

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SERBEST RADİKAL TEMİZLEYİCİ MADDE İÇEREN
NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLERİN TASARIMI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Kıvılcım ÖZTÜRK

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2010**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERBEST RADİKAL TEMİZLEYİCİ MADDE İÇEREN
NANOPARTİKÜLER TAŞIYICI SİSTEMLERİN TASARIMI VE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Kıvılcım ÖZTÜRK

Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

ANKARA
2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Yılmaz Çapan
(Tez Danışmanı) Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Sema Çalış
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. İmran Vural
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Yasemin Gürsoy Özdemir
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Öğr. Gör. Dr. Ecz. Hakan Eroğlu
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, karşılaştığımız sorunlar karşısında her zaman yol gösteren, bu süreçte desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı sağlayan, değerli hocam Sayın **Prof.Dr. Yılmaz ÇAPAN**'a, çalışmalarım süresince, bilgi, deneyim ve değerlendirmelerini benimle paylaşan, in vivo deneylerin yürütülebilmesi için her türlü olanağı sağlayan emeğine ve bilgisine her zaman saygı duyduğum değerli hocam Sayın **Prof.Dr. Turgay DALKARA**'ya, bilimsel çalışmalarım sırasında sağladığı katkılar ve kıymetli bilgileri için değerli hocam Sayın **Doç.Dr. Yasemin GÜRSOY-ÖZDEMİR**'e, in vivo deneylerim sırasında vaktini ve emeğini esirgemeyen, olumlu yaklaşımları ve sağladığı katkılardan dolayı değerli hocam Sayın **Doç.Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca destekleri, emekleri ve dostlukları ile hep yanımda olan **Ecz. (B.U.) Seçil ÇABAN** ve **Ecz. (B.U.) Serhat KOZLU**'ya, deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşarak bilimsel açıdan desteklerini her zaman hissettiğim **Ecz. (B.U.) Can SARISÖZEN** ve **Ecz. (B.U.) Fırat YERLİKAYA**'ya, deney ve tez yazım aşamasında tavsiyeleri, samimiyetleri ve arkadaşlıkları ile her zaman yanımda olan **Ecz. (B.U.) Seren KAYIRAN**, **Ecz. Nazlı ERDOĞAR**, **Ecz. (B.U.) Merve GÜNBEYAZ**, **Ecz. Süheyla TOPRAK**, **Ecz. (B.U.) Burçin YAVUZ**, **Ecz. (B.U.) Harika ÖCAL**, **Ecz. (B.U.) Tuğba GÜLSÜN** ve **Dr.Ecz. Yasemin ÇIRPANLI**'ya sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Eczacılık Teknolojisi Bölümü'ndeki değerli hocalarıma, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, idari personelimize, teknisyenlerimize değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tezim sırasında da varlıkları ile bana güç veren, desteklerini her daim hissettiğim, sayelerinde bugünlere gelebildiğim **anneme, babama, kardeşime** ve **teyzeme** en derin teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Öztürk, K. Serbest Radikal Temizleyici Madde İçeren Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı ve Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010. Felç, endüstrileşmiş ülkelerde, yılda 15 milyon insanı etkileyen ve yetişkinlerde özür lülüğe neden olarak yaşam kalitesini ve verimliliği düşüren önemli bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Felci takip eden 3 ay içinde, hayatta kalan hastaların % 15-30'u daimi olarak özür lü kalırken, % 20'si bakıma ihtiyaç duymaktadır. Serbest radikal temizleyici bir bileşik olan alfa-fenil-n-tert-butil nitron (PBN)'in, organizmada normal şartlarda da var olan ancak, bazı stres koşullarında miktarı artan, akabinde de lipitlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, DNA hasarına ve hücre ölümüne neden olan serbest radikallerle reaksiyona girip onları daha stabil ürünlere dönüştürmesi iskemik kaskadın önemli yolaklarını bloke edeceği için hücre ölümü önlenmiş olur. Ancak PBN'in düşük in vivo stabilitesi ve kısa yarı ömrü klinik kullanımını kısıtlayan durumlardır. Bu nedenle tez çalışmasında PBN'in kitosan ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerleri ile, kitosan-polietilen glikol (KS-PEG) ve PLGA-PEG blok kopolimerleri kullanılarak nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Hidrofilik PEG zinciri ile oluşturulan blok kopolimerlerin, nanopartiküllerin opsonizasyonunu ve fagositozunu azaltması amaçlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin, in vitro karakterizasyon çalışmaları (morfolojik özellikleri, partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri, enkapsülasyon etkinliği, in vitro salım çalışmaları) tamamlanmış, ayrıca formülasyonların ex/in vivo etkinlik çalışmalarının yapılabilmesi için, ex vivo deney modeli oluşturulmuştur. Yapılan deneyler sonucunda hazırlanan nanopartiküllerin küresele yakın şekilde oldukları ve homojen dağıldıkları, uygun partikül büyüklüklerine sahip ve stabil oldukları, etkin ilaç yükleme kapasitesine sahip oldukları, başlangıçta hızlı bir salım özelliği, devam eden 24 saatlik süreçte daha yavaş kontrollü bir salım gösterdikleri ve nöroproteksiyon sağlanması amacıyla kullanılabilir özelliklerde formüle edilebildiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nanoteknoloji, kitosan, PLGA, PBN, PEGilasyon

ABSTRACT

Öztürk, K. Design and Evaluation of Nanoparticle Carrier Systems Containing Free Radical Scavenger Substance, Hacettepe University Institute of Health, Master of Science Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara 2010. Stroke is a devastating condition, which annually affects 15 million people worldwide, and is the leading cause of adult disability in industrialized countries. Three months following a stroke, 15–30% of stroke survivors are permanently disabled and 20% require institutional care. Free radicals already present in the organism at the normal conditions, however their amount increases at the stress conditions and free radicals cause lipid peroxidation, protein oxidation, DNA damage and cell death. Since, alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) is a free radical scavenger, it reacts with free radicals and converts them more stable spin adducts so that ischemic cascade can be blocked and cell death can be prevented. However PBN has some limitations for clinical use like low in vivo stability and short half life. Therefore, in the thesis study, nanoparticle formulations were prepared using chitosan, poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) polymers and its PEGylated derivatives chitosan-PEG and PLGA-PEG block co-polymers. The aim of the study is to reduce opsonization and phagocytosis of the nanoparticles through block co-polymers with hydrophilic PEG chains. In vitro characterization studies (morphological properties, particle size and zeta potential measurement, encapsulation efficiency/capacity, in vitro release study) of prepared nanoparticles were completed and also ex vivo experimental model was developed for future ex/in vivo efficiency studies of nanoparticles. As a conclusion, it is observed that nanoparticles can be formulated as almost spherical in shape. They have homogeneous distribution, stably, having suitable particle sizes and effective encapsulation capacity. Moreover, they exhibit initially burst release, but then controlled release following 24-hour period, so that they can be used with the aim of neuroprotection.

Keywords: Nanotechnology, chitosan, PLGA, PBN, PEGylation

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İlaç Taşınmasında Nanoteknoloji	3
2.1.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	3
2.2. İlaç Taşınmasında Nanoteknolojinin Geleceği	8
2.3. Nanoteknoloji Kökenli Teşhis ve Görüntüleme	10
2.3.1. Kuantum Noktası ile Teşhis ve Görüntüleme	10
2.4. Nanoteknolojide İlaç Taşınmasının ve Hedeflendirmenin Önemi	11
2.4.1. Tümöre Hedeflendirme	13
2.4.1.1. Tümör Spesifik Hedeflendirme	14
2.4.2. Beyne İlaç Hedeflendirilmesi	16
2.5. Nanopartiküllerin Hazırlanma Yöntemleri	22
2.5.1. Emülsifikasyon/Solvan Buharlaştırma Metodu	22
2.5.2. Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Metodu	24
2.5.3. Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Metodu	24
2.5.4. Süperkritik Sıvı Teknolojisi Kullanarak Nanopartiküllerin Hazırlanması	25

2.5.5.	Polimerizasyon Metodu	25
2.5.6.	Hidrofilik Polimerler ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	26
2.5.7.	İyonotropik Jelasyon	27
2.6.	Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	29
2.6.1	Polimer Seçimindeki Hususlar	30
2.6.2.	Biyoparçalanabilir Olmayan Polimerler	32
2.6.3.	Biyoparçalanabilir Polimerler	32
2.6.3.1.	Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	33
2.6.3.2.	Kitosan	35
2.7.	PEGilasyon	38
2.8.	Opsonizasyon ve Fagositoz	41
2.9.	Oksidatif Stres	45
2.9.1.	Serbest Radikaller	46
2.9.1.1.	Serbest Radikallerin Doğası	46
2.9.1.1.1.	Reaktif Oksijen Türleri	48
2.9.1.1.2.	Reaktif Azot Türleri	51
2.9.1.2.	Reaktif Oksijen Radikallerinin İskemi Üzerindeki Etkileri	52
2.9.2.	Lipit Peroksidasyon	53
2.9.3.	Tedavi Yaklaşımları	56
2.9.3.1.	Nitron Bileşikleri	59
2.9.3.1.1.	Alfa-Fenil-N-Tert-Butil Nitron (PBN)	59
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	62
3.1.	Araç ve Gereçler	62
3.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	62
3.1.2.	Kullanılan Aletler	63
3.2.	Yöntem	64

3.2.1.	PBN'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	64
3.2.1.1.	UV Spektrumu	64
3.2.2.	PBN'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	64
3.2.2.1.	Kalibrasyon Doğrusu	65
3.2.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	65
3.2.2.2.1.	Doğrusallık ("Linearity")	66
3.2.2.2.2.	Doğruluk ("Accuracy")	66
3.2.2.2.3.	Keskinlik ("Precision")	67
3.2.2.2.3.1.	Tekrarlanabilirlik ("Repeatability")	67
3.2.2.2.3.2.	Tekrar Elde Edilebilirlik ("Reproducibility")	67
3.2.2.2.4.	Duyarlılık ("Sensitivity")	68
3.2.2.2.4.1.	Saptama Sınırı ("Limit of Detection")	68
3.2.2.2.3.4.2.	Miktar Tayin Sınırı ("Limit of Quantification")	68
3.2.2.2.5.	Özgüllük ("Specificity")	68
3.2.2.2.6.	Stabilite ("Stability")	69
3.2.3.	Kitosan-Polietilen glikol (KS-PEG) Sentezi	69
3.2.4.	Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları	70
3.2.4.1.	Kitosan ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş Kitosan (Kitosan-PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması	70
3.2.4.1.1.	Etkin Madde Yüklenmemiş Kitosan ve KS-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	72
3.2.4.1.1.1.	Boş Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması	72
3.2.4.1.1.2.	Boş Kitosan-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	72
3.2.4.1.2.	Etkin Madde Yüklü Kitosan ve KS-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	73
3.2.4.1.2.1.	PBN Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması	73
3.2.4.1.2.2.	PBN Yüklü Kitosan-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	74

3.2.4.2.	PLGA ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş PLGA (PLGA-PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması	76
3.2.4.2.1.	Boş PLGA ve PLGA-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	78
3.2.4.2.2.	PBN Yüklü PLGA ve PLGA-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	78
3.2.5.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	79
3.2.5.1.	Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	79
3.2.5.2.	Morfolojik Özellikleri	79
3.2.5.3.	Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi	80
3.2.5.3.1.	PBN Yüklü Kitosan ve Kitosan-PEG Nanopartiküllerinde Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi	80
3.2.5.3.2.	PBN Yüklü PLGA ve PLGA-PEG Nanopartiküllerinde Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi	81
3.2.5.4.	İn Vitro Salım Deneylei	81
3.2.6.	Ex Vivo Hayvan Deneyleiinin Yapılışı	82
3.2.6.1.	Dokudaki Lipit Peroksidlerin Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Aracılığı ile Tayin Edilmesi	82
3.2.6.2.	Bikinkoninik Asit (BCA) Kiti ile Protein Miktar Tayini	83
4.	BULGULAR	85
4.1.	PBN'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	85
4.1.1.	UV Spektrumu	85
4.2.	PBN'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	86
4.2.1.	Kalibrasyon Doğrusu	86
4.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	87
4.2.2.1.	Doğrusallık	87
4.2.2.2.	Doğruluk	88
4.2.2.3.	Kesinlik	88
4.2.2.3.1.	Tekrarlanabilirlik	88
4.2.2.3.2.	Tekrar Elde Edilebilirlik	90
4.2.2.4.	Duyarlılık	90

4.2.2.5.	Özgüllük	90
4.2.2.6.	Stabilite	94
4.3.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	95
4.3.1.	Kitosan ve KS-PEG in Karakterizasyonu	95
4.3.2.	Polimer ve Etkin Madde Konsantrasyonunun Nanopartiküllerin Fizikokimyasal ve Yükleme Etkinliği Üzerindeki Etkisi	96
4.3.2.1.	Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	96
4.3.2.2.	Morfolojik Özelliklere Ait Bulgular	100
4.3.2.3.	Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular	101
4.3.2.4.	İn Vitro Salım Çalışmaları	102
4.4.	Ex Vivo Hayvan Deneilerine ait Bulgular	104
4.4.1.	Dokudaki Lipit Peroksitlerin Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Aracılığı ile Tayin Edilmesi	104
4.4.2.	Bikinkoninik Asit (BCA) Kiti ile Protein Miktar Tayini	105
5.	TARTIŞMA	106
5.1.	PBN'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	108
5.1.1.	UV Spektrumu	108
5.2.	PBN'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	108
5.3.	Kitosan-Polietilen glikol (KS-PEG) Sentezi	110
5.4.	Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları	110
5.4.1.	Kitosan ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş Kitosan (Kitosan- PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması	110
5.4.2.	PLGA ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş PLGA (PLGA-PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması	111
5.4.3.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	114
5.4.3.1.	Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	114
5.4.3.2.	Morfolojik Özellikleri	119
5.4.3.3.	Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi	120
5.4.3.4.	İn Vitro Salım Çalışmaları	122

5.5.	Ex Vivo Hayvan Deneyleri	123
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	125
	KAYNAKLAR	127
	EKLER	150

SİMGELER VE KISALTMALAR

BCA	Bikinkoninik Asit Protein Tayini
BSA	Sığır serum albumini
DHA	Dokosaheksaenoik asit
EC	Etilselüloz
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit
EPA	Eikosapentaenoik asit
EPR	Elektron paramanyetik rezonans
F2I	F2-izoprostan
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu
GSH	Glutasyon
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KBE	Kan beyin engeli
LDL	Düşük dansiteli lipit
MAb	Monoklonal antikor
MDA	Malondialdehit
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NO	Nitrik oksidin
NP	Nanopartikül
O ₂ ⁻	Süperoksit anyon
OH [·]	Hidroksil Radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit anyonunu
PACA	Poli-alkilsiyanoakrilat
PBN	Alfa-fenil-N-tert-butil nitron
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PCL	Poli (ϵ -kaprolakton)
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Poli(etilen glikol)
PEK	Poli-elektrolit kompleksleşmesi
PGA	Poli(glikolik asit)
PHB	Poli(hidroksibutirat)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLGA-PEG	Poli[(D,L-laktid-ko-glikolid)-ko-PEG] diblok
PVA	Poli(vinil alkol)
RAT	Reseptör aracılı taşıma
RES	Retiküloendoteliyal sistem
ROS	Reaktif oksijen türleri
SAS	Süperkritik anti-solvent
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
SOD	Süperoksid dismutaz
S-PBN	N-tert-butil-(-2-sülfofenil)-nitron
SSS	Santral sinir sistemi
TAT	Taşıyıcı aracılı taşıma
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif substans
TEM	Transmisyon elektron mikroskopisi
TfR	Transferrin reseptörü
TPF	Tripoli fosfat
VK	Varyasyon katsayısı
YE	Yükleme etkinliği
YK	Yükleme kapasitesi

ŞEKİLLER

ŞEKİL		SAYFA
Şekil 2.1	Biyoparçalanabilir nanopartiküllerin çeşitleri	5
Şekil 2.2	Farklı nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi	9
Şekil 2.3	Kuantum noktasının şematik gösterimi	10
Şekil 2.4	Çok fonksiyonlu nanopartikül	12
Şekil 2.5	Nanopartiküllerin reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınmaları	15
Şekil 2.6	Beyne ilaç taşınmasındaki ikincil stratejilerin şematik gösterimi	19
Şekil 2.7	PEG'lenmiş PLA immünonanopartikül hazırlamak için günümüzde yaygın olarak kullanılan konjugasyon tekniği olan biyotinleme	20
Şekil 2.8	Emülsifikasyon/solvan buharlaştırma tekniğinin şematik gösterimi	23
Şekil 2.9	Kitosan nanopartiküllerinin iyonotropik jelasyonla oluşumu	28
Şekil 2.10	PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapıları	34
Şekil 2.11	PLGA mikrokürelerinin, pH 7,4, 33 mM fosfat tamponu içerisinde 37°C'de 28 gün inkübasyonundan sonra görüntülenen taramalı elektron fotoğrafı	35
Şekil 2.12	Kitin ve kitosanın [poli (β 1 \rightarrow 4-D-glukozamin)] yapısı	36
Şekil 2.13	Opsonizasyon üzerine hidrofilik segmentlerin yüzey dansitesine etkilerinin gösterildiği şematik diyagram	39
Şekil 2.14	Polimerik bir nanopartikülün, üst yarım küresinin üzerindeki PEG konfigürasyonunun şematik gösterimi	39
Şekil 2.15	PLGA-PEG kopolimerinin yapısı	40
Şekil 2.16	PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine yüklü [125 I]BSA'nın 3. saatte (A) ve 12. saatteki (B) biyodağılımları	41

Şekil 2.17	Plazma proteinleri ve kandaki immün hücrelerle nanopartiküllerin etkileşimi	43
Şekil 2.18	Reaktif oksijen türlerini içeren klinik durumlar	49
Şekil 2.19	İskemik kaskadın başlangıcı. İskemik kaskad, iskeminin başlamasını takiben glutamat salımını ve diğer nörokimyasal değişiklikleri içerir	56
Şekil 2.20	Orta serebral arterin bir dalında oklüzyon oluşumu	58
Şekil 2.21	Hücre hasarında, reperfüzyonu takiben, önemli biyokimyasal yollar	58
Şekil 2.22	PBN'in kimyasal yapısı	60
Şekil 3.1	Kitosan ve yüzeyi modifiye edilmiş kitosan nanopartiküllerin hazırlanma şeması	71
Şekil 3.2	PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerin hazırlanma şeması	77
Şekil 4.1	PBN'in etanol:su [1:9 (h/h)]'da 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu	85
Şekil 4.2	PBN'e (100 ng.mL ⁻¹) ait HPLC kromatogramı	86
Şekil 4.3	PBN'in kalibrasyon doğrusu ve denklemi	87
Şekil 4.4	Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, kitosan nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları	91
Şekil 4.5	Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, kitosan-PEG nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları	92
Şekil 4.6	Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, PLGA nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları	93
Şekil 4.7	Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, PLGA-PEG nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları	94
Şekil 4.8	KS ve KS-PEG polimerlerine ve ayrıca PEG molekülüne ait NMR spektrumları	95
Şekil 4.9	(A) Boş kitosan (B) Boş KS-PEG (C) Boş PLGA (D) Boş PLGA-PEG nanopartiküllerine ait partikül boyutu dağılım grafikleri	98

Şekil 4.10	(A) Boş kitosan (B) Boş KS-PEG (C) Boş PLGA (D) Boş PLGA-PEG nanopartiküllerine ait zeta potansiyel dağılım grafikleri	99
Şekil 4.11	Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) KS nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü	100
Şekil 4.12	Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) KS-PEG nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri	100
Şekil 4.13	Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) PLGA nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri	101
Şekil 4.14	Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) PLGA-PEG nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri	101
Şekil 4.15	0,5 mg.mL ⁻¹ ve 1 mg.mL ⁻¹ dozlarda PBN yüklü kitosan ve kitosan-PEG nanopartiküllerinin in vitro salım profilleri (n=3).	103
Şekil 4.16	0,5 mg.mL ⁻¹ ve 1 mg.mL ⁻¹ dozlarda PBN yüklü PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin in vitro salım profilleri (n=3).	103
Şekil 4.17	Deney grupları arasındaki TBARS (nmol MDA/0,1 g protein) seviyelerinin değişimi	104
Şekil 4.18	BCA tayini kalibrasyon doğrusu ve denklemi	105

TABLOLAR

TABLO		SAYFA
Tablo 2.1	FDA tarafından onaylanmış nanopartikül temelli ilaçlar	7
Tablo 2.2	İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler	31
Tablo 2.3	Bazı serbest radikal türleri	47
Tablo 3.1	PBN'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.	65
Tablo 3.2	Boş kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan kitosan ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri.	72
Tablo 3.3	Boş KS-PEG nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan KS-PEG ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri	73
Tablo 3.4	Değişen konsantrasyonda (a; 0,5 mg/ml, b; 1 mg/ml) etkin madde içeren kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan PBN, kitosan ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri	74
Tablo 3.5	a; 0,5 mg/ml ve b; 1 mg/ml etkin madde içeren kitosan-PEG nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan PBN, KS-PEG ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri	75
Tablo 3.6	Dilüe BSA standartlarının hazırlanması	84
Tablo 4.1	PBN'in HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=6).	87
Tablo 4.2	Deney içi ve deneyler arası doğruluk	88
Tablo 4.3	Tekrarlanabilirlik sonuçları	89
Tablo 4.4	Gün içi ve günler arası kesinlik	90
Tablo 4.5	PBN'in stabilite sonuçları	94
Tablo 4.6	Değişen konsantrasyonlarda etkin madde içeren kitosan ve kitosan-PEG nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri	96
Tablo 4.7	Değişen konsantrasyonlarda etkin madde içeren PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri	97
Tablo 4.8	KS ve KS-PEG nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları	102
Tablo 4.9	PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları	102
Tablo 4.10	Deney gruplarına ait TBARS düzeyleri	104

1. GİRİŞ

Felç (inme) endüstrileşmiş ülkelerde, yılda 15 milyon insanı etkileyen ve yetişkinlerde özür lülüğe neden bir durumdur. Felci takip eden 3 ay içinde, hayatta kalan hastaların % 15-30'u daimi olarak özür lü kalırken, % 20'si bakıma ihtiyaç duymaktadır. Felç, genetik eğilim ve kan damarlarına kronik olarak zarar veren farklı risk faktörleri arasındaki ilişkiden köken alan ve ilerleyen kompleks bir hastalıktır. Temel ve klinik bilimcilerin ana önceliği, felçli hastaların efektif tedavisi için araştırmalar yapmaktır. Şimdiye kadar yayınlanan birçok çalışma felcin akut fazda tedaviye duyarlı olduğunu, fakat tedavinin etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermiştir. Nöroprotektif ajanların rolü iskemik kaskattaki bir veya daha fazla mekanizmaya engel olmaktır. Böylece, meydana gelebilecek doku hasarı en aza indirilir. Kan akımının çok azaldığı bölgenin (iskemik çekirdek) etrafının penumbra ile çevrelendiği varsayılır, ki bu bölge yavaş kan akımından dolayı tehlike altındadır, ancak bu bölge nöroprotektanların kullanımı ile veya kan akımının yeniden sağlanmasıyla korunabilir. Eğer böyle bir müdahale yapılmazsa penumbradaki hücreler ölür ve çekirdek giderek büyür. Nöroprotektif etki gösteren ve bir nitron bileşiği olan alfa-fenil-n-tert-butil nitron (PBN) etkili bir ajandır. PBN, beyin iskemisi sırasında oluşan serbest radikalleri yok ederek etkisini göstermektedir. PBN kısa ömürlü radikaller için de "spin trap" ajanı olarak kullanılmaktadır. Fokal embolik orta beyin arterlerinde meydana gelen serebral iskemilerin tedavisinde, beyinde meydana gelen iskemi-reperfüzyon hasarlarının ve infarkt hacimlerin azaltılmasında kullanılmaktadır. Bahsedilen nitron bileşiğinin biyoyararlanımı iyi olup sistemik yolla verildiği zaman yarılanma ömürleri yaklaşık olarak 3 saattir. PBN, kan-beyin engelinden kolaylıkla geçebilen bir bileşik olmasına rağmen, bu bileşiğin in vivo stabilitesi oldukça azdır ve bu bileşiklerle hazırlanan polimerik taşıyıcı sistemler de kan dolaşımından retiküloendotelial sistem (RES) tarafından hızla uzaklaştırılmaktadır. Bu durum farmakolojik etkinin önemli ölçüde azalmasına yol açmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, PBN'in terapötik dozunu içeren, hidrofilik PEG zinciri ile oluşturulmuş blok kopolimeri kullanarak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler

hazırlamaktır. Ayrıca, bu sistemlerin in vitro karakterizasyonlarını gerçekleştirmek, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere ideal sistemler olup olmadığını göstermek, yapılması amaçlanan ex/in vivo hayvan denemeleri için deney modeli oluşturmak ve PBN'in etkinliğini akut karaciğer toksisitesi oluşturulmuş fareler üzerinde, lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehitin tayin edilmesiyle gösterebilmektir.

Bu amaçla, doğal ve biyoparçalanabilir bir polimer olan kitosan ve PEG ile hazırlanmış blok kopolimer kitosan-PEG, sentetik ve biyoparçalanabilir bir polimer olan PLGA ve PEG ile hazırlanmış blok kopolimer PLGA-PEG nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır. PEG zincirlerinin sağladığı sterik engel ve hidrofilitiklik, opsonin proteinleri ile gerçekleşebilecek özgün olmayan etkileşimleri azaltır. Opsonin proteinleri, nanopartikülleri makrofajlar için daha görünür hale getirilmesini sağlayacağından, opsonizasyonun azaltılmasıyla, nanopartiküllerin fagositozu da azaltılmış olur. Böylece etkin maddeyi içeren nanopartikül taşıyıcı sistemi kan dolaşımında uzun süre kalıp, etkin maddenin korunmasını ve kontrollü salımını sağlayabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Taşınmasında Nanoteknoloji

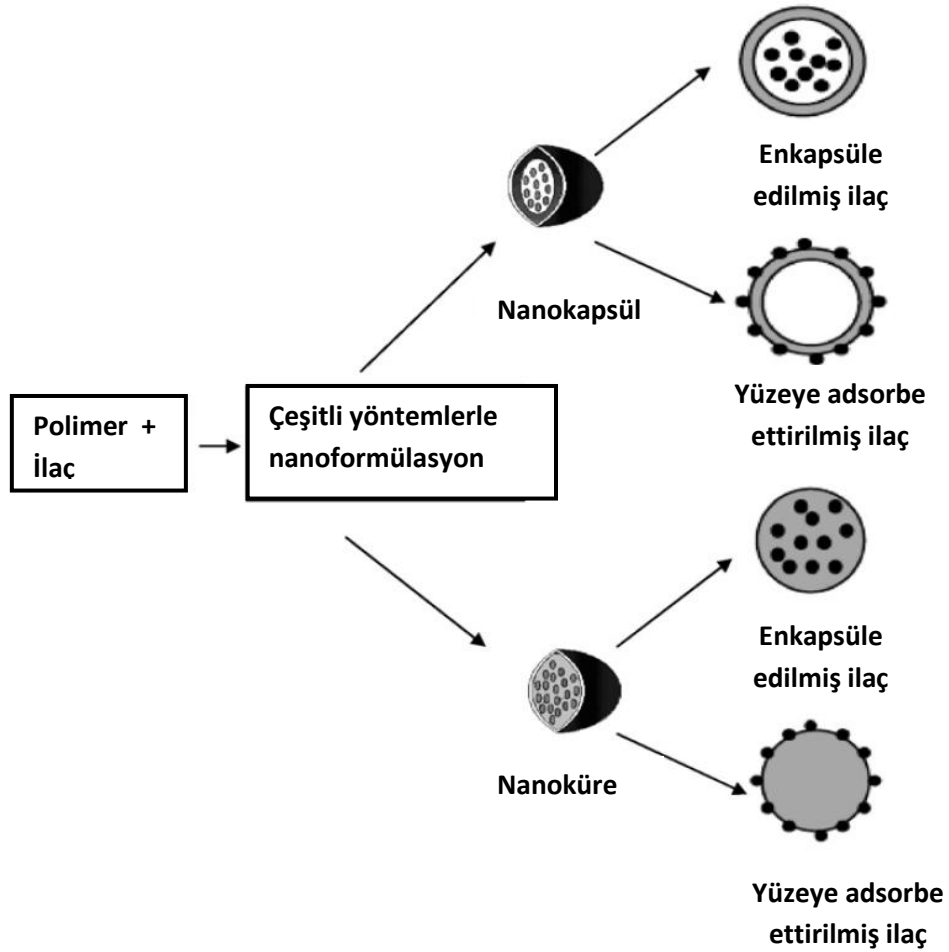
İlaç endüstrisi için, yeni ilaç taşıyıcı teknolojiler, büyüyen ilaç pazarında stratejik bir seçenek oluşturmaktadır. Var olan farmasötiklerin, ürün ömrünün uzatılması veya hasta uyuncunun ve güvenilirliğinin geliştirilerek ya da etkinliği artırılarak ürünün performans ve uygunluğunun iyileştirilmesi gibi konular teknolojinin irdelediği konular arasındadır. Buna ek olarak, ilaç taşıyıcı sistemlerin efektif kullanımı için neler gerektirdiği, insan genom projesinden elde edilen bilgiler kullanılarak, bilgisayarlı kimyanın yardımıyla daha yeni ilaçlar geliştirilebilir. Bu teknoloji, biyolojik ortamda stabil olmayan veya suda çözünmeyen ilaçların taşınmasına olanak sağlar. Yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin global ilaç satışına büyük bir katkı sağlayacağı umulmaktadır. Son yıllarda yeni ilaç taşıyıcı sistemler global ilaç endüstrisinde pek çok ilaç firmasının faaliyet alanına girmiştir. Aynı zamanda, ilaç endüstrisi performans esaslı ve daha efektif yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik olarak hızlarını arttırmaktadırlar. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde ilaç taşıyıcı sistemlere olan talebin yıllık yaklaşık olarak % 9 oranında artması beklenmektedir ve ilaç taşıyıcı sistemlerin 2007 yılı cirosu \$ 82 milyar Amerikan Dolarından daha fazladır (1) .

2.1.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Etkin ilaç taşıyıcı sistem olarak biyoparçalanabilir nanopartiküllerin geliştirilmesi geçtiğimiz birkaç on yıldan fazla bir süredir büyük ilgi odağı oluşturmuştur (2-4) . Nanopartiküller, 10 nm – 1000 nm boyutlarında, makromoleküler maddeleri içeren kolloidal, katı partiküllerdir. İlaç, nanopartikül matriksi içinde çözündürülebilir, hapsedilebilir, adsorbe ettirilebilir, eklenebilir (attached) veya enkapsüle edilebilir (2) . Hazırlama yöntemine bağlı olarak, enkapsüle edilmiş terapötik ajanın farklı özellikler ve farklı salım karakteristikleri sergilediği, nanopartiküller, nanoküreler veya nanokapsüller elde edilir. Nanokapsüller veziküler sistemlerdir, ilaç bir kaviteye hapsedilir ve bir polimer membran ile çevrelenir, nanoküreler ise matriks sistemlerdir burada ilaç fiziksel

olarak ve uniform olarak disperse edilmiştir (Şekil 2.1). Nanopartiküller ilk defa yaklaşık olarak 40 yıl önce geliştirilmişlerdir (5) . Bunlar ilk olarak aşıların ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların taşınması için geliştirilmiştir (6-8) .

Nanopartiküller stabil, katı kolloidal partiküllerdir, lipid materyal veya biyoparçalanabilir polimer içerirler. Düşük molekül ağırlığına sahip ilaçların yanı sıra, proteinler, peptitler ve genlerin de ilgili dokuya hedeflendirilmeleri ya da lokalizasyonlarında uygun yöntemler sunduğundan ilaç taşınmasında nanoteknolojinin geliştirilmesi için son yıllarda büyük çabalar sarf edilmiştir (9) . Nanoteknoloji, nanopartiküller, nanokapsüller, miseller sistemler ve konjugatlar gibi biyouyumlu nanokompozitler içine terapötik ajanların formüle edilmesi üzerine odaklanmıştır. Bu sistemler çoğunlukla polimerik olduğu ve submikron boyutta olduğu için, ilaç taşınmasında çok yönlü avantajları vardır.



Şekil 2.1. Biyoparçalanabilir nanopartiküllerin çeşitleri: Biyoparçalanabilir nanopartiküller yapısal organizasyonlarına göre nanokapsüller ve nanopartiküller olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. İlaç molekülü iç kısma hapsedileceği gibi yüzeye adsorbe de ettirilebilir (10) .

İlaç taşınmasında nanopartiküllerin kullanılmasının avantajları, onların iki temel özelliğinden ileri gelmektedir. Birincisi, nanopartiküllerin küçük partikül boyutları, onların küçük kapillerlerden geçerek penetrasyonunu ve hücrelere alınmasını sağlar bu da, hedef bölgede etkili ilaç akümüülasyonunu sağlamaktadır (11-14) . İkincisi ise, nanopartiküllerin hazırlanmasında biyoparçalanabilir materyallerin kullanılması, günler hatta haftalar süren periyotlarda hedef dokuda kontrollü ilaç salımını sağlamasıdır. Ayrıca, nanopartiküllerin diğer üstünlükleri arasında ilaçların/proteinlerin stabilitesinin artması ve kontrollü salım özelliğinin sağlanması vardır (15) .

İlaç taşınmasında nanoteknolojinin maliyet avantajları ise;

- Gelişmiş ilaç taşınması, ürünün performans karakteristiklerinin artmasını sağlar.
- Yeni ilaç taşıyıcı sistemler aracılığıyla ilaçların yeniden formüle edilmesi ile en çok satılan ilaçların ekonomik yaşam sürelerinin yeniden uzatılabilmesi ve etkili patent koruması arttırılabilir.
- İlaç taşıyıcı sistemin formülasyonu, yeni bir molekülün keşfedilmesi için gereken harcamalardan daha düşük olduğu için pahalı ilaçların kullanımının en aza indirilmesi ve ürünün maliyetinin azaltılması gerçekleştirilir (1) .

Bu sistemler genel olarak, hedefleme (hücrese/doku) sağlamak, oral biyoyararlanımı arttırmak, hedef dokuda ilacın veya genin etkisini sürdürmek, intravasküler ilaç taşınması için ilaçların çözünmesini sağlamak, enzimatik degradasyona karşı (nükleazlar, proteazlar) özellikle protein, peptit ve nükleik asit yapısındaki ilaçların stabilitesini arttırmak için kullanılırlar (9) .

Önceden var olan kanunlara göre Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) (*Food and Drug Administration*) tarafından onaylanan Tablo 2.1’de verilen tüm nanopartiküler sistemler piyasada yer almaktadır. FDA tarafından nanopartikül temelli ilaçlar için herhangi bir özel teste (farmakokinetik profilleri göz önünde bulundurularak) gereksinim duyulmasa da, ilaç pazarında nanopartikül temelli çok fazla ilaç bulunmamaktadır. Bu da FDA’nın klinik denemeler için, oldukça kompleks ve emek isteyen çalışmaları gerektirmesinin açık bir sonucudur. Fakat buna rağmen birçok nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem gelişme süreci içerisinde (16) .

Tablo 2.1. FDA tarafından onaylanmış nanopartikül temelli ilaçlar.

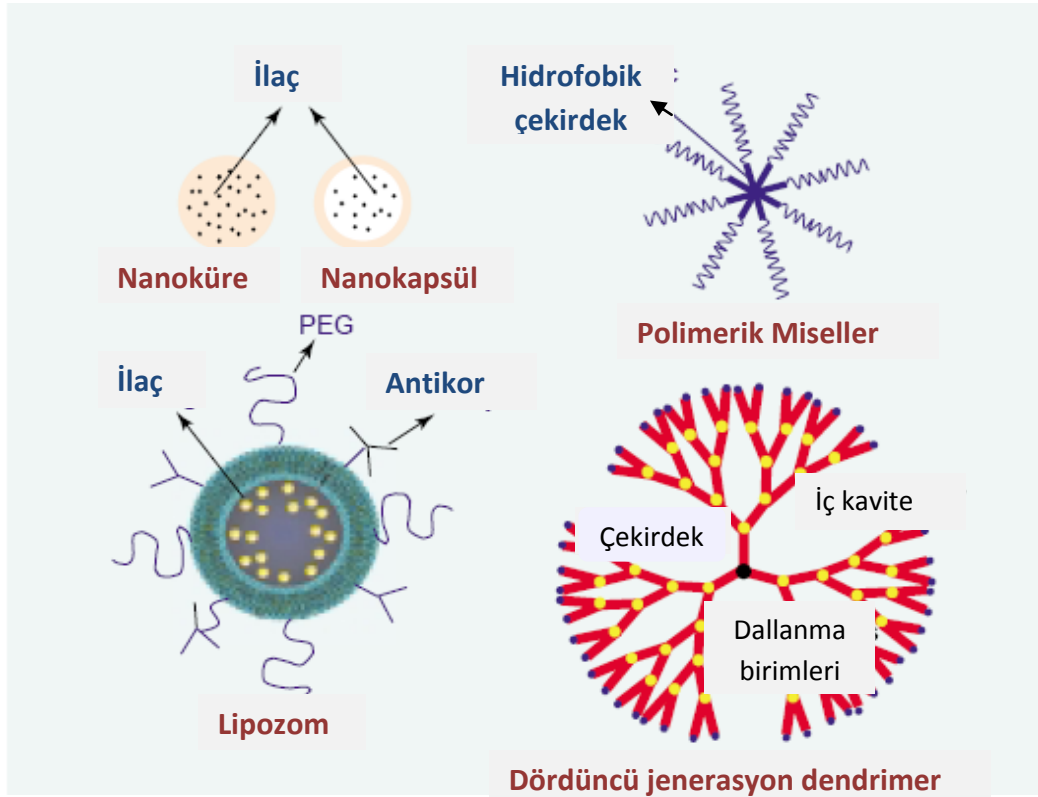
Preparat Adı	Nanopartikülün Etkin Madde(ler) İçeriği	Uygulama Yolu	Firma Adı	FDA Tarafından Onaylanan Endikasyon	FDA Tarafından Onaylanma Tarihi
Doxil Caelyx	PEG'lenmiş doksorubisin (Adriamisin) HCl lipozomları	IV	OrthoBiotech Schering-Plough	Metastatik overyum kanseri ve AIDS ile ilgili Kaposi sarkomu	Kasım, 1995
Abraxane	Albumine bağlı paklitaksel (taksol) nanopartikülleri (~130 nm)	IV	Abraxis, Bioscience, AstraZeneca	Kombine tedavi ile başarı sağlanamayan metastatik akciğer kanserinin tedavisinde	Ocak, 2005
AmBisome Diprivan	Amfoterisin B lipozomları (~ 45- 80 nm) Propofol lipozomları	IV	Gilead Sciences	Mantar enfeksiyonları	Ağustos, 1997
Renagel	Çapraz bağlı poli(alililamin) resin	IV	Zeneca Pharma	Anestezi	Ekim, 1989
Triglide	Fenofibrat nanokristali	Oral tablet	Genzyme	Diyalizdeki kronik böbrek hastalarında serum fosfor miktarının kontrolünde	Ekim, 1998
Myocet	Dokсорubisin-citrat kompleks enkapsüle edilmiş lipozomlar	Oral tablet	SkyePharma, First Horizon	Artmış, serum trigliserit, LDL ve total kolesterol seviyelerinin düşürülmesi ve düşük HDL düzeyinin artırılmasında	Mayıs, 2005
DepoCyt	Sürekli salım sağlayan sitarabin lipozomları	IV	Zeneus Pharma, Sopherton Therapeutics	İleri safha akciğer kanserinde dokсорubisin kullanımında kardiyoprotektif korunma sağlanmasında	Avrupa ve Kanada'da onaylandı
DaunoXome	Daunorubisin sitrat enkapsüle edilmiş lipozomlar	IV	SkyePharma, Enzon	Lenfomatöz menenjit	Nisan, 1999
Estrasorb	Estradiol hemihidrat misel nanopartikülleri (emülsiyon)	IV	Gilead Sciences	İlerlemiş HIV kaynaklı Kaposi sarkomunda	Nisan, 1996
Macugen	PEG'lenmiş anti-VEGF aptamer	Transdermal	Novavax	Vazomotor semptomların azaltılmasında	Ekim, 2003
Abelcet	Amfoterisin B fosfolipid kompleksi	Intravitreal	OSI Pharmaceuticals, Pfizer	Yaşa bağlı neovasküler makula dejenerasyonunda	Aralık, 2004
Adagen	PEG'lenmiş adenozin deaminaz	IV	Enzon	Konvansiyonel amfoterisin B tedavisine direnç gösteren ya da tolere edilemeyen mantar enfeksiyonlarında	Kasım, 1995
Pegasys	Peginterferon alfa-2a	IV	Enzon	İmmünyetmezliği olan hastalarda enzim replasman tedavisinde	Mart, 1990
Somavert	Pegvisomant (PEG-hGH)	Subkutan	Nektar, Hoffmann-La Roche	Kronik hepatit C virus enfeksiyonunda	Ekim, 2002
Neulasta	PEG-C-CSF veya pegfilgrastin ve monometoksipolietilenglikol	Subkutan	Nektar, Pfizer	Akromegali	Mart, 2003
Copaxone	Glatiramer asetat	Subkutan	Amgen	Febril nötropeni	Ocak, 2002
Amphotec	Lipid bazlı amfoterisin B'nin kolloidal süspansiyonu (~ 115 nm)	Subkutan	TEVA	Nükseden-remisyona giren multipl skleroz	Aralık, 1996
PEGIntron	Peginterferon alfa-2a	Subkutan	Sequus	Konvansiyonel amfoterisin B tedavisine direnç gösteren ya da tolere edilemeyen invazif aspergilloz enfeksiyonunda	Kasım, 1996
Oncaspar	Pegasparginaz	Subkutan	Enzon, Schering-Plough	Kronik hepatit C virus enfeksiyonunda	Ocak, 2001
Epaxal	İmmünopotansiyalize edilmiş influenza virozom (IRIV) adjuvanı ile birlikte hepatit A aşısı	subkutan	Enzon	Lösemi	Şubat, 1994
Elestrin	Kalsiyum fosfat bağlı estradiol (% 0,06) jel nanopartikülü	IM	Berna Biotech	Yetişkin ve 12 aydan büyük çocuklar için hepatit A'ya karşı aktif immünizasyon	Kanada'da ulaşılabilir
		Transdermal	BioSanté	Menapozdaki kadınların sıcak basması semptomlarının kontrolünde	Aralık, 2006

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin nano boyutta olmaları, ilaç taşınmasında çok kesin avantajlar sunar. Sub-mikron ve hücrelerden küçük boyutta olmalarından dolayı, nanopartiküller ince kapillerler aracılığı ile dokuların içine penetre olabilirler, epitel üzerindeki açıklıktan geçebilirler (örneğin, karaciğer) ve genellikle hücreler tarafından etkin bir şekilde alınır (17) . Bu, vücutta hedeflenen yere terapötik ajanların etkin bir şekilde taşınmasını sağlar. Ayrıca, polimerlerin karakteristiklerinin değiştirilmesiyle, optimum terapötik etki için gereken sürede hedef dokuda istenilen terapötik seviyeye ulaşabilmek için nanopartiküllerden terapötik ajanın salımı kontrol edilebilir. Ayrıca, nanopartiküller çok küçük invazif bir prosedürle kateter esaslı bir yaklaşım kullanılarak lokalize edilmiş taşınma veya hedef doku ve organa yönlendirilir (18) . Bu yöntemde biyospesifik bir ligandla konjuge edilerek hedef organ veya dokuya taşınabilirler (9) .

