz bir şekle sahipken, lipit Dynasan® 114 şekli küme benzeri yapılar olarak izlenmiş, F3 formülasyonu da literatürle uyumlu olarak pul şeklinde gözlemlenmiştir [68].

6.2. Analitik yöntem geliştirme ve validasyon

İncelenen literatür çalışmalarında *in vitro* salım çalışmaları ve miktar tayini yöntemi olarak KL için hem YBSK hem ultraviyole (UV) spektrofotometrik yöntemler kullanıldığı gözlenmiştir [31-34].

Tez çalışmamızda YBSK yöntemi kullanılmıştır (Bkz. Çizelge 4.6.). Analiz süresi daha kısa ve LOD ile LOQ değerleri açısından bakıldığında çok daha hassas bir yöntemdir [32]. Etkin maddenin farklı dalga boylarında görünür pik verdiği incelenen literatürlerde tespit edilmiş ve bu literatürlerden farklı olarak 242 nm dalga boyunda ideal şiddet ve morfolojide kısa sürede pik elde edilmiştir. Doğrusallık çalışması kapsamında r^2 0.9998 olarak bulunmuş ve bu değere bağlı olarak sistemin doğrusallığı ispatlanmıştır (Bkz. Çizelge 5.1 ve Şekil 5.6.). 3 ayrı gün boyunca yapılan kesinlik çalışmalarında geliştirilen yöntemin varyasyon katsayısı %2 değerinin oldukça altında bulunmuş ve yöntemin kesinliği ispatlanmıştır (Bkz. Çizelge 5.2, Çizelge 5.3. ve Çizelge 5.4). Yöntemin seçicilik (Bkz. Şekil 5.7, Şekil 5.8, Şekil 5.9. ve Şekil 5.10.) çalışması için boş formülasyon ve saf etkin madde ile çalışmalar yapılmış ve herhangi bir girişim

ya da pik oluşumu gözlenmemiştir. Üç farklı derişim ile çalışılan doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile geliştirilmiş yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır (Bkz. Çizelge 5.5). Geliştirilen yöntemde etkin madde saptama sınırı hesaplanmış ve çalışmalar bu sınırlar dahilinde ilerlemiştir.

6.3. Kararlılık çalışması ve enkapsülasyon oranı

En düşük parçacık boyutuna ve en iyi zeta potansiyel değere sahip KLN formülasyonları arasından, F3 formülasyonu optimum formülasyon olarak seçilmiştir. Kararlılık çalışması için F3 formülasyonları kehribar renkli kaplarda saklanmıştır. F3 formülasyonunun parçacık boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği 3 ay boyunca incelenmiştir. Verilerde istatistiksel olarak (two-way ANOVA testi) anlamlı bir değişme gözlenmemiştir ($p > 0.05$).

İlaç taşıyıcıları olarak KLN'lerle ilgili önemli bir parametre, ilaç kapsülleme kapasiteleridir. Özetle KL formülasyonda (F3) 96.031 ± 0.130 'luk yüksek bir enkapsülasyon oranı gözlenmiştir. 3 aylık kararlılık çalışması sonucunda bu değerde nispeten bir azalma gözlenmiş fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

6.4. *İn vitro* salım çalışması ve kinetik modelleme

Kolloidal sistemlerde etkin madde salımında birden fazla mekanizma rol almaktadır. Etkin madde yüzeye tutunabilir, aynı zamanda lipitin içine hapsolabilir. Yüzeye tutunan etkin madde ani salım ile patlama etkisi gösterebilir. KL'nin kısa yarı ömürlü etkin madde olması ve piyasada bulunan geleneksel tablet formülasyonundan hızla salınması hastanın günde iki kez ilacı kullanmasına sebep olmaktadır. *İn vitro* salım çalışmaları KL'nin KLN'den salımının 20 saatin üzerinde olduğunu göstermiştir.

SIF'de ve bu vasata %30 PEG 400 eklenmiş iki ayrı ortamda yapılan deney çalışmasında, SIF'de F3 formülasyonundan % kümülatif etkin madde salımı 24 saat sonunda 75.13 ± 0.15 bulunurken, pH 6.8 +% 30 PEG 400'deki % kümülatif etkin madde salımı 96.57 ± 0.40 olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 5.11). Çözünürlüğü arttıran PEG sebebiyle kümülatif salımın daha fazla olduğu düşünülmektedir. Saf etkin madde ile karşılaştırmalı olarak yapılan çalışmada salımın kontrollü hale getirildiği gözlenmiştir. KL'nin yavaş salınması, etkin maddenin çekirdekte olduğunu ve lipit ile

çevrelendiğini düşündürmektedir. Diffüzyon mesafesinin artması nedeniyle ilacın salınım süresi de uzamıştır [48, 64].

In vitro salım çalışması kontrolünde kinetik modelleme kullanılmıştır (Bkz. Çizelge 5.10). Bu modelleme *in vivo* çalışmalar öncesinde emilimi öngörmek açısından önemlidir [59]. Piyasada bulunan pek çok ilaç sıfır derece veya birinci derece ya da patlama etkisi ardından sıfır derece veya birinci derece kinetikte salım göstermektedir [71]. Kullanılan kinetik modelleme hesaplama doğru salım profilini belirlemek için DDSolver bilgisayar programı ile yapılmıştır. Elde edilen veriler üç önemli kriteri belirlemek üzere DDSolver programına aktarılmıştır. Bu kriterler k, AIC ve r^2 ve değerlendirmede en yüksek k ve r^2 değeri ile en düşük AIC değeri esas alınmıştır [59]. Sıfırncı derece, birinci derece, Higuchi, Hopfenberg, Hixon-Crowell ve Korsmeyer-Peppas modelleri seçilmiş ve yapılan değerlendirmenin ardından salım profilinin Higuchi ve birinci derece kinetiğe uyum gösterdiği belirlenmiştir.

6.5. Sitotoksisite çalışması

Nanopartiküllerin sitotoksisite analizi, hastaya herhangi bir risk getirmediğinden veya akut toksisite cevabı ortaya çıkmadığından emin olmak için yapılır ve hayati önem taşımaktadır. KL'nin Dynasan[®] 114 nanopartiküllerinin toksisitesi, 24 ve 48 saat boyunca 3T3 fare embriyo fibroblast hücre dizileri kullanılarak incelenmiştir (Bkz. Şekil 5.12). Literatür taramalarında Dynasan[®] 114'ün lipit olarak % 0.01-10 arasında değişen oranlarda hazırlanan KLN formülasyonlarında anlamlı bir sitotoksisite görülmemiştir [60, 61].

Genellikle, % 60'dan fazla hücre yaşayabilirliği gösterilmiştir [69, 70]. Elde ettiğimiz sonuçlar Dynasan[®] 114 ile hazırlanan formülasyonda sadece 48 saat inkübasyon periyodunun sonunda %60'a kadar bir azalma göstermiştir [25, 26].

Literatür çalışmalarında KL'nin, kullanılan doza ve hücre hattına bağlı olarak farklı insan tümör hücre çizgileri üzerinde sitotoksisiteye neden olduğunu bulmuştur. Burman ve arkadaşları tarafından yürütülen bu çalışmada, KL, *in vitro* sitotoksisiteyi önemli ölçüde gösterir. KL için ED₅₀'nin PTC (kolon) hücrelerinde 7 µg / mL olduğu, MiaPaCa.2 (pankreas) hücrelerinde 33 µg / mL'nin olduğu bulunmuştur [69]. KL'nin, 10 µL'ye eşit veya daha düşük konsantrasyonlarda sitotoksik olmamasını daha yüksek dozajların (≥20 µL) sitotoksik olduğunu göstermiştir, çünkü T hücre apoptozu indüklenmekte ve bu nedenle hücre canlılığı düşmeye başlamaktadır [69, 70].

Çalışmamızda, KL, 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon periyodu boyunca 25 ug / mL'den sonra yüksek sitotoksosite göstermiştir. Bütün sonuçlar değerlendirildiğinde formülasyonlarımıza doz ve zamana bağlı toksisite gösterdiği saptanmıştır. Sonuçlarımız literatürdeki çalışmalarla benzerlik ve farklılıklar göstermektedir. Kullandığımız lipit oranının, YEM'in türüne ve miktarına, hazırlanma yöntemine bağlı olarak MTT'de kullanılan kuluçka sürelerinin ve seçilen hücre türünün bu farklılıklara yol açtığı düşünülmektedir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, KL yüklü katı lipit Dynasan® 114 ile hazırlanan ideal formülasyonlarda parçacık boyutu, PDI, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç salınım özellikleri aydınlatılmıştır.