2.2. İlaç Taşınmasında Nanoteknolojinin Geleceği

Nanoteknoloji kökenli ilaç taşıyıcı sistemlerin terapötik avantajları her geçen gün artmaktadır ve yakın zamanda tüm ilaç uygulama yollarını içine alacaktır. Güncel tedavi yöntemleri üzerindeki avantajları, düşük toksisite, artırılmış biyoyararlanım, azalmış tedavi maliyeti ve hastanın tedaviye uyuncunun artmasıdır. Malignitelerin tıbbi idaresi nanoteknolojiden önemli ölçüde etkilenmiştir ve kısa zamanda diğer tıbbi uzmanlıklar da, optimum tedavi başarısına ulaşmak için ilaç taşınmanın yeni şekillerini kullanacaktır. Terapötik olarak daha etkili nanotaşıyıcıların yenilikçi araştırma ve geliştirme çalışmaları, devam etmektedir. Bunlar, geliştirilmiş polimer-ilaç konjugatlarını (19) , lipozomları (20) , dendrimerleri (21-22) , miselleri (23-24) , polimerik vezikülleri (25) , nanokapsülleri (26) ve nanopartikülleri (27-29) içermektedir. Nanoteknolojinin geleceği her ne kadar umut verici olsa da, nanopartiküllerin toksikolojik açıdan dikkate alınması önemlidir (30) (Şekil 2.2). Nanoteknoloji ürünlerinin toksisite taraması, nanomateryalin fizikokimyasal karakterizasyonunu, in vitro analizleri ve in vivo çalışmaları içermelidir, çünkü insan vücudunda hücresel reaksiyonları etkilemediğine dair halkın temin edilmesi gerekir. İlaçta yenilikler devam ederken, ilaç taşınmasında nanoteknoloji zamanla sıradan ve sıkça söz edilen bir konu haline gelecektir. İlaç

araştırmalarında bu alandaki ilginin artması, nanoteknoloji kökenli ilaç taşıma örneklerinin potansiyelini ve umut verici olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.2. Farklı nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi (1) .

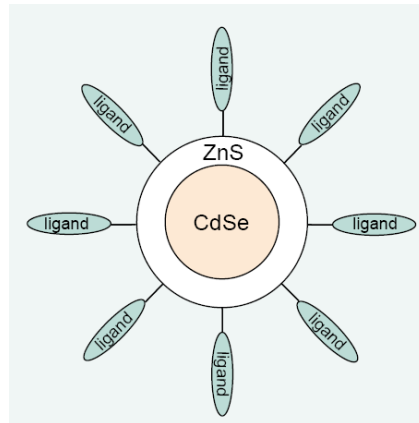
Nanopartiküller küçük polimerik kolloidal partiküllerdir. Etkin madde polimer matrisi içinde disperse edilmiş ya da polimer içine enkapsüle edilmiş olabilir. Miseller kendiliğinden oluşan blok ko-polimerlerdir. Sulu çözelti içerisinde, dışta hidrofilik katman, içte hidrofobik çekirdek olacak şekilde düzenlenirler. Misel çekirdeği, suda çözünmeyen bir etkin madde ile yüklü olabilir. Lipozomlar, yağlı yapılardır, bunlar PEGilasyon ile “gizli” formda hazırlanabilecekleri gibi, antikor konjugasyonu yapılarak hedeflendirmede de kullanılabilirler. Dendrimerler, monodispers simetrik makromoleküllerdir. Küçük bir molekülün etrafı iç kavite oluşturacak şekilde, çok sayıda reaktif son gruplar ile çevrelenmiştir (Şekil 2.2).

2.3. Nanoteknoloji Kökenli Teşhis ve Görüntüleme

Nanoteknolojinin potansiyel olarak önemli bir uygulama alanı da teşhis ve görüntüleme alanıdır. Hormonların sekresyonunu taklit etmek için Mikro-elektromekanik sistemlerin (MEMS) ve diğer kapalı sistemlerin kullanımı, nanoteknoloji kökenli araçların en önemli amacını oluşturmaktadır. Görüntüleme, teşhis ve hücrel uygulamalarda, kuantum noktalarının kullanımının önemli gelişmeler yaratması da söz konusudur.

2.3.1. Kuantum Noktası ile Teşhis ve Görüntüleme

Kuantum noktalarının, in vivo görüntüleme, hücrel fonksiyonların analiz edilmesi ve teşhiste kullanımı medikal araştırmalarda yeni bir çığır açacaktır (31) . Kuantum noktaları birkaç nanometre boyutunda, yarı iletken materyallerden yapılmış, nanokristal veya nanotüplerdir. Kuantum noktaları, intravenöz yolla hasta dokuya (kanser) hedeflendirilebilirler. Kuantum noktaları, tek molekül seviyesinde, görünür floresan rezonans ile çalışırlar (32) . Konfokal mikroskop (33) ve geniş alan epifloresan mikroskopisi (34) ile uzun bir periyotta gözlemlenebilir ve izlenebilir. Kuantum noktaları, hedef molekül (ligand, DNA, antikor) işaretleyerek, tümörün in vivo görüntülenmesinde ve teşhis amaçlı fonksiyon testlerinde kullanılırlar (Şekil 2.3). Bu nanoboyutlu partiküller, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) (*Magnetic Resonance Imaging*)’da, pozitron emisyon tomografisinde (PET) ve bilgisayarlı tomografide, malign dokuyu görüntülemek amacıyla kontrast ajanı olarak da kullanılabilir.



Şekil 2.3. Kuantum noktaları floresan nanokristallerdir ve bir ligand ile konjuge edilip görüntüleme amacıyla kullanılabilirler.

Bir nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemi, minimum yan etkiyle malign tümörün tedavisinde kullanılabilir. Fakat, nanoteknolojide medikal yönetimin gelişimini sürdürmesi için ve aralıksız yenilikler için hem temel hem de klinik araştırmaların multidisipliner bir yaklaşım göstermesi gerekmektedir. Hastalar için, gerekli medikal tedavileri optimize etme arayışı içinde, birçok klinik araştırmacı, malzeme bilimciler, mühendisler ve polimer kimyacıları ile bu teknolojiyi en ön sıraya taşıyabilmek için işbirliği yapmaktadır. Büyük olasılıkla, nanoteknoloji, medikal araştırmaların bir sonraki çalışma alanı haline gelecektir.

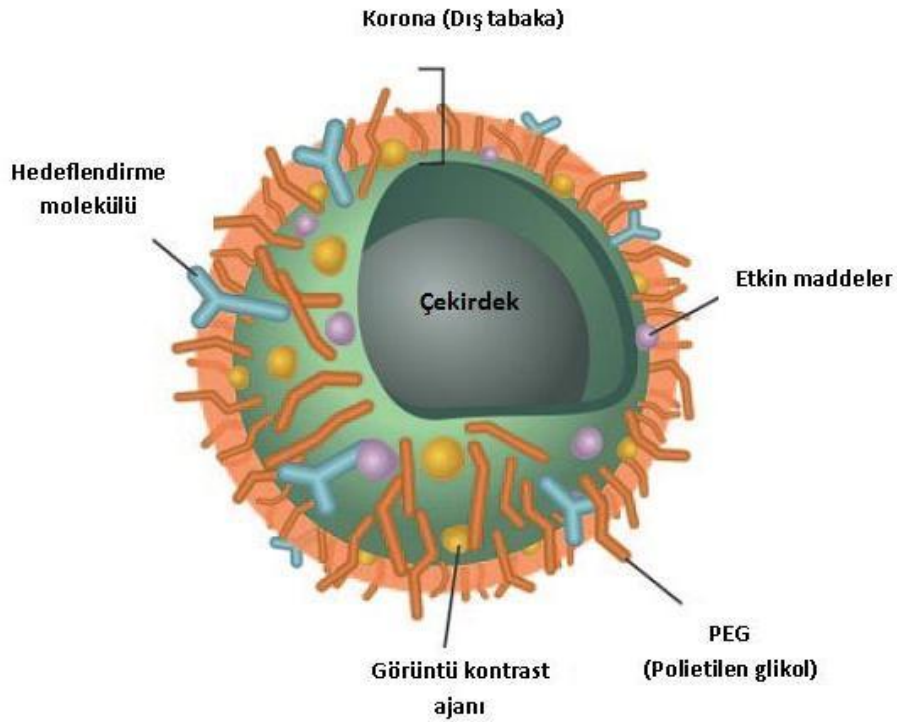
2.4. Nanoteknolojide İlaç Taşınmasının ve Hedeflendirmenin Önemi

Nanoteknoloji temelli etkin ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için fırsatlar tüm terapötik sınıflara genişletilebilse de, solunum, santral sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemle ilgili hastalıklar için etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi finansal ve terapötik açıdan büyük bir ihtiyaçtır. Nanopartiküllerin hedef dokuya ulaşabilmelerinin sınırlı olmasından dolayı bir çok terapötik ajanda başarıya ulaşamamıştır. Buna ek olarak, konvansiyel uygulama yöntemlerine nazaran ilaç taşıyıcı sistemlerin daha güvenli ve etkin sonuçlar vermesinden dolayı, anti-kanser ilaçlar, hormonlar ve aşılarda için çok hızlı gelişme olanakları beklenmektedir. Örneğin, kanser kemoterapisinde, sitostatik ilaçlar hem malign hücrelere hem de normal hücrelere benzer şekilde etki etmektedir. Bu nedenle, selektif olarak malign tümöre hedeflendirilen bir ilaç taşıma stratejisi çok gereklidir. İlacın biyolojik ortamda stabil olmaması, vücuttan hızlı uzaklaştırılması ve hızlı metabolize olması gibi nedenlerle ilacın zamanından önce kandan eliminasyonunu içeren problemler de mevcuttur. Benzer şekilde, bazı ilaçların proteaz inhibitörlerine olduğu gibi, proteinlere yüksek oranda bağlanması onların beyne ve diğer organlara difüzyonunu engeller. İlaç taşınması uygulamalarında nanoteknoloji, bütün ilaçlar için uygun olmayabilir. Özellikle etkinliği düşük, dozu yüksek etkin maddeler ilaç taşıyıcı sistemin boyutunu artırır bu da uygulamayı güçleştirir (1) .

Hedeflendirmede “Sihirli formül” (magic bullet) kavramı, 1891 yılında Paul Ehrlich tarafından ilaç hedeflendirme yaklaşımının en erken tanımı sunmuştur (35) .

İlaç hedeflendirmesinin amacı, doğru zaman periyodunda, doğru konsantrasyonda, doğru yere ilacın taşınmasıdır. Etkinliğin tanımlanmasını sağlayan, kimyasal kompozisyon, moleküler boyut, hidrofilitate ve protein bağlama gibi ilaca ait esansiyel karakteristikler oldukça komplekstir. İlaç pazarına yeni bir bileşik kazandırabilmek için, tüm bunlar araştırılmıştır ancak, sadece üzerinde çalışılan moleküllerin çok az bir kısmı diğer bir deyişle 5000-10000 yeni bileşikten bir tanesi klinikte aktif kullanıma erişebilmektedir (36) .

Aktif hedeflendirme, taşıyıcı yüzeyine spesifik molekülün eklenmesi ile başarılmıştır. Böylece, hedef hücre popülasyonu üzerinde eksprese edilen reseptörler veya antijenler ile etkileşmesi ve bağlanması artırılır. Bileşiklerin spesifik hedef bölgesine taşınmasında bir yaklaşım, taşıyıcıya ligand bağlanmasıdır (Şekil 2.4). Bazı ligandlar, monoklonal antikor ve peptidleri içermektedir (37-39) . Uygun ligand seçimi, bu ligandın hedef hücredeki seçicilik, stabilite, kullanılabilirlik ve özgünlüğüne dayanır.



Şekil 2.4. Çok fonksiyonlu nanopartikül. Nanopartikülün korona kısmı hidrofilik polimerler, hedeflendirme molekülleri, etkin madde ve görüntü kontrast ajanları ile fonksiyonelleştirilebilir (40) .

Nanoteknoloji kökenli hedeflendirilmenin iki temel uygulama alanı söz konusu olup, bunlar tümöre ve beyne ilaç hedeflendirilmesidir. Bizim grup çalışmalarımızın ağırlığı beyne ilaç hedeflendirilmesi alanında olup, bu nedenle tümöre hedeflendirme üzerinde kısaca durulduktan sonra, beyne ilaç hedeflendirilmesi daha ayrıntılı olarak işlenecektir.

2.4.1. Tümöre Hedeflendirme

Güncel kanser tedavileri genellikle, kemoterapiye izin veren kateterlerin uygulamasını içeren kolay uygulanmayan işlemleri içerir. Başlangıçta, var olan tümör küçültülür ve daha sonra cerrahi işlemle eğer mümkünse tümör(ler) temizlenir, bunu takiben biraz daha kemoterapi uygulanır ve radyasyon tedavisine geçilir.

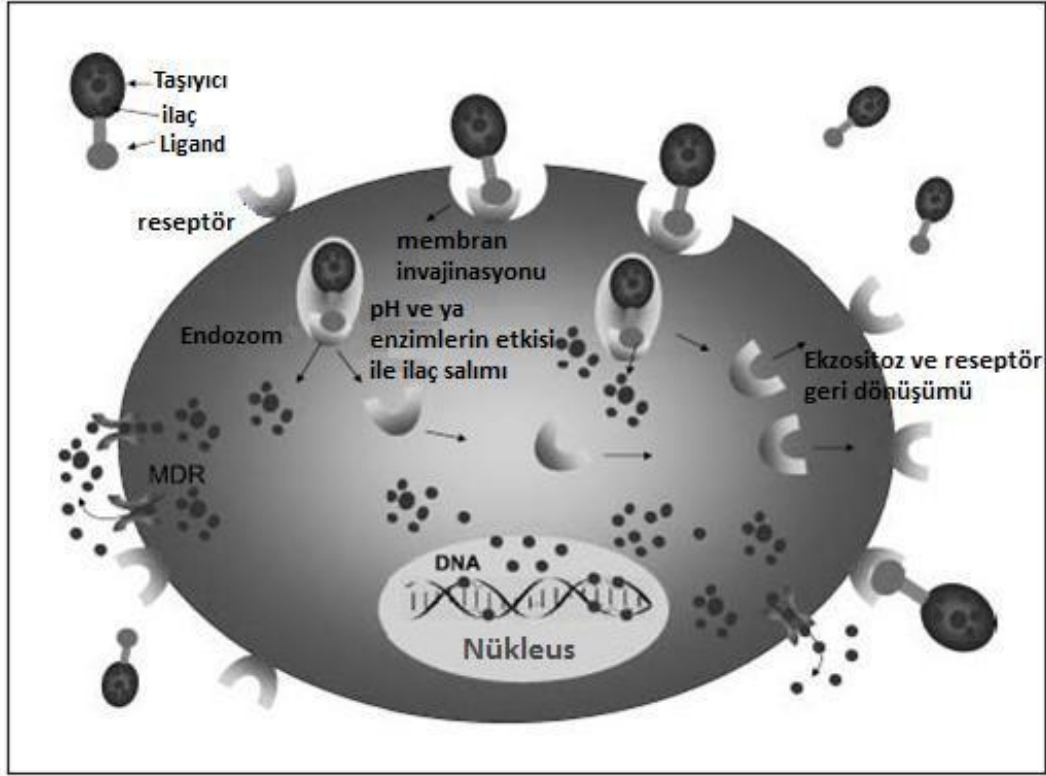
Kemoterapi ve radyasyonun amacı, tümör hücrelerini öldürmektir. Tümör hücreleri, bu ilaçların ve yöntemlerin etkilerine, en azından yetişkinlerde sağlıklı hücrelerden daha duyarlıdır. Çünkü tümör hücrelerinin büyüme hızı sağlıklı hücelere göre daha hızlıdır. Kemoterapiyi geliştirmek için son 25 yıldaki araştırma girişimleri, hastaların hayatta kalmalarında önemli bir gelişme sağlamıştır. Fakat hala ilerlemeye ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzdeki araştırma alanları, alternatif yollardan ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulanmasına izin verecek taşıyıcıların geliştirilmesini kapsamaktadır. Klinik denemeler, hastaların yeni terapötik seçeneklere açık olduğunu göstermektedir. Bu yeni ilaç taşıyıcı sistemler, kanser hastalarının yaşam kalitesini ve hayatta kalma sürelerini arttırmak içindir. Tedavinin etkinliği, mümkün olan en az sayıda sağlıklı hücreyi de etkilerken, tedavinin kanser hücrelerine hedeflenme ve onları öldürme yeteneği ile ilgilidir. Hastaların yaşam kalitesi ve yaşam beklentisindeki değişikliğin derecesi tedavinin hedeflenme yeteneği ile doğrudan ilgilidir. Günümüzdeki kanser hastalarının tedavilerindeki tek seçiciliği, kemoterapötik ilaçların doğası ile ilgili olarak, belirli tipteki kanser hücreleri üzerinde sağlıklı hücelere göre daha yoğun bir biçimde etki göstermesidir. Bu şiddetli ilaçların yüksek (bolus) dozlarda sistemik olarak uygulanmasında bazı yan etkiler mutlaka meydana gelir ve bazen bu yan etkiler o kadar yoğun olur ki, ilaçların kanseri tamamen ortadan kaldırma şansı varken hastalar tedaviyi bırakmak zorunda kalırlar (41) .

2.4.1.1. Tümör Spesifik Hedeflendirme

Tümör aktive edilmiş önilaç tedavisinin kullanımı, ilaç ile tümöre spesifik molekülün konjugasyonunun yapıldığı bir yaklaşımdır, bu konjugat tümöre ulaşana kadar inaktiftir (42) . Bu sistemler ideal şartlarda, sağlıklı hücrelerde olmayıp kanserli hücrelerin yüzeyinde olan reseptörlerle etkileşirler. Bağlayıcıların çoğu, aside karşı dayanıksız veya peptidaz ile bölünebilir ve istenen klinik sonuçları verebilmesi için in vivo ortamda yeteri kadar stabil olmayabilirler. Hedefleme kısmı tam olarak bağlanamadığında veya hücre içinde konjugatla olan bağın kırılmaması durumunda etkinliği azalır veya yok olur. Enzimatik olarak ayrılabilen peptit zincirler aracılığıyla, poli(etilen glikol) (PEG) ile konjuge edilmiş adriamisin üzerinde yapılan son çalışmalar, ayrılmanın tümör hücrelerinde daha selektif olduğunu göstermiştir (43) . 1975 yılında hedeflendirmenin diğer bir türü olarak monoklonal antikorların spesifik tümör antijenine bağlanabilme yeteneğinde olduğu gösterilmiştir (44) . Ancak bu antikorların kanser tedavisi için geliştirilmesi 20 yıl sürmüştür. İdeal antijen tüm tümör hücrelerinde eksprese edilip, konakçı organizmanın kritik hücrelerinde eksprese edilmeyen antijendir. Bu antijenlerde, mutasyon veya varyasyon olmamalı ve hücrelerin hayatta kalması veya önemli hücre fonksiyonları için gerekli olmalıdır (45) . Birçok araştırmacı, antikor kullanılarak kansere hedeflendirilen tedavilerin yakın bir gelecekte marketlere hükmedeceğine inanmaktadır (46) . Bu antikorlar, kendi içlerinde terapötik ajan olduklarını kanıtlarken, ayrıca daha etkili ve daha kullanışlı ilaç taşıyıcı sistemler için taşıyıcı olarak hizmet etme yeteneğindedirler.

Hedeflendirilmiş konjugatın hedef hücreye bağlandıktan sonra hücre içine girip giremediği, uygun hedeflendirme ligandının seçiminde önemli bir kriterdir. Hücre içine alınma genellikle reseptör aracılı endositoz ile gerçekleşir (Şekil 2.5). Folat reseptörleri örnek verilecek olursa, folat reseptörüne hedeflendirilmiş bir konjugat folat reseptörü ile hücre yüzeyine bağlandığında, içe doğru büzülen hücre membranı reseptör ve ligand konjugatını kuşatır ve endozom formu oluşur. Endozomun iç kısmında pH asidik hale gelir ve lizozomlar aktive olur. Tüm bunlar, ilacın endozom membranından geçişinin sağlanması için ilacın uygun fiziko-

kimyasal özelliklere sahip olmasını sağlar, sonrasında, ilacın konjugattan salını gerçekleşir ve sitoplazmaya geçer. Daha sonra salınan ilaçlar, hedef organel tarafından alınırlar. Aynı zamanda, konjugattan salınan folat reseptörü, folat-hedeflendirilmiş yeni konjugatlarla bağlanarak ikinci bir taşıma turu için tekrardan hücre membranına döner (47) .



Şekil 2.5. Nanopartiküllerin reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alınmaları.

Nanopartikül üzerindeki tümör spesifik ligandlar veya antikorlar, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanırlar, bu da nanopartiküllerin hücre içindeki endozoma alınmasını tetikler. Endozomun iç kısmındaki pH asidik hale gelir ve ilaç nanopartiküllerden salınır, sitoplazmaya geçer. İlaç yüklü nanopartiküller aktif akış pompası olan P-glikoprotein tarafından tanınmadıkları için buraya uğramadan hücre içine geçmiş olurlar, böylece ilacın hücre içi konsantrasyonu artırılabilir (48) .

Hem aktif hem de pasif hedeflendirme stratejilerinde kullanılan nanopartiküller, sağlıklı hücrelerde toksisiteye neden olmadan, ilacın tümör hücreleri içindeki konsantrasyonunun artırılmasını sağlar (49-50) . Ayrıca, nanopartiküller spesifik reseptörlere bağlanıp, hücre içine girerler ve reseptör aracılı endositoz aracılığı ile endozomlar tarafından kuşatılırlar, böylelikle ana ilaç direnç mekanizmalarından olan P-glikoproteinler tarafından tanınmazlar (51) . İlaç direnci, kemoterapötik ajanların terapötik etkinliğini sınırlayıcı büyük bir engel olarak ortaya çıkmaktadır. İlaç direnç mekanizmaları arasında P-glikoprotein en iyi bilinen ve en çok araştırılanıdır (52) . Nanopartiküllerin, P-glikoprotein aracılı direnci önleyeceği tahmin edilmektedir. Nanopartiküller hücre içine girdiklerinde endozom tarafından kuşatılacağından, aktif akış pompası P-glikoproteinden kaçınılmış olur, sonuçta hücre içindeki etkin madde konsantrasyonu artar (48) .

2.4.2. Beyne İlaç Hedeflendirilmesi

Santral sinir sisteminde (SSS) var olan dengeli iç ortamı korumak ve kandan beyin için gerekli besin maddelerini sağlamak, endotelial yapıda membranöz bir bariyer olan kan - beyin engelinin (KBE) görevidir. KBE, bir yandan kandaki maddelerden beyni korurken diğer yandan beyin için gerekli besin maddeleri, oksijen ve metabolitlerin beyne geçişini sağlar. Böylece KBE, seçici ve dinamik bir filtre gibi görev yaparak SSS'deki dengenin korunmasını sağlar. Ancak bu doğal koruyucu mekanizma, zararlı maddelerden beyni korurken pek çok terapötik etkili molekülün de SSS'ye geçişini engeller. Büyük moleküllerin yaklaşık olarak % 100'ü, küçük moleküllerin ise % 98'inden fazlası KBE'den geçemezler.

KBE'nin anatomik yapısının temelini ise mikrovasküler yapısındaki endotel hücreleri oluşturur. KBE esas olarak beyni dolaşımdan ayıran, membranöz bir bariyerdir (53) . SSS'de bulunan kapillerler diğer dokularda bulunan kapillerlerden yapı olarak farklıdır. Omurgalı beyinde ve omuriliğindeki kapillerler dolaşımdaki maddelerin diğer organlara geçmesini sağlayan küçük gözeneklere sahip değildir. SSS kapillerlerinin endotel hücreleri sıkı kavşaklarla birbirine bağlanmıştır. Bu farklılık beyin kapillerlerinde bulunan kan ve beyin dokusundaki ekstrasellüler sıvı arasında bir permeabilite bariyeri oluşmasıyla sonuçlanmıştır.

Beyinde bulunan küçük kılcallar kimyasalların beyne geçebildiği KBE'nin total yüzey alanının % 95'ini oluştururlar. Beyindeki damarlar, organlarda bulunan kan damarlarından daha ince ve daha küçük çaplıdır.

Beyin kapillerlerinde değişim genellikle transsellüler yoldan olur. Pinositoz ve hücre içi geçiş yoktur. Bu nedenle sadece kapiller endotel membranından serbestçe difüze olabilen, yağda çözünebilir maddeler KBE'ni pasif olarak geçebilir. KBE'nin 12 m² yüzey alanına ve toplamda 650 km uzunluğa sahip olmasına rağmen bariyer oldukça etkili olduğu için polar moleküller ve küçük iyonlar gibi yağda çözünmeyen maddelerin KBE'den geçişi pratik olarak imkansızdır. Bu nedenle terapötik değeri oldukça yüksek olan çoğu ilaç sistemik olarak kullanılamamaktadır.

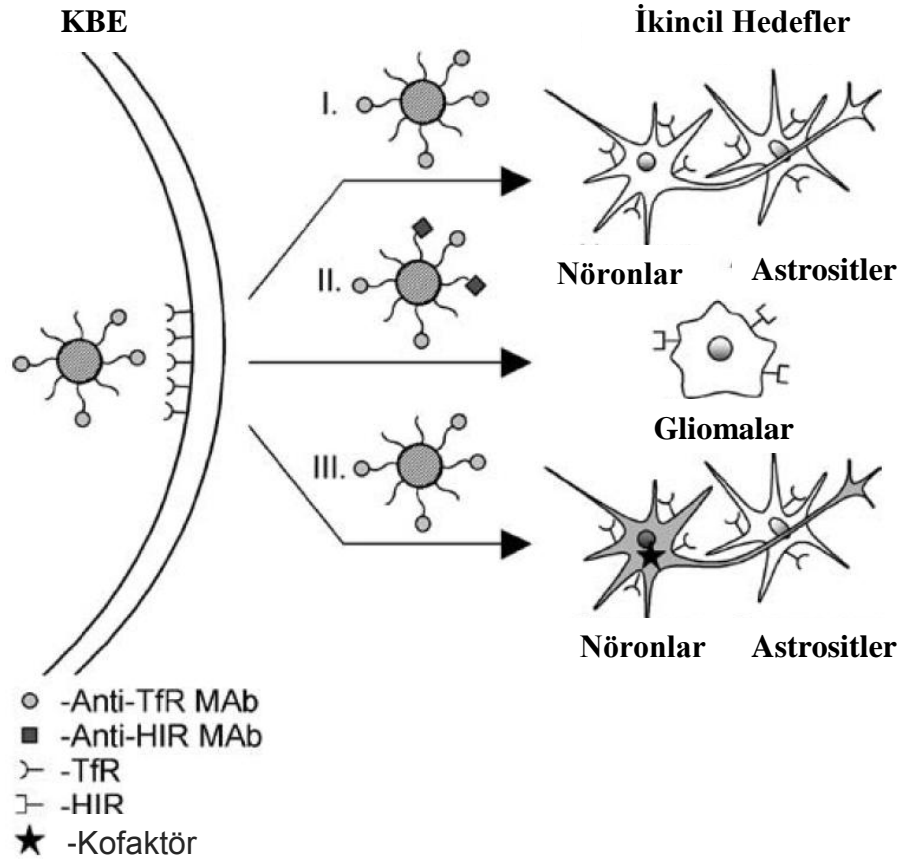
Klinik gelişmelerde, SSS'ye etki eden aday ilaçlar çok düşük başarı oranına sahiptir (54) . KBE'yi geçişte düşük permeabiliteye sahip olduğu için aday ilaçların % 98'inden fazlasının gelişimi devam edememektedir, bu da ilaç endüstrisi için önemli bir sorun oluşturmaktadır (55-56) . Bunun üstesinden gelebilmek için, KBE'deki geçiş mekanizmalarının moleküler düzeyde anlaşılır hale getirilmesi ve daha sonra ilaç geliştirme aşamasında bu bilgilerin kullanılması gerekmektedir. Küçük moleküllerin, beyin kapiller endotel hücrelerinin plazma membranından basit difüzyonu onların lipofilikliğine bağlıdır, bu yüzden böyle moleküllerin lipofilikliğin artırılması, ilaç endüstrisinde etkin maddenin KBE geçirgenliğinin artırılması yönünde uzun süredir kabul görmüş bir stratejidir. Fakat, son gelişmeler KBE'de çeşitli taşıyıcıların eksprese edildiğini ve bu taşıyıcıların, substratı olan küçük moleküllerin KBE'den geçirgenliğinde etkili olduğunu göstermiştir (57) .

KBE'den ilaç taşınmasında çeşitli stratejiler mevcuttur, bunlar invazif ve invazif olmayan olmak üzere iki grup altında toplanabilir. İnvaziv teknikler kan-beyin engelinin bozulması ve direk ilaç enjeksiyonunu içermektedir. İnvaviz olmayan teknikler ise kendi arasında ikiye ayrılmaktadır, bunlardan birincisi, ön ilaç tasarımı ve lipidizasyonu içeren kimyasal yoldur. KBE'den ilaç taşınmasında gelişmesini sürdüren bir platform olan invaviz olmayan ikinci yol ise, biyolojik temelli stratejilerdir. Büyük ya da küçük molekülü ilaçların yeniden formüle edilmesine izin vererek birçok endojen taşıyıcı aracılığıyla KBE'den taşınmasını

sağlamaktadır. Bu taşıyıcılar üç kategori altında özetlenebilir; reseptör aracılı taşınım (RAT) sistemleri, taşıyıcı aracılı taşınım (TAT) sistemleri ve aktif effluks transport (AET) sistemleri. Terapötik amaçla kullanılan küçük moleküller KBE'den, belirli taşıyıcı aracılı taşınım moleküllerinin yardımıyla ya da aktif effluks taşıyıcılarının inhibisyonu ile taşınabilirler. Rekombinant proteinler ya da gen ilaçları gibi büyük molekülle ilaçlar ise KBE'den ancak reseptör aracılı taşınım sistemleri yardımıyla geçebilir (58) . Reseptör aracılı taşınım sistemleri beyinde taşıyıcı aracılı taşınım sistemleriyle beraber işlev görürler. TAT sistemleri dolaşımdaki küçük molekülle besinlerin, vitaminlerin ve hormonların KBE'den taşınımını milisaniyeler içinde sağlarken RAT sistemleri ise dolaşımdaki peptitlerin ve transferrin gibi plazma proteinlerinin dakikalar içinde KBE'den geçişini sağlarlar. Özetle, KBE reseptörleri rölatif olarak küçük transmembran bölgelere ve ligand bağlayıcı bölgeleri oluşturan geniş, hücre dışı çıkıntılı bölgelere sahiptir. Reseptör-ligand kompleksi dakikalar içinde endotelial hücreler içine endositoz edilir, endozomal sistem tarafından paketlenir ve endotelial stoplazma içinde ekzositoza uğramak üzere membrandan geçişe uğrar. KBE boyunca transitöz süresince geçiş sırasında katedilen uzaklık yalnızca 200-300 nm'dir. KBE boyunca bir çok peptit reseptör sistemleri ekspres edilir ve bunlardan birçoğu dolaşımdaki peptitlerin KBE'den RAT'ını düzenler.

Nanoteknoloji, nano boyutta ve fonksiyonel düzene sahip materyallerin, araçların tasarımını, sentezini ve karakterizasyonunu içine almaktadır. Seçici taşınma ve başka yollarla geçişi mümkün olmayan ilaçların, diğer küçük moleküllerin KBE'den geçişlerinin sağlandığı nanoteknoloji alanı günümüzde klinik açıdan çok büyük bir öneme sahiptir (59) (Şekil 2.6). Nanopartiküller KBE'den peptit, protein antisens ilaçlar gibi büyük molekül ağırlıklı ilaçların taşınımı için kullanımı, SSS'ye potansiyel terapötik etkili bu moleküllerin iletimini sağlar. Biyolojik sıvılardaki düşük stabilite, hızlı enzimatik degradasyon, elverişsiz farmakokinetik özellikler ve SSS'ye geçişin azlığı nedeniyle bu tip KBE'ye hedeflendirilen ilaç moleküllerinin koruyucu nanotaşıyıcılarda formüle edilmesi nanopartiküler sistemlerin bir avantajıdır (60) . Konvansiyonel ilaçlarla karşılaştırıldığında oldukça yüksek farmakolojik aktiviteye sahiptirler. Terapötik etkinlik için yeterli miktarda ilaç

molekülü nanopartiküllere yüklenerek istenilen yere yönlendirilebilir ve ilaçlardan kaynaklanabilecek olası toksisite engellenmiş olur (61) .

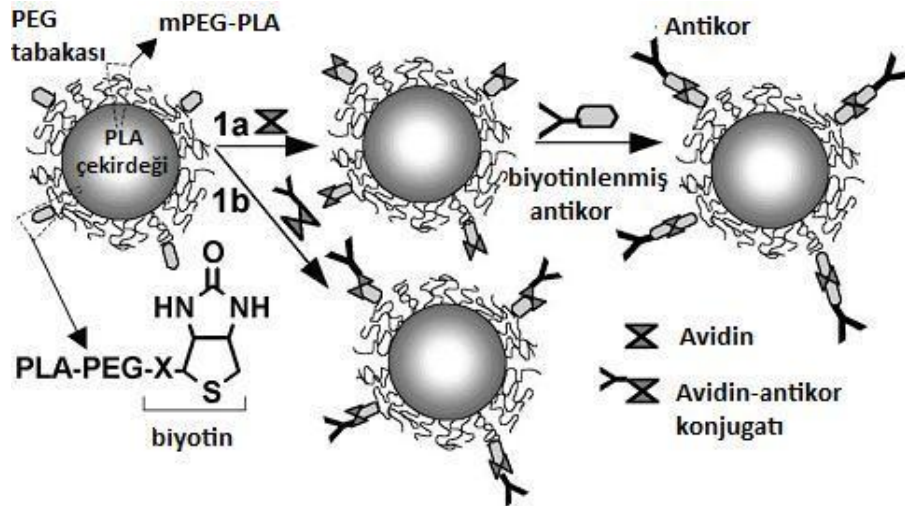


Şekil 2.6. Beyne ilaç taşınmasındaki ikincil stratejilerin şematik gösterimi.

Şekil 2.6'da, anti-Transferrin reseptör (TfR) antikoru ile hedeflendirilmiş PEG'lenmiş lipozomları göstermektedir. Fakat, beyne ilaç hedeflendirilmesinde sadece lipozomlar değil, buna benzer diğer ilaç taşıyıcı sistemler de kullanılabilir (örneğin, nanopartiküller). Şekilde gösterilen her bir teknikte, anti-TfR monoklonal antikoru, transferrin reseptörüne bağlanır ve transitoz ile kan-beyin engelinden geçiş sağlanır. I. Taşıyıcı hem kan-beyin engelinde, hem de hedef hücrelerde bulunmaktadır, bu durumda, anti-TfR monoklonal antikoru nöron ve astrositlerin TfR'lerine de bağlanabilir böylece ilacın hücre içine taşınması da sağlanır. II. Ardışık hedeflendirme. Anti-TfR monoklonal antikora ek olarak, anti- insan insülin reseptör monoklonal antikoru gibi ikinci bir hedeflendirme antikoru bulunmaktadır. Bu antikor da lipozom yüzeyindeki PEG'lere konjuge edilebilir. Böylece, anti-TfR

monoklonal antikorun farenin kan-beyin engeline geçişine izin verirken, ikinci hedeflendirme ajanı, yabancı doku aşısı yapılmış insan glioma hücrelerinin yüzeyindeki insan insülin reseptörüne bağlanır ve ilacın hedeflendirilmiş taşınımı sağlanır. III. Selektif etki. Anti-TfR monoklonal antikor, nöronlardaki ve astrositlerdeki TfR'ye bağlanır. İlaç taşıyıcı sisteme yüklü enzimin aktivitesi için gerekli kofaktör nöron tarafından üretiliyorsa, seçici taşınım sağlanır.

Beyne ilaç hedeflendirilmesinde en çok çalışma yapılan alan, koloidal ilaç taşıyıcı sistemlerle hazırlanan PEG'lenmiş immünolipozomlardır. Bu sistemler, kandan beyne reseptör aracılı transitoz ile girerler ve içeriklerini (küçük ilaç molekülleri, plazmid) kan-beyin engeline zarar vermeden, beyin parenkiması içine taşırlar (62-65). Bu strateji, PEG 2000 zincirinin % 1-2'lik kısmının ucuna reseptöre spesifik hedeflendirme ligandının varlığını gerektirmektedir. Hedeflendirme ligandları, reseptörlerin (transferrin veya insülin) aktivitesini tetikleyen ve beyin kapiller endotelinde yüksek oranda eksprese edilen peptidomimetik monoklonal antikorlardır (62,64-65). PEG'lenmiş ve kontrollü salım sağlayan poli(laktik asit) (PLA) immünonanopartikülleri, ilgi çeken alternatifler sunmaktadır. Biotin ile fonksiyonelleştirilmiş ko-polimerler sentezlenmektedir (Şekil 2.7). Biotinlenmiş PEG-PLA nanopartikülleri avidin köprüsü (66) veya avidin-antikor konjugatı (67) aracılığı ile biyotinlenmiş antikorlar ile bağlanabilir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. PEG'lenmiş PLA immünonanopartikül hazırlamak için günümüzde yaygın olarak kullanılan konjugasyon tekniği olan biyotinleme (61).

Genel KBE özelliklerini ve parenteral preparat formülasyonlarında olması gereken kıstaslar göz önüne alındığında beyne ilaç taşınımı için kullanılacak nanopartiküllerde olması gereken bazı ideal özellikler bulunmaktadır. Bunlar;

- Toksik olmayan, biyouyumlu, biyoparçalanabilir olması
- Partikül büyüklüğü < 100 nm olması
- Kandaki fiziksel stabilitesinin düşük olması, aglomerasyon gözlenmemesi
- Nanopartiküllerin dolaşımında kalış süresinin uzatılması amacıyla uygun modifikasyonlar yapılmalı, mononükleer fagositik sistem tarafından opsonizasyonun engellenmesi
- İlaç salım profillerini istenen yönde değiştirebilmesi
- Taşıdığı ilaç molekülünün bozunmasını indüklememesi, bozunmayı engellemesi
- Ölçek büyütülebilir ve maliyetin etkin üretim sürecine uygun olması
- Küçük moleküllere, peptit ve proteinlere veya nükleik asitlere uygulanabilir olması
- Beyinde terapötik ilaç konsantrasyonunun sağlanması için kanda dolaşım süresinin arttırılmış olması, mononükleer fagositik sistem tarafından fagositoz ihtimalinin en aza indirilmiş olması
- Nanopartikül ekspiyanıyla ilacın geçimli olması, kimyasal degradasyon, protein denaturasyonu gözlenmemesidir (68) .

Sonuç olarak, profilaksisi ve tedavisi çok güç olan santral sinir sistemi hastalıklarında nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile güvenilirliği ve etkinliği saptanmış etkin maddelerin terapötik dozları, tedavide kısıtlayıcı rol oynayan KBE'nin aşılması ile hedef bölgeye taşınmış olur. Bu sistem, polimerik nanopartikül yapısı içerisine enkapsüle edilmiş etkin maddeyi, yüzeyinde sistemin kandaki

stabilitesini arttırmak ve diğer grupların bağlanmasını sağlamak amacıyla poli(etilen glikol)'ü ve buna avidin-biyotin teknolojisi ile bağlanmış KBE'deki transferrin reseptörüne özgü monoklonal antikorunu içermektedir. Truva atı olarak nitelendirilen bu sistem, beyin endotelinde yer alan reseptöre antikor aracılığı ile bağlanarak KBE'yi aşabilmekte ve etkin maddenin hedef bölgeye istenilen doz ve sürede taşınması sağlanmış olmaktadır (27) .

2.5. Nanopartiküllerin Hazırlanma Yöntemleri

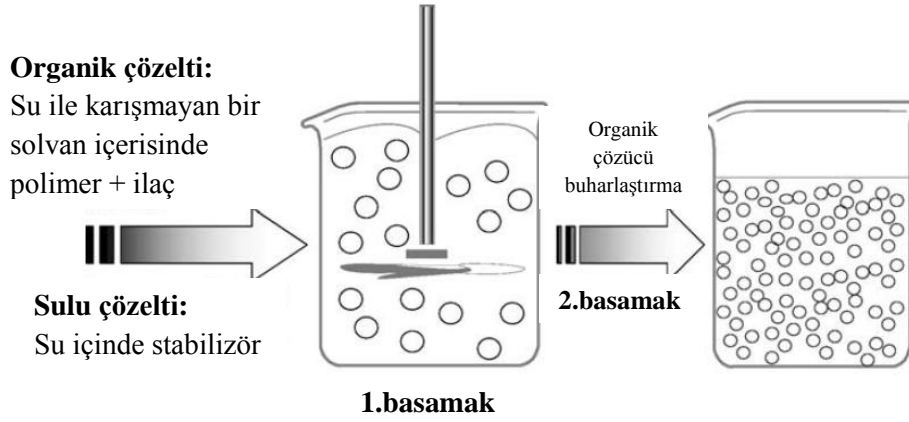
Nanopartiküllerin hazırlanmasında birçok yöntem geliştirilmiştir, bu yöntemler, formülasyonun polimerizasyon reaksiyonuna gereksinim duymasına ya da doğrudan önceden şekillendirilmiş polimerden hazırlanabilmesine göre iki ana kategoride sınıflandırılabilir (69) .

- Ham polimerin dispersiyonu
 - Emülsifikasyon/solvan buharlaştırma metodu
 - Emülsifikasyon/solvan difüzyon metodu
 - Tuzla çöktürme metodu
- Monomerlerin polimerizasyonu
- Hidrofilik polimerlerin iyonik jelyasyonu ya da koaservasyonu olarak sıralanabilir (15) .

2.5.1. Emülsifikasyon/Solvan Buharlaştırma Metodu

Emülsifikasyon/solvan buharlaştırma iki basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamakta, sulu faz içerisinde polimer çözeltisinin emülsifikasyonu sağlanır (Şekil 2.8) (70) . İkinci adımda, polimerin içinde çözündüğü solvan buharlaştırılır ve polimerin nanopartikül olarak çökmesi sağlanır. Etkin maddeyi de içeren polimerin organik fazdaki çözeltisi, dispersiyon ajanı ve yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak nano boyuttaki damlacıklar içerisine disperse edilir. İlaç polimer matriks sistemi içine iyi bir şekilde disperse olmuş ise, polimer, nanopartikül formunda çöker. Solvan, sıcaklığın basınç altında artırılmasıyla veya sürekli karıştırılarak uçurulur (15) . Nanopartiküllerin boyutu, karıştırma hızı, dispersiyon ajanının miktarı ve tipi, organik ve sulu fazın viskozitesi ve sıcaklık ile ayarlanabilir. Sıkça kullanılan polimerler, poli(laktik asit) (PLA) (71-72) , poli(laktik-ko-glikolik

asit) (PLGA) (73) , etilselüloz (EC) (74) , selüloz asetat ftalat, poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) (5,75-76) ve poli(hidroksibutirat)'tır (PHB) (77-78) .



Şekil 2.8. Emülsifikasyon/solvan buharlaştırma tekniğinin şematik gösterimi (70) .

Etkin maddenin hidrofilik ya da lipofilik oluşuna göre, hazırlanan emülsiyonun tipi farklılık gösterir. Peptit, protein yapısındaki ilaçların bu yöntemle enkapsülasyonlarının sağlanabilmesi için, S/Y/S tipinde çoklu emülsiyonu oluşturulur. Hidrofilik ilaçlar hazırlama sırasında dış faza kaçmaktadır (79) . Hidrofilik ilaçların hapsedilme etkinliğini artırmak için S/Y/S emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemi geliştirilmiştir (80) . Organik faz bu sistemde iki sulu faz arasında ilacın dış sulu faza difüzyonunu önleyici bir bariyer görevi görmektedir (81) . Bu yöntemde etkin maddenin sulu çözeltisi, polimer içeren organik faz içinde dağıtılır. Elde edilen S/Y emülsiyonu dış sulu faz içinde emülsifiye edilerek S/Y/S çoklu emülsiyonu hazırlanır. Elde edilen küreler santrifüjlenir, yıkanır ve kurutulur (dondurarak kurutma v.b.).

Yağda çözünebilen lipofilik ilaçlar için Y/S tipinde basit emülsiyon oluşturulur. Tez çalışmasında kullanılan etkin maddenin lipofilik karakterde olmasından dolayı Y/S emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemi ayrıntılı olarak anlatılacaktır.

Bu yöntemde, öncelikle polimer, su ile karışabilen uçucu bir organik solvan (etil asetat, diklorometan, aseton vb.) içerisinde çözünür. Daha sonra bu çözelti

içerisine etkin madde eklenir. Etkin maddenin bu sistem içerisinde çözünmesi sağlanır.

Etkin madde, polimer ve organik fazı içeren bu solüsyon, Y/S tipinde bir emülsiyon elde etmek üzere, emülgatör (poli(vinil alkol) (PVA) gibi) varlığında büyük hacimde bir sulu faz içine emülsifiye edilir (uygun karıştırma ve sıcaklık koşullarında). Organik fazı uzaklaştırmak için buharlaştırma ya da ekstraksiyon yöntemi kullanılır. Eskiden kullanılan teknikte, emülsiyon, düşük basınç veya normal atmosfer basıncında tutulur, karıştırma hızı organik fazın uçmasını sağlayacak şekilde azaltılırdı. Organik fazı uzaklaştırmak için diğer bir yol ise, rotavapor tekniğidir. Rotavapor ile vakum oluşturularak, organik fazın kaynama noktası azaltılır, aynı zamanda ısı uygulanır ve organik fazın buharlaşması sağlanır. Etkin maddenin ve polimerin ısıya olan duyarlılıkları göz önünde bulundurulmalıdır. Buharlaştırma aşamasında sonra nanopartiküller, filtrasyon, santrifüjleme ya da eleme metodu ile toplanabilir. Elde edilen nanopartiküller son olarak, uygun koşullar altında kurutulur veya liyofilize edilir (82) .

2.5.2. Emülsifikasyon/Solvan Difüzyon Metodu

Solvan buharlaştırmanın modifiye versiyonu olan bu methoda suyla karışabilen aseton ya da metanol gibi bir solvan ve diklorometan ya da kloroform gibi suyla karışmayan bir solvan yağ fazını oluşturmak amacıyla kullanılır (83) . Suyla karışabilen solvanın kendiliğinden ani uçması iki fazın yüzeyleri arasında türbülans ve küçük partiküllerin oluşumu ile sonuçlanır. Suyla karışan solvanın konsantrasyonunun artırılması ile daha küçük partikül büyüklüğüne sahip partiküller elde edilebilir.

2.5.3. Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Metodu

Yukarıda bahsedilen metotlarda organik solvanların kullanılması ve bu maddelerin hem doğaya hem de insan fizyolojik sistemine zararlı olması nedeniyle yeni metotlar geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla organik çözücülerin daha az kullanıldığı yeni yöntemlerin tasarımı yapılmıştır.

2.5.4. Süperkritik Sıvı Teknolojisi Kullanarak Nanopartiküllerin Hazırlanması

Konvansiyonel metotlar (solvan ekstraksiyon buharlaştırma, solvan difüzyon ve organik faz ayrışması) fizyolojik sistemlere ve doğaya zararlı olan organik solvanların kullanımını gerektirir. Bu nedenle kullanımı zararlı olmayan süperkritik sıvılarla biyoparçalanabilir mikro ve nanopartikül hazırlanma yolları araştırılmıştır. Süperkritik sıvılar genel olarak süperkritik sıcaklığı üzerinde, basıncın değişmesine rağmen faz değiştirmeyen sıvılar olarak tanımlanırlar. Süperkritik CO₂ en çok kullanılan süperkritik sıvıdır çünkü kritik olduğu durumlar uyumludur (T_c=31,1 °C, P_c=73.8 bar), toksik değildir, alev almaz ve ucuzdur. Genel olarak süperkritik sıvılarla en çok gerçekleştirilen proses teknikleri süperkritik anti-solvent (SAS) ve kritik çözeltinin ani genişlemesidir (RESS). SAS metodunda süperkritik sıvı ile tamamen karışabilen bir sıvınının (Ör: metanol) içinde süperkritik sıvıda çözünmeyen solut tamamen mikronize edilir. Solvanın süperkritik sıvı içinde ekstrakte edilmesi solutun aniden çökmesine sonuç olarak da nanopartikülün oluşmasına sebep olur. RESS yönteminin SAS yönteminden ayrıldığı basamak solutun süperkritik sıvı içinde çözünmesini takiben çözeltinin düşük basınca nozzle yardımıyla genişletildiği basamaktır. Böylece süperkritik sıvıların solvan gücü birden azalır ve solut çöker. Bu tekniğin avantajı çöktürülmüş ürünün solvan içermemesidir. Bu teknik polimerik nanopartiküller hazırlamak amacıyla kullanılır (84) . Süperkritik sıvı teknolojisi tekniği, doğaya zararsız ve yüksek miktarda üretimler için elverişli olmasına rağmen özel tasarım edilmiş pahalı ekipmanlar gerektirmektedir.

2.5.5. Polimerizasyon Metodu

Nanopartiküller monomerlerin polimerizasyonu ile hazırlanabilir. Poli-alkilsiyanoakrilat (PACA) polimerlerinin kullanılması ile hazırlanan nanopartiküller ve bunların ameliyatlarda doku adezif olarak kullanılmasını takiben yapılan çalışmalarda metil ya da etil siyanoakrilatın polisorbata-20 varlığında sulu ortamda disperse edilmesi ile 200 nm büyüklüğünde nanopartiküller elde edilmiştir (85) . Burada siyanoakrilik monomer yüzey aktif ajanın olduğu polimerizasyon ortamına

eklenmiş, polimerize alkilsiyanoakrilat eldesi için kuvvetli bir şekilde manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu yöntemde ilaç molekülü monomerin eklenmesi ya da polimerizasyon işleminin tamamlanması sonrasında ortama eklenebilir. İşlem sonrasında elde edilen nanopartikül süspansiyonu ultrasantrifügasyon ya da izotonik, sürfaktandan arı ortamda resüspande edilerek saflaştırılabilir.

Polimerizasyon esnasında dekstran-70, -40, -10, poloksamer-188, -237 gibi stabilizanlar, polisorbata-80, -40, -20 gibi sürfaktanlar ortama eklenebilmektedir. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve moleküler kütlesi kullanılan sürfaktan ya da stabilizanın tipi ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir.

2.5.6. Hidrofilik Polimerler ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Diğer yöntemlerde kullanılan sentetik polimerlerin yanı sıra kitosan, aljinat, jelatin gibi hidrofilik polimerler de nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Organik solvanlarla hazırlanan pek çok hidrofobik ya da hidrofilik taşıyıcının limitli protein yükleme kapasitesi nedeniyle Calvo ve diğ. tarafından hidrofilik kitosan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlama metodu, bir fazın kitosan ve etilen oksit diblok kopolimerini diğer fazın polianyon sodyum tripoli fosfatı (TPF) içerdiği iki fazın iyonik jelyasyonuna dayanmaktadır (86-88) . Bu metodda kitosanın pozitif yüklü amino grupları negatif yüklü TPF ile etkileşime girmektedir. Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli kitosanın bileşiminin diblok polimerle farklılaştırılması ile 200-1000 nm ve 20-60 mv arasında değişmektedir. Elde edilen nanopartiküllerin sığır serum albumini, tetanoz ve difteri toksoidi, insülin ve oligonükleotidler gibi proteinlerle yüksek assosiyasyon gösterdiği bulunmuştur.

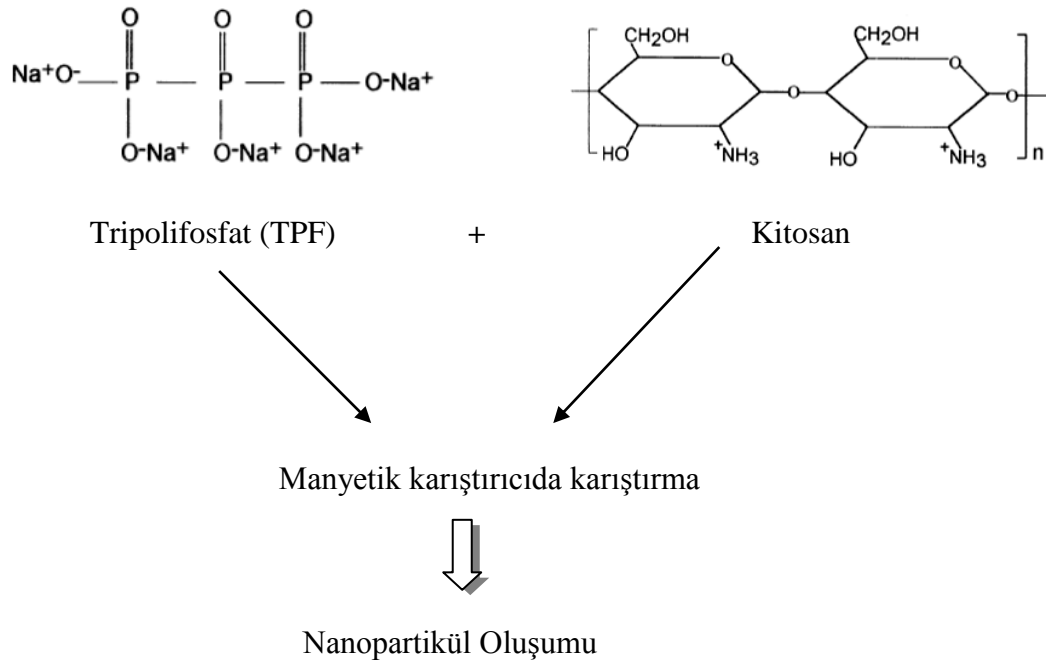
Mao ve diğ. DNA-kitosan nanopartiküllerini kompleks-çöktürme yöntemi ile hazırlamışlar ve oral gen taşınımı için kullanmışlardır. Aynı yöntem DNA-jelatin nanopartiküllerinin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Kitosan nanopartiküllerinin, immünolojik ve antineoplastik proteinlerin yüklenmesi bakımından daha iyi taşıyıcılar olduğu kanıtlanmıştır (89) . Kitosan nanopartikülleri ayrıca emülsiyon-koaservasyon metodu ile üretilmiştir (90) . Bu metodda kitosan ve yüklenmek

istenilen ilaç su fazında çözündürülmüş, S/Y emülsiyonu parafin likit içinde emülsifiye edici ajan yardımıyla hazırlanmıştır. Emülsiyonun stabilizasyonu amacıyla parafin likit içinde NaOH içeren diğer bir emülsiyon ortama eklenmiştir. NaOH ile temas anında kitosan nanopartikülleri polimerin koaservasyonu ile oluşturulmuştur.

2.5.7. İyonotropik Jelasyon

Kitosan polimerinden nanopartikül hazırlanmasında sıkça kullanılan bir yöntem olan iyonotropik jelasyonda zıt yüklü makromoleküller arasında gerçekleşen kompleksleşmeden yararlanır. Yöntemin tercih edilmesinin sebeplerinden biri yöntemin hazırlama sürecinin basitliği ve fazla ekipman gerektirmeyişidir. Yöntemde elektrostatik güçlerle katyonik olan kitosanla kolayca etkileşebilen çapraz bağlayıcı tripoli fosfat (TPF) kullanılmaktadır (91) . İyonotropik jelasyon yönteminde öncelikle iki ana faz olan polimer ve çapraz bağlayıcının uygun konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmaktadır. TPF çözeltisi içine kitosan ilave etmek suretiyle TPF-kitosan kompleksi oluşturulmuş ve nanopartiküller, karışmakta olan asidik özellikteki kitosan çözeltisini polianyonik TPF çözeltisinin damla damla ilave edilmesiyle elde edilmişlerdir (28) . Gerçekleşen etkileşmenin esası zıt yüklü iyonların kompleksleşmesi olup bu etkileşme sonrasında küresel nanopartiküller oluşturulmuştur. Zıt yüklerin etkileşimi nanopartikül oluşumu Şekil 2.9'de şematik olarak gösterilmiştir. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlama sürecinin ılımlı olması protein tipteki etkin maddelerin de nanopartiküllere yüklenmesine olanak sağlamıştır. İnsülin yüklü kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması için TPF çözeltisi ile insülin karıştırılmış daha sonra bu çözelti sürekli karıştırma altında kitosan çözeltisine ilave edilmiştir (88) . Polimer olarak kitosan hidroklorür tuzlarının kullanıldığı bu çalışmada (Seacure 210 Cl ve Protasan 110 Cl) molekül ağırlıkları ve deasetilasyon derecesinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve etkin madde yükleme etkinliği üzerinde etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonunda partikül büyüklüğü 300 ile 400 nm, zeta potansiyeli ise 25 ve 54 mV arasında değişen nanopartiküller elde edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak insülin yüklenmesi % 55'e kadar çıkartılmıştır. Kitosanın amin

gruplarının jelasyonunun yüklenme etkinliği üzerindeki etkisinden dolayı yöntemin etkinliğinin kitosanın deasetilasyonuna bağlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 2.9. Kitosan nanopartiküllerinin iyonotropik jelasyonla oluşumu.

Kitosan ve TPF kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının TEM analizleri nanopartiküllerin şeklinin küresel olduğunu göstermiştir. FTIR analizleri ile kitosan ve TPF arasındaki etkileşimin amonyum grupları arasında gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Protein tipteki etkin maddelere uygunluğunun araştırılması amacıyla model bir protein olan sığır serum albumini (BSA) nanopartiküllere yüklenmiştir. Kitosanın molekül ağırlığının, deasetilasyon derecesinin, ortamda bulunan kitosan, TPF ve ortama eklenen BSA konsantrasyonunun ve ortamda PEG varlığının nanopartiküllere yüklenen BSA miktarını etkilediği görülmüştür. Kitosanın molekül ağırlığının 19 kDa'dan 210 kDa'a çıkması, BSA'nın enkapsülasyon etkinliğini yaklaşık iki kat arttırmıştır. Ancak 8 gün boyunca gerçekleştirilen kümülatif salım analizleri salınan BSA yüzdesinin % 73,9'dan % 17,6'ya indiğini göstermiştir. Deasetilasyonun % 75,5'ten % 92'ye çıkması ise enkapsüle edilen BSA miktarını arttırırken, salım hızını yavaşlatmıştır. Nanopartikül hazırlama ortamında bulunan polimer olan kitosan ve

ortama eklenen model etkin madde BSA'nın konsantrasyonunun artması enkapsülasyonu azaltmıştır. BSA'nın yükleme kapasitesinin artması BSA salımında artışa neden olmuştur. Bununla beraber ortama PEG ilavesi BSA enkapsülasyonunu zorlaştırırken, salım hızını da arttırmıştır (92) .

İyonotropik jelasyon yöntemi ile kitosan mikrokürelerinin hazırlandığı bir çalışmada partikül boyutu 500 ile 710 μm arasında değişen mikropartiküller elde edilmiş ve yükleme etkinliği % 90'ın üzerinde bulunmuştur. Mikropartiküllerin yüzey özelliklerinin SEM ile analizi gerçekleştirildiğinde TPF çözeltisinin pH'sı azaltıldığında ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip kitosan kullanıldığında daha düzgün ve pürüzsüz küreler elde edilmiştir. Yapılan etkin madde salım çalışmaları sonrasında ise kitosanın molekül ağırlığında ve konsantrasyonunda gerçekleşen artışın etkin madde salımında artışa, çapraz bağlama süresindeki artışın ise salınan etkin madde miktarında azalmaya neden olduğu görülmüştür (93) .

2.6. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polimerler ilaç taşıyıcı sistem teknolojisinin ilerlemesinde bütünleyici ve önemli bir role sahiptir. Bu önemi, değişmeyen dozlarda uzun bir zaman diliminde, ayarlanabilir bir salım ile hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddelerin kontrollü salımını sağlayarak kazanmıştır (94) .

Çok amaçlı materyal sınıfına giren polimerler, son birkaç on yıldır hayatımızı günden güne değiştirmektedir. Fakat, kalıcı ve geçici biyomedikal uygulamalar için kullanılan polimerlerin ayrımı 30 yıl önce yapılabilmıştır (95) . Daha sonra polimer bilimi ile farmasötik bilimlerin birleşmesi sonucunda, ilaç taşıyıcı sistemlerin gelişimi ve tasarlanmasında yenilik açısından (fiziksel durumdaki esnekliği, şekli, boyutu ve yüzeyi) önemli gelişme yaşanmıştır. Polimerik taşıyıcı sistemler, ya zamana bağlı ya da yere özgü kontrollü ilaç taşınmasının başarılması yönünde ilerlemeler kaydetmiştir (96) .

2.6.1. Polimer Seçimindeki Hususlar

Polimerlerin yapılarındaki çeşitlilik ve polimerin bulk özellikleri ve yüzeyinin iyi tanınması gerekliliği polimer seçimini ve tasarımını zor bir konu haline getirmektedir. Eğer tüm bu özellikler iyi bilinirse, polimer istenen kimyasal, ara yüzey, mekanik ve biyolojik fonksiyonları yerine getirebilir. Polimer seçimi, onun fizikokimyasal özelliklerine ek olarak güvenilirliğinin kanıtlanabilmesi için gerekli olan klinik öncesi spesifik testler ve kapsamlı biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarına bağlıdır. Tablo 2.2’de polimerlere örnek olarak bir liste verilmiştir. Bu polimerler ilaç taşıyıcı sistem uygulamaları için araştırılmıştır ayrıca, biyoparçalanabilir ve biyoparçalanabilir olmayan şekilde de sınıflandırılmıştır.

Hidrofilisite, kayganlık, pürüzsüzlük ve yüzey enerjisi gibi yüzey özellikleri ve bunlara ek olarak, dayanıklılık, geçirgenlik ve parçalanabilirlik gibi fiziksel özellikler kan ve doku ile olan biyoyumluluğa etki eden özelliklerdir (97) . Yüzey özellikleri ayrıca, polimerin su emme kapasitesini de belirler bu da hidrolitik parçalanma ve şişme için önemlidir. Biyoyumluluklarını arttırmak için, kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak yüzey özellikleri geliştirilebilir. Enzimlerin, ilaçların, proteinlerin ve antikorların polimer yüzeyine bağlanması, nanopartiküllerin organ ve hücrelere hedeflendirilmesine olanak sağlar (96) .

Tablo 2.2. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler (96) .

Sınıflandırma	Polimer
Doğal Polimerler	
Protein bazlı polimerler	Kollajen, albumin, jelatin
Polisakkaritler	Agaroz, aljinat, karragenan, hyalüronik asit, dekstran, kitosan, siklodekstrinler
Sentetik Polimerler	
<i>Biyoparçalanabilir</i>	
Poliesterler	Poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(hidroksi butirat), poli(ϵ -kaprolakton), poli(β -malik asit), poli(dioksanon), poli(laktid-ko-glikolik asit)
Polianhidritler	Poli(sebasik asit), poli(adipik asit), poli(tereftalik asit) ve çeşitli kopolimerler
Poliamidler	Poli(imino karbonatlar), poliamino asit
Fosfor bazlı Polimerler	Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazenler
Diğerleri	Poli(siyano akrilatlar), poliüretanlar, poliorto esterler, polihidropiranlar, poliasetallar
<i>Biyoparçalanabilir Olmayanlar</i>	
Selüloz türevleri	Karboksimetil selüloz, etil selüloz, selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, hidroksipropil metil selüloz
Silikonlar	Polidimetilsiloksan, koloidal silika
Akrilik Polimerler	Polimetakrilatlar, poli(metil metakrilat), poli hidro(etil-metakrilat)
Diğerleri	Polivinil pirolidon, etil vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler

2.6.2. Biyoparçalanabilir Olmayan Polimerler

Bu polimerler hidrofilik ya da hidrofobik yapıda ve biyolojik ortamda parçalanamayan polimerlerdir. Bu nedenle bu polimerlerin en önemli sakıncaları, kronik toksisite göstermeleridir.

Biyolojik olarak parçalanamayan polimerlere; selüloz türevleri (karboksil metil selüloz, selüloz asetat, etil selüloz), silikonlar (polidimetil siloksan) ve akrilik türevleri (poli(hidroksi etil metakrilat), pol.(metoksi etil metakrilat), poli(metakrilik asit)) sayılabilir (96,98) .

2.6.3. Biyoparçalanabilir Polimerler

Biyoparçalanabilir polimerler, ilaçların, makromoleküllerin, hücrelerin ve enzimlerin taşınması için sentezlenirler. Bu polimerlerin kabul edilebilirlikleri, omurga yapıları içerisine, ester, orto-ester, anhidrit, karbonat, amid, üre ve üretan gibi bir çeşit değişken grupların ilave edilmesiyle parçalanabilirliklerinin kontrol edilebilmesinden ileri gelmektedir (99) . Bu alanda, Langer'ın grubunun (100) , polimerlerden makromoleküllerin salımının karakterizasyonu ve ilaç taşınması konularında çeşitli polimerlerle yaptığı araştırmalar, büyük katkılar sağlamıştır. Biyoparçalanma, enzimatik, kimyasal veya mikrobiyal kökenli olabilir ve bunlar ayrı ayrı ve eş zamanlı olarak etki edebileceği gibi, sıklıkla diğer birçok faktörden etkilenirler.

Polimerlerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini etkileyen faktörler aşağıdaki gibi sıralanabilir (96) :

- Kimyasal yapı ve kompozisyon,
- Fiziksel faktörler,
- Fizikokimyasal faktörler (iyon değişimi, iyonik güç, pH),
- Morfoloji (amorf, yarı kristal, kristal, içyapı, kalıcı gerilme),
- Degradasyonun mekanizması (enzimatik, hidroliz, mikrobiyal),

- Moleküler ağırlık dağılımı,
- Üretim koşulları ve sterilizasyon işlemi,
- Sertleştirme ve saklama koşulları,
- Uygulama yolu,
- Etki yeri.

Poliester bazlı polimerler, ilaç taşınmasında en yaygın incelenen polimerlerdir. Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimeri poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) ilaç taşıyıcı sistem uygulamalarında performans ve tasarım ile ilgili iyi tanımlanmış bazı biyomateryallerdir.

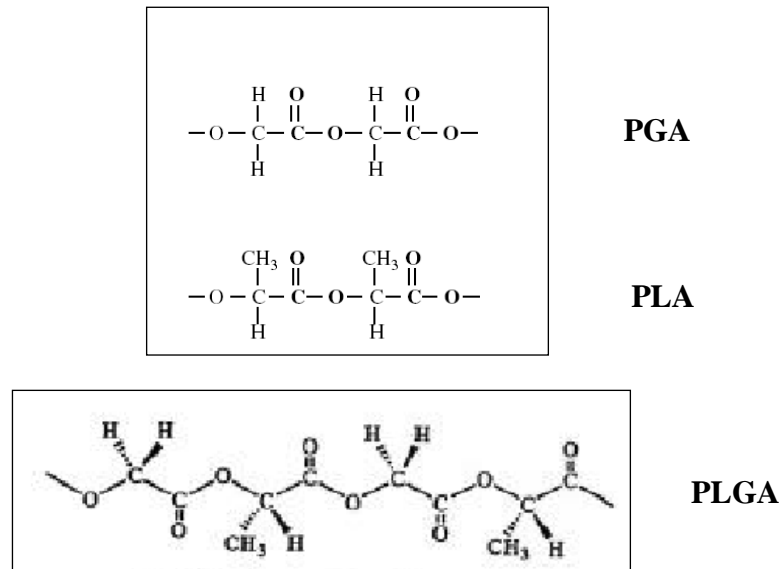
Kitosan, umut verici doğal bir polimerdir, biyoadeziv özelliklerinin yanı sıra absorpsiyonu arttırıcı ve kontrollü salım sağlayan bir polimerdir. Deasetilasyonun ve türevlendirmenin derecesine bağlı olarak çeşitli yan zincirler, spesifik ilaç taşınmasına olanak sağlayabilir.

Tez çalışmasında PLGA, modifiye edilmiş PLGA (PLGA-PEG), kitosan ve modifiye edilmiş kitosan polimerleri kullanıldığından bu polimerler hakkında ayrıntılı olarak bilgi verilecektir.

2.6.3.1. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) en sık kullanılan, biyoparçalanabilir polimerdir (101) . Konvansiyonel PLGA sistemleri ile geniş bir şekilde, molekül ağırlığı, laktid/glikolit oranı ve terminal fonksiyonel grup gibi farklı PLGA özelliklerinin etkileri incelenmiştir. Düşük molekül ağırlığı genellikle hızlı degradasyon (102) ve hızlı ilaç salımı elde edilmesini sağlar (103) . Laktid oranındaki artış ise, polimerin degradasyon hızını azaltır ve yavaş ilaç salımı elde edilir (104-105) . Serbest karboksil grubuna sahip PLGA daha hidrofildir ve karboksil grubu esterleştirilmiş PLGA'ya göre daha hızlı hidrolize uğrar.

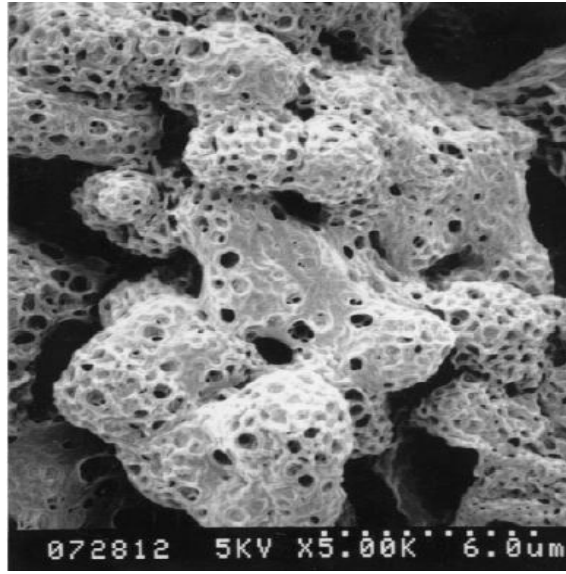
Poliesterler ve özellikle de glikolik ve laktik asit kopolimeri (PLGA) ilgi odağı olan ve yoğun bir şekilde çalışılan polimerlerdir (106-107) . Bu polimerler; halka açılma polimerizasyonu veya direk polikondenzasyon metodları ile sentez edilirler (106) . Polikondenzasyon metodu ile molekül ağırlığı <10 kDa olan düşük molekül ağırlıklı PLGA sentezlenirken, siklik dimerlerin halka açılma polimerizasyonu ile de orta ve yüksek molekül ağırlıklı PLGA sentezlenmektedir. PLGA % 25-75 arasında değişen oranlarda glikolid yapısı taşımaktadır (108) . PLGA yapısal formülü Şekil 2.10'da gösterilmektedir (109) . PLGA kopolimerinin sonuç kristalinitesi, kopolimer zincirinde monomer bileşenlerinin tipine ve molar oranına bağlıdır. D,L PLA'yı içeren kopolimer daha amorf yapıdadır (108) .



Şekil 2.10. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapıları (109)

PLGA polimerlerinin biyolojik olarak parçalanma hızı, polimer zincirindeki laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin molekül ağırlığına, kristalinite derecesine ve polimerin camsı geçiş sıcaklığına bağlıdır (106,108,110) . PLGA 50:50 stabilitesi en az olan ve homopolimerlerden daha hızlı parçalanan kopolimerdir (2 ay) (108) . Şekil 2.11'de pH 7,4, 33 mM fosfat tampon içerisinde boş (blank) mikropartiküllerin 28 gün inkübasyonundan sonra degradasyona uğradıkları görülmektedir (111) . Alifatik poliesterlerin biyolojik olarak parçalanması kütleli (homojen) aşınma ile meydana gelir (109) . Kütleli parçalanmada iki aşama vardır;

birinci aşamada moleküler bağların rastgele kopması sonucunda polimerin molekül ağırlığı, mekanik özellikleri ve morfolojisinde değişimler meydana gelirken, kayda değer bir kütle kaybı meydana gelmez. İkinci aşamada ise zincir kopması yanı sıra önemli bir ağırlık kaybı meydana gelir ve yapıdan koparak çözünen en küçük birim olan oligomerler oluşur. Laktik/glikolik kopolimer zincirleri, hidroliz yolu ile monomerik asitlere parçalanır ve Krebs döngüsü aracılığı ile CO₂ ve su halinde idrarla atılırlar (61) . Sıcaklık, pH değişimleri ve katalizör varlığı polimer zincirlerinin hidroliz olma hızını etkilemektedir (109) .



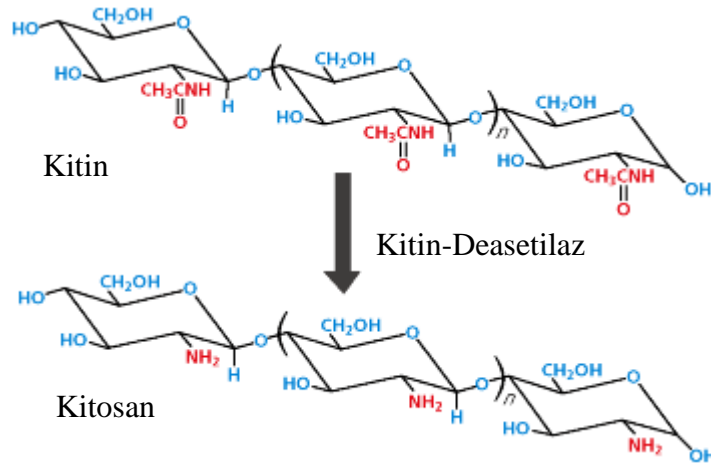
Şekil 2.11. PLGA mikrokürelerinin, pH 7,4, 33 mM fosfat tamponu içerisinde 37°C’de 28 gün inkübasyonundan sonra görüntülenen taramalı elektron fotoğrafı (SEM) (111) .

Bu polimerler; üretim kolaylığı, polimer karakteristiklerindeki çok yönlülük ve insan üzerinde kullanım için FDA tarafından onaylı olmaları gibi pek çok tercih edilen özelliğe sahiptirler (108) . Bu polimerler peptit ve protein yapıdaki ilaçların taşınması, kimyasal ve enzimatik parçalanmaya karşı korunması ve kontrollü salınması için üzerinde yoğun çalışılan materyallerdir (112) .

2.6.3.2. Kitosan

Kitosan yapı olarak selüloza benzer bir polimerdir. Her ikisi de doğrusal β -(1-4)-bağlı monosakkartilerden meydana gelir. Bununla beraber kitosanın selüloza göre

önemli farkı kitosanın glikozid bağlarıyla bağlanan 2-amino-2-deoksi- β -D-glukan yapısı taşımasıdır. Bu yapı polimerin genelinin %50'sinden fazlasını oluşturuyorsa yapı kitosan, yapının % 50'sinden fazlasını N-asetil-glukozamin oluşturuyorsa yapı kitin ismini alır (113) . Polikatyonik bir polimer olan kitosan, deniz kabuklularının dış iskeletlerinden elde edilen kitinin alkali ortamdaki deasetilasyonu ile elde edilir (114) . Kitosanın asetamid grupları kitinin konsantre alkali çözeltisinde bekletilmesiyle amine dönüştürülür ve kitosan elde edilir. Kitin ve kitosan molekül ağırlığı bir kaç milyon Dalton'a kadar çıkabilen uzun zincirli polimerlerden oluşurlar. Kitin ve kitosanın polimerik yapısı Şekil 2.12'de gösterilmektedir.



Şekil 2.12. Kitin ve kitosanın [poli (β 1 \rightarrow 4-D-glukozamin)] yapısı.

Kitosan pH'ya duyarlılık, biyouyumluluk ve toksik olmama gibi biyofarmasötik özelliklere sahiptir (115) . Bunun yanında kitosan vücutta bulunan enzimler, özellikle lizozim, tarafından metabolize edilir ve biyoparçalanabilir (116) .

Kitosan polikatyonik yapıda, pKa'sı 5,5 olan, doğal bir polimerdir. Nötral ya da bazik pH'larda yükünü kaybederek çökme eğilimi gösterir. Ancak, NH_2 gruplarına eklenen alkil grupları ile kitosan alkali ya da nötral pH'larda da çözünürlük kazanmaktadır. Bu durum peptit ve proteinlerin taşınması açısından avantaj sağlamaktadır (117) .

Pozitif yüklü kitosan molekülleri hücre membranına bağlanarak transsellüler epitelyal elektriksel direnci düşürür ve permeabilitenin artmasına neden olur (118-119) . Kitosan çözeltilerinin trans ve para-sellüler permeabiliteyi reversibl, doza bağımlı şekilde ve kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesine bağılı olarak arttırdığı gösterilmiştir (120) . Kitosan hücreler arası sıkı kavşakları açarak hücrelere taşınan elemanların alınmasını sağlayıcı doğal bir yeteneğe sahiptir (121) . Ek olarak kitosan tuzları transmukozal absorbsiyonda permeasyon arttırıcı olarak işlev görebilir ve normalde bariyeri aşamayan peptit yapılı ilaçların bariyeri aşarak hedefine ulaşmasını sağlayabilir. Kitosan nanopartiküllerinin alımı partikül büyüklüğü ve yüzeyindeki yük yoğunluğuna bağlıdır. Yüzey yükü ne kadar yüksekse nanopartiküllerin negatif yüklü hücre membranına afiniteleri o kadar artmaktadır (117,122) .

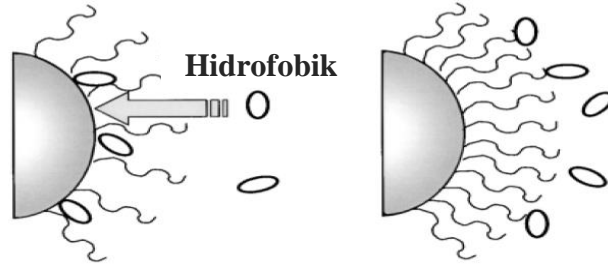
Alonso ve diğ.'nin 1997'de yaptığı çalışmalarda polikasyon kitosan ile polianyon TPF arasındaki etkileşmeden yararlanarak kitosan nanopartiküllerini oluşturmuşlardır (86) . Benzer olarak poli-elektrolit kompleksleşmesi yöntemi ise (PEK) yüklene proteinin doğal veya sentetik polimerlerle kendiliğinden etkileşmesi sonucuna dayanır. PEK, ters yüklü poli-elektrolitlerin beraber karıştırılması ve elektrostatik etkileşmeler göstermesi sonucu oluşmuştur. Her iki proses de kolayca uygulanabilir olup sonikasyon yapılmaması, organik solvan kullanılmaması gibi protein ve peptitleri koruyucu avantajlara sahiptir. PEK oluşumu optik olarak homojen ve stabil nano-emülsiyonların oluşumunu sağlamıştır (123) .

Yapılan çalışmalarda kitosanın nanopartikül formülasyonlarının etkinliği ile çözelti şeklindeki formülasyonlarının etkinliği karşılaştırıldığında nanopartikül tipi formülasyonların protein taşınımını arttırdığı görülmüştür (118) . Caco-2 hücrelerinin kitosan-insülin nanopartikülleri ile inkübasyonu, kitosan-insülin çözeltisi ile karşılaştırıldığında hücrelere daha yüksek bağlanma ve hücreler tarafından daha fazla alım sağlamıştır (124) . İki saatlik inkübasyon sonucunda kitosan çözeltisinin hücre dışında kalmasına rağmen floresan işaretli nanopartiküllerin büyük kısmının hücre içine geçtiği görülmüştür. Kitosan nanopartiküllerinin ayrıca endotelyal elektriksel direnci azalabilmektedir. Kitosan-

insülin nanopartiküllerinin diyabetik sıçanlara uygulanmasını takiben serum glukoz değerleri ölçüldüğünde uzatılmış bir koruma sağladığı bulunmuştur (125) . Kitosan-insülin çözeltisinin uygulanması sonucu herhangi bir etki gözlenmezken 50 U insülin/kg dozdaki nanopartiküllerin uygulanması glukoz düzeyinin % 60 azalmasını sağlamıştır. Floresan işaretli nanopartiküller incelendiğinde uygulamayı takiben 3 saat içinde bile sıçan intestinal epitelinden geçebildiği dolayısıyla etkinliğini sürdürdüğü görülmüştür (126-127) .

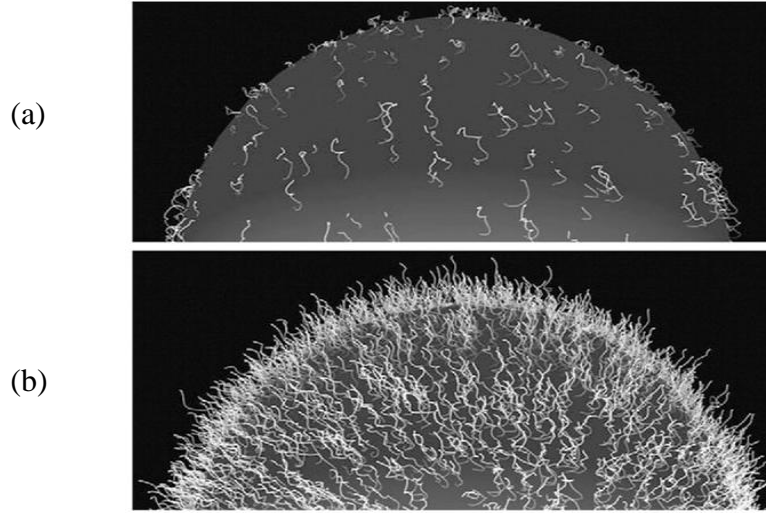
2.7. PEGilasyon

Sentetik polimerlerin çoğu hidrofobiktir, bu polimerlerden hazırlanan nanopartiküller de, modifikasyondan önce tabiatları gereği hidrofobiktir. Vücut hidrofobik partikülleri yabancı olarak nitelendirir. Hidrofobik yüzeye sahip partiküller kan komponentleri tarafından kaplanırlar, bu komponentler başlıca proteinlerdir (opsoninler). Daha sonra özellikle karaciğerde yer alan mononükleer fagositik sistem tarafından hızla alınırlar. Partiküllerin yüzeyine opsoninlerin adsorbsiyonu opsonizasyon olarak adlandırılır ve bu fagositler tarafından tanınmayı sağlayan işaretleyici rolü oynar. Yüzey modifikasyonun hedefleri, mononükleer fagositik sistem tarafından partiküllerin tanınmasını engellemek ve onların istenilen yere gidebilmesini sağlamaktır. Uzun süre kan dolaşımında kalma yeteneğine sahip nanopartiküller, yüzeyin hidrofilik polimer ve/veya sürfaktan ile kaplanması ile elde edilebilir (128) . Nanopartiküllerin PEG segmentleri ile kaplanmasının opsonizasyonu ve mononükleer fagositik sistem tarafından alımı engellediği bilinmektedir (129-130) . Gref ve diğ., opsonizasyonun derecesinin nanopartiküllerin yüzeyindeki PEG'in zincir uzunluğu ve yüzey dansitesi ile ayarlanabileceğini göstermişlerdir (Şekil 2.13). Ayrıca yüzeydeki PEG dansitesi protein adsorbsiyonundan korunmada PEG'in moleküler ağırlığından daha önemli rol oynamaktadır (131) .