IR, NMR, DSC ve XRD analizleri ile fizikokimyasal yapı aydınlatılmıştır. 3 aylık kararlılık testi sonucunda parçacıkların boyutunda, zeta potansiyel değerinde ve enkapsülasyon kapasitesinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. F3 formülasyonunun kararlı bir formülasyon olduğu gösterilmiştir. Ayrıca KL için valide edilen YBSK yönteminin analitik miktar tayini için seçici ve doğru bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan salım deneyleri saf etkin maddeye göre salım hızının KLN ile kontrollü hale getirildiğini ifade etmektedir. Dolayısıyla KL yüklü KLN'lerin kardiyovasküler hastalıklar için alternatif bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu düşünülmektedir.

Sitotoksisite açısından çalışma değerlendirildiğinde, hazırlanan formülasyonların derişim ve zamana bağı olarak yalnızca yüksek dozda sitotoksisite gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç ilerleyen zamanlarda yapılması planlanan *in vivo* deneyler için önemli bir parametredir.

Geliştirilen kararlı ve güvenli KLN'lerin, KL'nin sürekli ve kontrollü olarak verilmesi için umut verici bir taşıyıcı olduğu sonucuna varıyoruz.

İlerleyen çalışmalarda F3 formülasyonunun antioksidan etkisinin *in vitro* değerlendirilmesi ve *in vivo* hayvan deneylerinin yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] Demirel, M. ve Yazan, Y. (2000). Katı lipit nanopartiküller. *FABAD-Farmasötik bilimler Dergisi*, 25, 167-179.
- [2] Müller, R.H., Mader, K. and Gohla, S. (2011). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 161-177.
- [3] Eldem, T., Speiser, P. and Hıncal, A.A. (1991). Optimization of spray-dried and congealed micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharmaceutical Research*, 8, 47-54.
- [4] Kaş, H.S. (2002). İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. A.Z. Gürsoy (Ed.). *Kontrollü Salım Sistemleri* içinde (s. 65-102). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.
- [5] Müller, R.H. and Keck, C.M. (2004). Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid Nanoparticles. *Journal of Biotechnology*, 113, 151-170.
- [6] Wissing, S.A., Kayser, O. and Müller, R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Del. Rev.*, 56, 1257-1272.
- [7] Mehnert, W. and Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv. Drug Del. Rev.*, 47 (2-3), 165-96.
- [8] Cavalli R., Caputo O., Marengo E., Pattarino F. and Gasco M. R. (1998). The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (KLN) containing a series of model molecules. *Pharmazie*, 53, 392-396.
- [9] Bummer, P.M. (2004). Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery- solid lipi Nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21 (1), 1-19.
- [10] Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M. E., Trotta, M., Scarnecchia, C. and Gasco, M.R. (1997). Sterilization and freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid Nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 148, 47-54.

- [11] Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S. and Müller, R.H. (1994). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Cont. Rel.*, 30, 83-96.
- [12] Garud, A., Singh, D. and Garud, N. (2012). Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1 (11), 384-393.
- [13] Müller, R.H., Petersen, R.D., Hommos, A. and Pardeike, J. (2007). Nanostructured lipid carriers (NLT) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 522-530.
- [14] Souto, E.B., Almeida, A.J. and Müller, R.H. (2007). Lipid nanoparticles (KLN[®], NLT[®]) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 317-331.
- [15] Gökçe, E.H. and Özer, Ö. (2014). Katı Lipit Nanopartiküller. A.Z. Gürsoy (Ed.). *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları* içinde (s. 77-88). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.
- [16] Dingler, A., Runge, S. and Muller, R.H. (1996). SLN (Solid Lipid Nanoparticles) as drug carrier for an IV administration of poorly water soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 132-269.
- [17] Abdurrahma, M. H. and Badr-Eldin, S. M. (2014). Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. *Expert Opin Drug Deliv.*, 11 (12), 1865-83.
- [18] Pandya, B. J., Parmar, D. R., Soniwala, M. M. and Chavda, J. R. (2013). Solid Lipid Nanoparticles: Overview on Excipients. *Asian Journal of Pharmaceutical Thechnology & Innovation*, 01 (03):, 1-9.
- [19] Numanoğlu, U. ve Tarımcı, N. (2006). Katı lipid Nanopartiküllerin (KLN) Özellikleri, Farmasötik ve Kozmetik alandaki Uygulamaları. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35 (3), 211-235.
- [20] Ramteke, K. H., Joshi, S. A. and Dhole, S. N. (2012). Solid lipid nanoparticle: a review. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2 (6), 34-44.