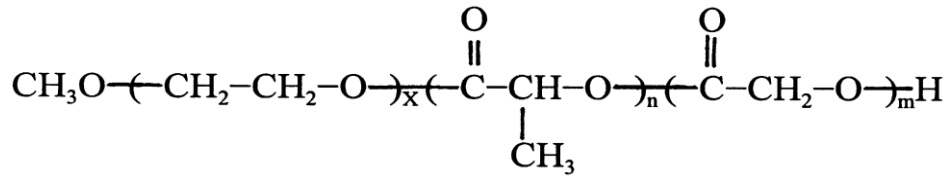
Şekil 2.13. Opsonizasyon üzerine hidrofobik segmentlerin yüzey dansitesine etkilerinin gösterildiği şematik diyagram (132) .

Kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin insanlara uygulanmasında, biyoparçalanabilirlik önemli bir gerekliliktir. Bu nedenle, ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeyine kovalan olarak bağlanmış PEG zincirlerini içeren, PEG ile modifiye edilmiş biyoparçalanabilir ilaç taşıyıcı sistemler üretilmiştir (133-135) . Çekirdek kısmı, poli(laktit-ko-glikolik asit) (PLGA) veya poli(laktik asit) (PLA)'dan oluşmuş biyoparçalanabilir nanopartiküllerin biyodağılımı, PEG “fırça” (brush)’nın etkinliği sonucunda değiştirilebilir (75,136-138) (Şekil 2.14).



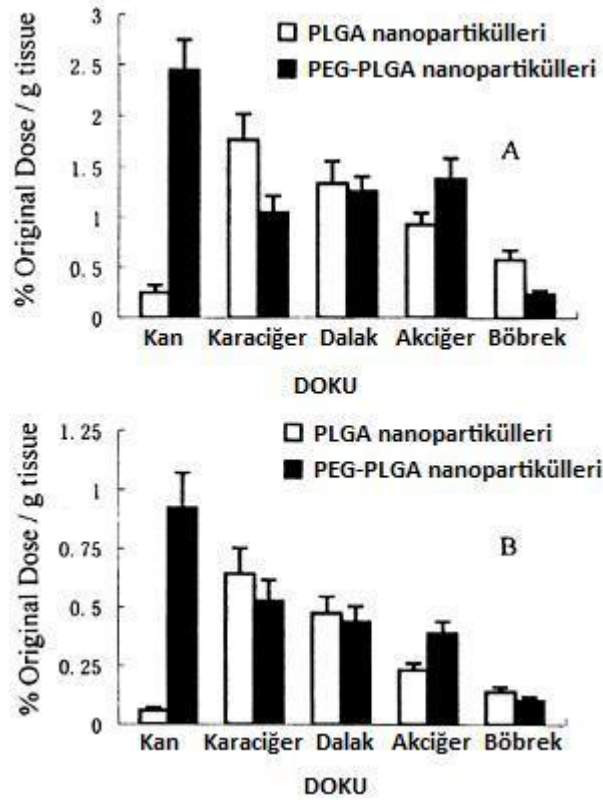
Şekil 2.14. Polimerik bir nanopartikülün, üst yarım küresindeki PEG konfigürasyonunun şematik gösterimi. (a) PEG zincirlerinin çoğu partikül yüzeyine yakın bir konumda lokalize olmuştur. Yüzeyde az miktarda bulunan PEG zincirleri “mushroom” konfigürasyonunu oluşturmuştur. (b) PEG zincirlerinin hareketi kısıtlanmıştır ve yüzeyde fazla miktarda PEG zincirinin bulunduğu “brush” konfigürasyonu oluşmuştur. Zincirler nanopartikül yüzeyine uzak bir konumda lokalize olmuştur (139) .

Farelerde yapılan in vivo çalışmaları, PEG-PLGA diblok kopolimeri içindeki, PEG'in molekül ağırlığı 5000 - 20000 g/mol'e kadar arttıkça, kanda kalış süresinde ciddi bir artış gözlenmiştir (75) . PLGA nanopartikülleri ile kıyaslandığında, PEG ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin protein adsorbsiyonlarında önemli bir azalma vardır. Özellikle, alipoprotein J ve C-III'ün miktarı, PLGA-PEG partikülleri üzerinde büyük bir azalma göstermiş ve hem PEG'in hem de PLGA'nın molekül ağırlığına bağlı olarak farklılık göstermiştir. Fibrinojen ve immünoglobulin G'nin adsorbsiyonu da nanopartiküllerin yüzeyindeki PEG zincirlerinde azalma göstermiştir. (131) . PLGA-PEG kopolimerinin kimyasal yapısı Şekil 2.15'te görülmektedir (140) .



Şekil 2.15. PLGA-PEG kopolimerinin yapısı

Li ve diğ.'nin yaptığı bir çalışmada intravenöz uygulamadan sonra PLGA-PEG nanopartikülleri ile PLGA nanopartiküllerinin karşılaştırmalı biyodağılımlarını araştırılmıştır (Şekil 2.16) (140) . PLGA nanopartikülleri 3 saat içinde, organlara (karaciğer, dalak, akciğer ve böbrek) dağılırken ve kan konsantrasyonu oldukça düşükken, PLGA-PEG nanopartiküllerinin çoğu kan dolaşımında kalmıştır. 12 saat içinde, PLGA nanopartikülleri kan dolaşımında şiddetle azalırken, PLGA-PEG nanopartikülleri kandan normal dokulara dağılmıştır. Bu sonuç, hidrofilik kaplamanın nanopartikülleri opsonizasyondan etkin bir şekilde koruduğunu ve nanopartiküllerin vücutta daha uzun süre dolaşmalarını sağladığını göstermektedir. Kaplama yöntemleri oldukça basittir ve kan dolaşımında kalış süresinin arttırılmasında çok etkindirler fakat vücutta dağılım oranlarının kontrolü bu uygulamaların sınırlı olması nedeniyle zordur (132) .

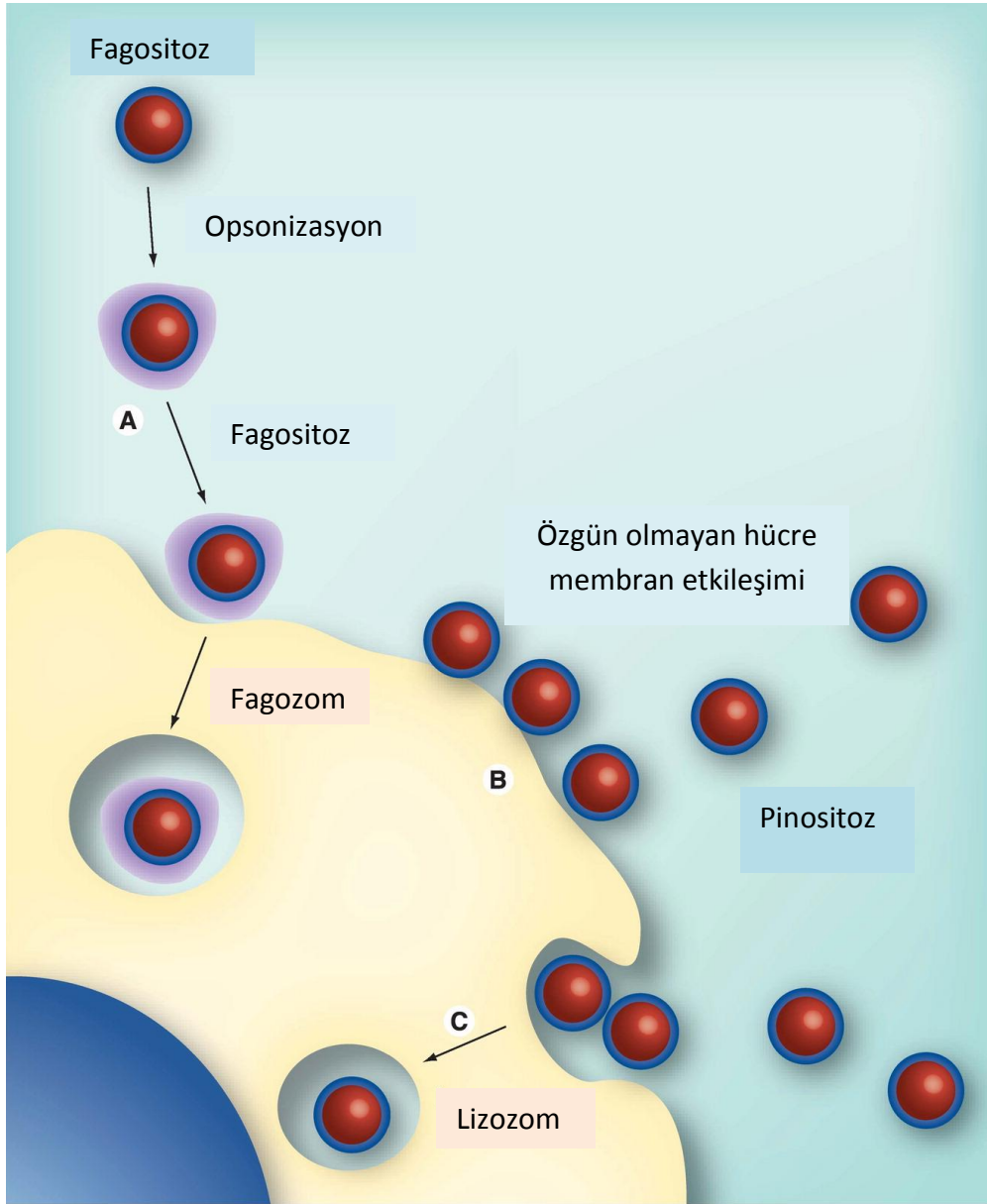


Şekil 2.16. PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine yüklü [125 I]BSA'nın 3. saatte (A) ve 12. saatteki (B) biyodağılımları, salımı ve hedeflendirilmesinde sınırlayıcı parametre opsonizasyon olup, aşağıda bu konunun önemi göz önüne alınarak ayrıntılı bir şekilde verilmiştir (140) .

2.8. Opsonizasyon ve Fagositoz

Retiküloendotelial sistem (RES) olarak da bilinen mononükleer fagositik sistem tarafından yabancı organizmaların veya partiküllerin ortadan kaldırılmasına, temizlenmesine “opsonizasyon” denir. Mononükleer fagositik sistemin makrofajları, korunmasız nanopartikülleri intravenöz uygulamadan sonra, saniyeler içinde kan dolaşımından uzaklaştırma yeteneğine sahiptir (Şekil 2.17) (75) . Opsonizasyonda, öncelikle, yabancı organizmalar veya partiküller opsonin proteinleri ile kaplanarak onları fagositik hücreler için görünür hale getirir. Opsonizasyondan sonra, fagositoz meydana gelir, bu yabancı materyallerin kan dolaşımından uzaklaştırılması veya yutma ve sonrasında yok etme işlemidir. Bu iki proses, renal eşik değerinden büyük istenmeyen maddelerin kandan uzaklaştırılması için ana klerens mekanizmalarını

oluşturmaktadır. Normalde fagositler tarafından yok edilemeyen polimerik nanopartiküllerin, mononükleer fagositik sistemin organları içinde ayrılmaları meydana gelmektedir. Eğer polimerik nanopartikül parçalanabilir değilse, partiküllerin organ içersinde akümülayonu söz konusudur, birikmenin olduğu en yaygın organlar, karaciğer ve dalaktır. Bu durum toksisiteye ve diğer yan etkilere neden olabilir (129,141-142) . Oponizasyon genellikle kan dolaşımında meydana gelir. Oponizasyonun asıl mekanizması çok karmaşık olup tam olarak anlaşılamaaktadır, fakat bu mekanizmanın önemli komponentleri iyi bilinmektedir. Laminin, fibrinonektin, C-reaktif protein, tip I kollajen gibi serum proteinlerinin yanı sıra, immünoglobülinler ve C3, C4 ve C5 gibi kompleman sistemin elemanları bilinen en yaygın oponin proteinleridir (143) . Kalıtsal ve indüklenmiş C3 eksikliği olan hayvan modellerinde yapılan in vivo çalışmalarda, oponin proteinlerinin temizleme sürecindeki önemi dolaylı olarak gösterilmiştir. Örneğin, C3 eksikliği olmayan hayvan modellerinde fagositoz ile kolaylıkla kontrol edilebilecek bazı hastalıklara karşı az önce bahsedilen hayvan modellerinin çok daha duyarlı olduğu yapılan araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (144) . Oponinler kanda her yerde bulunmaktadır ve injekte edilen polimerik nanopartiküllerle raslantısal brownian hareketi sonucuda temas ettikleri düşünülmektedir. Oponinler yüzeye yeteri kadar yaklaştıklarında, Van der Walls, elektrostatik, iyonik, hidrofobik/hidrofilik ve diğer bazı çekici kuvvetlerin nanopartikülün yüzeyine oponinlerin bağlanmasında etkili oldukları düşünülmektedir.



Şekil 2.17. Plazma proteinleri ve kandaki immün hücrelerle nanopartiküllerin etkileşimi. (A) Partikül yüzeyine özgün olmayan protein adsorpsiyonu (opsonizasyon) ve lökositler tarafından gerçekleşen fagositoz (B) özgün olmayan nanopartikül-hücre membranı etkileşmesi (elektrostatik veya hidrofobik) (C) sıvı fazda gerçekleşen pinositoz, etkileşimlerin ana şekillerini oluşturmaktadır (145) .

Opsinizasyon meydan geldikten sonra, fagositlerin nanopartikül yüzeyine, nanopartiküle bağı opsoninler aracılığı ile tutunma sürecini içeren temizlenme basamağı gelmektedir. Yüzeye bağı ya da adsorbe olmuş opsonin proteinlerinin yokluğunda, fagositler, yabancı partikülleri tanıyamazlar. Bağılanma yollarından biri şu şekilde gerçekleşir, bağı bulunan opsonin proteini, kan serumunda bulunan inaktif protein yapısından konformasyonel bir değışikliğe uğrayarak, aktif protein yapısına dönüşünce fagositler tarafından tanınır. Fagosit hücrelerinin yüzeyi, spesifiye edilmiş reseptörleri içerir, bunlar çeşitli opsoninlerin modifiye edilmiş konformasyonları ile etkileşime girebilirler ve fagositleri yabancı maddelerin varlığında uyarırlar. Fagosit bağılanmasının diğere bir yolu ise, fagositlerin, yüzeye adsorbe olmuş serum proteinlerine spesifik olmayan tutunmasını kapsar, bu yol da fagositozu aynı derecede harekete geçirir (143) . Bu süreç, opsonin proteinlerinin daha hidrofobik partikül yüzeyine assosiyasyonu sayesinde yürümektedir. Fagosit bağılanmasının üçüncü önemli yolu ise, kompleman aktivasyonudur. Kompleman sistemi, klasik, alternatif ve lektin yolağı olmak üzere çeşitli mekanizmalarla aktive olur. Kompleman aktivasyonu sonucunda her durumda mononükleer fagositler tarafından, yabancı partiküllerin bağılanması ve fagositozu gerçekleşmektedir.

Temizleme sürecinde, üçüncü ve son basamak yabancı maddelerin fagositler tarafından alınmasıdır. Bu aşama, bir fagosit tarafından partikülün veya yabancı maddelerin endositozunu içermektedir. Partiküllerin endositozunu takiben, fagositler, enzim ve süperoksitler, oksihalid moleküller, nitrik oksit ve hidrojen peroksit gibi oksidatif reaktif kimyasal faktörleri salarak fagosite olan maddenin yok edilmesini sağlarlar. Ancak, birçok parçalanamayan polimerik nanopartiküller, boyutlarına, molekül ağırlıklarına bağı olarak bu aşamada degrade edilemezler. Bunlar ya renal sistem tarafından uzaklaştırılır ya da mononükleer fagositik sistemin bir organı içinde depolanırlar. Renal sistem tarafından uzaklaştırılma molekül ağırlığı 5000 dolaylarında veya daha az olan moleküler, fakat dendrimerler gibi daha yoğun polimerler için 100000'e kadar yüksek molekül ağırlığında moleküller için gerçekleştirilebilir. Bu nedenle, renal eşik değere üzerindeki biyoparçalanabilir

olmayan partiküller ve parçalanma ürünleri genellikle, mononükleer fagositik sistemin organları içerisinde ayrılmış hale getirilirler.

Partiküllerin ilk opsonizasyonu, fagositik tanınma aşaması ve kan dolaşımından temizlenme için kritik olduğundan, gizlenmiş (stealth) ilaç taşıyıcı sistemler alanında birçok araştırma yapılmaktadır. Araştırmacılar, opsonizasyon basamağını bloke etme ya da durdurma yönünde denemeler üzerinde yoğunlaşmıştır. Partiküllerin opsonizasyonunu efektif bir şekilde tamamen bloke edecek metot ya da kurallar bulunmamaktadır, fakat son 30 yıldaki araştırmalar, yeni eğilim ve metotlar keşfetmiştir. Bunlar opsonizasyon aşamasının yavaşlatılması konusunda etkilidirler, böylece ilaç taşıyıcı sistemlerin kan dolaşımındaki yarı ömürleri ve etkinlikleri arttırılmış olur. Hidrofobik partiküllerin opsonizasyonu ile hidrofilik partiküllerin opsonizasyonu karşılaştırıldığında, hidrofobikler yüzeylerine serum proteinlerini daha fazla adsorbladıkları için, opsonizasyonları daha hızlı gerçekleşir (146-148) .

2.9. Oksidatif Stres

Oksidatif stresin, felçte oluşan nöronal hasarda en önemli mekanizmayı oluşturduğu bilinmektedir. Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile organizmanın bunlara karşı korunma yeteneği arasındaki dengesizlik durumudur ve giderek artan oksidatif hasara neden olur. Serbest radikaller hasarın derecesini azaltır ya da arttırırlar. Oksidatif stresin, felcin başlamasına ve ilerlemesine birbiriyle ilişkili farklı mekanizmalar aracılığı ile katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

Bu mekanizmalar,

- Hücresel enzim aktivasyonu ve reaktif oksijen türleri üretimi sonucunda oluşan eksitotoksisite
- Lökositlerin aktivasyonuna ve ateşlenmesine neden olan inflamasyon ve beraberinde aşırı miktarda radikal üretimi
- Nitrik oksidin (NO) azalan biyoyararlanımı sonucunda endotelin aktivasyonu ve oksidatif hasarı
- Serbest radikal aracılı hiperhomosistein

- Makrofajlar ve atardamar duvarında bulunan hücresel komponentlerin ve plazmanın lipit peroksidasyonu

Bu süreçlerin herbiri olumlu geri bildirim yolu mekanizmasıyla oksidatif hasarı kötüleştirebilir.

Serebral iskemi sırasında beyinde artmış serbest radikal üretimine ilişkin deney modellerinden elde edilen birçok kanıt vardır. Direk yapılan klinik çalışmalar, felç ve oksidatif stres arasındaki ilişkiyi doğrulamaktadır, fakat beyin dokusunda serbest radikallerin ölçümünden doğan morfolojik zorluklar nedeniyle hala eksikler bulunmaktadır. Serbest oksijen türleri kısa ömürlü bileşenlerdir. Kan dolaşımında lipit peroksidasyon ürünlerinin artması ve hücresel antioksidan koruyucu sistemlerin zayıflaması, felçte oksidatif stresin arttığının indirekt bir kanıtı olarak kabul edilmektedir. Bilim adamlarının araştırma konuları çerçevesinde oksidatif stres için yeni ve güvenilir işaretleyiciler hala aranmaktadır (149) . Felçten sonra kronik faz sırasında oksidatif stres indikatörlerinin izlenme çalışmaları da sınırlıdır. Risk faktörleri, kan damarları duvarında kronik değişiklere ek olarak serbest radikal ve inflamatuvar mekanizmalarının aktivasyonuna da neden olur. Felç hastalarının yaklaşık olarak beşte biri şeker hastasıdır, büyük çoğunluğu yüksek tansiyon hastasıdır ve bir kısmı da enfeksiyon ya da inflamasyon geçirmiştir veya geçirmektedir. Dahası, serbest radikal oluşum süreçlerinde birden fazla risk faktörünün varlığı yani kombine faktörler dikkate alınmalıdır, bunlar katkı ya da sinerjistik etki oluşturabilirler. Vasküler risk faktörleri işbirliği içinde bir sonraki felç için riski arttırır. Hayatta kalan felç hastalarında gözlemlenen patofizyolojik değişiklikler temelinde, hastaların iyileşmesini engelleyen süreçlerin gelişmesi ve hastaların vasküler komplikasyonlarının kötüleşmesinin oksidatif strese katkı sağladığı yönünde bir hipotez kurulmuştur (150) .

2.9.1. Serbest Radikaller

2.9.1.1. Serbest Radikallerin Doğası

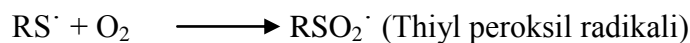
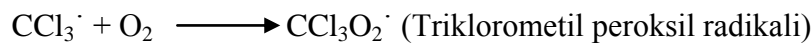
Atomlar ve moleküller içerisindeki elektronlar, orbital olarak bilinen boş alanları işgal ederler. Her bir orbital maksimum iki elektron alabilir. Örneğin,

kovalan bağ oluşturmuş iki elektron aynı (moleküler) orbitalde bulunur fakat, zıt spinlere (dönüşleri zıttır) sahiptirler. Eğer bir orbital tek elektron içeriyorsa, bu elektrona “eşleşmemiş” adı verilir. Serbest radikal, bağımsız olarak (bu nedenle terimi “serbest”) var olabilen herhangi bir tür olarak tanımlanır ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içerir. Bu geniş tanım, Tablo 2.3’te de özetlendiği gibi geniş bir aralıktaki türleri kapsamaktadır (151) .

Tablo 2.3. Bazı serbest radikal türleri.

Radikalın Tipi	Örnek
Hidrojen merkezli	Hidrojen atomu, H [·]
Karbon merkezli	Triklorometil, CCl ₃ [·]
Kükürt merkezli	Glutasyon Thiyl, GS [·]
Oksijen merkezli	Süperoksit, O ₂ ^{·-}
	Hidroksil, OH [·]
	Lipid peroksil, lipid-O ₂ [·]
Delocalize olmuş elektron taşıyan	Fenoksil, C ₆ H ₅ O [·] (elektron benzen halkası içine delocalize olmuştur.)
	Nitrik oksit, NO [·] (genellikle NO şeklinde yazılır)

Üst simge olarak gösterilen nokta (·) bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektron anlamına gelmektedir. Karbon ve kükürt merkezli radikaller, oksijenle genellikle hızlı bir şekilde reaksiyona girerler.

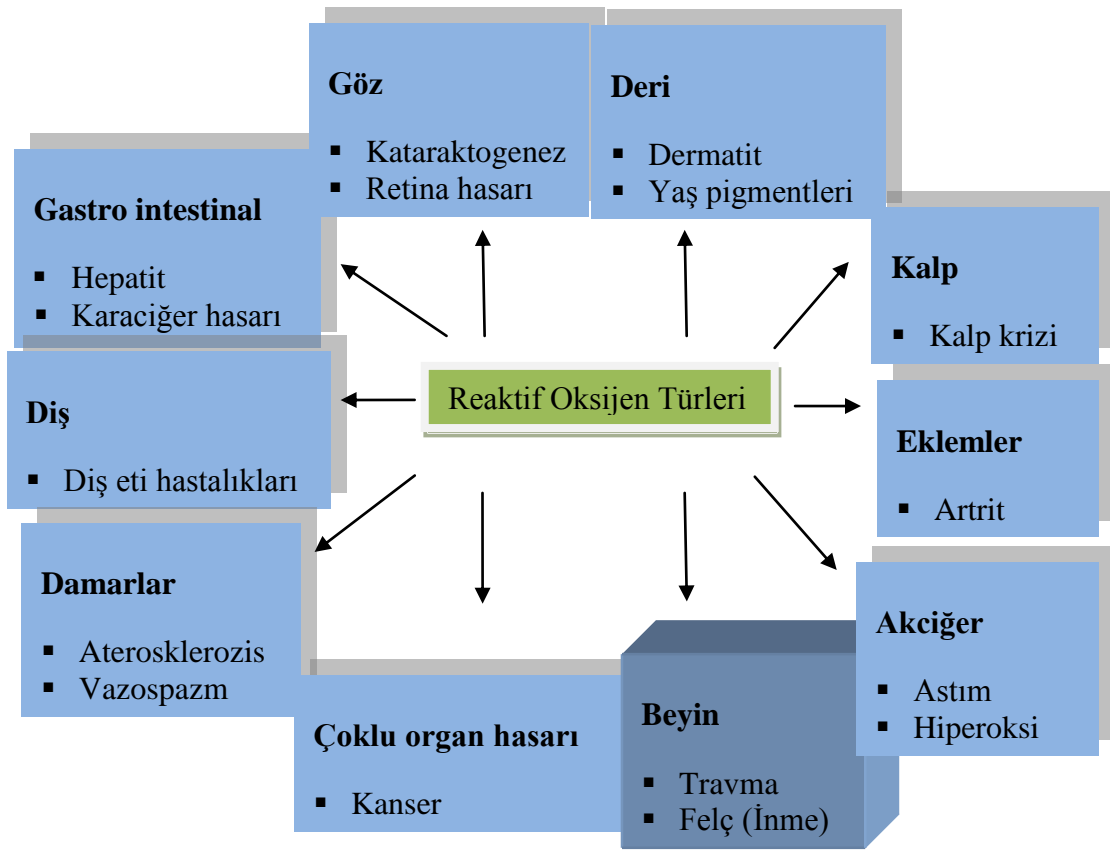


Nitrik oksit serbest radikalının, türetilmiş endotelyum genişletici faktör (endothelium-derived relaxing factor) ile özdeş veya yakından benzer olduğu düşünülmektedir (152) . Diatomik oksijen molekülü (O₂), bir radikal olarak

nitelendirilir, çünkü iki tane eşleşmemiş elektrona sahiptir ve bunlar farklı orbitallerde lokalize olmuştur fakat ikisi de aynı dönüş kuantum sayısına sahiptir. Bu paralel spinler, güçlü oksitleyici yapısına rağmen, O_2 'nin zayıf reaktivitesinin bir nedenidir. Aynı orbitaldeki bir çift elektron (örneğin, kovalan bağlı) kriterler dahilinde değildir, çünkü bu iki elektron zıt spinlere sahiptir. Bu spin kısıtlaması, O_2 'nin radikal olmayan (biyolojik moleküllerin çoğu) maddelerle reaksiyonunu azaltan en önemli faktördür. O_2 , onun elektronlarını kabul eden radikallerle reaksiyona girmeyi tercih eder.

2.9.1.1.1. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri, oksijen merkezli radikaller ve oksijen merkezli radikal olmayan türler olarak iki sınıfta toplanabilirler. Oksijen merkezli radikaller süperoksit anyon ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), aklöksil radikali (RO^{\cdot}) ve peroksil radikali (ROO^{\cdot})'dir. Oksijen merkezli radikal olmayanlar ise, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve singlet oksijendir (1O_2). Diğer reaktif türler ise, nitrik oksit (NO^{\cdot}), nitrik dioksit (NO_2^{\cdot}) ve peroksinitrit ($OONO^{\cdot}$) gibi azot türleridir (153-154) . Serbest radikaller genel olarak, stabil değildir, yüksek oranda reaktiftir ve harekete geçirilmiş moleküllerdir. Serbest radikallerin reaktif oksijen türleri biyolojik sistemlerde, prooksidatif enzim sistemleri, lipit oksidasyon, irradyasyon, inflamasyon, sigara içme ve hava kirleticileri aracılığı ile oluşturulabilirler (155-156) . Klinik çalışmalar, serbest radikalleri, aterosklerosis, vazospazm, kanser, travma, inme, astım, hiperoksi, artrit, kalp krizi, yaş pigmentleri, dermatit, kataraktogenez, retinal hasar, hepatit, karaciğer hasarı ve diş eti hastalıkları gibi birçok yaşla ilgili dejeneratif hastalık ile ilişkilendirmektedir (Şekil 2.18) (157-158) .



Şekil 2.18. Reaktif oksijen türlerini içeren klinik durumlar.

Reaktif oksijen türlerinin aynı zamanda hücrelerin apoptozisini de indüklediği bilinmektedir. Serbest radikallerin aynı zamanda yararlı etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Örnek olarak, nükleer transkripsiyon faktörlerin aktivasyonu, gen ekspresyonu ve mikrobiyal enfeksiyonlarla, hedef tümör hücrelerine karşı koruyucu mekanizmalar verilebilir (154) .

- **Süperoksit Anyon ($O_2^{\cdot-}$)**

Süperoksit anyon, moleküler oksijenin bir elektron almasıyla oluşmuş indirgenmiş şeklidir. Süperoksit anyon, mitokondriyal elektron transport sisteminde oluşan ilk serbest radikaldir. Mitokondri dört elektronlu zincir reaksiyonlarını kullanır, oksijeni suya indirger ve enerji üretir. Mitokondride, zincir reaksiyonlarından kaçan bazı elektronlar, direk olarak oksijenle reaksiyona girer ve süperoksit anyonu oluşturur (159) . Süperoksit anyon, hidrojen peroksit, hidroksil

radikali veya singlet oksijen ($2 \cdot O_2 - + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$) gibi yaşayan sistemlerdeki diğer reaktif oksijen türlerinin oluşumunda önemli bir role sahiptir. Süperoksit anyon, nitrik oksit ile reaksiyona girebilir ve peroksinitriti oluşturabilir, bu da hidroksil radikali ve nitrik dioksit gibi toksik bileşikler oluşturabilir ($ONOO^- + H^+ \rightarrow \cdot OH + \cdot NO_2$). Daha önce serbest radikallerin yararlı fonksiyonlarından bahsedilmişti, süperoksit anyonu da, bir hücre büyüme düzenleyicisi olarak işlev görebilmektedir (155) .

- **Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)**

Hidroksil radikali en reaktif serbest radikaldır. Bakır ve demir gibi metal iyonlarının varlığında, süperoksit anyon ve hidrojen peroksitten oluşmaktadır ($\cdot O_2 - + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$). Hidroksil radikalleri en yüksek 1-elektron redüksiyon potansiyeline sahiptirler (2310 mV) ve yaşayan organizmalardaki herşeyle reaksiyona girebilirler. Genel olarak, aromatik bileşikler veya karbon-karbon çifte bağlı bileşikler hidroksil radikalleri ile katılma reaksiyonuna uğrarlar ve sonuçta, hidroksillenmiş serbest radikaller oluşur (160) . Oluşan serbest radikaller, oksijenle reaksiyona girer ve diğer serbest radikalleri oluşturur. Hidroksil radikalleri, lipitlerle, polipeptitlerle, proteinlerle ve DNA ile özellikle tiamin ve guanozin ile reaksiyona girer (161) . Hidroksil radikalleri çifte bağlara da kolaylıkla katılabilirler (162) .

- **Hidrojen Peroksit (H_2O_2)**

Hidrojen peroksit, dismutasyon reaksiyonu aracılığı ile süperoksit dismutaz tarafından süperoksit anyonundan oluşabilir. Amino asit oksidaz ve ksantin oksidaz gibi enzimler de, süperoksit anyonundan hidrojen peroksit oluşturabilir. Hidrojen peroksit, yüksek derecede difüze olabilir, plazma membranlarından kolaylıkla geçebilir. Hidrojen peroksit, reaktif oksijen türleri arasındaki en az reaktif moleküldür, fizyolojik pH'da ve sıcaklıkta metal iyonlarının yokluğunda stabildir. Oksidasyon ve redüksiyon kapasitesi oldukça zayıftır. Metal iyonlarının ve süperoksit anyonunun varlığında, hidroksil radikali oluşturabilir ($\cdot O_2 - + H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + OH^- + O_2$) (155) . Yaşayan sistemlerde, kloraminler veya HOCl ile veya süperoksit anyonu ile reaksiyona girerek singlet oksijen üretebilir. Hidrojen peroksit,

hemoglobin gibi bazı hem-proteinlerinden demir iyonunun salımı sonucunda, degradasyona neden olur (159) .

- **Peroksil ve Alkoksil Radikalleri**

Peroksil radikalleri (ROO \cdot), oksijenin alkil radikalleri (R \cdot) ile reaksiyonu sonucu oluşur. Örnek olarak, lipit radikalleri ile oksijen verilebilir. Alkil peroksitlerin (ROOH) dekompozisyonu da peroksil ve alkil radikalleri oluşumu ile sonuçlanır. UV ışığın irradyasyonu veya geçiş metal iyonlarının varlığı, peroksitlerin homolizisine neden olur sonuçta, peroksil ve alkoksil radikalleri oluşur (ROOH \rightarrow ROO \cdot + H \cdot , ROOH + Fe³⁺ \rightarrow ROO \cdot + Fe²⁺ + H⁺). Peroksil ve alkoksil radikalleri iyi birer oksidasyon ajanıdır ve 1000 mV standart redüksiyon potansiyelinden daha fazla bir potansiyele sahiptirler (159) . Düşük redüksiyon potansiyeli ile diğer moleküllerden hidrojen koparabilirler. Bu reaksiyon, lipit peroksidasyonun yayılma aşamasında sıklıkla gözlemlenir. Bu reaksiyonla oluşan alkil radikalleri oksijenle reaksiyona girer ve başka bir peroksil radikalini oluşturur. Bazı peroksil radikalleri süperoksit anyonunun salınmasını durdurabilir veya kendi aralarında reaksiyona girerek singlet oksijeni oluşturabilirler (163) .

- **Peroksinitrit**

Süperoksit anyon ve NO'nun reaksiyonu sonucunda peroksinitrit oluşur (O₂ – + NO \cdot \rightarrow OONO \cdot). Peroksinitrit, sitotoksiktir, doku hasarına ve düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonuna neden olur (155) . Peroksinitrit, inflamasyon bölgesinde oluşturulur ve doku hasarı oluşumunda önemli bir yere sahiptir ayrıca, çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ve bazı böbrek rahatsızlıklarında da rol oynamaktadır. Peroksinitrit, protein ve DNA temelli oksidasyona neden olur. Peroksinitritin biyolojik oksidan olarak önemi, onun hücre membranlarından kolaylıkla difüze olabilmesinden ileri gelmektedir (159) .

2.9.1.1.2. Reaktif Azot Türleri

- **Nitrik Oksit (NO)**

Nitrik oksit küçük bir moleküldür, bir tane eşleşmemiş elektron içerir, bu yüzden bir radikaldir. NO biyolojik dokularda, spesifik nitrik oksit sentetazlar

(NOSs) tarafından üretilir (164) . NO çok reaktif bir radikaldir, nörotransmisyon, kan basıncının düzenlenmesi, korunma mekanizmaları, düz kasların gevşemesi ve immün regülasyon gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli oksidatif biyolojik sinyal molekülü olarak rol oynar (165) . NO, sıra dışı özelliklerinden dolayı 1992 yılında *Science Magazine*'de yılın molekülü olarak ilan edilmiştir (166) . NO'in sulu ortamdaki yarı ömrü birkaç saniyedir. Oksijen konsantrasyonunun düşük olduğu ortamdaki stabilitesi daha iyidir (yarı ömrü > 15 saniye). Fakat, hem sulu hem de yağlı ortamdaki çözünürlüğü nedeniyle, sitoplazma ve plazma membranlarından kolaylıkla difüze olabilir (167) . NO, santral sinir sisteminde nöronal transmisyonun yanı sıra sinaptik esneklik üzerinde de etkilere sahiptir. NO, hücre dışında su ve oksijenle, nitrat ve nitrit anyonlarını oluşturmak üzere reaksiyona girer (168) . Reaktif azot türlerinin aşırı üretimi nitrozatif stres olarak adlandırılır (169) . Bir sistemde reaktif azot türlerinin oluşumu, onların nötralize edilmesini ve elimine edilmesini aşırıya çıkarırsa, nitrozatif stres meydana gelir. Nitrozatif stres, nitrolizasyon reaksiyonlarına neden olur, bu reaksiyonlar da, proteinlerin yapısını değiştirir ve fonksiyonlarını inhibe eder.

İmmün sistemin hücreleri, inflamatuvar süreçlerde, hem süperoksit anyon hem de nitrik oksit oluşturur. Bu koşullar altında, nitrik oksit ve süperoksit anyon, reaksiyona girer ve oksidatif açıdan çok daha aktif bir molekül olan peroksinitrit anyonunu (ONOO⁻) oluşturur ($NO\bullet + O_2\bullet^{-} \rightarrow ONOO^{-}$). Bu reaksiyon bilinen en yüksek reaksiyon hız sabitine sahiptir, bu nedenle NO'nun toksisitesi büyük ölçüde süperoksit anyon ile birleşme yeteneğine bağlıdır. Peroksinitrit anyonu potansiyel bir oksidasyon ajanıdır, DNA'nın parçalanmasına ve lipit peroksidasyonuna neden olur (170) .

2.9.1.2. Reaktif Oksijen Radikallerinin İskemi Üzerindeki Etkileri

Beyin disfonksiyonları ve birçok nörolojik hastalığın patofizyolojisinde reaktif oksijen radikallerinin rolü büyüktür. Geçen 20 yıl süresince toplanan kanıtlar, reaktif oksijen radikallerinin reperfüzyon ve serebral iskemi gibi beyin hasarlarına neden olduğunu göstermiştir. Fokal ve global beyin iskemisinde, tıkalı damarlarla oksijen sağlanan beyin bölgelerinde serebral kan akımı azalır. Trombolitik veya

kendiliğinden oluşan reperfüzyonla oluşan yeniden oksijenlenme, sitozolik kompartmanlarda veya hücre içi organellerde ve mitokondride birçok enzimatik oksidasyon reaksiyonu için oksijen sağlar. İzole edilmiş beyin mitokondrisinde elektron akımının % 2-5'inin süperoksit anyon radikalleri ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ürettiği gösterilmiştir. Daimi olarak üretilen reaktif oksijen türleri, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve katalazlar tarafından temizlenir. Glutatyon (GSH), askorbik asit ve α -tokoferol gibi diğer küçük moleküler antioksidanlar da serbest radikallerin detoksifikasyonunda yer alırlar. Reperfüzyon sırasında, sitozolik prooksidan enzimler ve mitokondri tarafından oksijen radikallerinin aşırı üretimi, detoksifikasyon sistemlerinin inaktivasyonu, antioksidanların tüketimi ve antioksidanların yeterli düzeyde yenilenememesinin sonucu olarak iskemik beyin dokusunda endojen antioksidan koruyucu sistemler rahatsız edilmiş bir hal alır. İskemik dokudaki lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi hücrel makromoleküllerin oksidatif hasarında ve hücre ölümüne gitmesinde reaktif oksijen türlerinin direk olarak rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Serebral iskemi ve reperfüzyonda reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulan indirekt sinyal yollarının hücrel hasara ve ölüme yol açtığı son çalışmalarda kanıtlanmıştır. İskemik dokuda ve oksidatif stres altındaki nöronlarda hidroksil radikali ve nitrik oksit radikali gibi çeşitli oksijen radikallerinin araştırmacılar tarafından miktar tayinine imkan veren birçok metot bulunmasına rağmen, iskemik beyin hasarında serbest oksijen radikallerinin etken rolünün nörobilimciler tarafından anlaşılması zor görülüyor (171) .

2.9.2. Lipit Peroksidasyon

Lipit peroksidasyon, hem bitkilerde hem de hayvanlarda, çok iyi anlaşılmış hücrel hasar mekanizmasıdır, hücrelerde ve dokularda oksidatif stresin indikatörü olarak kullanılır. Serbest radikallerin, hücre membranlarındaki lipitlerden elektron koparması sonucunda, lipitler yükseltgenir (oksitlenir), hücre hasarı meydana gelir ve serbest radikal üretimi artar. Lipit peroksitler, stabil değildir ve reaktif karbonil bileşiklerini içeren, bir seri kompleks bileşiğe dekompoze olurlar.

Biyolojik sistemlerde, membran lipitlerinin oksidatif hasarı üzerinde uzun yıllar çalışılmıştır. Yapılan gözlemler, lipit peroksidasyonda demir atomunun da yer aldığını göstermiştir (172-173) . Membran lipitleri, karbon-karbon çifte bağına sahip olduğu için oksidasyona çok duyarlıdır (173) . Lipit peroksidasyonu, endojen membran proteinleri katalizler (173-174) . Temel olarak, lipit peroksidasyonu ölçebilmek için iki metot kullanılır. Bunlardan birincisi, tez çalışmasında da kullanılan, tiyobarbitürik asit reaksiyon ürünlerinin analitik olarak tayinidir. Bu yöntem, lipit peroksidasyon sırasında oluşan malondialdehit veya benzeri ürünlerin tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girip pembe bir renk oluşturması esasına dayanır. İkinci yöntem ise, lipit peroksidasyon sırasında oluşan konjuge dien membran lipit ürünlerinin varlığında yapılan optik tayindir. Membran lipitlerinin peroksidasyonu, membranın yapısında değişikliklere neden olur, bu da daha rijid bir membran oluşmasına neden olur sonuçta, Na/K ATPaz gibi esansiyel membran proteinlerinin aktivitesi değişir. Bu önemli fizyolojik sonuçlar, membranın iyon pompalama hızını da değiştirir. Lipit peroksidasyonun iyi karakterize edilmiş iki ürünü malondialdehit ve 4-hidroksinoneal'dir. Bu maddeler bazı fizyolojik koşulların sağlanmasında önemli rolü olan biyomoleküllerle reaksiyona girer. Örneğin, malondialdehiti de içeren birçok aldehitin nükleik asitlerle reaksiyona girdiği gösterilmiştir (175) , bu reaksiyon mutajenez ve karsinogenezise neden olabilir. Diğer lipit peroksidasyon ürünlerinin, düşük dansiteli lipitlerle (LDL) reaksiyona girdiği gösterilmiştir, bu da LDL'nin reseptörü için yüksek afinitesini kaybetmesine neden olur böylece, LDL'nin kan dolaşımındaki kalış süresi artar ve makrofajlar tarafından alımları artmış olur (176) .

Lipit peroksidasyon, serbest radikal aracılı bir süreçtir, siklooksijenazlarla katalizlenen reaksiyonlardan oldukça farklıdır, çünkü onlar bir peroksidasyon aracılığı ile prostaglandin kaskadını başlatabilmek için, serbest yağ asidine gereksinim duyarlar. Lipit peroksidasyonda, öncü bir serbest radikal, çoklu doymamış yağ asidi ile etkileşime girer ve bir seri reaksiyonu başlatmış olur, sonuçta çeşitli degradasyon ürünleri oluşur (177) .

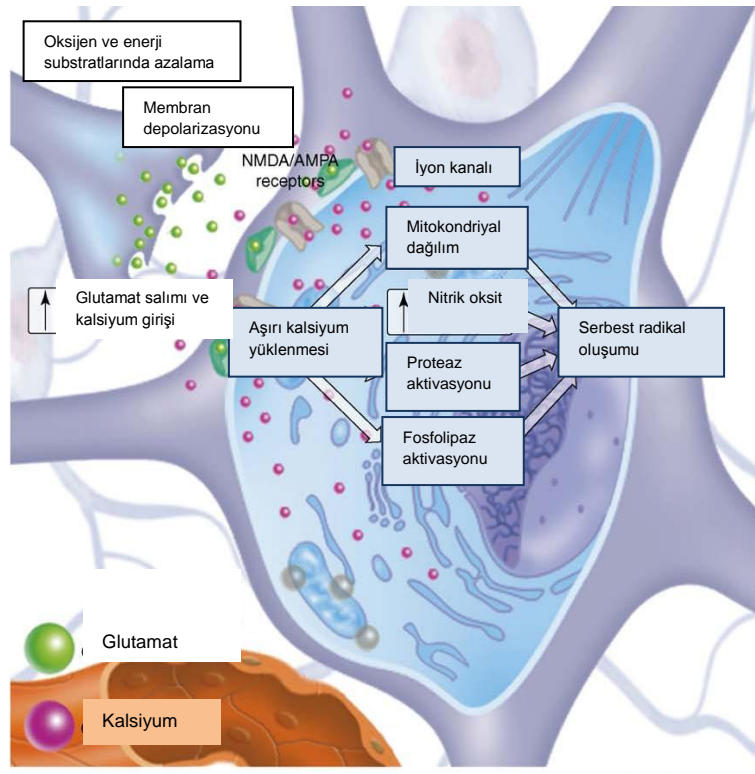
Lipit peroksidasyon, normal koşullar altında gerçekleşen, doğal bir süreçtir ve üç aşamaya ayrılabilir: Başlangıç, yayılma ve son bulma (178) . Başlangıç evresi, oksijenin aktivasyonunu içerir ve hız kısıtlayıcıdır. Çoklu doymamış yağ asitleri (membran lipitlerinin ana bileşeni), peroksidasyona çok duyarlıdır. Lipit peroksidasyon, reaktif oksijen türlerinin membran yapısı ve fonksiyonu üzerine etkilerinin en çok araştırılan sonucudur. Lipit peroksidasyonun sadece yıkıcı bir süreç olduğu fikri geçtiğimiz on yılda değişmiştir. Lipit peroksidasyon başlatıcılarının (reaktif oksijen ürünleri) yanı sıra lipit hidroperoksidazlar ve oksijenlenmiş ürünlerin de sinyal iletim kaskadı (179) , hücre proliferasyonunun kontrolü, farklılaşma, olgunlaşma ve apoptozisin indüksiyonuna katkıda bulunurlar (180-181) . Lipit peroksidasyon ve reaktif oksijen türlerinin, apoptozisi harekete geçirdiği gösterilmiştir, böylece kansere dönüşebilecek hücreler, kanserli hücreler, virüsle enfekte olmuş hücreler ve başka yollarla hasar görmüş, vücut için tehdit oluşturan hücreler elimine edilir (182) . Buna ek olarak, her ne kadar esansiyel n-6 yağ asidi, linoleik asidin deneysel çalışmalarla göğüs kanserini arttırdığı gösterilmiş olsa da, diğer n-6 yağ asitlerinin (eikosapentaenoik asit (EPA), dokosaheksaenoik asit (DHA) ve alfa-linoleik asit) in vivo ve in vitro çalışmalarda, göğüs kanserinin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyon, tümör hücrelerinde lipit peroksidasyon oluşumunun artması ile ilişkilendirilebilir. Kanserin büyümesinin bu şekilde baskılanması, pro-oksidanlarla artırılmış, antioksidanlarla elimine edilmiştir ve bu eliminasyon antioksidanlar tarafından lipit peroksidasyon ürünlerinin inhibisyonu ile orantılıdır (183) .

Oksidatif stresin değerlendirilmesinde, belirteç olarak en yaygın kullanılan grup, lipitlerin peroksidasyon ürünleridir. Lipit peroksidasyon sonucunda oluşan ilk ürünler, dienik hidroperoksitlerle konjuge olurlar. Bu aktif maddeler çeşitli aldehitlere veya eğer orijinal yağ asidi araşidonik asit ise, izoprostana parçalanır. Parçalanma ürünleri oksidatif stresin değerlendirilmesinde kullanılırlar. Bu maddeler arasında, yaygın olarak kullanılan son ürünler olan malondialdehit (MDA) ve F2-izoprostanların (F2I) yanı sıra hidroperoksitler, fazla miktarda eksprese edilen konjuge dienler yer almaktadır. Lipit peroksidasyon ürünlerinin konsantrasyonları, sıklıkla yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve GC/MS'in kombinasyonu ya

da peroksidasyon ürünlerinin absorbansı okunarak tayin edilir. Spektroskopik teknikte, dışardan eklenen bir madde ile peroksidasyon ürününün reaksiyona girmesi sonucunda oluşan renkli kompleksler ile, lipit peroksidasyon ürünlerinin konsantrasyonu tayin edilir. Bu amaçla tez çalışmasında da, lipit peroksidasyon ürünü olan malondialdehitin tayini yapılmıştır. Karaciğer dokusundan tayini yapılan maddenin analizinin esası, tiyobarbitürik asit ile malondialdehitin reaksiyona girip renkli bir ürün oluşturmasına dayanır. Oluşan bu ürünün verdiği absorbans UV spektrofotometre ile 532 nm dalga boyunda ölçülür (184) .

2.9.3. Tedavi Yaklaşımları

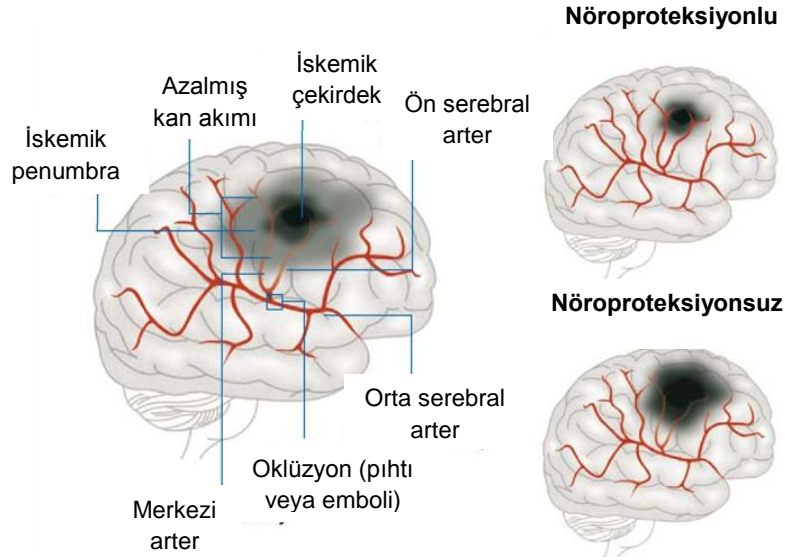
Son 30 yılda, “iskemik kaskad” olarak da sık sık ifade edilen, iskemik hasarı takiben oluşan olaylar zincirinden sonra meydana gelen nörokimyasal değişikliklerin başlaması üzerinde önemli bilgi birikimi sağlanmıştır (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. İskemik kaskadın başlangıcı. İskemik kaskad, iskeminin başlamasını takiben glutamat salımını ve diğer nörokimyasal değişiklikleri içerir (185) .

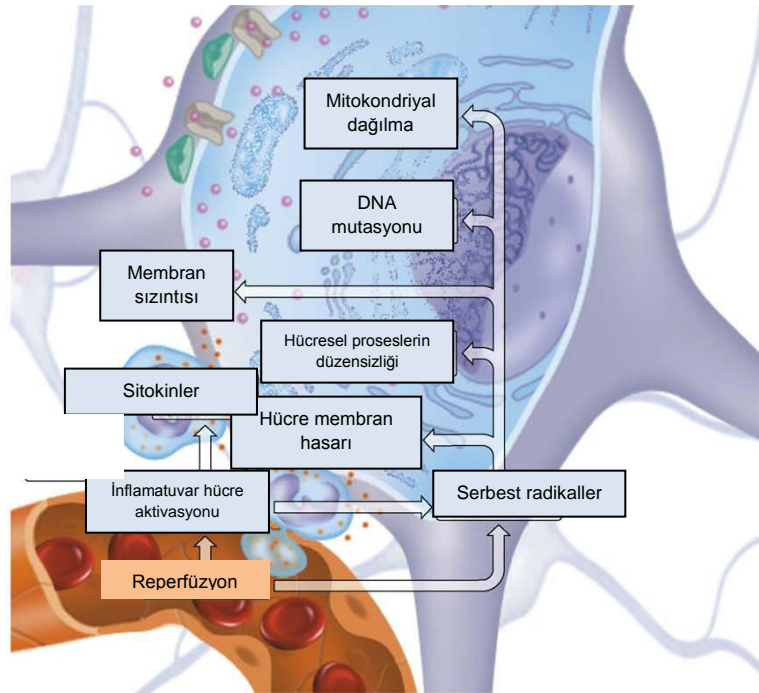
Akut iskemik felcin tedavisine ilişkin iki yaklaşım bulunmaktadır: trombolizis, kan akımını riskli bölgeye doğru düzenlemeye çalışmak; nöroproteksiyon, daha sonra oluşacak nörodejenerasyonu minimize etmek ve iskemik kaskattaki mekanizmalarının bir veya daha fazlasına engel olmaktır. Trombolizisin esası pıhtıyı çözmektir, böylece iskemik dokunun reperfüzyonu ve kan akımının yeniden başlaması indüklenir. Orta serebral arterin kalıcı oklüzyonu veya oklüzyonu takiben reperfüze edildikten 2 saat sonra hayvanlarda yapılan çalışmaların sonuçları kolaylıkla incelenir ve reperfüzyonun değeri (value of reperfusion) ölçülebilir. Geçici iskemi oluşturulan sıçanların beyindeki infarkt hacim, kalıcı iskemi oluşturulanlara göre daha azdır (186) . Akut iskemik felcin tedavisinde rt-PA ile trombolizis her ne kadar klinik olarak efektif olsa da, kullanımı birkaç faktör tarafından kısıtlanmıştır. Birincisi, trombolitiklerin kullanımı hemorajik felçte kontrendike olduğu için, bu durumun kontrolünde hastaların bilgisayarlı tomografiye girmeleri gerekmektedir. Çünkü, rt-PA ilk üç saat içinde uygulanmalıdır ancak, bilgisayarlı tomografi gecikmeye neden olur ayrıca hastaneye getirmedeki gecikme veya diğer kontrendike durumlar da göz önünde bulundurulduğunda hastaların büyük bölümü (yaklaşık % 95) ilacı alamamaktadır. İkincisi, birçok hasta ilaç verilmesine rağmen reperfüze olamamaktadır ve de % 5'inden daha fazlası ilaç uygulanmasının sonucunda hemorajik komplikasyonlarla karşılaşmaktadır (187) .

Nöroproteksiyon tüm yönleriyle farklı bir yaklaşımdır. Genel olarak yukarıda da bahsedildiği gibi nöroprotektif ajanların rolü iskemik kaskattaki bir veya daha fazla mekanizmaya engel olmaktır böylece, meydana gelebilecek doku hasarı en aza indirilir. Kan akımının çok azaldığı bölgenin (iskemik çekirdek) etrafının penumbra ile çevrelendiği varsayılır, ki bu bölge yavaş kan akımından dolayı tehlike altındadır, ancak bu bölge nöroprotektanların kullanımı ile veya kan akımının yeniden sağlanmasıyla korunabilir. Eğer böyle bir müdahale yapılmazsa penumbradaki hücreler ölür ve çekirdek giderek büyür (Şekil 2.20). Bu bakış açısını destekleyecek birçok kanıt mevcuttur (188) . Eğer müdahale edilmezse diğer mekanizmalar, hücrelerin ölümüne neden olacak şekilde iskemik kaskad tarafından çevrilir (Şekil 2.21).



Şekil 2.20. Orta serebral arterin bir dalında oklüzyon oluşumu (185) .

Orta serebral arter, penumbra ve iskemik çekirdek bölgesinde bir belirtiyeye sahiptir. Şekil 2.20’de nöroprotektif ilaç uygulandığında ve uygulanmadığında oluşan hasarın yayılımı gösterilmektedir.



Şekil 2.21. Hücre hasarında, reperfüzyonu takiben, önemli biyokimyasal yollar. Bu nörodejeneratif mekanizmalar, aynı zamanda, süregelen iskemiye takiben de oluşur, çünkü serbest radikallerin oluşumu ve endotelial hücre duvarı hasarı da devam eder (185) .

Trombolitik ajanların ve nöroprotektanların kombine kullanımı, bir takım avantajlar sunar. Üretilen klinik gelişimin derecesinde sinerjistik etki sağlar. rt-PA'nın neden olduğu bazı problemlerin görülme sıklığı azalır. Kombine tedavinin değerinin gösterilmesi, hayvan deneylerinde bile oldukça kompleksdir, fakat, konuyla ilgili faktöriyel tasarımları içeren öneriler yayınlanmaktadır (185) .

Deneyisel çalışmalarla etkinliği kanıtlanmış nitron bileşikleri, nöroproteksiyon sağlayan, serbest radikal temizleyici ajanlardır. Birçok araştırmaya konu olan ve güçlü etkilere sahip nitron bileşikleri anlatıldıktan sonra, tez çalışmalarında kullanılan etkin madde olan alfa-fenil-N-tert-butil nitron (PBN) hakkında ayrıntılı bilgi verilecektir.

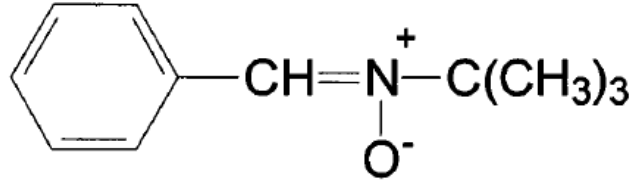
2.9.3.1. Nitron Bileşikleri

Nitron bileşikleri en basit şekliyle, X-CH=NO-Y şeklinde gösterilirler. Nitronlar altmışlı yıllarda analitik kimya uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır. Nitron bileşikleri, serbest radikallerle reaksiyona girerek onları tuzağa düşürür ve stabil bir hale dönüştürür. Serbest radikaller, çok kısa bir süre stabildir bu nedenle karakterizasyonları ve tayinleri çok güçtür (189) . Nitronların serbest radikallere bağlanması oldukça yüksek hız sabiti ile gerçekleşen bir reaksiyondur ve nitronun yapısından bağımsızdır. PBN, en çok çalışılan nitron bileşiğidir (190) . Nitron bileşiklerinin serbest radikalleri temizleme ve onları tuzağa düşürme yeteneği, klinikte birçok alanda kullanıma ışık tutmaktadır. Nitron bileşiklerinin kullanım alanları arasında, inme tedavisi, anti-kanser aktivite, işitme kaybının tedavisi yer almaktadır (189) . Nitron bazlı antioksidan bir bileşik olan PBN, biyolojik sistemlerde serbest radikalleri stabilize etmek ve onları temizlemek için en çok kullanılan bileşiktir.

2.9.3.1.1. Alfa-Fenil-N-Tert-Butil Nitron (PBN)

Kimyasal formülü, 2-metil-N-(fenilmetilen)-2-propanamin N oksit, moleküler formülü ise $C_{11}H_{15}NO$ olan alfa-fenil-n-tert-butil nitron (PBN) biyolojik sistemlerde, kısa ömürlü oksijen, karbon ve azot merkezli serbest radikallerin tuzağa düşürülmesini sağlar (Şekil 2.22). Işığa duyarlı bir maddedir, bu duyarlılık çözelti

formunda daha da artmaktadır. Polar organik solvanlarda (metanol, etanol, asetonitril, toluen, benzen, kloroform, etilasetat) kolaylıkla çözünür. Sudaki çözünürlüğü % 2,9'dur. Beyaz renkli kristal bir toz olan PBN'in molekül ağırlığı 177,3 g/mol, erime derecesi ise 72-74 °C'dir (191) .



Şekil 2.22. PBN'in kimyasal yapısı (192) .

Serebral iskemi ve reperfüzyon, reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırmaktadır, bu da lipid peroksidasyon ve/veya proteinlerin oksidasyonu sonucunda hücre membranında hasara neden olmaktadır (151,193) . Daha önceki çalışmalar, reaktif oksijen türlerinin artışının ikincil mitokondriyal disfonksiyona ve mitokondriyal permeabilite geçiş oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Mitokondriyal permeabilite geçişi olduğu için, apoptozisi indükleyen faktörlerin ve sitokrom C'nin mitokondriden sitoplazmaya salımı gerçekleşir. Böylece, kaspazların aktivasyonunu içeren programlanmış hücre ölüm yolları tetiklenir ve sonuçta DNA'nın fragmantasyonuna neden olur. Serbest radikal tutucu ajanların reperfüzyondan 3 saat sonra uygulansa bile, kalıcı veya geçici fokal iskemi sonucunda iskemik beyin hasarını azalttığı sıçanlarda ve primatlarda gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, 2 saat süren geçici fokal iskemiye takiben, sirkülasyonun başlatılmasından 1 saat sonra PBN verildiğinde, biyoenerjik durumdaki azalmayı ve mitokondriyal solunumdaki azalmayı iyileştirildiği, reperfüzyondan 4 saat sonra gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, PBN'in mitokondriyal düzeyde rol oynadığını ileri sürmektedir. İkincil mitokondriyal disfonksiyonu önleme etkisine ek olarak, nitron bazlı serbest radikal süpürücüler ayrıca oksidatif stresi baskılayıcı maddeler olarak da bilinirler, bunu inflamatuvar sitokin kaskadının aktivasyonunu baskılayarak sağlarlar (194) .

Serbest radikal süpürücülerin terapötik etkinliği üzerine literatürde, kan beyin engelini geçebilen maddelerin, iskemik hasardan beyni antioksidanlara göre daha

etkili koruduğu yer almaktadır. Antioksidanlar genellikle, serebral mikrovaskülerin endotelinde rol alırlar. Kan beyin engelinden geçemeyen serbest radikal süpürücüler, hayvan deneylerinde, infarkt hacmi % 25-35 arasında azaltırken, PBN ile ikna edici sonuçlar alınmıştır. Nitron bazlı serbest radikal süpürücüler, beyne yüksek konsantrasyonda penetre olurlar ve serbest radikallerle stabil bir eklenme ürünü oluşturmak üzere reaksiyona girerler. Geçici ve kalıcı fokal iskemi hayvan modellerinde, PBN ile tedavide infarkt hacim % 50 < oranında azalmıştır (195) .

PBN, ilgi çekici farmakolojik özelliklere sahiptir, bunun nedeni kuvvetli nöroprotektif etkinliği ve travmatik beyin hasarı, inme, intraserebral hematoma gibi bazı santral sinir sistem hasarı modelleri gibi geniş terapötik pencereye sahip olmasıdır. PBN, lipofilik özelliği sayesinde, yüksek derecede kan beyin engeli penetrasyonuna sahiptir ve plazma yarı ömrü 3 saattir. Ön tedavi olarak, hasardan 30 dakika önce, 30 mg/kg'lık intravenöz uygulama ile bilişsel eksikliği ve lezyonun hacmini azalttığı sıçanlarda gösterilmiştir. PBN'in nöroprotektif etkisi, onun reaktif oksijen türlerini temizlemesine dayandırılmaktadır. Fakat, PBN'in, inflamatuvar araçlar, transmitter sistemler veya kalsiyum kanallarının blokasyonu üzerine etkisi gibi alternatif mekanizmalara da sahip olabileceği öne sürülmektedir (196) .

PBN'in nöroprotektif etkinliği lipopolisakkarit aracılı septik şok modeli, hipoksi-iskemi modeli ve diğer nöronal dejeneratif hastalıklar aracılığı ile gözlenmiştir (197) . PBN'in manyetik rezonans görüntüleme ile, karbontetraklorür intoksikasyonu sonrasında, sıçanlarda karaciğer ödeminin hacmini önemli ölçüde azalttığı gözlenmiştir. PBN'in en çarpıcı farmakolojik etkilerinden birisi de, ön uygulama ile endotoksin aracılı ölümlere karşı koruma sağlamasıdır (198) .

Serbest radikal temizleyicilerin, geçici ön beyin iskemisinin reperfüzyon sürecinde başarılı bir şekilde nöronal hasarı azalttıkları bilinmektedir. PBN'in ayrıca fokal iskemide de infarkt hacmi azalttığı gösterilmiştir. Önemli bir nöroproteksiyon ajanı olan PBN, serbest radikallerle reaksiyona girerek, onları daha stabil bir forma dönüştürür. PBN'in, sıçanlarda kalıcı ve geçici fokal iskemi modellerinin yanı sıra, hem global hem de ön beyin iskemisi modellerinde gerbillerde yapılan çalışmalarda beyin hasarını iyileştirdiği gösterilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Alfa-fenil-n-tert-butil nitron (PBN)	Fluka, İsviçre
Bikinkoninik asit (BCA) Potein Miktar Tayin Kiti	Thermo Scientific, Pierce Protein Research, ABD
Butanol (iso for analysis)	Carlo Erba Reagents, İtalya
Etanol (% 96)	Al-Abbas Sugar Mills, Pakistan
Etil asetat	Merck, Almanya
Hidroklorik asit	Riedel-de Hæn, Almanya
Kitosan Cl (Protasan UP CL 113) (MA <150 kDa, deasetilasyon derecesi: % 75-90)	FMC Biopolymers, Norveç
Metanol (HPLC grade)	Sigma Aldrich, ABD
Orto fosforik asit (% 85)	Merck, Almanya
Pentasodyum tripolifosfat (TPF)	Sigma-Aldrich, ABD
PLGA (50:50) (Resomer RG 502 H)	Boehringer Ingelheim, Almanya
PLGA-ko-PEG diblok (Resomer RGP d 50105)	Boehringer Ingelheim, Almanya
Polivinil alkol (Mw:30 000-70 000 Da)	Sigma®, ABD
Sodyum hidroksit	Riedel-de Hæn, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Tiyobarbitürik asit	Sigma Aldrich, ABD

3.1.2. Kullanılan Aletler

Hassas Terazî	Shimadzu, Japonya
	Mettler Toledo, İsviçre
HPLC Sistemi	Agilent Technologies 1200 Series, ABD
Kolon (C18 5µm, 150x4,6 mm)	Cliepus, Higgins Analytical Inc., ABD
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL3000, Jouan, Danimarka
Manyetik Karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya
	Heidolph, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı	Zetasizer Nanoseries ZS, Malvern Instruments, İngiltere
pH metre	Sartorius PP-20, Almanya
Rotavapor	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Almanya
Santrifüj Aleti	Hermle Z383 K, Almanya
Şırınga Filtresi	Advantec, MFS, Inc., Japonya
Taramalı Elektron Mikroskopisi	Nova™ NanoSEM 430, FEI, ABD

Termostatlı Yatay Çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra Saf Su Sistemi	Simplicity 185-Milipore, ABD
Ultrasonik Banyo	Branson B 220 Smith Kline, ABD
UV Spektrofotometre	UV-1800, Shimadzu, Japonya
Vorteks	Nüvemix, Türkiye
Yüksek Hızlı Homojenizatör	Ultraturrax T25 Basic, IKA, Almanya

3.2. Yöntem

3.2.1. PBN'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. UV Spektrumu

PBN'in etanol:su [1:9 (h/h)] içerisinde hazırlanan 10 µg/ml konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu 1x1 cm'lik kuartz küvetler içerisinde 200 -400 nm arasında taranmış ve çözeltinin λ_{maks} değeri tespit edilmiştir.

3.2.2. PBN'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

PBN'in in vitro koşullardaki miktar tayini Chen ve diğ. (199) tarafından uygulanan yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. PBN'in miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. PBN'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

Kolon	C₁₈ (150x4,6mm, por büyüklüğü 5 µm)
Mobil faz	Metanol : Su (50:50)
Enjeksiyon Hacmi	20 µl
Akış Hızı	1 ml/dk
Dedektör	UV dedektör
Dalga Boyu	286 nm
Kolon Fırını Sıcaklığı	25 °C

3.2.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

HPLC analizleri sonucunda, PBN'in kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için etkin maddenin etanol:su [1:9 (h/h)] içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonda birinci ana stok çözeltisinden hareketle 10 µg/ml konsantrasyonda ikinci stok çözeltisi ve bu stok çözeltiden hareketle 100 ng/mL konsantrasyonda üçüncü stok hazırlanmıştır (n=6). İkinci ve üçüncü stok çözeltiler kullanılarak 25, 50, 100, 200, 400, 800 ng/mL konsantrasyonda PBN içerecek şekilde etanol:su [1:9 (h/h)] ile gerekli seyreltmeler yapılarak 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgül ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. Metot validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır (200) . HPLC analitik metodunun değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

- Doğrusallık (“Linearity”)
- Doğruluk (“Accuracy”)
- Kesinlik (“Precision”)
- Duyarlılık (“Sensitivity”)

- Özgüllük (“Specificity”)
- Stabilité (“Stability”)

3.2.2.2.1. Doğrusallık (“Linearity”)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direk olarak orantılı olmasını sağlama yeteneğidir (201) . Bu amaçla etkin maddenin etanol:su [1:9 (h/h)] içindeki 1 mg/ml konsantrasyonda birinci ana stok çözeltisinden hareketle 10 µg/ml konsantrasyonda ikinci stok çözeltisi ve bu stok çözeltiden hareketle 100 ng/mL konsantrasyonda üçüncü stok hazırlanmıştır (n=6). İkinci ve üçüncü stok çözeltiler kullanılarak 25, 50, 100, 200, 400, 800 ng/mL konsantrasyonda PBN içerecek şekilde etanol:su [1:9 (h/h)] ile gerekli seyreltmeler yapılarak 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.2.2.2. Doğruluk (“Accuracy”)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade eder (201) . PBN’in miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (intra-assay) ve deneyler arası (inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Formül 3.1) (202) .

$$\text{Doğruluk} = \frac{\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon} - \text{İlave edilen konsantrasyon}}{\text{İlave edilen konsantrasyon}} \times 100 \quad (3.1)$$

Deney içi doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 200, 800 ng/mL), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 200, 800 ng/mL), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayin edilmiştir.

3.2.2.2.3. Kesinlik (“Precision”)

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçümü olarak tanımlanır (201) . Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerlerle ilgisi yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda numune ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (“repeatability”) ve tekrar elde edilebilirlik (“reproducibility”) olarak ifade edilir (200) .

3.2.2.2.3.1. Tekrarlanabilirlik (“Repeatability”)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır.

Tekrarlanabilirliğin tespiti için, kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 200, 800 ng/mL) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile altı kez ayrı ayrı analiz edilip, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması önerilmektedir (201) .

3.2.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik (“Reproducibility”)

Aynı konsantrasyondaki çözeltiden hareketle, aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Üç farklı konsantrasyon düzeyinde uygun sayıda bağımsız çözeltiler kullanılarak aynı gün ve farklı günlerde gerçekleştirilir.

Deney içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 200, 800 ng/mL) her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyleler arası tekrar elde edilebilirliliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 200, 800 ng/mL) her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayin edilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında VK % 2'den küçük olmalıdır (200) .

3.2.2.2.4. Duyarlılık (“Sensitivity”)

3.2.2.2.4.1. Saptama Sınırı (“Limit of Detection”)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (201-202) .

3.2.2.2.4.2. Miktar Tayin Sınırı (“Limit of Quantification”)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (201-202) .

3.2.2.2.5. Özgüllük (“Specificity”)

Bir analitik yöntemin özgüllüğü; ortamda bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir, sayısal olarak ifade edilmez (203) . Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (kitosan, kitosan-PEG, TPF, PLGA, PLGA-PEG, PVA) formülasyonda

buldukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir. Ayrıca, ilaç yükleme ve in vitro salım çalışmalarında etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonlarına uygulanan işlemler, boş nanopartiküllere de uygulanarak HPLC kromatogramları elde edilmiştir.

3.2.2.2.6. Stabilite (“Stability”)

PBN’in analiz boyunca stabilitesini göstermek amacıyla 400 ng/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltisi (PBS pH 7,4 ortamındaki) 37 °C’de 24 saat bekletilmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak gösterilmiştir.

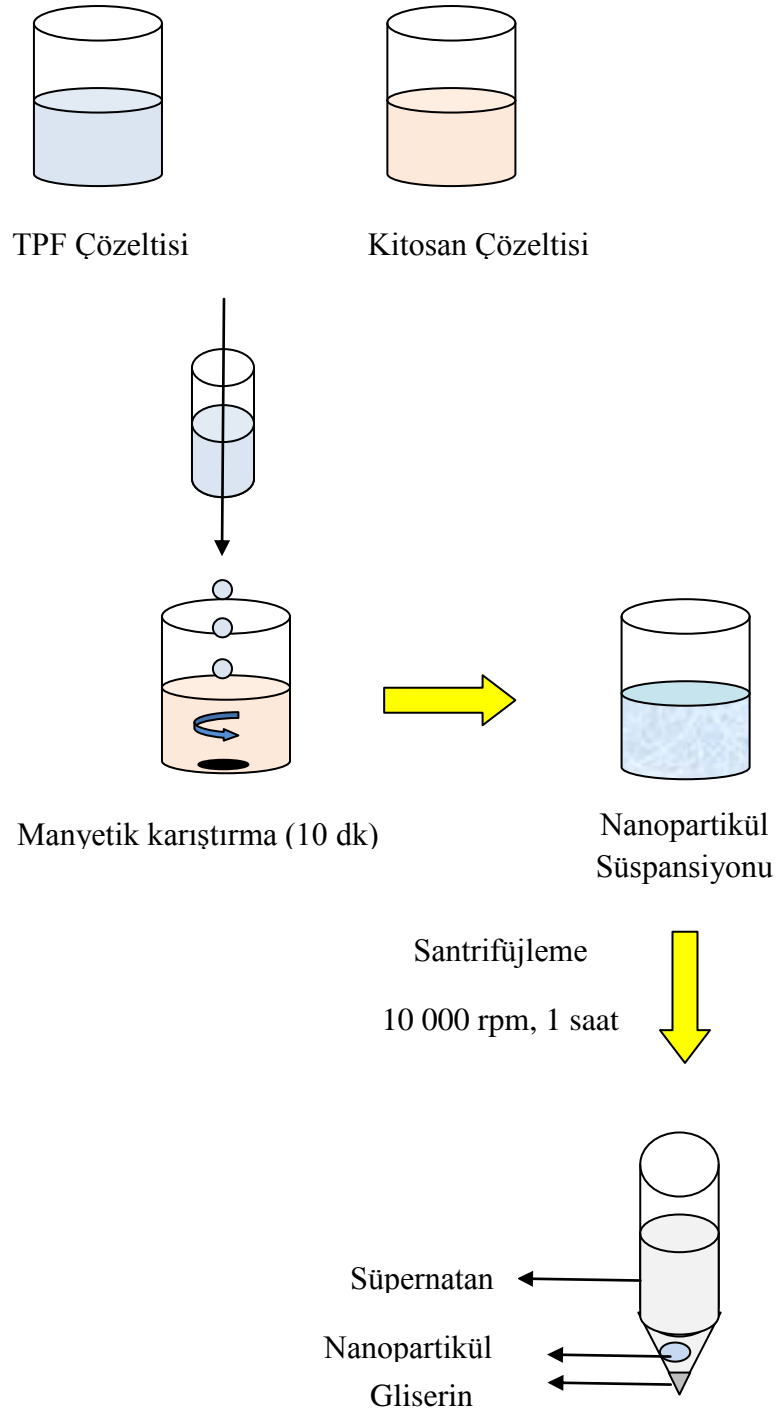
3.2.3. Kitosan-Polietilen glikol (KS-PEG) Sentezi

Nanoteknoloji konusundaki çalışmalarımız uluslararası bir işbirliği çerçevesinde yürütülmekte olup, aşağıda özetlenen polimer sentezi çalışmaları İspanya’dan Prof. Fernandez-Megia ve diğ. tarafından gerçekleştirilmiş, sentezlenen polimerle ilgili yöntem ve bulgular daha önce rapor edilmiştir (27,204) . KS-PEG sentezi için 100 mg KS.HCl (Protasan UP CL 113, 0,50 mmol) 14,3 mL suda çözüldürülmüştür. MeO-PEG-OCH₂CO₂H ticari olarak bulunan MeO-PEG-OH’dan hareketle önceden uygulanan prosedürler çerçevesinde sentezlenmiştir (205) . 17,8 mg MeO-PEG-OCH₂CO₂H (3,47 mmol, Mn 5114) ve 2,03 mg N-hidroksi süksinimid (NHS) (0,018 mmol) sonradan çözeltiliye eklenmiş ve 27,1 mg N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC-HCl) (0,141 mmol) stabilite sorunu nedeniyle porsiyonlar halinde karışıma ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti 22 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılıp, filtreden süzülüş (Amicon, YM30) ve KS-g-PEG (KS-PEG) beyaz köpük halinde elde edilmiştir.

3.2.4. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

3.2.4.1. Kitosan ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş Kitosan (Kitosan-PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kitosan ve KS-PEG nanopartikülleri, TPF ile kitosan ve Bölüm 3.2.3’de “*Kitosan-Polietilen glikol (KS-PEG) Sentezi*” başlığı altında sentezi açıklanan polimerin (KS-PEG) iyonotropik jelasyonu ile hazırlanmıştır (29) . Bu yöntemle hazırlanan nanopartiküllerde yüklenen etkin madde miktarı farklılığının yanı sıra PEG ile modifikasyonun nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Nanopartiküller, TPF çözeltisinin manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında sürekli olarak karışmakta olan kitosan çözeltisine damla damla ilave edilmesiyle elde edilmiştir. Kitosan/TPF oranının belirlenmesi için kitosan ve TPF çözeltilerinin değişen konsantrasyonlarının ve hacimlerinin kullanıldığı ön çalışmalar yapılmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanması Şekil 3.1’de şematize edildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Kitosan ve yüzeyi modifiye edilmiş kitosan nanopartiküllerin hazırlanma şeması.

3.2.4.1.1. Etkin Madde Yüklenmemiş Kitosan ve KS-PEG Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.2.4.1.1.1. Boş Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kitosan nanopartikülleri iyonotropik jelasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Etkin madde yüklü olmayan kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması için ultra saf su içinde 1,75 mg/mL konsantrasyondaki kitosan ve 0,4 mg/mL konsantrasyondaki TPF çözeltisi hazırlanmıştır. Kitosan su içinde 45 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda 700 rpm hızda karıştırılarak çözündürülmüştür. Kitosanın tamamen çözünmesinden sonra karışmakta olan kitosanla eşit hacimdeki TPF çözeltisi damla damla ilave edilerek 10 dakika karıştırılıp 10 µL gliserin eklenmiş ependorf tüplere 2 mL hacimde nanopartikül süspansiyonu konulmuştur. Süspansiyon, +4 °C'de 10000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra geride kalan nanopartiküller, kullanılmak üzere ultra saf su içinde yeniden süspand edilmiştir. Etkin madde içermeyen kitosan nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan polimer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ve hacimleri ayrıntılı şekilde Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Boş kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan kitosan ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri.

	Konsantrasyon (mg/mL)	Hacim (mL)
KS	1,75	1
TPF	0,4	1

3.2.4.1.1.2. Boş Kitosan-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kitosan-PEG nanopartiküllerinin hazırlanması iyonotropik jelasyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir. KS-PEG ile nanopartiküllerin hazırlanması için ultra saf su içinde 1 mg/mL konsantrasyondaki KS-PEG çözeltisi ve 0,84 mg/mL konsantrasyondaki TPF çözeltisi hazırlanmıştır. KS-PEG su içinde 1 saat boyunca

manyetik karıştırıcıda 700 rpm hızda karıştırılarak çözündürülmüştür. KS-PEG'in tamamen çözünmesinden sonra karışmakta olan kitosan çözeltisinin 5 mL'sine TPF çözeltisinden 2 mL damla damla ilave edilerek 10 dakika karıştırılıp 10 µL gliserin eklenmiş ependorf tüplere 7 mL hacimde nanopartikül süspansiyonu konulmuştur. Süspansiyon, +4 °C'de 10000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra geride kalan nanopartiküller, kullanılmak üzere ultra saf su içinde yeniden süspand edilmiştir. Etkin madde içermeyen KS-PEG nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan polimer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ve hacimleri ayrıntılı şekilde Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Boş KS-PEG nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan KS-PEG ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri.

	Konsantrasyon (mg/mL)	Hacim (mL)
KS-PEG	1	5
TPF	0,84	2

3.2.4.1.2. Etkin Madde Yüklü Kitosan ve KS-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

3.2.4.1.2.1. PBN Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kitosan nanopartiküllerine 0,5 mg/mL ve 1 mg/mL olmak üzere iki farklı dozda PBN yüklenmiştir. 0,5 mg/mL konsantrasyonda PBN yükleyebilmek için 2,042 mg/mL konsantrasyonda, 1 mg/mL konsantrasyonda PBN yükleyebilmek için ise, 2,451 mg/mL konsantrasyonda kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Kitosan çözeltisi 700 rpm'de manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Kitosanın tamamen çözünmesinden sonra karışmakta olan kitosan çözeltisinden gerekli hacim üzerine PBN çözeltisi (1:9 (h/h) etanol:su içerisinde) ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. Eşit hacimdeki polimer-etkin madde çözeltisi üzerine TPF çözeltisi damla damla ilave edilerek 10 dakika karıştıktan sonra 10 µL gliserin

eklenmiş ependorf tüplere hazırlanan nanopartikül süspansiyonu aktarılmıştır. Süspansiyon +4 °C'de 10000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmış, elde edilen nanopartiküller, kullanılmak üzere ultra saf su içinde yeniden süspand edilmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan polimer, etkin madde ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ve hacimleri ayrıntılı şekilde Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4. Değişen konsantrasyonda (a; 0,5 mg/mL, b; 1 mg/mL) etkin madde içeren kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan PBN, kitosan ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri.