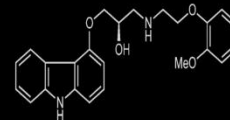
- [21] Freitas, C. and Müller, R.H. (1998). Spray-drying of solid lipid nanoparticles (SLN). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46, 145-151.
- [22] Gasco, M.R. (1993). 'Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. *US Patent*, 5, 236-250.
- [23] Trotta, M., Debernardi, F. and Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 257, 153-160.
- [24] Hou, D-Z., Xie, C-S., Huang, K-J. And Zhu, C-H. (2003). The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24, 1781-1785.
- [25] Schwarz, C. and Mehnert, W. (1997). Freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.*, 157, 171-179.
- [26] Westesen, K., Siekmann, B. and Koch, M.H. J. (1993). Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *International Journal of Pharmaceutics*, 93, 189-199.
- [27] Doktorovova, S., Gokce, E., Ozyazici, M. and Souto, E.B. (2009). Lipid matrix nanoparticles: Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. *Current Nanoscience*, 368-371.
- [28] Jennings, V. and Gohla, S. (2000). Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN®). *Int. J. Pharm.*, 196, 219-222.
- [29] Zur Muhlen, A., Schwarz, C. and Mehnert, W.(1998). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45, 149-155.
- [30] Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, S.A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Del. Rev.*, 54 (1), 131-155.
- [31] Özyazici, M., Gökçe, E.H. and Yurdasiper, A. (2012). Nanosized drug delivery for enhancement of oral bioavailability" In: "Patenting nanomedicines: Legal aspects, Intellectual property and Grant opportunities" Ed: E.B. Souto, 305-344 ISBN: 978-3-642-29264-4 Berlin, Springer.

- [32] Hokama, N., Hobara, N., Kameya H., Ohshiro S. and Sakanashi M. (1999). Rapid and simple micro-determination of carvedilol in rat plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 732, 233–238.
- [33] Lanlan, W., Peinan, S., Shufan, g N. and Weisan, P. (2005). Preparation and Evaluation of SEDDS and SMEDDS Containing Carvedilol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31, 785–794.
- [34] Bristow, M. R., Larrabee, P., Minobe, W., Roden, R., Skerl, L., Klein, J. And Müller-Beckmann, B. (1992). Receptor pharmacology of carvedilol in the human heart. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 19, 68-80.
- [35] Yoshikawa, T., Port, J. D., Asano, K., Chidiak, P., Bouvier, M., Dutcher, D., and Bristow, M. R. (1996). Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. *European heart journal*, 17 (suppl B), 8-16.
- [36] Francis, G.S., Benedict, C., Johnston, D.E., Kirlin, P.C., Nicklas, J., Liang C.S., Kubo, S.H., Rudin-Toretsky, E. and Yusuf S. (1990). Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*, 82, 724-9.
- [37] Özdemir, O.A. ve Ertaş, F.S. (2005). Karvedilol: Klinik Kullanımı, *Dahili Tıp Bilimleri Dergisi*. 12(4), 183-189.
- [38] Packer, M. (1992). The neurohormonal hypothesis: A theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol.*, 20, 248-54.
- [39] Packer, M. (1998). Beta-adrenergic blockade in chronic heart failure: Principles, progress, and practice. *Prog Cardiovasc Dis.*, 41, 39-52.
- [40] Book, W.M. (2002). Carvedilol: A nonselective beta-blocking agent with antioxidant properties. *Congest Heart Fail.*, 8, 173-7.
- [41] Gürdal, H. Ve Kayaalp, O. (2009). Beta-Adrenerjik Reseptör Blokörleri. *Tıbbi Farmakoloji* içinde (s. 454-466). İstanbul: Pelikan Yayıncılık.

- [42] Boyle, D.A., Tenero, D.M. ve Cyronak, M.J. (1991). Dose-proportional stereoselectivity of carvedilol pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 126 (Abs PI-14).
- [43] Dunn, C.J., Lea, A.P., Wagstaff, A.J. (1997). Carvedilol: A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in cardiovascular disorders. *Drugs*, 54, 161-85.
- [44] Hardman, J.G., Limbird, P.B. and Gilman, A.G. (2001). In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York, McGraw-Hill.
- [45] Baboota, S., Faisal, M.S., Ali, J. and Ahuja, A. (2009). Effect of poloxamer 188 on lymphatic uptake of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for bioavailability enhancement. *Journal of Drug Targeting*, 17(3), 249–256.
- [46] Neugebauer, G., Akpan, W., Möllendorff, E. V., Neubert, P. and Reiff, K. (1987). Pharmacokinetics and disposition of carvedilol in humans. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 10, 85-S88.
- [47] Möllendorff, E. V., Reiff, K. and Neugebauer, G. (1987). Pharmacokinetics and bioavailability of carvedilol, a vasodilating beta-blocker. *European journal of clinical pharmacology*, 33(5), 511-513.
- [48] Prasanthi, N. L., Gondhi, S., Manikiran, S. S., Kumar, S. N. and Rao, N. R. (2011). Solid lipid nanoparticles of carvedilol by hot homogenization: Formulation and evaluation. *Inventi Rapid: NDDS*, 2(2), 1-16.
- [49] Stojanovic, J., Marinkovic, V., Vladimirov, S., Velic̃kovic, D. and Sibinovic P. (2005). Determination of Carvedilol and its Impurities in Pharmaceuticals, *Chromatographia*, 62, 539–542.
- [50] Balkan, A. (2016). Adrenerjik Bloke Edici İlaçlar. *Farmasötik Kimya 1* içinde, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 473-489.
- [51] RxMediaPharma® 2015
- [52] Warne, T., Edwards, P. C., Leslie, A. G., & Tate, C. G. (2012). Crystal structures of a stabilized β 1-adrenoceptor bound to the biased agonists bucindolol and carvedilol. *Structure*, 20(5), 841-849.
- [53] ¹<http://www.ilactr.com/etken-madde/karvedilol> (Erişim Tarihi: 11.02.2017)

- [54] Kayaalp, O. (2009). Antihipertansif İlaçlar. Tıbbi Farmakoloji içinde, Pelikan Yayıncılık, 347-387.
- [55] Patel, L. J., Suhagia, B. N., Shah, P. B., and Shah, R. R. (2006). RP-HPLC and HPTLC methods for the estimation of carvedilol in bulk drug and pharmaceutical formulations. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 68(6), 790.
- [56] ICH, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2014). *ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Q2(R1). 1-13.
- [57] Pople, P. V., and Singh, K. K. (2011). Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: application to topical delivery of tacrolimus. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(1), 82-94.
- [58] Başaran, E., Demirel, M., Sırmagül, B. and Yazan, Y. (2010). Cyclosporine-A incorporated cationic solid lipid nanoparticles for ocular delivery. *Journal of microencapsulation*, 27(1), 37-47.
- [59] Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., and Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS journal*, 12(3), 263-271.
- [60] Olbrich, C., Schöler, N., Tabatt, K., Kayser, O., and Müller, R. H. (2004). Cytotoxicity studies of Dynasan 114 solid lipid nanoparticles (SLN) on RAW 264.7 macrophages—impact of phagocytosis on viability and cytokine production. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(7), 883-891.
- [61] Sharma, A., Jain, C. P. and Tanwar, Y. S. (2013). Preparation and characterization of solid dispersions of carvedilol with poloxamer 188. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(1), 1553-1557.
- [62] Alves, J. M. V., Prado, L. D. and Rocha, H. V. A. (2016). Evaluation and correlation of the physicochemical properties of carvedilol. *Pharmaceutical development and technology*, 21(7), 856-866.