		Konsantrasyon (mg/mL)	Hacim (mL)
(a)	KS	2,042	0,857
	PBN	7	0,143
	TPF	0,4	1
		Konsantrasyon (mg/mL)	Hacim (mL)
(b)	KS	2,451	0,714
	PBN	7	0,286
	TPF	0,4	1

3.2.4.1.2.2. PBN Yüklü Kitosan-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Kitosan-PEG nanopartiküllerine 0,5 ve 1 mg/mL olmak üzere iki farklı konsantrasyonda PBN yüklenmiştir. 0,5 mg/mL konsantrasyonda PBN yükleyebilmek için, 1,11 mg/mL konsantrasyonda, 1 mg/mL PBN konsantrasyonda PBN yükleyebilmek için ise, 1,25 mg/mL konsantrasyonda KS-PEG çözeltisi

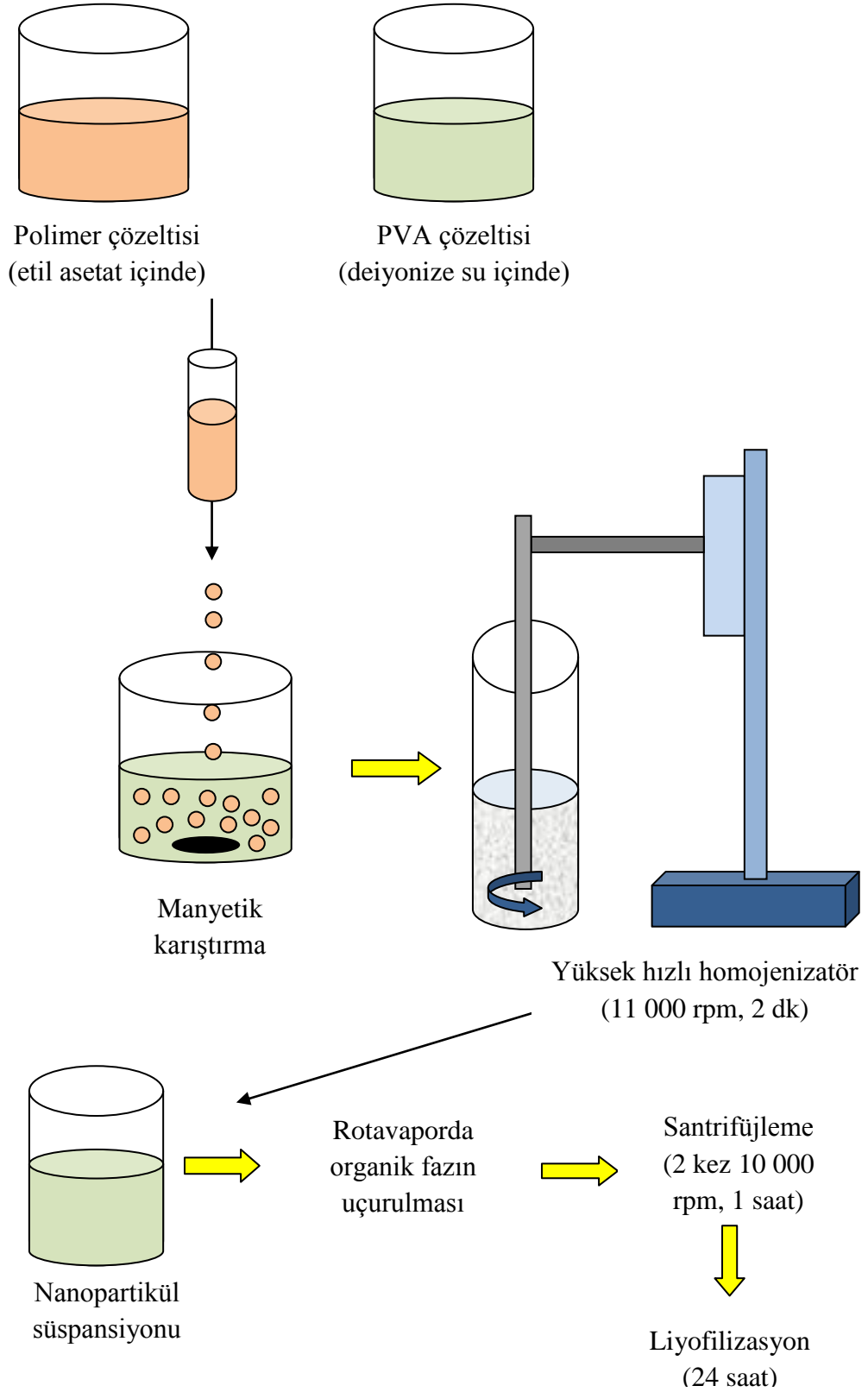
hazırlanmıştır. KS-PEG çözeltisi ultra saf su içerisinde, 700 rpm'de 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlanmıştır. Polimer tamamen çözündükten sonra, karışmakta olan çözeltinin hesaplanan hacmi üzerine PBN çözeltisi (1:9 (h/h) etanol:su içerisinde) ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılmıştır. 5mL hacimdeki polimer-etkin madde çözeltisi üzerine 2 mL hacimde TPF çözeltisi damla damla ilave edilerek 10 dakika karışıktan sonra 10 µL gliserin eklenmiş ependorf tüplere hazırlanan nanopartikül süspansiyonu aktarılmıştır. Süspansiyon +4 °C'de 10 000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen nanopartiküller, kullanılmak üzere ultra saf su içinde yeniden süspand edilmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında kullanılan polimer, etkin madde ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonları ve hacimleri ayrıntılı şekilde Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. a; 0,5 mg/mL ve b; 1 mg/mL etkin madde içeren kitosan-PEG nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan PBN, KS-PEG ve TPF çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri.

	Konsantrasyon (mg/mL)	Hacim (mL)
(a)	KS-PEG	1,11
	PBN	7
	TPF	0,84
	Konsantrasyon (mg/ml)	Hacim (ml)
(b)	KS-PEG	1,25
	PBN	7
	TPF	0,84

3.2.4.2. PLGA ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş PLGA (PLGA-PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Biyoparçalanabilir sentetik polimerler olan PLGA ve PLGA-PEG polimerleri ile emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemine uygun olarak nanopartiküller hazırlanmıştır. Tez çalışmasında kullanılan etkin maddenin organik fazda (etil asetat, aseton, vb.) kolaylıkla çözünebilen lipofilik bir madde olmasından dolayı Y/S basit emülsiyon oluşturulmuştur. Polimerin ve etkin maddenin iç faz olan yağ fazında (organik solvanı içeren faz) çözünmesi sağlanmıştır. Emülgatör olarak formülasyonda yer alan yüzey etkin madde olan polivinil alkolün su içindeki çözeltisi üzerine polimeri ve etkin maddeyi içeren organik faz eklenmiştir ve yüksek hızlı homojenizatör ile karıştırılarak, stabil ve nano boyutta damlacıklara sahip emülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Organik faz olan etil asetat rotavaporda uçurulduktan sonra ve iki kez santrifüjleme işlemi yapılarak nanopartiküllerin yıkanması ve toplanması sağlanmıştır. Emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül üretimi Şekil 3.2’de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerin hazırlanma şeması.

3.2.4.2.1. Boş PLGA ve PLGA-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

PLGA ve PLGA-PEG nanopartikülleri, emülsifikasyon/solvan buharlaştırma metodu kullanılarak hazırlanmıştır. Etkin madde yüklü olmayan, boş PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin hazırlanması için, öncelikle 20 mL % 3'lük polivinil alkol (PVA) çözeltisi ultra saf su içinde hazırlanmıştır. Daha sonra PLGA ve PLGA-PEG polimerlerinin etil asetat içindeki % 2'lik çözeltisi 10 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerinde, polimer çözeltisi, PVA çözeltisi üzerine eklenmiştir, yüzey aktif madde olan PVA sayesinde Y/S emülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Bu emülsiyon uygun bir cam kap içerisinde, yüksek hızlı homojenizatörde 2 dakika boyunca 11000 rpm homojenize edilmiştir. Partikül boyutunun küçülmesi ve homojenizasyonu sağlanmıştır. Bu süre sonunda, emülsiyon manyetik karıştırıcı üzerinde iken 20 mL ultra saf su eklenmiştir ve 10 dakika karışmaya bırakılmıştır. Bu süre sonunda, organik faz olan etilasetatın uçması için rotavapor kullanılmıştır. Organik fazın uçması için kullanılan diğer bir yol olan oda sıcaklığında bir gece boyu uçmaya bırakma tekniği, etkin madde yüklü nanopartikül üretiminde maddenin salımına neden olacağı için tercih edilmemiştir. Organik faz olan etil asetat rotavaporda uçurulduktan sonra, 40 mL'lik santrifüj tüplerine alınmıştır ve 10000 rpm'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant atılarak 40 mL ultra saf su içinde resüspande edilen nanopartiküllerin yıkanması sağlanmıştır ve aynı şartlarda bir kez daha santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen nanopartiküller yeniden süspande edilmiştir. Bu şekilde karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, daha sonraki üretimlerde son basamakta nanopartiküller liyofilize edilmiştir. In vitro salım çalışmaları ve liyofilize nanopartiküllerde karakterizasyon çalışması yapmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.4.2.2. PBN Yüklü PLGA ve PLGA-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine polimer miktarının % 5 (a/a)'i ve % 10 (a/a)'u kadar olmak üzere iki farklı dozda PBN yüklenmiştir. 10 mL PLGA ve

PLGA-PEG çözeltisi etil asetat içerisinde konsantrasyonu % 2 olacak şekilde manyetik karıştırıcıda 20 dakika karıştırılarak hazırlanmıştır. Bu süre sonunda karışmakta olan polimer çözeltisinin üzerine yüklenecek miktarda (10 mg ve 20 mg) PBN eklenmiştir ve 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 20 mL % 3'lük PVA çözeltisi ultra saf su içerisinde hazırlanmıştır. Karışmakta olan bu çözelti içerisine etkin madde ve polimeri içeren 10 mL'lik çözelti eklenmiştir, Y/S emülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Oluşan emülsiyon uygun bir cam kap içerisine alınarak, yüksek hızlı homojenizatörde 2 dakika 11000 rpm'de homojenize edilmiştir. Homojenize edilen emülsiyon manyetik karıştırıcıda 10 dakika daha karıştırıldıktan sonra üzerine 20 mL ultra saf su eklenmiştir ve rotavaporda organik faz olan etil asetatın uçması sağlanmıştır. Bu işlem sonunda elde edilen nanopartikül süspansiyonu + 4 °C'de 10000 rpm'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Süpernatant enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması için saklanırken, nanopartiküller ultrasaf su içerisinde yeniden resüspande edilmiştir, PVA ve polimer artığını uzaklaştırmak için, aynı şartlarda santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır ve yeniden süspande edilmiştir.

3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.5.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Tez çalışmasında hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri foton korelasyon spektroskopisi ve lazer dopler anemometri esasına göre çalışan Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Her formülasyon için ardarda üç ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C ve ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.5.2. Morfolojik Özellikleri

Kitosan, modifiye edilmiş kitosan (KS-PEG), PLGA ve modifiye edilmiş PLGA (PLGA-PEG) polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik özellikleri Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Nanopartiküller iki tarafı yapışkan bant aracılığı ile metal levhalar üzerine tesbit

edilmiştir. Bu işlemi takiben, örnekler marka kaplama cihazında (BIORAD) 100 Å kalınlıkta altın ile kaplanmıştır. Daha sonra örnekler SEM (Nova™ NanoSEM 430) ile incelenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5.3. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

3.2.5.3.1. PBN Yüklü Kitosan ve Kitosan-PEG Nanopartiküllerinde Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Etkin madde yüklü nanopartiküller + 4 °C’de, 10 000 rpm’de, 1 saat santrifüj edildikten sonra, süpernatandan indirekt analiz, nanopartiküllerden ise direkt analiz gerçekleştirilmiştir. Süpernatanda serbest halde bulunan yüklenmemiş etkin madde miktarının tayininde Bölüm 3.2.2’de “*PBN’in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*” başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılmıştır. Toplam süpernatant hacmi tespit edildikten sonra, gerekli seyreltmeler yapılmıştır ve yeterli miktarı 0,22 µm por açıklığına sahip enjektör filtresinden süzülerek analiz gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen nanopartiküllere yüklenen PBN miktarının direk tayininde ise, ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Nanopartiküller etkin maddenin kolaylıkla çözündüğü metanol içinde resüspande edildikten sonra 30 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Bu sırada, nanopartiküllerin parçalanması, etkin maddenin ise, metanol fazına geçmesi beklenmektedir. 30 dakika sonunda, elde edilen örnek 0,22 µm por açıklığına sahip enjektör filtresinden süzülüp, etkin madde miktar tayini için Bölüm 3.2.2’de “*PBN’in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*” başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılmıştır.

Yükleme etkinliğinin tayini, ortama eklenen etkin madde ile nanopartikül formülasyonuna yüklenen etkin madde miktarları kullanılarak hesaplanır (Formül 3.2).

Yükleme kapasitesi tayin edilirken, nanopartiküllere pratikte yüklenen etkin madde miktarının yanı sıra, bu etkin maddenin ne kadar nanopartiküle yüklendiği bilinmelidir. Bu nedenle, santrifüj sonrası elde edilen nanopartiküller, liyofilizatörde dondurularak kurutulduktan sonra, nanopartiküllerin ağırlıkları tayin edilmiştir.

Etkin maddenin yüklenme etkinliği (% YE) ve yükleme kapasitesi (% YK) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.2, 3.3).

$$\% \text{ YE} = \frac{(\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Serbest etkin madde miktarı})}{(\text{Toplam etkin madde miktarı})} \times 100$$

(3.2)

$$\% \text{ YK} = \frac{(\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Serbest etkin madde miktarı})}{\text{Nanopartikül ağırlığı (mg)}} \times 100$$

(3.3)

3.2.5.3.2. PBN Yüklü PLGA ve PLGA-PEG Nanopartiküllerinde Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Etkin madde yüklü PLGA ve PLGA-PEG nanopartikülleri + 4 °C’de, 10000 rpm’de 1 saat santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatant üzerinden yapılmıştır. Toplam süpernatant hacmi tespit edildikten sonra, gerekli seyreltmeler yapılmıştır ve yeterli miktarda 0,22 µm por açıklığına sahip enjektör filtrelerinden süzöldükten sonra etkin madde miktarı tayini için Bölüm 3.2.2’de “*PBN’in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*” başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılmıştır. Yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesinin tayini için Formül 3.2 ve 3.3 kullanılmıştır.

3.2.5.4. İn Vitro Salım Deneyleri

Kitosan, kitosan-PEG, PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinden PBN’in in vitro ortamdaki salım profilinin incelenebilmesi için, salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Boş ve etkin madde yüklü nanopartiküllerde salım deneyi, 37 °C’de ve yatay çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı olarak

pH 7,4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) kullanılmıştır. Etkin madde ile yapılan sink koşulu denemelerinde, salım ortamının hacminin 2 mL olması uygun görülmüştür. 37 °C’de su banyolu yatay çalkalayıcıda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılan ependorf tüplerden her biri belirli örnek alma aralıklarıyla (0. dk, 30. dk, 1. sa, 2. sa, 4. sa, 8. sa, 12. sa, 24. sa) alınarak 10 000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant hacminin 1/9’u kadar etanol ilave edilmiştir ve 0,22 µm por açıklığına sahip enjektör filtresinden süzülerek, Bölüm 3.2.2’de “*PBN’in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*” başlığı altında anlatılan HPLC yöntemi ile nanopartikül formülasyonundan salınan etkin madde miktarı tayin edilmiştir.

3.2.6. Ex Vivo Hayvan Deneylerinin Yapılışı

3.2.6.1. Dokudaki Lipit Peroksitlerin Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Aracılığı ile Tayin Edilmesi

Karaciğer doku homojenatından, tiyobarbitürik asit (TBA)- reaktif substansları, Ohkawa ve diğ. tarafından oluşturulmuş köklü bir metoda göre ölçülmüştür. Tiyobarbitürik asit reaktif substanslar (TBARS) malondialdehit cinsinden (nmol/0,1 g protein) ifade edilmiştir ve 1,1,3,3 tetrametoksipropan (TEP) eksternal standart olarak kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında üç farklı deney grubu üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bunlar, sağlıklı (kontrol grubu), akut karaciğer toksisitesi oluşturulmuş ve bu toksitenin tedavi edilmesi üzerine PBN verilmiş olmak üzere üç gruptur. Bu gruplar arasında serbest radikallerin miktarının aşırı miktarda artmasıyla oluşan lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit düzeyleri tayin edilmiştir. PBN’in lipid peroksidasyonu, dolayısıyla lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit seviyesini önemli ölçüde düşürmesi hedeflenmiştir. Arada anlamlı farkların bulunması, oluşturulan deney modelinin, ilerleyen çalışmalarda, formülasyonların etkinliklerinin tayininde sağlıklı bir şekilde kullanılmasını sağlayacaktır. Deney gruplarından birincisini sağlıklı swiss albino fareler oluşturmaktadır. İkinci grup, karbontetraklorür ile akut karaciğer toksisitesi oluşturulmuş hasta grup, üçüncü ise,

PBN'in lipit peroksidasyonu azalttığını göstermeyi amaçladığımız, karbontetraklorür ve PBN verilen (100 mg/kg) gruptur. Deney protokolü Etik Kurul izni ile onaylanmıştır. PBN'in intraperitoneal yolla ve karbontetraklorürden 30 dk önce uygulanmıştır. Akut toksisite oluşturmak amacıyla swiss albino farelere 0,5 mL/kg karbontetraklorür iv yolla verilmiştir. 24 saat sonunda, ketamin ile anestezi uygulanan farelerin cerrahi bir işlemle, karaciğerleri çıkarılmıştır. Karaciğer dokusunun 150 mM KCl içeren 25 mM TRİS pH 7.0 içerisinde % 10'luk doku homojenatı hazırlanmıştır. Doku homojenatından 0,5 mL alınmıştır. 3 mL % 1'lik fosforik asit (H₃PO₄) eklenip, 30 saniye vortekslenmiştir, daha sonra 1 mL % 0,67'lik tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi eklenmiştir. 30 saniye vorteksleme işleminden sonra, 45-60 dakika kaynatılmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra, ekstarksiyon amacıyla, 4 mL n-butanol eklenmiştir. Vortekste en az 2000 rpm'de 2 dk ekstraksiyon yapılmıştır. 7000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra, üstteki pembe renkli butanol fazı alınıp spektrofotometrede butanole karşı 532 nm'de ölçüm yapılmıştır. Standart olarak 1,1,3,3 tetrametoksipropan kullanılmıştır. Tayin edilen malondialdehit miktarının dokudaki protein miktarı üzerinden ifade edilebilmesi için, Bikinkoninik Asit Protein Tayini (BCA) kiti ile protein miktarı tayin edilmiştir.

3.2.6.2. Bikinkoninik Asit (BCA) Kiti ile Protein Miktar Tayini

Tayin için BCA kiti içinde yer alan BSA (2mg/mL) standartı kullanılarak dilüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonlar Tablo 3.6'da gösterilmiştir. Çalışmada dilüent olarak % 0,9'luk sodyum klorür çözeltisi kullanılmıştır. Bunun paralelinde çalışma ajanı hazırlanmıştır. Çalışma ajanı 50:1 oranında ajan A:ajan B'nin karıştırılması ile elde edilmiştir. Ajan A: sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, bikinkoninik asit ve sodyum tartaratın 0.1 M sodyum hidroksit içindeki çözeltisidir. Ajan B ise: % 4'lük bakır sülfat çözeltisidir.

Tablo 3.6. Dilüe BSA standartlarının hazırlanması

	Dilüent hacmi (μL)	BSA kaynağı hacmi (μL)	BSA konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)
A	125	375 (2mg/mL)	1500
B	325	325 (2mg/mL)	1000
C	175	175 (A şişesinden)	750
D	325	325 (B şişesinden)	500
E	325	325 (D şişesinden)	250
F	325	325 (E şişesinden)	125
G	400	100 (F şişesinden)	25
H	200	200 (G şişesinden)	12,5
I	160	240 (H şişesinden)	7,5
İ	400	0	0 (Boş=blank)

Tablo 3.6’da ifade edildiği şekilde hazırlanan dilüe BSA standartlarından ve miktar tayini örneklerinden 100 μL kapaklı tüplere ilave edilmiştir. Daha sonra bu tüplerin her birine 2000 μL çalışma ajanı ilave edilmiş, karıştırılmış ve iyi bir şekilde kapatılarak sıcaklığı 37 °C olan su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Tüplerin oda sıcaklığına gelmesinin ardından, UV-spektrofotometre kullanılarak hızlı bir şekilde 562 nm’de absorbans değerleri okunmuştur.

Elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alınmış ve bu değerlerden boşun (=blank) absorbans ortalama değeri çıkarılmıştır. Bu işlemler sonucunda elde edilen absorbans değerlerine karşı standartların konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir.

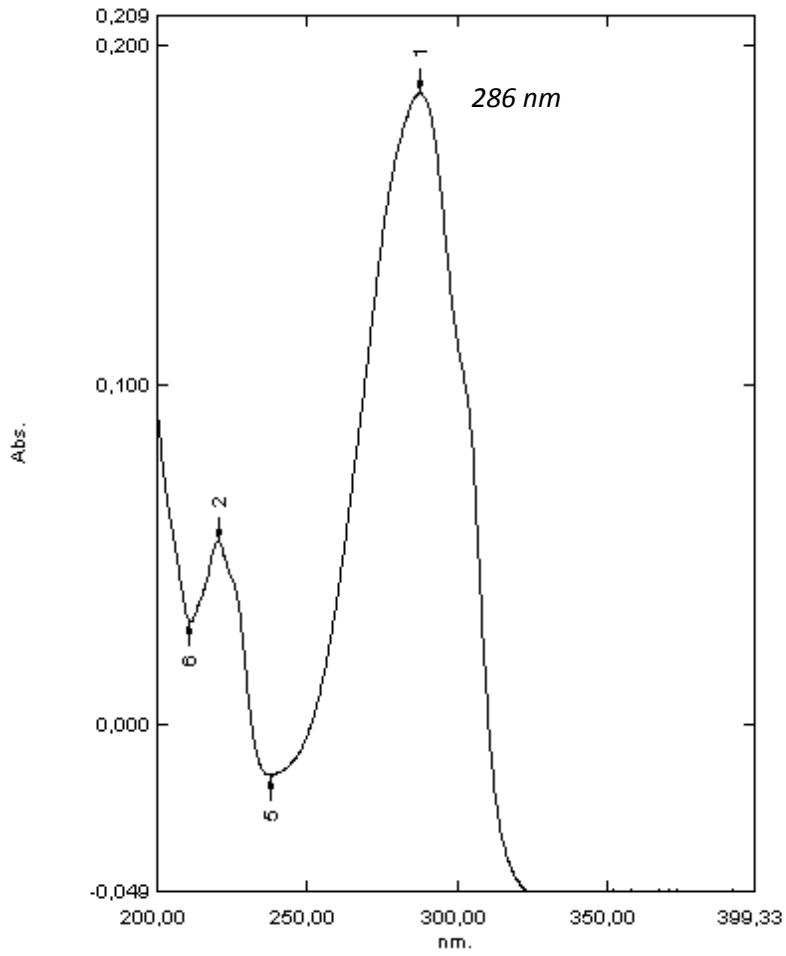
Kalibrasyon doğrusu kullanılarak % 0,9’luk NaCl çözeltisi içinde, 1:10 (a/h) oranında homojenatı hazırlanan karaciğer dokusunun içerdiği protein miktarı tespit edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. PBN'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.1.1. UV Spektrumu

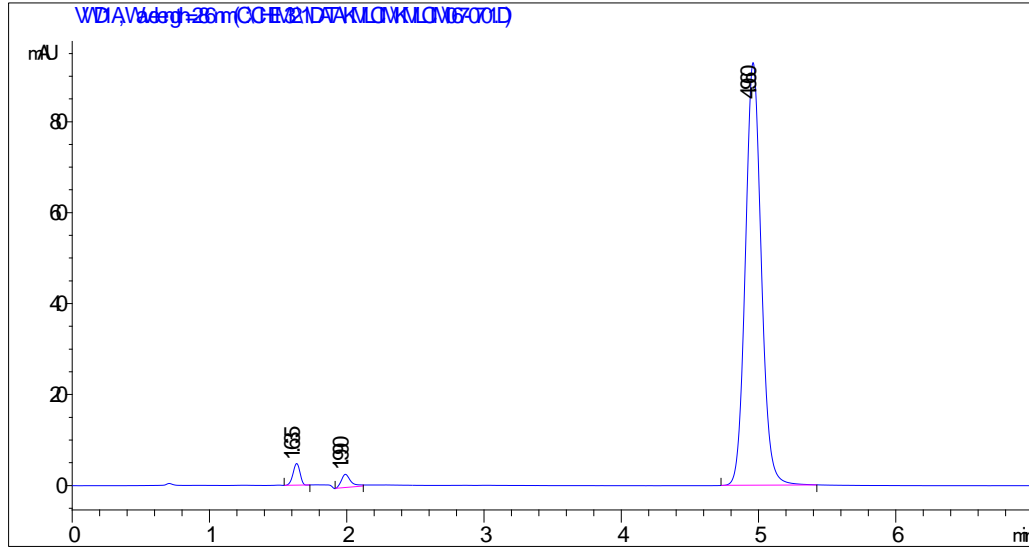
PBN'in etanol:su [1:9 (h/h)] içinde hazırlanan çözeltisinin UV spektrumu Bölüm 3.2.1.1'de belirtildiği şekilde ölçülmüştür. Bu çözücü içinde PBN'e ait maksimum absorbanın (λ_{maks}) gözlemlendiği dalga boyu 286 nm olup UV spektrumu Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. PBN'in etanol:su [1:9 (h/h)]'da 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu.

4.2. PBN'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

PBN'in HPLC ile miktar tayini Bölüm 3.2.2'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş ve PBN'e ait aşağıdaki pik elde edilmiştir (Şekil 4.2). Kromatogramdan da görüldüğü gibi PBN'e ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş ve alıkonma zamanı 5 dakika olarak bulunmuştur.



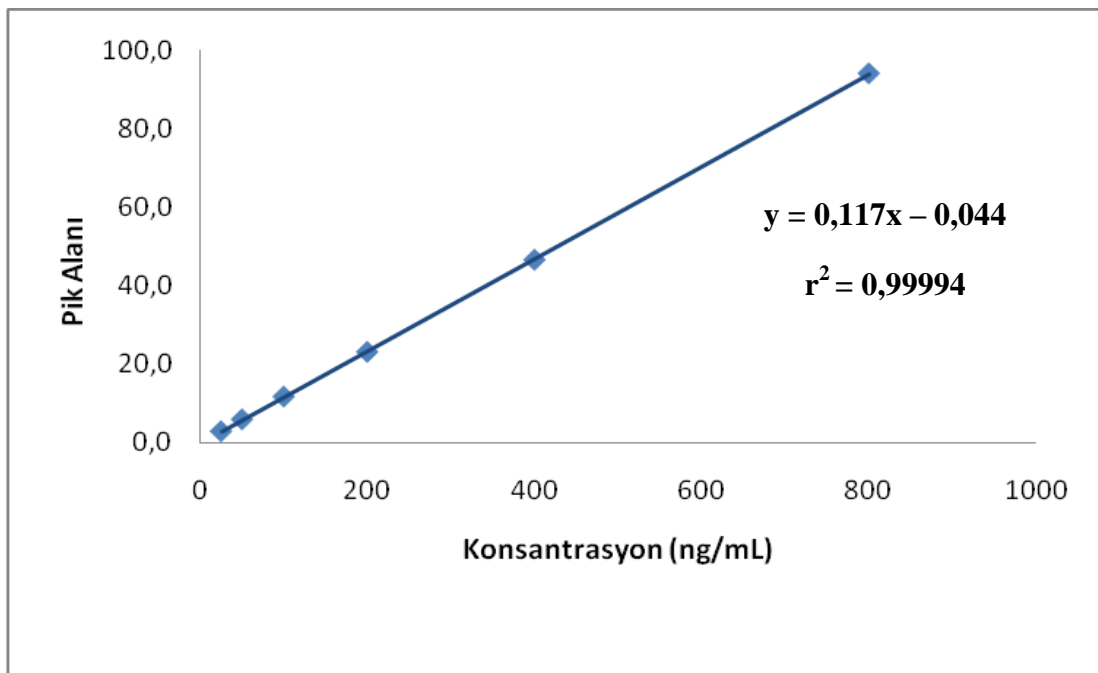
Şekil 4.2. PBN'e (100 ng.mL^{-1}) ait HPLC kromatogramı.

4.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

PBN'e ait kalibrasyon doğrusu HPLC analizleri sonucunda Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan ve her birinde 25, 50, 100, 200, 400, 800 ng.mL^{-1} konsantrasyonda PBN olan çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmalar 6 seri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonundan sonra elde edilen pik alanları çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile bulunmuştur. PBN'in HPLC ile miktar tayininde lineer regresyon verileri Tablo 4.1'de gösterilmekte olup, kalibrasyon doğrusu ve denklemi ise Şekil 4.3'te yer almaktadır.

Tablo 4.1. PBN'in HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=6).

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon aralığı	25 – 800 ng.mL ⁻¹
Eğim	0,117
İntersept	0,044
Korelasyon katsayısı (r ²)	0,99994



Şekil 4.3. PBN'in kalibrasyon doğrusu ve denklemi

4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

4.2.2.1. Doğrusallık

Kalibrasyon doğruları Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda 25, 50, 100, 200, 400, 800 ng.mL⁻¹ konsantrasyondaki standart çözeltilerin HPLC analizi yapılmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplanmış ve doğru denklemini elde

edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı $r^2 = 0,99994$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir (Şekil 4.3).

4.2.2.2. Doğruluk

PBN'in miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneyler arası (günler arası; inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesi için yapılan deneyler Bölüm 3.2.2.2.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney içi ve deneyler arası doğruluğun tespiti için yapılan deneyleri takiben Formül 3.1 kullanılarak doğruluk bulguları elde edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Deney içi ve deneyler arası doğruluk.

	İlave edilen Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Hesaplanan Konsantrasyon (ng.mL ⁻¹)	Doğruluk ^a
Gün İçi^b	25	25,011	0,044
	200	198,695	0,652
	800	797,317	0,335
Günler Arası^b	25	25,703	1,98
	200	197,725	1,137
	800	801,546	0,193

^a Bağıl Hata (%)

^b Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için n = 6

4.2.2.3. Kesinlik

4.2.2.3.1. Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.2.2.2.3'de açıklandığı gibi, kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 25, 200, 800 ng.mL⁻¹) standart çözeltiler

hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için VK değerleri hesaplanmıştır. VK'nın % 2'den küçük olması yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Tekrarlanabilirlik sonuçları.

Konsantrasyon	Pik Alanı	Konsantrasyon	X ± SS	VK (%)
25 ng.mL ⁻¹	2,951	25,558	25,703 ± 0,209	0,814
	2,992	25,91		
	2,956	25,595		
	2,984	25,839		
	2,992	25,904		
	2,934	25,412		
200 ng.mL ⁻¹	23,005	196,67	197,725 ± 1,65	0,835
	22,980	196,453		
	22,884	195,635		
	23,312	199,284		
	23,280	199,012		
	23,313	199,298		
800 ng.mL ⁻¹	93,769	800,45	801,546 ± 0,987	0,123
	93,927	801,802		
	93,867	801,29		
	93,909	801,645		
	94,010	803,276		
	93,811	800,812		

4.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

PBN'in miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneyler arası (günler arası; inter-assay) kesinliğin değerlendirilmesi için yapılan deneyler Bölüm 3.2.2.2.3.2'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. VK'nın % 2'den küçük bir değere sahip olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

Tablo 4.4. Gün içi ve günler arası kesinlik.

	İlave edilen kons. ng.mL ⁻¹	Hesaplanan Kons. ng.mL ⁻¹	Kesinlik ^a
Gün içi^b	25	25,011 ± 0,345	1,38
	200	198,695 ± 0,286	0,144
	800	797,317 ± 0,187	0,023
Günler arası^b	25	25,83 ± 0,287	1,11
	200	197,836 ± 0,165	0,08
	800	802,11 ± 0,11	0,014

^a Varyasyon katsayısı (%)

^b Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için n = 6

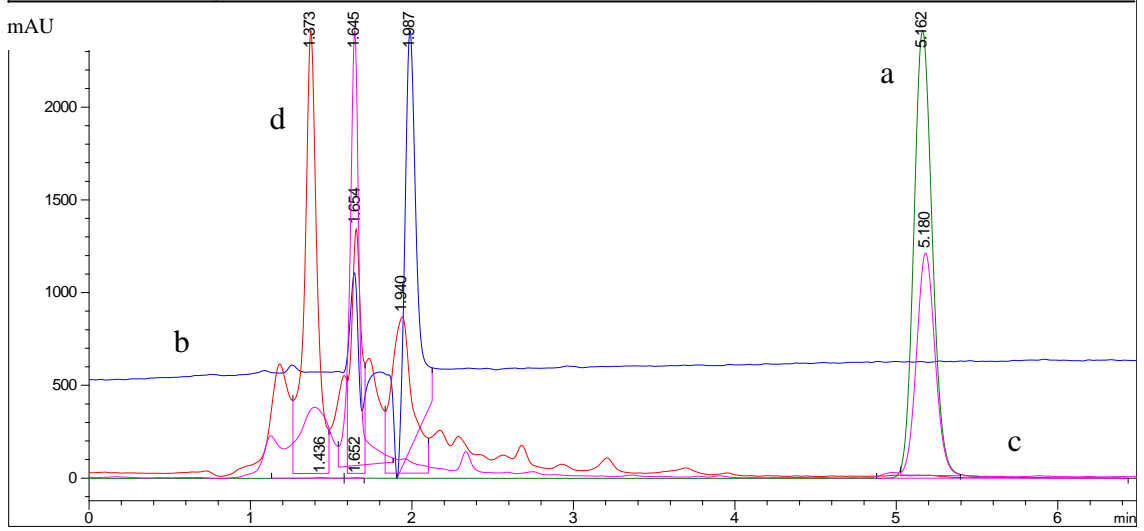
4.2.2.4. Duyarlılık

PBN'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan yöntemin duyarlılığı Bölüm 3.2.2.2.4'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup miktar tayin sınırı 6,86 ng.mL⁻¹ ve saptama sınırı 2,06 ng.mL⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

4.2.2.5. Özgüllük

Bölüm 3.2.3'te açıklandığı şekilde, hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin etkin madde ile aynı kromatografik şartlarda pik verip vermediğinin belirlenmesi için HPLC kromatogramları alınmıştır. Aynı amaçla, ilaç yükleme ve in vitro salım

çalışmalarında etkin madde yüklü nanopartiküllere uygulanan işlemler, boş nanopartikül formülasyonlarına da uygulanarak HPLC kromatogramları elde edilmiştir.



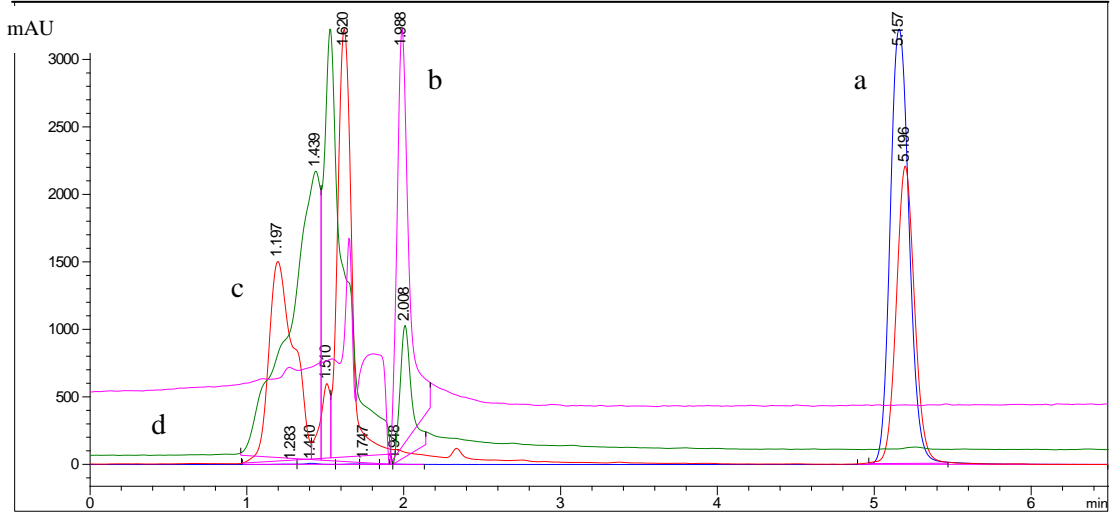
Şekil 4.4. Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, kitosan nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları.

a: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen PBN yüklü kitosan NP'lere ait

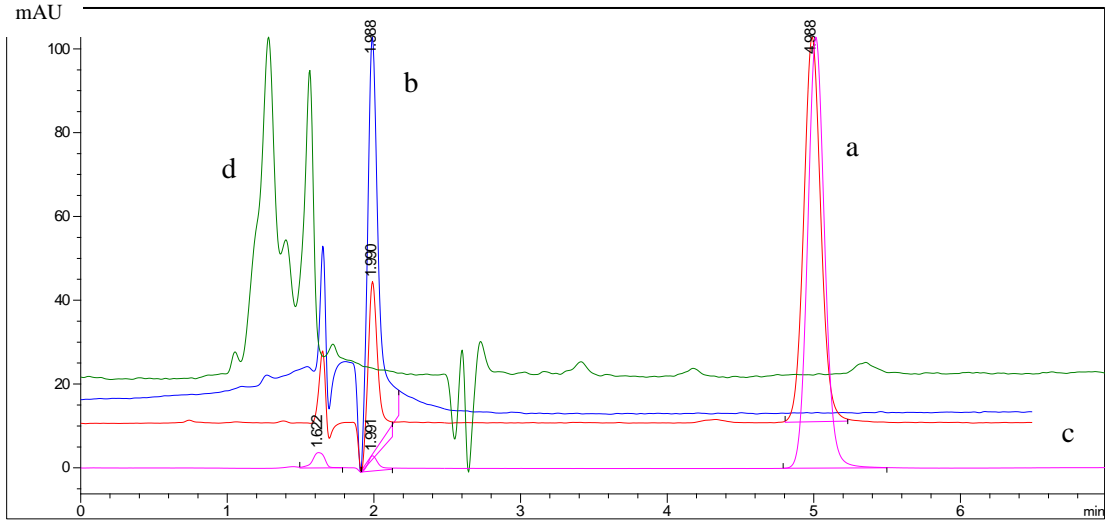
b: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen boş kitosan NP'lere ait

c: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen PBN yüklü kitosan NP'lere ait

d: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen boş kitosan NP'lere ait HPLC kromatogramları.



Şekil 4.5. Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, kitosan-PEG nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları.
a: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen PBN yüklü kitosan-PEG NP'lere ait
b: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen boş kitosan-PEG NP'lere ait
c: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen PBN yüklü kitosan-PEG NP'lere ait
d: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen boş kitosan-PEG NP'lere ait HPLC kromatogramları.



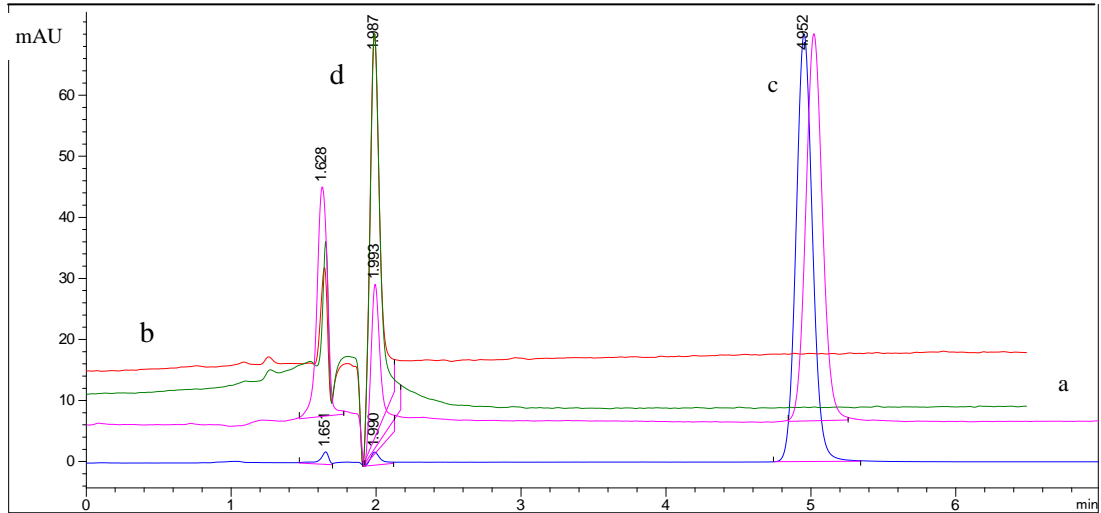
Şekil 4.6. Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, PLGA nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları.

a: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen PBN yüklü PLGA NP'lere ait

b: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen boş PLGA NP'lere ait

c: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen PBN yüklü PLGA NP'lere ait

d: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen boş PLGA NP'lere ait HPLC kromatogramları.



Şekil 4.7. Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş, PLGA-PEG nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları.
a: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen PBN yüklü PLGA-PEG NP'lere ait
b: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen boş PLGA-PEG NP'lere ait
c: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen PBN yüklü PLGA-PEG NP'lere ait
d: İn vitro salım çalışmalarında elde edilen boş PLGA-PEG NP'lere ait HPLC kromatogramları.

4.2.2.6. Stabilite

Analiz süresi boyunca (24 saat) PBN'in 400 ng.mL^{-1} konsantrasyonda (PBS pH 7,4 ortamdaki) hazırlanan çözeltisi $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. 24 saat sonunda HPLC ile analiz edildiğinde, elde edilen sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir.

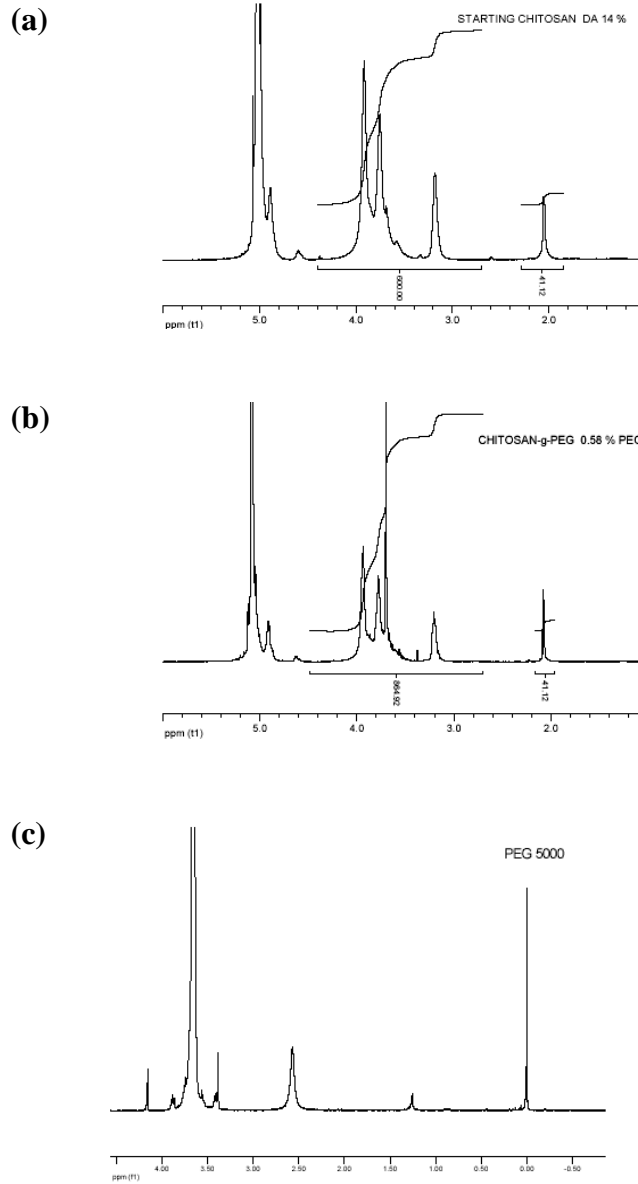
Tablo 4.5. PBN'in stabilite sonuçları.