- [63] Gürsoy, A.Z. (2002). Giriş. İçinde: A.Z. Gürsoy (Ed.). *Kontrollü Salım Sistemleri* içinde (s. 65-102). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği.
- [64] Mishra, A., Imam, S. S., Aqil, M., Ahad, A., Sultana, Y., Ameerduzzafar and Ali, A. (2016). Carvedilol nano lipid carriers: formulation, characterization and in-vivo evaluation. *Drug delivery*, 23(4), 1486-1494.
- [65] Wissing, S. A., Müller, R. H., Manthei, L., and Mayer, C. (2004). Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. *Pharmaceutical research*, 21(3), 400-405.
- [66] Morel, S., Terreno, E., Ugazio, E., Aime, S. and Gasco, M. R. (1998). NMR relaxometric investigations of solid lipid nanoparticles (SLN) containing gadolinium (III) complexes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 45(2), 157-163.
- [67] Aboud, H. M., Ali, A. A., El Menshawe, S. F. and Elbary, A. A. (2016). Development, optimization, and evaluation of carvedilol-loaded solid lipid nanoparticles for intranasal drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, 17(6), 1353-1365.
- [68] Liu, D., Pan, H., He, F., Wang, X., Li, J., Yang, X. and Pan, W. (2015). Effect of particle size on oral absorption of carvedilol nanosuspensions: *in vitro* and in vivo evaluation. *International journal of nanomedicine*, 10, 6425.
- [69] Cheng, S. M., Yang, S. P., Ho, L. J., Tsao, T. P., Chang, D. M. and Lai, J. H. (2003). Carvedilol Modulates In-Vitro Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Induced Interleukin-10 Production in U937 Cells and Human Monocytes. *Immunological investigations*, 32(1-2), 43-58.
- [70] Yang, S. P., Ho, L. J., Lin, Y. L., Cheng, S. M., Tsao, T. P., Chang, D. M. and Lai, J. H. (2003). Carvedilol, a new antioxidative β -blocker, blocks *in vitro* human peripheral blood T cell activation by downregulating NF- κ B activity. *Cardiovascular research*, 59(3), 776-787.
- [71] Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L. and Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm.*, 67(3), 217-23.



INTRODUCTION

Solid lipid nanoparticles (SLNs) are one of the most promising particulate delivery systems to improve the oral bioavailability of lipophilic drugs¹.

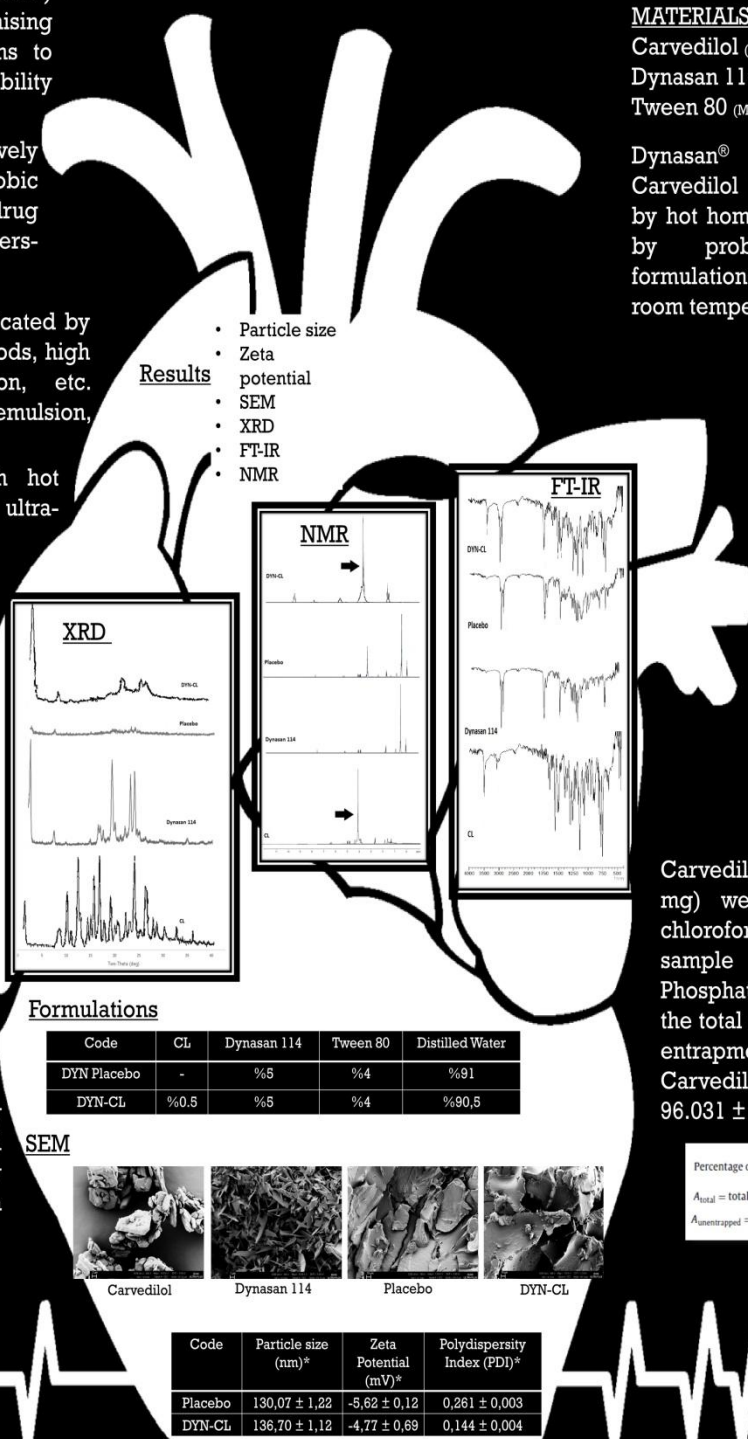
SLN is able to effectively encapsulate hydrophobic molecules with higher drug payload than biopolymers-based nanoparticles².