Ölçüm Zamanı (saat)	Konsantrasyon (ng.mL^{-1})	Hesaplanan Konsantrasyon ($\text{X} \pm \text{SS}$)	Geri Kazanım (%)	VK (%)
0	400	$398,6 \pm 1,23$	100	0,308
24	400	$392,65 \pm 4,77$	98,5	1,215

4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.3.1. Kitosan ve KS-PEG in Karakterizasyonu

Şekil 4.8’de kitosanın, KS-PEG’in ve PEG’in tek başına halindeki NMR spektrumları gösterilmektedir.



Şekil 4.8. KS ve KS-PEG polimerlerine ve ayrıca PEG molekülüne ait NMR spektrumları. (a) Kitosanın $^1\text{H-NMR}$ spektrumu; (b) KS-PEG’in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu; (c) PEG’in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

4.3.2. Polimer ve Etkin Madde Konsantrasyonunun Nanopartiküllerin Fizikokimyasal ve Yükleme Etkinliği Üzerindeki Etkisi

4.3.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

0,5 mg.mL⁻¹ ve 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda PBN içeren kitosan ve kitosan-PEG nanopartiküllerinin partikül boyutları, zeta potansiyelleri, yükleme etkinlikleri (% YE) ve yüklenen miktarlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

10 mg ve 20 mg PBN yüklü PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin partikül boyutları, zeta potansiyelleri, yükleme etkinlikleri, yükleme kapasiteleri ve yüklenen miktarlar ise Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Değişen konsantrasyonlarda etkin madde içeren kitosan ve kitosan-PEG nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri.

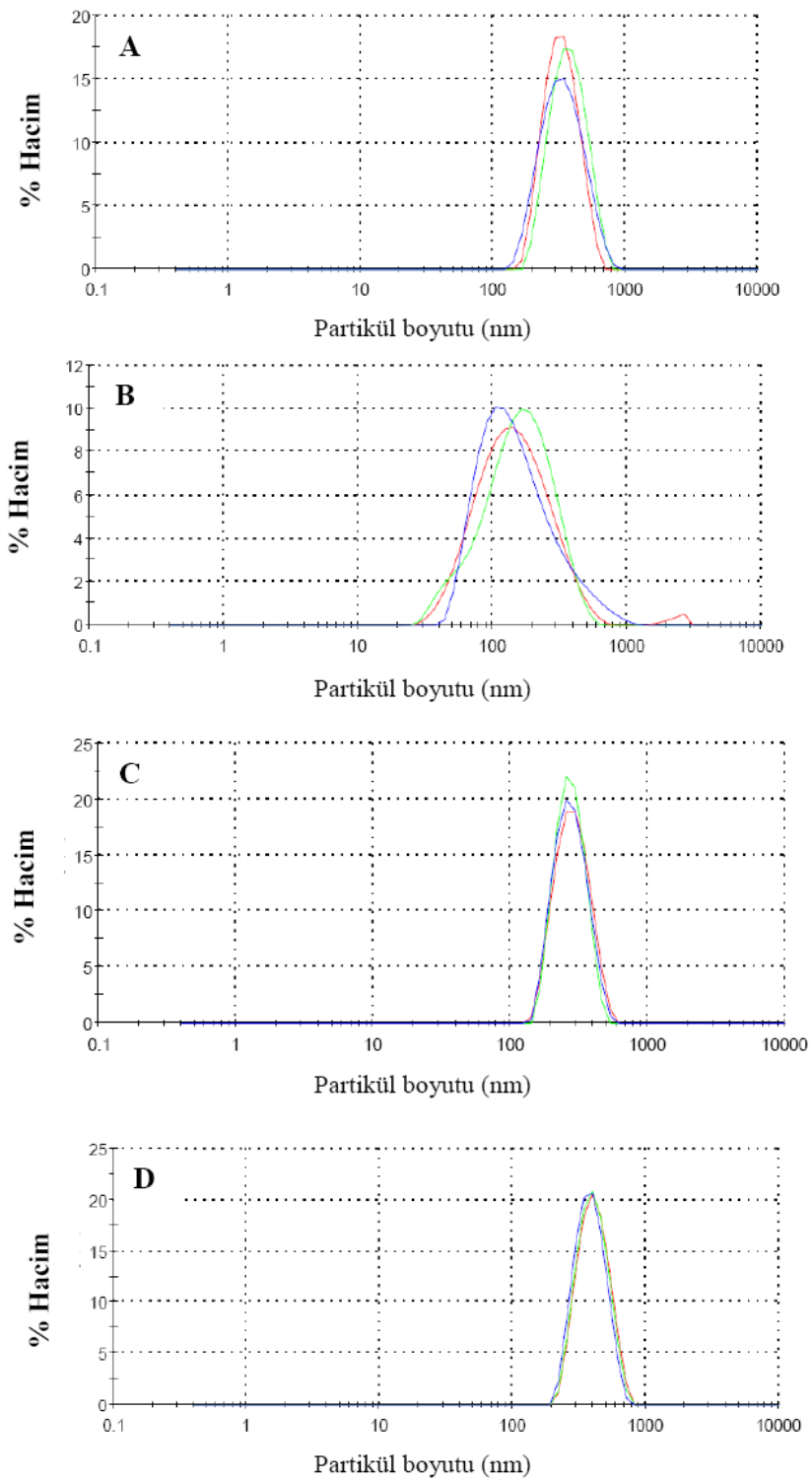
Formülasyon	Partikül Boyutu (nm)	PDI*	Zeta Potansiyeli (mV)
Kitosan (Boş) NP	319,6 ± 18,13	0,19	38,7 ± 7,6
Kitosan-PEG (Boş) NP	142,4 ± 13,49	0,281	17,5 ± 1,1
Kitosan (0,5 mg/mL PBN yüklü) NP	340 ± 19	0,3	20,2 ± 0,9
Kitosan (1 mg/ml PBN yüklü) NP	356,4 ± 4,19	0,32	18,6 ± 3,5
Kitosan-PEG (0,5 mg/ml PBN yüklü) NP	265,6 ± 10,54	0,434	25,9 ± 0,436
Kitosan-PEG (1 mg/ml PBN yüklü) NP	208,8 ± 1,153	0,424	23,45 ± 0,493

* PDI: Polidispersite indeksi

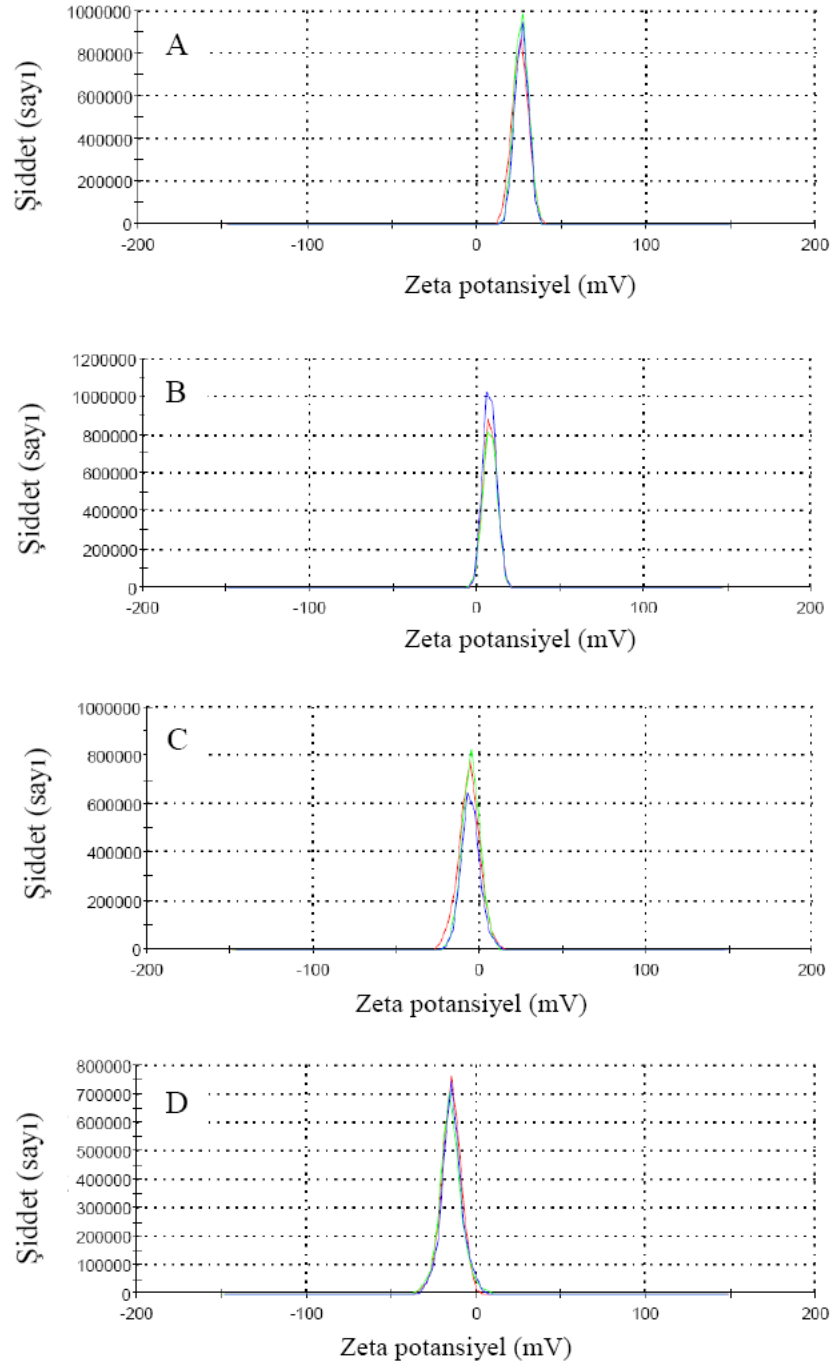
Tablo 4.7. Değişen konsantrasyonlarda etkin madde içeren PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri.

Formülasyon	Partikül Boyutu (nm)	PDI*	Zeta Potansiyeli (mV)
PLGA (Boş) NP	269,6 ± 6,42	0,09	-18,4 ± 2,86
PLGA-PEG (Boş) NP	271,1 ± 4,88	0,051	-14,4 ± 0,53
PLGA (10 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon öncesi)</i>	279,06 ± 5,717	0,063	-7,9 ± 3,2
PLGA (20 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon öncesi)</i>	285,6 ± 3,93	0,075	-15,4 ± 3,8
PLGA (10 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon sonrası)</i>	318,4 ± 10,87	0,191	-14,7 ± 0,36
PLGA (20 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon sonrası)</i>	303,1 ± 15,54	0,197	-16,3 ± 0,3
PLGA-PEG (10 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon öncesi)</i>	278,2 ± 2,177	0,07	-12,9 ± 0,34
PLGA-PEG (20 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon öncesi)</i>	290,0 ± 2,1	0,09	-11,9 ± 0,47
PLGA-PEG (10 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon sonrası)</i>	293,6 ± 6,03	0,11	-13,3 ± 1,03
PLGA-PEG (20 mg PBN yüklü) NP <i>(liyofilizasyon sonrası)</i>	301,8 ± 2,82	0,098	-14,0 ± 0,7

* PDI: Polidispersite indeksi



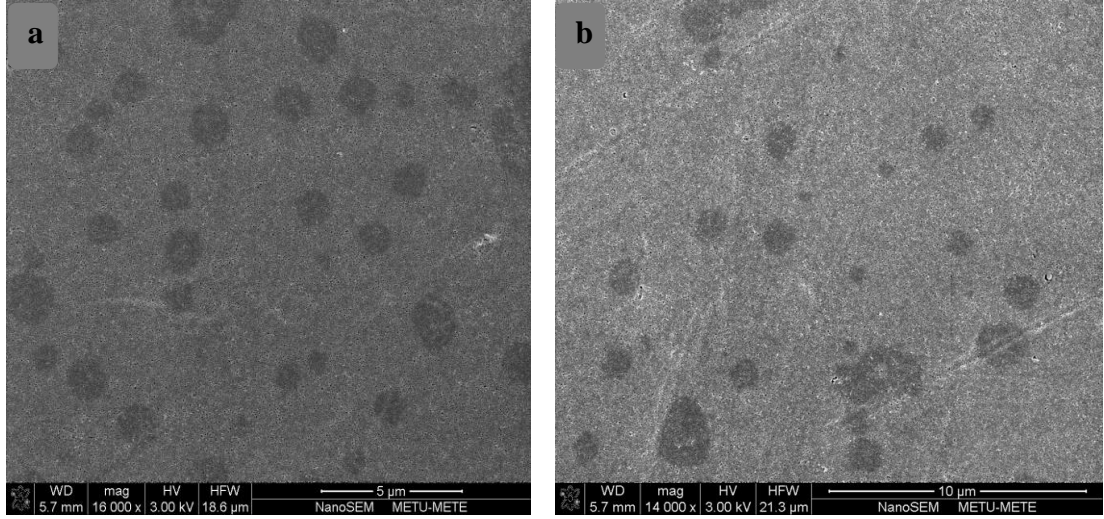
Şekil 4.9. (A) Boş kitosan (B) Boş KS-PEG (C) Boş PLGA (D) Boş PLGA-PEG nanopartiküllerine ait partikül boyutu dağılım grafikleri.



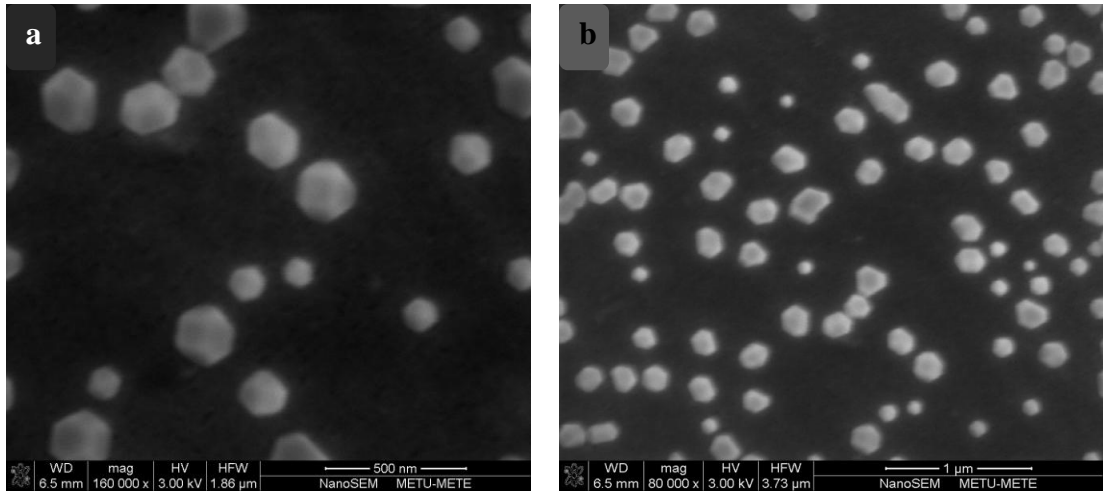
Şekil 4.10. (A) Boş kitosan (B) Boş KS-PEG (C) Boş PLGA (D) Boş PLGA-PEG nanopartiküllerine ait zeta potansiyel dağılım grafikleri.

4.3.2.2. Morfolojik Özelliklere Ait Bulgular

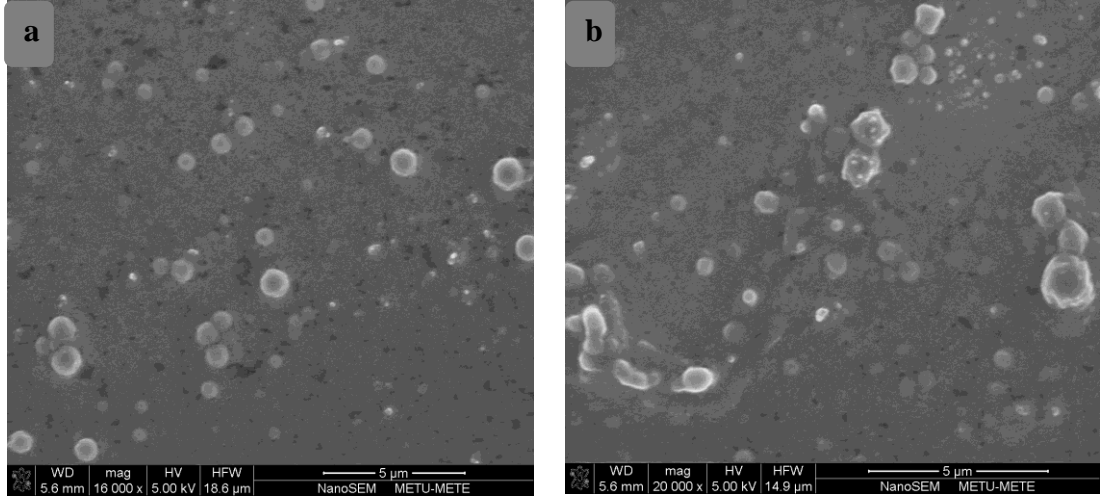
Kitosan, KS-PEG, PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri Bölüm 3.2.5.2’te anlatıldığı gibi, SEM yöntemiyle incelenmiştir. Nanopartiküllere ait görüntüler, Şekil 4.11 – 4.14’te verilmiştir.



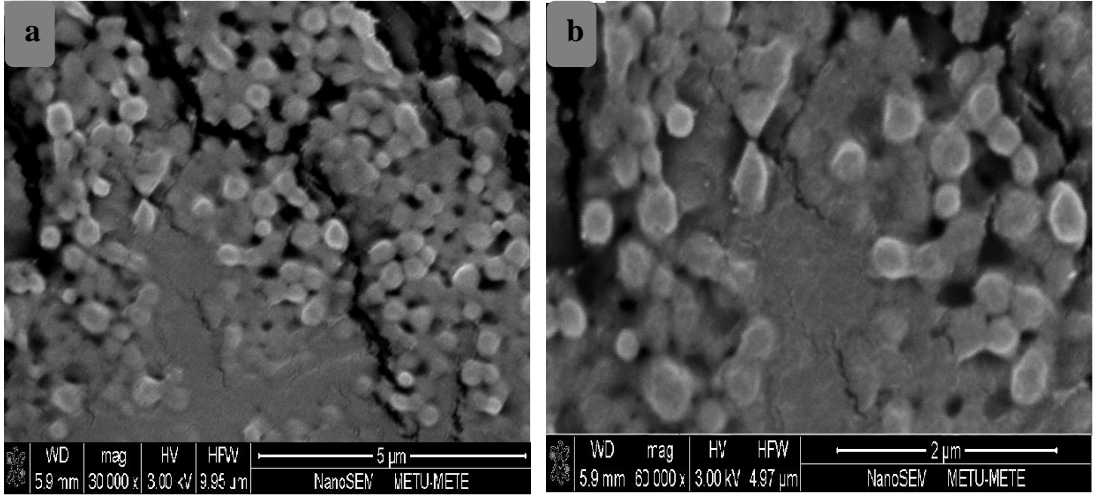
Şekil 4.11. Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) KS nanopartiküllerine ait SEM görüntüsü.



Şekil 4.12. Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) KS-PEG nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.



Şekil 4.13. Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) PLGA nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.



Şekil 4.14. Etkin madde içermeyen (a) ve etkin madde içeren (b) PLGA-PEG nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.

4.3.2.3. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

Bölüm 3.2.5.3'te "*Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi*" başlığı altında anlatıldığı şekilde, KS, KS-PEG, PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine yüklenen PBN miktarı tayin edilmiştir. Yükleme etkinliği, yükleme kapasitesi ve yüklenen miktarlara ilişkin elde edilen sonuçlar, Tablo 4.8 ve 4.9'da özetlenmektedir.

Tablo 4.8. KS ve KS-PEG nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları.

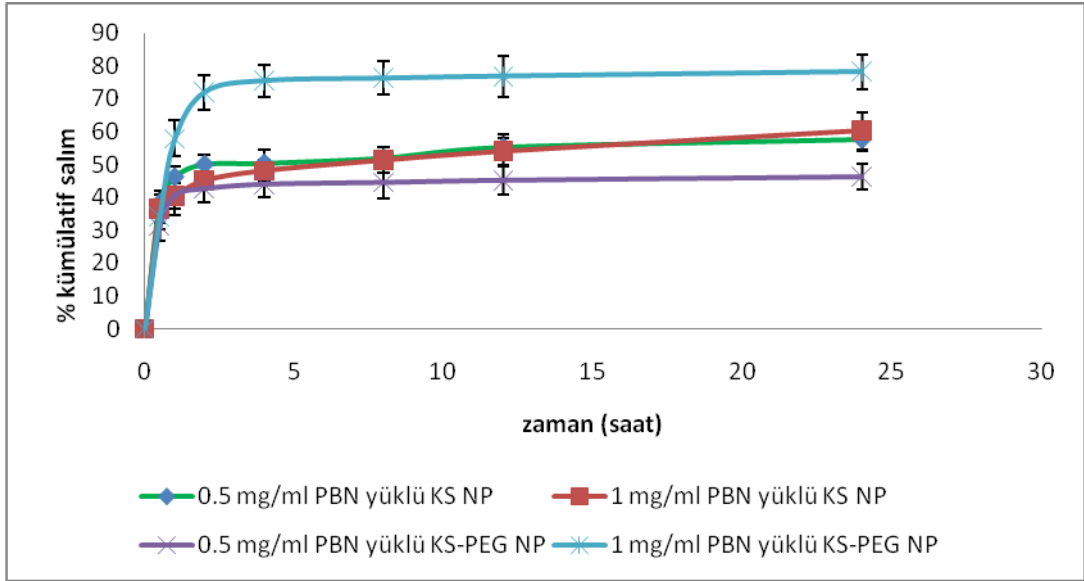
Formülasyon	Yükleme Etkinlikleri (% YE)	Yüklenen Miktar (μ g)	Yükleme Kapasitesi (%)
Kitosan (Boş) NP	-	-	-
Kitosan-PEG (Boş) NP	-	-	-
Kitosan (0,5 mg/mL PBN yüklü) NP	32,67 \pm 2,3	326,7	16,5 \pm 0,2
Kitosan (1 mg/mL PBN yüklü) NP	44,65 \pm 2,8	1106,87	55,9 \pm 0,3
Kitosan-PEG (0,5 mg/mL PBN yüklü) NP	53,26 \pm 1,8	1065,25	29,91 \pm 0,11
Kitosan-PEG (1 mg/ml PBN yüklü) NP	24 \pm 3,3	1680	47,19 \pm 0,35

Tablo 4.9. PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları.

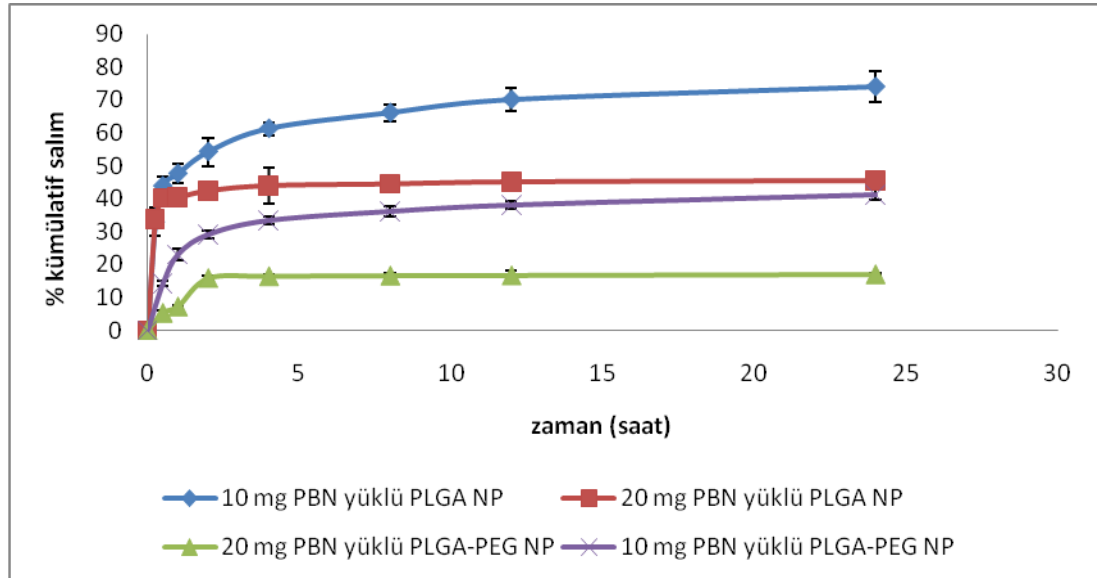
Formülasyon	Yükleme Etkinliği (% YE)	Yüklenen Miktar (mg)	Yükleme Kapasitesi (%)
PLGA (Boş) NP	-	-	-
PLGA-PEG (Boş) NP	-	-	-
PLGA (10 mg PBN yüklü) NP (<i>liyofilizasyon öncesi</i>)	52,3 \pm 2,4	5,23	34,36 \pm 0,28
PLGA (20 mg PBN yüklü) NP (<i>liyofilizasyon öncesi</i>)	54 \pm 3,1	10,815	68,40 \pm 0,29
PLGA-PEG (10 mg PBN yüklü) NP (<i>liyofilizasyon öncesi</i>)	12,7 \pm 1,6	1,27	9,26 \pm 0,22
PLGA-PEG (20 mg PBN yüklü) NP (<i>liyofilizasyon öncesi</i>)	21,21 \pm 2,2	4,242	29,24 \pm 0,24

4.3.2.4. İn Vitro Salım Çalışmaları

İN vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.5'te "*İN Vitro Salım Deneyleri*" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım miktarının gösterildiği grafik Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.15. 0,5 mg.mL⁻¹ ve 1 mg.mL⁻¹ dozlarda PBN yüklü kitosan (KS) ve kitosan-PEG nanopartiküllerinin(KS-PEG NP) in vitro salım profilleri (n=3).



Şekil 4.16. 10 mg ve 20 mg dozlarda PBN yüklü PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin in vitro salım profilleri (n=3).

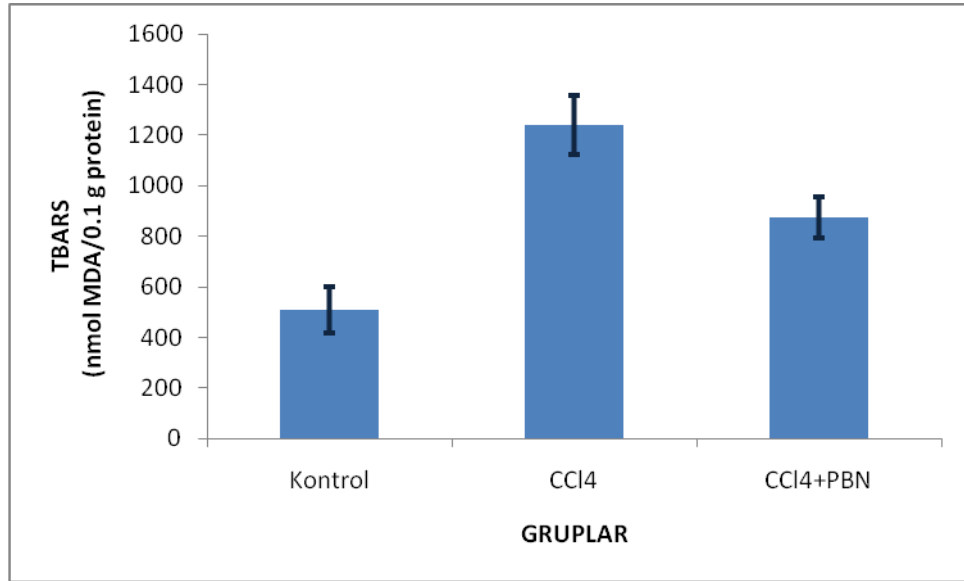
4.4. Ex Vivo Hayvan Deneylerine ait Bulgular

4.4.1. Dokudaki Lipit Peroksitlerin Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Aracılığı ile Tayin Edilmesi

Bölüm 3.2.6.1’de altında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen deneyler sonucunda, deney gruplarına ait tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin malondialdehit cinsinden (nmol MDA/0,1 g protein) tayin edilmesi sonucunda elde edilen bulgular, Tablo 4.10’da verilmiştir. Deney grupları arasındaki TBARS düzeylerinin değişimi Şekil 4.17’de verilmiştir.

Tablo 4.10. Deney gruplarına ait TBARS düzeyleri

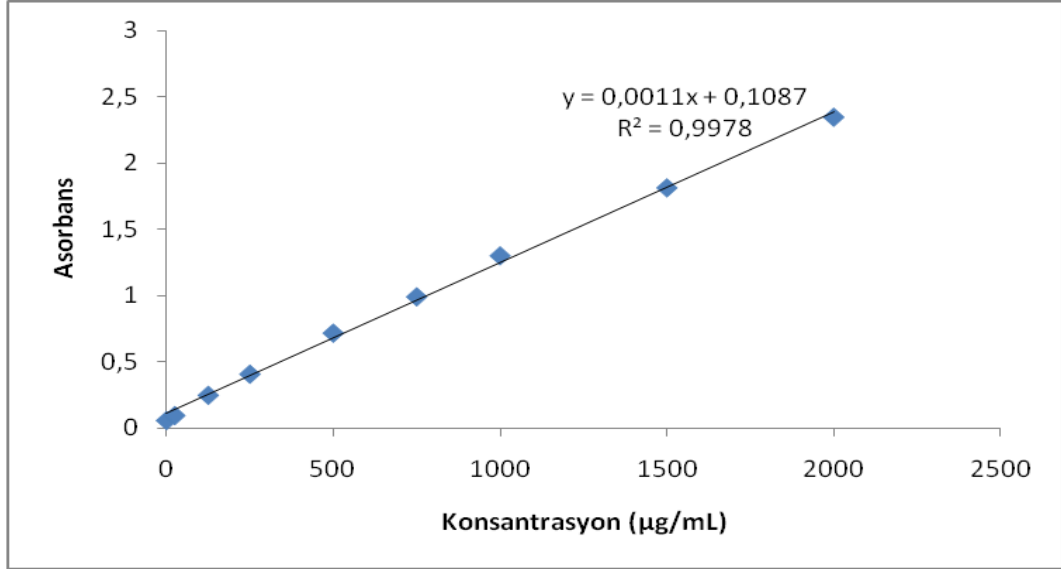
	Deney Grupları		
	Kontrol	CCl ₄ (0,5 ml/kg)	CCl ₄ + PBN
TBARS düzeyi (nmol MDA/0,1 g protein)	509,18 ± 92	1239,76 ± 117	764,19 ± 81,8



Şekil 4.17. Kontrol grubu, CCl₄ verilen grup ve CCl₄ + PBN verilen gruplar arasındaki TBARS (nmol MDA/0,1 g protein) seviyelerinin değişimi.

4.4.2. Bikinkoninik Asit (BCA) Kiti ile Protein Miktar Tayini

Bölüm 3.2.6.2’de anlatıldığı şekilde BCA protein analiz kitleri ile gerçekleştirilen, dokudan protein miktar tayinine ait kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi Şekil 4.17’de verilmiştir. Her bir analizde, BCA kitleri kullanılarak karaciğer dokusundan tayin edilen protein miktarı, okunan absorbans değerinin doğru denkleminde yerine konulması ile tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. BCA tayini kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6).

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasında etkin madde olarak kullanılan PBN, iskemide iki tedavi yaklaşımından biri olan nöroproteksiyonun sağlanmasında, etkili bir serbest radikal temizleyici ajandır. Organizmada normal şartlarda da var olan ancak, bazı stres koşullarında miktarı artan, akabinde de lipidlerin peroksidasyonuna, proteinlerin oksidasyonuna, DNA hasarına ve hücre ölümüne neden olan serbest radikallerin, nitron bileşikleri ile reaksiyona girip onları daha stabil ürünlere dönüştürmesi iskemik kaskadın önemli yolaklarını bloke edeceği için hücre ölümü önlenmiş olur.

PBN'in ve üzerinde faz çalışmaları devam eden diğer nitron bileşiklerinin klinikte kullanımını kısıtlayan bazı durumlar mevcuttur. PBN'in antioksidan etkisi ve farmakokinetik özellikleri ile farelerde gösterilmiştir. Butil hidroksi toluen (BHT) ile karşılaştırıldığında PBN'in total plazma klerensi daha düşük, $12,37 \pm 3,82 \text{ mL.dk}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ve yarı ömrü $2,01 \pm 0,35$ saat olarak bulunmuştur. BHT de ise 12 dakikalık bir plazma yarı ömrü ve $200 \text{ mL.dk}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ lik bir total plazma klerensi söz konusudur. Ayrıca PBN'in metaboliti olan α -hidroksifenil-N-tert-butil nitron (HOPBN) de ana ilaç gibi antioksidan özelliktedir. İnsanda henüz bu verileri doğrulayacak çalışma yapılmamıştır, bunun da nedeni PBN'in in vivo stabilitesinin çok düşük olmasıdır. Tüm bunların yanı sıra PBN'in etkin nöroprotektif özelliği ve farmakolojik özellikleri klinikte potansiyel kullanım için umut vaat etmektedir (206-207) . Bu nedenle daha önce yapılan bir çalışmada (29) , PBN'in parenteral yolla verildiği zaman in vivo stabilitesini arttırmak amacıyla, PEG'lenmiş kitosan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller 97 – 320 nm arasında ve zeta potansiyeli 9 – 33 mV arasındadır. Bu çalışmada nanopartikül boyutuna bağlı olarak, PBN'in salım profilinin değiştiği gösterilmiştir. PEG'lenmiş kitosan kullanılmasının amacı da, plazmada opsonizasyonu engellemektir. Bu konuda yapılan ilk çalışmada yükleme etkinliği % 13,46 – 18,8 arasında, yükleme kapasitesi ise % 0,003 – 0,006 arasında bulunmuştur. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında, daha önce yapılan formülasyonların geliştirilmesi artırılması ve in vivo hayvan deneyleri için terapötik dozda etkin madde içeren nanopartiküllerin hazırlanması amaçlanmıştır.

Kontrollü salım sağlayan sistemler, tedavi sürecinde istenmeyen yan etkilerin görölme sıklığını azaltır, hastaların tedaviye olan uyuncunu artırır ve dolayısıyla yaşaam kaliteleri artmış olur. Tüm bunların sağlanabilmesi için, etkin maddenin terapötik etki yerini tanıyabilecek ve oraya ulaşabilecek miktarının kan dolaşımında bulunması gerekir. Ancak, retiküloendoteliyal sistem olarak da bilinen, mononükleer fagositik sistem tarafından ilaç taşıyıcı sistemlerin kan dolaşımından temizlenmesi nanopartiküler sistemlerin amaçlanan hedeflerini gerçekleştirmesini kısıtlayan en önemli sorundur. Nanopartikülleri maskeleyerek ya da kamufle ederek, kan dolaşımındaki yarı ömürlerini arttırmak amacıyla bir çok yöntem denenmiştir. En çok tercih edilen yöntem, nanopartiküllerin hazırlanmasında PEG veya PEG kopolimerlerinin kullanılmasıdır. Bu şekilde, nanopartikül yüzeyinde PEG ile hidrofilik koruyucu bir tabaka oluşturulur, bu da nanopartiküllerin opsonin proteinleri tarafından tanınmasını engeller (208) . Tüm bu bilgiler ışığında tez çalışmalarında kitosan-PEG ve PLGA-PEG blok kopolimerleri kullanılmıştır.

Pınarbaşı ve diğ.'nin (29) yaptığı çalışmada hazırlanan kitosan ve kitosan-PEG nanopartikülleri ile ilgili çalışmalar daha da derinleştirilerek, kitosan ve kitosan-PEG formülasyonlarına terapötik dozda etkin madde yüklenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada, biyoparçalanabilir sentetik ve FDA onaylı bir polimer olan PLGA ve PLGA-PEG blok kopolimeri ile nanopartiküller hazırlanmış ve karakterizasyonları tamamlanmıştır ve PBN'in karaciğer toksisitesi oluşturulmuş fareler üzerindeki etkinliği, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere ex vivo testlerle değerlendirilmiştir.

İlaç taşıyıcı bir sistem olan nanopartiküllerin hazırlanması ile, PBN'in klinikte kullanımını engelleyen tüm bu kısıtlamaların önüne geçileceği düşünülmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle, kontrollü salımın sağlanabilmesi ve PBN'in retiküloendoteliyal sistem tarafından alımının azaltılması planlanmıştır. Etkin maddeyi korumayı ve stabil halde kan dolaşımında kalmasını amaçlayan ilaç taşıyıcı sistemin, mononükleer fagositik sistem elemanları tarafından alımını engellemek ya da azaltmak amacıyla, biyoparçalanabilir polimerlerin PEG ile

oluşturulmuş blok kopolimerleri kullanılmıştır. Hazırlanan bu sistemle, PBN'in etkisini uzun süre gösterebilmesi amaçlanmaktadır, nöroprotektif etki yeri olarak beyin damar endoteline ulaşması ve serbest radikalleri ortadan kaldırabilmesi için kontrollü salım sağlayan ve mononükleer fagositik sistem elemanlarından koruyan bir sistem hazırlanmıştır.

Li ve diğ. (140) PLGA ve PLGA-PEG polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerin in vitro karakterizasyonlarını, PLGA nanopartikülleri ve PLGA-PEG nanopartiküllerini kan dolaşımında kalış sürelerine göre değerlendirmiştir. Buna göre PLGA-PEG nanopartikülleri PLGA nanopartiküllerine göre 20 kat daha uzun süre kan dolaşımında kalmıştır (sırasıyla, 270,9 ve 13,6 dakika).

Aşağıda sırayla PBN üzerinde yapılan fizikokimyasal çalışmalar, daha sonra nanopartikül formülasyonları, nanopartiküllerin karakterizasyonları ve son olarak PBN'in etkinliğini gösteren ex vivo deney bulguları tartışılacaktır.

5.1. PBN'in Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

5.1.1. UV Spektrumu

Bölüm 3.2.1.1'de "*UV Spektrumu*" başlığı altında anlatıldığı gibi hazırlanan PBN çözeltisinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 200 - 400 nm dalga boyları arasında tarama yapılarak tayin edilmiştir. PBN'in miktar tayininde HPLC sisteminin UV dedektörünün, λ_{maks} olarak bulunan 286 nm (Şekil 4.1)'de analizi gerçekleştirmesi sağlanmıştır. PBN'in maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu literatür ile uyumlu bulunmuştur (191).

5.2. PBN'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve

Analitik Yöntem Validasyonu

Tez çalışmasında, PBN'in miktar tayini için UV dedektör içeren yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemi kullanılmıştır. Chen ve diğ. (199) tarafından kullanılan yöntemde bazı değişiklikler yapılarak HPLC yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin analitik validasyonu yapılmıştır. PBN'e ait kromatogram Şekil 4.2'de verilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi PBN'e ait

pik düzgün bir şekilde elde edilmiş olup, alıkonma zamanı 5 dakika olarak bulunmuştur.

Doğrusallık çalışmalarında, çalışma aralığı olarak 25 - 800 ng/mL arası konsantrasyonlar seçilmiştir. Deney bulguları incelendiğinde, belirtilen konsantrasyon aralığında, konsantrasyon ile elde edilen pik alanı arasında doğrusal ilişki saptanmış olup, regresyon analizi bulguları Tablo 4.1 ve Şekil 4.3'te verilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait korelasyon katsayısı 0,99994 olarak bulunmuştur.

Gün içi ve günler arası doğruluk % relatif hata ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % 0,044 ile 0,652 arasında, günler arası için % 0,193 ile % 1,98 arasında değişmektedir (Tablo 4.2). Validasyon çalışmalarında % relatif hata değerlerinin % 2'den küçük olması gerektiği bildirildiğinden (201) , hesaplanan % relatif hata değerlerinin % 2'nin altında olması ile kullanılan analitik yöntemin deney içi ve deneyler arası doğruluğu gösterilmiştir.

Kesinlik çalışmaları üç farklı konsantrasyon (düşük, orta, yüksek: 25, 200, 800 ng/mL) üzerinden gerçekleştirilmiş olup, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik % VK ile belirtilmiş olup, bu değerler 0,123 ile 0,835 arasında değişmektedir (Tablo 4.3). Gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik % VK ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % 0,023 ile % 1,38 arasında, günler arası için % 0,08 ile % 1,11 arasında değişmektedir (Tablo 4.4). Hesaplanan % VK değerlerinin % 2'nin altında olması ile analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve deney içi ve deneyler arası tekrar elde edilebilirliği gösterilmiştir (201) .

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen konsantrasyon 6,86 ng.mL⁻¹ olup, saptama sınırı 2,06 ng.mL⁻¹'dir. Bu veriler geliştirilen analitik yöntemin çalışmamızın amacına uygun duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir.

Yöntemin özgünlüğü için yapılan çalışmalarda, formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (kitosan, kitosan-PEG, TPF, PLGA, PLGA-PEG, PVA) formülasyonda buldukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir.