Generally, SLN can be fabricated by a number of different methods, high pressure homogenization, etc. solvent diffusion, microemulsion, etc.

SLNs were prepared with hot homogenization and ultrasonication methods³.

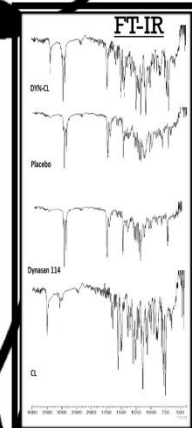
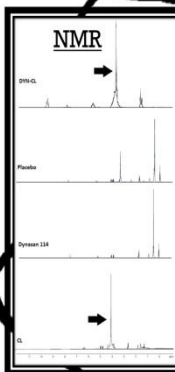
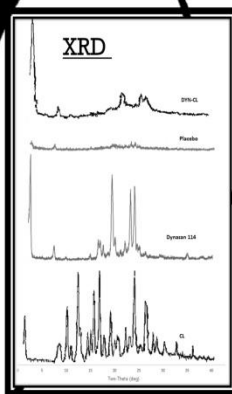
Carvedilol (CL) is a nonselective β -blocker used as an antihypertensive agent, having low oral bioavailability (around 23%) as a result of extensive hepatic first pass metabolism. The drug is well tolerated and has relatively few adverse effects. To increase the bioavailability of carvedilol, buccal and transdermal routes have been tried⁴.

Nevertheless, bioavailability enhancement upon peroral delivery is still in infancy and no work has been reported so far.



Results

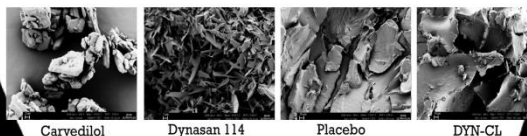
- Particle size
- Zeta potential
- SEM
- XRD
- FT-IR
- NMR



Formulations

Code	CL	Dynasan 114	Tween 80	Distilled Water
DYN Placebo	-	%5	%4	%91
DYN-CL	%0,5	%5	%4	%90,5

SEM



Code	Particle size (nm)*	Zeta Potential (mV)*	Polydispersity Index (PDI)*
Placebo	130,07 ± 1,22	-5,62 ± 0,12	0,261 ± 0,003
DYN-CL	136,70 ± 1,12	-4,77 ± 0,69	0,144 ± 0,004

MATERIALS & METHOD

Carvedilol (Santa Farma, Turkey)
 Dynasan 114 (Sasol, Germany)
 Tween 80 (Merck, Germany)

Dynasan[®] 114 as the solid lipid. Carvedilol loaded SLNs were prepared by hot homogenization method followed by probe ultrasonication and formulations were cooled down to the room temperature.

ANALYTICAL METHODS

Carvedilol was estimated employing a validated HPLC method. The analysis was performed at wavelength of 242 nm, reversed-phase C18, 150 mm × 6.0 mm, 5 m column maintained at 40 °C (column oven) employing a mobile phase consisting of 60% 50 mM Phosphate Buffer (pH adjusted to 3 with phosphoric acid), 50% of Acetonitrile and 10 % Methanol delivered at a flow-rate of 1.0 mL/min.

Carvedilol loaded SLN (C-SLN) (10 mg) were diluted to 10 ml with chloroform/methanol (1:1) and this sample was further diluted with Phosphate buffer pH 6.8 to determine the total drug content using HPLC. The entrapment efficiency (EE) of Carvedilol in SLN was in the range of 96.031 ± 0.130 .

$$\text{Percentage of entrapment efficiency (EE)} = \left[\frac{A_{\text{total}} - A_{\text{unentrapped}}}{A_{\text{total}}} \right] \times 100$$

A_{total} = total amount of carvedilol in SLN;
 $A_{\text{unentrapped}}$ = unentrapped carvedilol in SLN

CONCLUSION

Easy, simple and suitable produce of CL-SLN

- Nanometer ranged particle size,
- Molecularly dispersed Carvedilol,
- DYN-CL formulation can be a potential as a drug delivery system.
- Sustained delivery and small particle size will suitable for reducing the initial hypotensive peak and prolonged the antihypertensive effect.

Future studies

In vitro released studies through dialysis membrane, In vivo studies with wistar rats ..

References

- [1] Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. Solid Lipid Nanoparticles: A Modern Formulation Approach in Drug Delivery System. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009;71(4):349-358. doi:10.4103/0250-474X.57282.
- [2] Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. Experimental and molecular pathology. 2009;88(3):215-223. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
- [3] Ekambaram P, Sathali AAH, Priyanka K. Solid lipid nanoparticles: a review. Sci Rev Chem Commun. 2012;2(1):90-102.
- [4] N L Prasanthi, Swathi Gondhi, S S Manikiran, S Nandha Kumar, N Rama Rao, Solid Lipid Nanoparticles of Carvedilol by Hot Homogenization: Formulation and Evaluation, NDDS Vol. 2, Issue 2, 2011.

ISBPPB CONFERENCE RECOGNIZES THE
CONTRIBUTION MADE BY

Evrim Yenilmez

To the Furtherance of knowledge on the area of Biomaterials

AUGUST 11-12
2016

x



MUNMAYA MISHRA
Chairman ISBPPB
3rd International Conference
Woodbridge, New Jersey, USA



International Society for Biomedical
Polymers and Polymeric Biomaterials

Solid Lipid Nanoparticles Containing Carvedilol: Formulation and Evaluation

Zeynep Kipriye, Evrin Yenilmez

Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology,
Eskişehir, TÜRKİYE

Solid lipid nanoparticles (SLNs) are one of the most promising particulate delivery systems to improve the oral bioavailability of lipophilic drugs. Carvedilol is a nonselective β -blocker and alpha blocker used as an antihypertensive agent having low oral bioavailability (around 23 %) due to extensive hepatic first-pass metabolism. SLNs were developed in this study to improve oral bioavailability of carvedilol. SLNs were prepared using hot homogenization and ultra-sonication methods. SLNs developed were characterized using particle size/zeta potential measurements, DSC thermograms, SEM imaging, X-ray diffraction, FT-IR and NMR spectroscopic analyses. Quantification of carvedilol was performed with a modified HPLC method.

ICPS 2016 [icps@saco.ae]

Gönderildi: 29 Ekim 2016 Cumartesi 07:39

Kime: Evrim YENİLMEZ

Ekler:

Dear Dr. Evrim YENİLMEZ

Its a great pleasure for us to inform you that your abstract entitled Carvedilol Loaded Solid Lipid Nanoparticles has been accepted for Oral Presentation at International Conference on Pharmaceutical Sciences (ICPS 2016).

Therefore, I would like to request you to please submit your registration form urgently.

You may download the Registration form from the following link:

<http://saco.ae/icps/register.php>

Note: Please ignore this message if you have submitted your registration fee already.

Regard

Andrew Van Wasshnova

Secretary, ICPS 2016,

SACO

Deira Dubai, UAE

E-mail: icps@saco.ae

Carvedilol Loaded Solid Lipid Nanoparticles

Zeynep Kipriye, Evrin Yenilmez

Anadolu University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Technology,
Eskişehir, TÜRKİYE

Carvedilol is a nonselective β -blocker (β_1 - β_2) and alpha blocker (α_1) used as an antihypertensive agent having low oral bioavailability (around 23 %) due to extensive hepatic first-pass metabolism. It is metabolized primarily by cytochrome P450 through aromatic ring oxidation and glucuronidation. Solid lipid nanoparticles are colloidal drug carriers developed at 1990s. SLNs combine the advantages and avoid the disadvantages of other colloidal carriers. SLNs were developed in this study to improve oral bioavailability of carvedilol. SLNs were prepared using hot homogenization and ultrasonication methods. SLNs developed were characterized using particle size/zeta potential measurements, DSC thermograms, SEM imaging and 3 months stability studies. Quantification of carvedilol was performed with a modified HPLC method.