Ayrıca, ilaç yükleme ve in vitro salım çalışmalarında etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonlarına uygulanan işlemler, boş nanopartiküllere de uygulanarak HPLC kromatogramları elde edilmiştir (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). Kullanılan yardımcı maddelere ait pikler, ilaç yükleme ve salım deneyleri sırasında alınan örnekler üzerinde yapılan değerlendirmelerde PBN'e ait alıkonma süresinde herhangi bir pik görülmemiştir. Tüm bu analizler sonucunda, geliştirilen analitik yöntemin, hazırlanan formülasyonlar ve kullanılan yardımcı maddeler kapsamında özgün olduğu bulunmuştur.

Stabilite bulguları incelendiğinde, seçilen bir konsantrasyonda, salım ortamında (pH 7,4) hazırlanan PBN çözeltilisinin hazırlanır hazırlanmaz ve 37 °C'de 24 saat bekletildikten sonra HPLC ile analizi sonucunda elde edilen konsantrasyonlar karşılaştırılmış, % VK değerleri % 2'nin altında ve % geri kazanım değerleri % 98 – 102 arasında bulunarak PBN'in in vitro salım çalışmaları sırasında dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.5) (201) .

Yöntemin doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük ve stabilite bulguları tümüyle değerlendirildiğinde, bu yöntemin analitik amaçla validasyonunun yapıldığı ve geçerli bir yöntem olduğu görülmektedir.

5.3. Kitosan-Polietilen glikol (KS-PEG) Sentezi

Bu çalışmada kullanılan KS-PEG polimerinin sentezi Santiago de Compostela Üniversitesi, Organik Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Eduardo Fernandez-Megia ve diğ. tarafından gerçekleştirilmiştir. Polimerlere ilişkin bulgular Şekil 4.8'de gösterilmiştir. KS-PEG'in spektrumunda 3,7 ppm de görülen sinyal polimerdeki PEG varlığını göstermektedir.

5.4. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

5.4.1. Kitosan ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş Kitosan (Kitosan-PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Nanopartikül hazırlanması ile ilgili, polisakkarit yapıdaki kitosanın biyoyumlu ve biyoparçalanabilir özellikleri ideal bir hidrofilik taşıyıcı sistem

oluşturur. Ayrıca, kitosan nontoksik ve doku uyumlu olup, peptid, protein, oligonikleotid ve plazmidlerin taşınmasında uygun bir polimerdir. Biyoaktif maddelerin epitel hücrelerinden geçerken enzimatik ve kimyasal degradasyondan korunmasını sağlar. Bu nedenle, bu çalışmada kitosan taşıyıcı bir polimer olarak seçilmiş ve daha önce Vila ve diğ. (209) tarafından rapor edilen Aktaş ve diğ. (28) tarafından da uygulanan tripolifosfatla iyonotropik jelasyon yöntemi kullanılarak nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu yöntemde kitosanın pozitif grupları ile çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPF'nin negatif grupları arasındaki etkileşimden yararlanılmıştır.

Tez çalışması dahilinde hazırlanan KS ve KS-PEG nanopartikül formülasyonlarının hazırlanışı Bölüm 3.2.4.1'de verilmiştir. Nanopartikül hazırlama ve etkin madde yüklenmesi esnasında Aktaş ve diğ. (28) geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Kullanılan konsantrasyonların belirlenmesi yapılan ön çalışmalar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyonların belirlenen değerler dışında olması durumunda nanopartikül oluşumu gerçekleşmemiş ya da agregat oluşumu gözlemlenmiştir. Nanopartikül oluşumu TPF eklenmesini takiben süspansiyonun yarı-opak homojen görünüm oluşturması ile karakterizedir. Polimer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarının belirlenmesini takiben etkin maddelerin dozu belirlenip polimer çözeltisine eklenerek etkin madde yüklenmiş nanopartiküller hazırlanmıştır (Tablo 3.1 – 3.4).

5.4.2. PLGA ve Yüzeyi Modifiye Edilmiş PLGA (PLGA-PEG) Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında kullanılan diğer polimerler PLGA ve PLGA-PEG blok kopolimeridir, FDA tarafından onaylı, biyoparçalanabilir, sentetik nitelikte olan bu polimerin, nanoteknoloji kapsamında bir çok araştırmaya konu olduğu bilinmektedir (132).

Tez çalışması kapsamında hazırlanan PLGA ve PLGA-PEG nanopartikül formülasyonlarının hazırlanışı Bölüm 3.2.4.2'de anlatılmıştır. Emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemine göre nanopartiküllerin hazırlanması ve etkin madde

yüklenmesi esnasında Kılıç ve diğ. (210) geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Kullanılacak olan PLGA tipinin ve konsantrasyonların belirlenmesi ön çalışmalar doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İstenilen salım hızı, parçalanma hızı ve yükleme etkinliğine göre değişik tipte PLGA polimerleri mevcuttur. Yapılan araştırmalar sonucunda karboksilik asit ya da metil terminal grup içermesi, poli(laktik asit) (PLA) ve poli(glikolik asit) (PGA) oranları, viskozitesi ve termal özellikleri olmak üzere dört önemli parametrenin göz önünde bulundurulması gereklidir. PBN ile nöroproteksiyonun sağlanması ve etkisinin artırılmasının amaçlandığı çalışmamızda, öncelikle hızlı (burst effect) bir salım ve bunu takip eden süreçte salımın, kontrollü olarak 24 saat devam etmesi istenen bir durumdur. Biyouyumlu ve biyoparçalanabilir bir polimer olmasına rağmen, degradasyon hızının yüksek olması organizma açısından her zaman tercih edilen bir durumdur. Nanopartikülün hızlı degradasyonu vücuttan polimerin hızla atılmasını sağlar, akümülesyonunu azaltır (211) . Polimerdeki PLA oranı arttıkça salım süresinin uzamaktadır. Salımın ve degradasyon hızının yüksek olması açısından PLA:PGA oranı 50:50 olarak seçilmiştir. Etkin maddenin salım profili ve polimerin degradasyon hızı üzerinde etkili olan diğer bir parametre polimerin viskozitesidir. Viskozitenin düşük olması salım profili üzerinde istenen bir etki oluşturacağından 0,16 – 0,24 dl/g (0,1 % içinde CHCl_3 , 25 °C) viskoziteye sahip, organik fazın uçurulması aşamasında sıcaklığın etkisi göz önünde bulundurularak camsı geçiş sıcaklığı 42-46 °C olan “RG 502 H” seçilmiştir.

Budhian ve diğ. (212) yaptığı çalışmada PLGA polimerlerinin karboksilik asit terminal grup ve metil terminal grup içeren tipleri yükleme etkinlikleri açısından değerlendirilmiştir. Haloperidol yüklü nanopartiküllerin üretiminde iki tip PLGA polimeri kullanmışlardır. Bunlar, karboksilik asit son grubu içeren ve metil ester son grubu içerenlerdir. Nanopartiküllere haloperidol yüklenmiş ve yükleme etkinlikleri incelenmiştir. Karboksilik asit son grubu içeren nanopartiküllerde yükleme etkinliği, metil ester son grup içerenlerden dört kat fazla bulunmuştur (sırasıyla, % 32 ± 15 ve % 8 ± 5). Ayrıca, polimerdeki laktik asit, glikolik asit oranlarının yükleme etkinliğine etkisi de incelenmiş ve bu oranın son gruptan daha az önemli olduğu

bulunmuştur. Yapılan çalışmada PLGA 50:50'de yaklaşık olarak % 8 yükleme etkinliği bulunurken, PLGA 95:5'te yaklaşık olarak % 12 bulunmuştur. Buna göre, polimerin sahip olduğu son grupların, nanopartiküllerden etkin maddenin salımı ve nanopartiküllere etkin maddenin yükleme etkinliğinde önemli bir yere sahip olduğu bildirilmiştir. Bunun nedeni, karboksilik asitlerin PLGA ile etkin madde arasındaki hidrojen bağı kurulmasını arttırmasıdır, böylece solvanın buharlaştırılması esnasında, etkin maddenin nanopartikülden dışarıya difüzyonu engellenmiş olur. Metil ester son grubu içeren polimerin etkin madde ile hidrojen bağı kurma yeteneği daha düşük olduğu için, bu polimerde yükleme etkinliği daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, polimerin serbest karboksilik asit içermesi, su tutma kapasitesini ve degradasyon hızını arttırır. Bu da polimer matriksinin, serbest karboksilik asit içermeyen polimere göre daha fazla şişmesine neden olur dolayısıyla etkin maddenin PLGA nanopartiküllerinden salımı, PLGA'nın şişmesi ile kontrol edilen diffüzyon hızına bağlı olarak daha hızlı gerçekleşir. Tüm bu bilgiler ışığında karboksil terminal grup içeren PLGA tiplerinin yüksek yükleme etkinliği göstermesi karboksil terminal grup içeren PLGA (RESOMER RG 502 H)'nin en uygun polimer olduğunu kanıtlamıştır (213-214) . PBN'in hidrofobik özellikte olduğu daha önce belirtilmişti. Hidrofobik maddelerin PLA ve PLGA mikropartiküllerine enkapsülasyonu ile ilgili Wischke ve diğ.'nin (213) yapılan çalışmaları özetledikleri derlemeleri incelendiğinde, PLGA nanopartiküllerinin PBN ilaç taşıyıcı sistem için uygun olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada formülasyon parametrelerinin ilaç taşıyıcı sistemi nasıl etkilediği üzerinde durulmuştur. Özellikle, PLGA bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin kronik hastalıkların tedavisi için dozlama sıklığını azalttığı, salım hızını yavaşlattığı ve hasta uyuncunu iyileştirmesi açısından uygun polimer olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle PLGA biyoparçalanır ilaç taşıyıcı sistemler arasında en sık kullanılanıdır. Son yıllarda özellikle biyoyararlanımı problemlili olan maddeler için de uygun taşıyıcı olduğu literatürde belirtilmektedir. Ayrıca PLGA bazlı ilaç taşıyıcı sistemler ticari olarak da piyasada bulunmaktadır (Tablo 2.1). Fakat PLGA'nın genel bir kullanım yaklaşımı hiçbir zaman söz konusu olmayıp, her etkin madde için, tek tek deneysel olarak incelenmelidir. Bu nedenle, bu tez kapsamındaki çalışmada, PBN'in nanopartikül formülasyonunda PLGA polimeri kullanılmıştır. Nanopartiküller kan

dolaşımından organizma tarafından yabancı madde gibi algılanıp, opsonizasyon sonucu RES tarafından 8-10 dakika içerisinde genel kan dolaşımından uzaklaştırılmaktadırlar. Bu nedenle piyasada ticari olarak bulunan üç farklı PLGA-PEG'den PEGilasyon oranı % 8 – 12 arasında değişen PLGA-PEG (RESOMER® RGP d 50105) seçilmiştir. Bu polimerle ilgili teknik doküman incelendiğinde, polimerdeki PEG oranına, nanopartiküllerin kan dolaşımında kalış süreleri, kontrollü salım özellikleri ve hidrofiliği göz önünde bulundurularak karar verilmiştir.

Cegnar ve diğ.'nin (214) yaptığı benzer bir çalışma, teknolojik parametrelerin nanopartikül formülasyonu üzerine etkisinin araştırıldığı sistatin yüklü PLGA nanopartikülleri üzerinde yapılmıştır. Protein yapısındaki sistatinin biyoaktivitesinin korunması için, formülasyona kriyoprotektan eklenmiş ve sistatin yüklü PLGA nanopartiküllerinin, sistatin çözeltisi ile karşılaştırıldığında, çok dayanıklı oldukları açıklanmıştır. Benzer yönde çalışmalar daha önceki grup çalışmalarımızda da yer almaktadır (210) .

5.4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

5.4.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Tez çalışması kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyellerinin ölçümüne ait bilgiler Bölüm 3.2.5.1'de ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular Bölüm 4.3.2.1'de verilmiştir ve bu değerler Tablo 4.6 ve 4.7'de özetlenmiştir. Ayrıca, etkin madde içermeyen nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel dağılımlarına ait grafikler de Şekil 4.9 ve 4.10'de verilmiştir. Bu özelliklerin, polimerin PEG ile modifikasyonunda, etkin madde yüklendiğinde ve farklı dozlarda yükleme yapıldığında nasıl etkilendiği incelenmiştir.

Kitosan ve kitosan-PEG nanopartiküllerinin partikül boyutları incelendiğinde, KS-PEG nanopartiküllerinin ($142 \pm 13,49$ nm), KS nanopartiküllerine ($319,6 \pm 19$ nm) kıyasla daha küçük olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Aktaş ve diğ.'nin (27) yaptığı çalışmada da, KS-PEG nanopartiküllerinin boyutları KS nanopartiküllerine

göre daha küçük bulunmuştur. Bunun sebebinin, PEG ile koloidal stabilizasyonun sağlanmasının olabileceği düşünülmektedir.

Kitosan nanopartiküllerinin, partikül boyutu dağılımı incelendiğinde (Tablo 4.6, Şekil 4.9) , polidispersite indekslerinden ($\sim 0,27$) ve dağılım grafiklerinden monodispers bir sistem oldukları görülmektedir. KS nanopartiküllerine etkin madde yüklendiğinde ve yüklenen etkin madde miktarı arttığında partikül boyutunun arttığı gözlenmiştir (340 ± 19 , $356,4 \pm 4,19$ nm). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Etkin madde yüklenmesi partikül boyutunun dağılım aralığını genişletse de, sistem monodispers dağılım formunu korumuştur. Pınarbaşı ve diğ.'nin (29) yaptığı çalışmada da kitosan nanopartiküllerine ait partikül boyutu ~ 300 nm bulunmuştur, polidispersite indeksleri de $\sim 0,2$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar dikkate alındığında, elde edilen bulguların literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.

KS-PEG nanopartiküllerinin partikül boyutları incelendiğinde (Tablo 4.6, Şekil 4.9) polidispersite indeksleri ($\sim 0,3$) ve dağılım grafiklerinden monodispers bir sistem oldukları görülmektedir. KS-PEG nanopartiküllerine etkin madde yüklenmesi partikül boyutunda ve PDI değerinde artışa neden olmuştur. KS-PEG nanopartiküllerine yüklenmesi hedeflenen etkin madde miktarı arttığında, yani ortama ilave edilen PBN miktarı arttığında, partikül boyutunda azalma olduğu gözlenmiştir ($265,6 \pm 10,54$, $208,8 \pm 1,15$ nm). Dolayısıyla KS-PEG nanopartikülleri için yüklenen etkin madde miktarı ile partikül boyutu arasında doğrusal bir ilişki kurulamamıştır.

PLGA nanopartiküllerinin partikül boyutları incelendiğinde (Tablo 4.7, Şekil 4.9) polidispersite indeksleri ($\sim 0,07$) ve dağılım grafiklerinden monodispers bir sistem oldukları görülmektedir. Kitosandan farklı olarak, PLGA ve PLGA-PEG blok kopolimeri ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (sırasıyla, $269,6 \pm 6,42$, $271 \pm 4,88$ nm) ($p>0,05$). Li ve diğ.'nin (140) yaptığı çalışmada da PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin boyutları arasında anlamlı fark bulunamamıştır (sırasıyla, $213,8 \pm 10,9$ ve $198,1 \pm 11,1$ nm).

PLGA nanopartiküllerine etkin madde yüklendiğinde ve yüklenen miktar arttıkça, partikül boyutu artmıştır ($279,06 \pm 5,717$, $285,6 \pm 3,93$ nm). PDI değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Partikül boyutundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

PLGA-PEG nanopartiküllerinin partikül boyutları incelendiğinde (Tablo 4.7, Şekil 4.9) polidispersite indeksleri ve dağılım grafiklerinden monodispers bir sistem oldukları görülmektedir. PLGA-PEG blok kopolimeri ile hazırlanan nanopartiküllere etkin madde yüklendiğinde ve yüklenen miktar arttığında partikül boyutu artmış ($278,2 \pm 4,88$; $290,0 \pm 2,1$ nm), PDI değerlerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Partikül boyutundaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Nanopartikül formülasyonunda, partikül boyutu hedeflendirilmiş veya hedeflendirilmemiş nanopartikül formülasyonlarında, biyodağılımı önemli ölçüde etkilemektedir. Cheng ve diğ.'nin (215) PLGA-PEG nanopartikülleri ile yaptığı bir çalışmada, polimer konsantrasyonu, ilaç yüklemesi, solvanın suyla karışabilirliği ve solvan su oranının nanopartikül boyutunu nasıl etkileyeceği araştırılmıştır. 70 – 250 nm aralığında nanopartikül boyutunun polimer konsantrasyonu ile lineer değiştiği gösterilmiştir. Hedeflendirme için yapay prostat kanseri oluşturulmuş farelerde, nanopartikül yüzeyinin spesifik membran antijeni A10 Aptameri ile konjuge edilmesi, nanopartiküllerin tümöre hedeflendirilmesini arttırmıştır. Yüzeyi değiştirilmiş ve değiştirilmemiş nanopartiküllerde dokuya hedeflendirme, yüzeyi değiştirilmiş nanopartiküllerin lehine 3,77 kat artmıştır. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, yüzeyi değiştirilmiş PBN taşıyan PLGA-PEG nanopartiküllerinin beyne hedeflendirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma bulguları, polimer konsantrasyonu ile nanopartikülün volümetrik büyüklüğü, kullanılacak solvanlar ve çalışma koşullarının in vivo bulguları önemli ölçüde etkileyeceğini göstermektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda da, teknolojik parametrelerin özellikleri üzerine etkisi dikkate alınmıştır.

Çalışmamızda hazırlanan PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküler sistemlerin formülasyonlarının hazırlanmasında son işlem basamağı olan liyofilizasyon işleminin

partikül boyutu ve dağılımı üzerine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla çalışmamızda kriyoprotektan madde kullanılmamasına rağmen yüzey etkin madde olan polivinil alkolün kullanımı ile stabil partiküller elde edilmiştir. Benzer şekilde literatürde kriyoprotektan ajan kullanılmadan stabil nanopartiküller hazırlanabildiği bildirilmiştir (216) .

Kitosan ve KS-PEG ile PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin partikül boyutları kıyaslandığında PLGA ve PLGA-PEG polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerde daha küçük boyutta partiküller elde edilmiştir. Partikül boyutu dağılım grafikleri ve PDI değerleri incelendiğinde, PLGA ve PLGA-PEG polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerde daha homojen bir dağılım gözlenmiştir. PLGA ve PLGA-PEG ile daha homojen bir dağılım ve daha küçük partikül boyutu elde edilmesinin nedeni, bu polimerlerin sentetik ve dolayısıyla yüksek saflıkta olmasıdır. Partikül boyutu ve dağılımındaki farklılığın diğer nedenleri arasında, üretim yöntemi farklılığı, yüklenen etkin madde miktarı, yüzeyde adsorbe olan etkin madde miktarlarının farklılığı sayılabilir.

Partiküler sistemlerin yüzey yükü zeta potansiyel ölçümü ile tespit edilmektedir. Zeta potansiyel analizleri; kolloidal stabilitenin değerlendirilmesi ve in vivo uygulamalarda partikülün sahip olduğu yüzey yükünün önemi nedeni ile incelenmelidir (217) . Ölçülen yüzey yükünün değeri, partikülün uzun süreli stabilitesinin tahmini için önemlidir. Bir süspansiyon içindeki partiküllerin sahip olduğu yüksek pozitif veya negatif zeta potansiyel değerleri, partiküllerin birbirini itmesi ile sonuçlanmakta ve bu durum partiküllerin bir araya gelme eğilimine engel olmaktadır. Diğer bir deyişle, partiküllerin düşük zeta potansiyel değerlerine sahip olması partiküllerin bir araya gelmesini engelleyecek kuvvetin ortadan kalkmasına ve partiküllerin flokülasyonu ile sonuçlanmaktadır (218) .

Kitosan nanopartiküllerine ait zeta potansiyel değerlerine ait tablo ve dağılım grafikleri Tablo 4.6 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Kitosan ve KS-PEG nanopartiküllerinin zeta potansiyellerinin pozitif olduğu bulunmuştur, bunun nedeni kitosanın amin grupları içeren poli katyonik bir polimer olmasıdır. Kitosan

nanopartiküllerine PBN yüklenmesi, zeta potansiyelde düşüğe neden olmuştur. Pozitif yüklü bir madde olan PBN'in zeta potansiyelinde düşüğe neden olması, yüksek miktarda yüklenen PBN'in dispersiyonun stabilitesini etkilemesi olarak düşünülmektedir. Yani kitosan nanopartiküllerine etkin madde yüklenmesi, nanopartikül süspansiyonunun koloidal stabilizasyonunu olumsuz etkilemiştir. Kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri $18,6 \pm 3,5$ ile $38,7 \pm 7,6$ mV arasında değişmektedir. KS-PEG nanopartiküllerine PBN yüklenmesi zeta potansiyelinde artışa neden olmuştur, bunun nedeninin, PEG ile koloidal stabilizasyonun sağlanmasının olabileceği düşünülmektedir. Aktaş ve diğ.'nin (27) yaptıkları çalışmada, kitosan nanopartiküllerine negatif yüklü Z-DEVD-FMK'nın yüklenmesi ile zeta potansiyelinde düşme olduğu gösterilmiştir. Etkin madde içermeyen kitosan nanopartiküllerinin zeta potansiyeli + 28,4 mV olarak bulunurken, etkin madde yüklendiğinde bu değer, + 20,25'e düşmüştür. Zeta potansiyeli etkileyen faktörler arasında yüklenen maddenin yükünün önemli olduğu bu çalışmada da gösterilmiş olup, tez çalışmasında elde edilen bulgular ile uyumlu bulunmuştur.

PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel değerlerine ait tablo ve grafikleri Tablo 4.7 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. PLGA ve modifiye edilmiş PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerinin negatif olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni diğer poliester polimerler gibi PLGA'nın da yüzeyinde yer alan terminal karboksilik asit gruplarının varlığı ile açıklanabilmektedir. PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine PBN yüklenmesi zeta potansiyel değerlerini düşürmüştür, bunun nedeni olarak da PBN'in pozitif yüke sahip bir madde olmasındandır. PLGA'nın PEG ile modifikasyonunda zeta potansiyel değerinde nötral değere yaklaşma gözlenmiştir (sırasıyla, $-18,4 \pm 2,86$, $-14,4 \pm 0,53$). Li ve diğ.'nin (140) PLGA ve PLGA-PEG nanopartikülleri ile yaptıkları çalışmada, PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerleri, - 33,9 mV olarak bulunurken, PLGA-PEG nanopartiküllerinde bu değer - 16, 31 mV olarak bulunmuştur. PEG zincirlerinin zeta potansiyel değerini önemli ölçüde etkilediği sonucuna varılmıştır.

Kitosan ve PLGA polimerleri hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyelleri ile PEG ile modifiye edilmiş polimerlerle hazırlanan nanopartiküllerin zeta

potansiyel değerleri karşılaştırıldığında, iki polimerde de, PEG'lenmiş polimerle hazırlanan nanopartiküllerde zeta potansiyel değerinde anlamlı bir dūřuř olduğu görülmüştür. Bunun nedeni nanopartikül yüzeyindeki hidrodinamik fazın daha uzak mesafeye kayması ile açıklanmaktadır (140) .

5.4.3.2. Morfolojik zellikleri

Bölüm 3.2.5.2'de "*Morfolojik zellikleri*"başlığı altında anlatıldığı Şekilde tez çalışmasında hazırlanan nanopartiküllerin, etkin madde yüklenmiş ve etkin madde yüklenmemiş formlarının morfolojik özellikleri incelenmiştir. Buna ilişkin SEM görüntüleri Bölüm 4.3.2.2' de "*Morfolojik özelliklere ait Bulgular*" başlığı altında Şekil 4.11 - 4.14'te verilmiştir.

SEM görüntüleri incelendiğinde, kitosan nanopartiküllerinin küresele yakın bir yapıya sahip olduğu, partikül boyutu dağılımının oldukça tek düze olduğu ve boyutlarının 350 nm civarında olduğu görülmektedir (Şekil 4.11). Literatürde de benzer Şekilde, benzer boyutlarda görüntüler yer almaktadır (27,219) .

KS-PEG nanopartiküllerine ait görüntüler incelendiğinde, KS nanopartiküllerine nazaran daha az küresel oldukları görülmektedir. Ancak boyutlar daha küçük ve dağılım daha homojendir. Literatürde yer alan KS-PEG nanopartiküllerine ait görüntüleri incelendiğinde, yapılarının bizim çalışmamızda olduğu gibi küresele yakın oldukları görülmüştür (27,29) .

PLGA nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde, nanopartiküllerin küresel yapıda oldukları, partikül boyutu dağılımının tek düze olduğu ve boyutlarının yaklaşık olarak 250 nm olduğu görülmektedir. Choi ve diğ.'nin (220) yaptıkları çalışmada, tez çalışmasında kullanılan yöntemle elde edilen PLGA nanopartiküllerinin küresel oldukları boyutlarının ~ 300 nm olduğu ve partikül boyutlarının dar bir aralıktta dağıldığı bildirilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen SEM görüntüleri literatür ile uyumlu bulunmuştur.

PLGA-PEG nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri incelendiğinde, nanopartiküllerin küresel oldukları ve homojen bir dağılıma sahip oldukları ve

boyutlarının yaklaşık olarak 280 nm olduğu görülmektedir. Avgoustakis ve diğ.'nin (211) yaptıkları çalışmada da, benzer görüntüler elde edilmiştir.

5.4.3.3. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.5.3'te "*Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi*" başlığı altında anlatıldığı şekilde, KS, KS-PEG, PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine yüklenen PBN miktarı tayin edilmiştir. Bölüm 4.3.2.3'te "*Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular*" başlığı altında da yükleme etkinlikleri, pratik olarak yüklenen miktarlar ve yükleme kapasiteleri verilmiştir (Tablo 4.8, 4.9).

Kitosan nanopartiküllerinin yükleme etkinliği ve yükleme kapasiteleri incelendiğinde, yüklenmesi hedeflenen madde miktarı ve dolayısıyla ortama ilave edilen etkin madde miktarı arttıkça, yükleme etkinliği (sırasıyla, % 32,67 ve 44,65) ve yükleme kapasitelerinde (sırasıyla, % 16,5 ve 55,9) artış olmuştur. Bu da yüklenmeye çalışılan ilk dozda, nanopartikülün maksimum yükleme kapasitesine ulaşamadığını ve dozu arttırdığımızda polimerin hala etkin madde enkapsüle edecek kapasitede olduğunu göstermektedir. Pınarbaşı ve diğ.'nin (29) yaptığı çalışmada da kitosan nanopartiküllerine yüklenen madde miktarı arttıkça yükleme kapasitesinin arttığı rapor edilmiştir.

KS-PEG nanopartiküllerinde enkapsülasyonun etkinliği değerlendirildiğinde, kitosan nanopartiküllerinde olduğu gibi ortama eklenen etkin madde miktarı arttıkça nanopartikülün yükleme kapasitesinde artış olduğu (sırasıyla, % 29,91 ve 47,19) gösterilmiştir bu da, düşük dozla elde edilen yükleme kapasitesinin doygunluğa ulaşmadığını ifade etmektedir. Pınarbaşı ve diğ.'nin (29) yaptıkları çalışmada da, KS-PEG nanopartiküllerine yüklenen madde miktarı arttıkça, nanopartikülün yükleme kapasitesinde artış olduğu gösterilmiştir.

KS ve KS-PEG nanopartikülleri kendi aralarında karşılaştırıldıklarında, KS-PEG nanopartiküllerinin düşük doz etkin madde yüklendiğinde yükleme kapasitesi daha fazla iken, yüksek dozda, KS nanopartiküllerinin yükleme kapasitesi daha fazladır (Tablo 4.8), bunun nedeni, PEG'in oluşturduğu hidrofilik tabakanın hidrofobik yapıdaki PBN'in kitosanla olan etkileşimini azaltması yönünde olduğu

düşünülmektedir. KS-PEG nanopartiküllerinin yüklenen PBN miktarının artmasıyla yükleme etkinliğinde azalma olması da, nanopartiküler etkin madde yükleme aşamasında PEG zincirinin oluşturduğu sterik engelin açık bir göstergesidir. Pınarbaşı ve diğ.'nin (29) yaptıkları çalışmada da yüklenen etkin madde miktarının iki katına çıkarılması (400 ng/mL, 800 ng/mL) KS nanopartiküllerinin yükleme kapasitesi ve yükleme etkinliğinde KS-PEG nanopartiküllerine nazaran daha yüksek bulunmuştur.

PLGA nanopartiküllerinin yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi değerlendirildiğinde, nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarı arttıkça, yükleme kapasitesi artarken (sırasıyla, % 34,36 ve 68,40), yükleme etkinliğinde önemli bir değişiklik olmamıştır (sırasıyla, % 52,3 ve 54). Bunun nedeni, PLGA'nın enkapsüle ettiği etkin madde miktarının ortama eklenen madde miktarı ile doğrusal bir ilişki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla nanopartiküllere yüklenen dozun iki katına çıkarılması yükleme kapasitesinde iki katlık bir artışa neden olmuştur.

PLGA-PEG nanopartiküllerinin yükleme etkinlikleri ve yükleme kapasiteleri değerlendirildiğinde, ortama eklenen PBN miktarı arttıkça, yükleme kapasitesinde (sırasıyla, % 9,26 ve 29,24) ve yükleme etkinliğinde (sırasıyla, % 12,7 ve 21,21) artış olduğu görülmüştür, bu da PLGA polimerinin hapsedeceği etkin madde miktarına düşük dozda erişilemediğini dozun artırılmasıyla bu değerlerde artış olduğunu göstermektedir.

PLGA ve PLGA-PEG nanopartikülleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, her iki dozda da PLGA nanopartiküllerinin yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. Bunun nedeninin hidrofobik etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. PLGA'nın PLGA-PEG'e oranla daha hidrofobik olması, hidrofobik özellikteki PBN'in PLGA'ya daha yüksek miktarda yüklenmesini sağlamıştır. PEG'lerle oluşturulan hidrofilik tabakanın PBN'in PLGA ile etkileşime girmesini azalttığı düşünülmektedir.

Li ve diğ. (140) yaptığı çalışmada da PEG ile modifiye edilmiş, PLGA'nın yükleme etkinliği daha düşük bulunmuştur. Bunun nedeni tam olarak açıklanamamıştır.

KS, KS-PEG nanopartikülleri ile PLGA, PLGA-PEG nanopartiküllerinin yükleme etkinlikleri incelendiğinde, PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerine daha yüksek miktarda PBN yüklenebilmiştir. Bunun nedeni lipofilik özellikteki polimerin, lipofilik polimerin çözeltisinde yüksek konsantrasyondaki çözeltisinin hazırlanabilmesinden ve lipofilik karakterdeki PBN'in hidrofobik karakterdeki PLGA ile daha fazla etkileşmesinden kaynaklanmaktadır (213) .

5.4.3.4. İn Vitro Salım Çalışmaları

İN vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.5'te "*İN Vitro Salım Deneyleri*" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım miktarının gösterildiği grafik Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

Salım profilleri incelendiğinde, ilaç salımının başlangıçta patlama etkisi gösterdiği görülmektedir. Bunun nanopartiküllerin yüzeyine yakın ilaç kristallerine veya yüzeye adsorbe olmuş ilaç kristallerine bağlı olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir (140,211) . Avgoustakis ve diğ. (211) sisplatinin PLGA-mPEG nanopartikül formülasyonlarını hazırlamışlardır ve nanopartiküllerin in vitro degradasyon, in vitro salım ve kanda kalış özelliklerini incelemişlerdir. Sisplatin yüklü PLGA-PEG nanopartiküllerinden kontrollü ilaç salımının birkaç saatin üzerinde olduğu gözlenmiştir. İlaç salım profilinin iki fazlı olduğu görülmüştür, birincisi hızlı salım (burst effect) ve ikincisi hızlı salımı takip eden süreçte gözlenen daha yavaş salımdır.

KS ve KS-PEG nanopartikülleri ile gerçekleştirilen salım çalışmaları incelendiğinde, PEG'li formülasyonlarda yüksek etkin maddede yüklendiğinde kitosana göre daha hızlı bir salım görülürken, düşük doz yüklendiğinde KS nanopartiküllerinde daha hızlı bir salım görülmüştür. Bunun nedeni PEG ile modifiye edilmiş polimerle hazırlanan nanopartiküllerde, düşük dozda yüklenen etkin maddenin büyük çoğunluğu nanopartikül içine hapsedilip, salımın PEG ile yavaşlatılmasıdır. Yüksek dozda yüklendiğinde ise, etkin maddenin bir kısmı nanopartikül yüzeyinde ve yüzeye yakın yerlerde bulunacağından, salım daha hızlıdır (140,221) .

PLGA ve PLGA-PEG nanopartiküllerinin salım profilleri incelendiğinde, PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerde, salımın daha hızlı olduğu gösterilmiştir. PEG'in varlığı, hidrofilik yapısı ve sterik engeli nedeniyle, hidrofobik karakterdeki PBN'in daha yavaş ve kontrollü olarak salımını sağlamıştır. Hidrofilik PEG zincirlerinin uzunluğunun ve polimerdeki PEG oranının salım üzerinde etkileri olduğu bildirilmiştir (214,222) . Mosqueira ve diğ.'nin (222) PLA ve PLA-PEG polimerleri ile yaptıkları çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir, PEG'in varlığı salımın yavaşlamasını ve nanopartiküllerin uzun süre kan dolaşımında kalmasını sağlamıştır.

5.5. Ex Vivo Hayvan Deneyleri

Bölüm 3.2.6.2'da "*BCA Tayini Kalibrasyon Doğrusu*" başlığı altında anlatıldığı şekilde karaciğer dokusundan protein miktar tayini yapabilmek için elde edilen kalibrasyon doğrusu Bölüm 4.4.2'de "*BCA Tayini Kalibrasyon Doğrusu*" başlığı altında verilmiştir. Korelasyon katsayısı 0,9978 olarak bulunan doğru denklemi yapılan her bir analizde, karaciğer doku homojenatındaki protein miktar tayininde kullanılmıştır.

Bölüm 3.2.6.1'de "*Dokudaki Lipit Peroksidlerin Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri (TBARS) Aracılığı ile Tayin Edilmesi*" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılan deneylerde elde edilen bulgular, Bölüm 4.4.1'de "*Dokudaki Lipit Peroksidlerin Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeler Aracılığı ile Tayin Edilmesi*" başlığı altında Tablo 4.10'da özetlenmiştir. Tablo değerleri incelendiğinde, kontrol grubuna ait farelerin karaciğer dokusundan elde edilen MDA düzeyi $509,18 \pm 92$ nmol/0,1 g protein olarak bulunurken, bu düzeyin akut karaciğer toksisitesi oluşturulmuş farelerde $1239,76 \pm 117$ nmol/0,1 g protein olarak bulunmuştur. Bu gruplar arasındaki TBARS (nmol MDA/0,1 g protein) seviyeleri arasındaki farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Karbontetraklorür uygulamadan 30 dakika önce intraperitoneal yoldan PBN verilmesi (100mg/kg) MDA düzeyinde büyük ölçüde düşüş olmasını sağlamıştır ($764,19 \pm 81,8$ nmol MDA/0,1 g protein). Bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olması, oluşturulan deney modelinin

formülasyonlarının etkinliğinin saptanması amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

Zhu ve diğ.'nin (223) yaptıkları çalışmada da, CCl₄ ile akut karaciğer toksisitesi oluşturulmuş ve karaciğerdeki TBARS seviyeleri tayin edilmiştir. Kontrol grubunda 368,7 ± 20,4 nmol MDA/0,1 g protein bulunurken, 0,5 ml/kg CCl₄ uygulanan grupta bu düzey 1178,5 ± 197,3 nmol MDA/0,1 g protein olarak bulunmuştur.

Oksidatif stres oluşturmak amacıyla karbontetraklorür (CCl₄) uygulanan farelerde, karbontetraklorür P450 enzimi ile triklorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) serbest radikaline dönüştürülür, oksijen varlığında triklorometil peroksi radikaline ($\cdot\text{OCCl}_3$) dönüşür. Bu serbest radikaller, farklı moleküllerden hidrojen koparır ve lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidasyonunu başlatır. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden birisi olan malondialdehitin tayin edildiği tez çalışmasında, dolaylı olarak lipit peroksidasyon düzeyi ölçülmüştür. PBN'in CCl₄'ten 30 dakika önce uygulanmasıyla lipit peroksidasyonun azaltılması amaçlanmıştır. Deney sonuçları incelendiğinde, PBN'in karaciğerde oluşturulan oksidatif stresi azalttığı ve dolayısıyla lipit peroksidasyonu ve lipit peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehiti azalttığı gösterilmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Felç tedavisinde kullanılmak üzere, bir çok yararlı etkilere sahip PBN'in düşük in vivo stabilitesinin ve kısa yarı ömrünün önüne geçilerek, hem hasta uyuncunun arttırıldığı hem de tedavisi bir çok yönden kısıtlı olan santral sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için umut verici bir yaklaşım olarak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formüle edilmiştir. Bu sistemin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler, ayrıca bu polimerlerin PEG ile modifikasyonu sonucunda elde edilen blok kopolimerler kullanılmıştır. Sonuçta, morfolojik özellikleri, boyut ve yüzey yükü, yükleme kapasitesi, yükleme etkinliği açısından incelendiğinde, kitosan ve kitosan-PEG ile hazırlanan nanopartiküllerin pozitif yüke sahip oldukları ve bunun hücre içine alımda avantajlı olacağı, ayrıca kitosan ile hazırlanan nanopartiküllerin parçalanma hızının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak kitosana hazırlanan nanopartiküllerin PLGA'ya göre başlangıçta daha hızlı bir salım gösterdikleri gözlenmiştir. PLGA ile hazırlanan nanopartiküller, sentetik ve yüksek saflıkta olmaları nedeniyle daha verimli bir şekilde formüle edilmiştir ve de partiküllerin boyutlarına ait dağılım grafikleri incelendiğinde daha tez düze bir dağılıma sahip oldukları görülmüştür. Polimerin hidrofobik yapısı gereği, hidrofobik karakterdeki PBN'in bu polimere yüklenmesi daha kitosana göre daha fazla olmuştur. PEG ile modifiye edilmiş polimerlerden hazırlanan nanopartiküllerin biyodağılım çalışmaları ve kan dolaşımındaki kalış sürelerinin tayin edildiği çalışmalar incelendiğinde, bu formülasyonların daha uzun süre kan dolaşımında kaldığı ve daha geniş bir biyodağılım gözlendiği gösterilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında formülasyonların ex vivo ve in vivo olarak değerlendirilmesi için ön çalışma niteliği taşıyan ex vivo deney modeli çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada çok bilinen ve eski bir yöntem olan tiyobarbitürik asit reaksiyon substansları (TBARS) ile dokudaki lipid peroksidasyon ürünleri tayin edilmiştir. Akut karaciğer toksisitesi oluşturmak üzere karbontetraklorür uygulanan fareler ile, karbontetraklorür uygulanmasından 30 dakika önce PBN verilen farelerde lipid peroksidasyon düzeyleri ölçüldüğünde arada ~1,6 katlık bir fark bulunmuştur. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olması yapılması hedeflenen çalışmalarda, bu deney modelinin kullanılabileceği gösterilmiştir.

Tüm formülasyonların CCl₄ ile oluşturulmuş deney modelinde etkinliklerinin çalışılmasının ardından, iskemi modeli ile nanopartikül formülasyonlarının etkinliklerinin gösterilmesi hedeflenmektedir. PBN'in beyin damar endotelinde etkinliğinin artırılması amacıyla bu sistemlerin beyne hedeflendirilmesi de amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Sahoo, S.K., Labhasetwar, V. (2003) Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today*, 8 (24), 1112-1120.
2. Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 54 (5), 631-651.
3. Panyam, J., Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev*, 55 (3), 329-347.
4. Lamprecht, A., Ubrich, N., Yamamoto, H., Schafer, U., Takeuchi, H., Maincent, P. ve diğerleri. (2001) Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 299 (2), 775-781.
5. Kumar, M.N.V.R. (2000) Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (2), 234-258.
6. Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., Speiser, P. (1982) Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *J Pharm Sci*, 71 (7), 790-792.
7. Beck, P., Kreuter, J., Reszka, R., Fichtner, I. (1993) Influence of polybutylcyanoacrylate nanoparticles and liposomes on the efficacy and toxicity of the anticancer drug mitoxantrone in murine tumour models. *J Microencapsul*, 10 (1), 101-114.
8. Conway, M.A., Madrigal-Estebas, L., McClean, S., Brayden, D.J., Mills, K.H. (2001) Protection against *Bordetella pertussis* infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells. *Vaccine*, 19 (15-16), 1940-1950.
9. Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C. (2001) Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, 53 (2), 283-318.

10. Kumari, A., Yadav, S.K.,Yadav, S.C. (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75 (1), 1-18.
11. Thomas, M.,Klibanov, A.M. (2003) Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (16), 9138-9143.
12. Desai, M.P., Labhasetwar, V., Amidon, G.L.,Levy, R.J. (1996) Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res*, 13 (12), 1838-1845.
13. Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J.,Amidon, G.L. (1997) The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res*, 14 (11), 1568-1573.
14. Panyam, J., Sahoo, S.K., Prabha, S., Bargar, T.,Labhasetwar, V. (2003) Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm*, 262 (1-2), 1-11.
15. Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R.,Rudzinski, W.E. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 70 (1-2), 1-20.
16. Bawa, R. (2008) Nanoparticle-based Therapeutics in Humans: A Survey. *Nanotechnology Law & Business*, 5 (2), 135-155.
17. Vinogradov, S.V., Bronich, T.K.,Kabanov, A.V. (2002) Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 54 (1), 135-147.
18. Song, C., Labhasetwar, V., Cui, X., Underwood, T.,Levy, R.J. (1998) Arterial uptake of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery: results with an acute dog model. *J Control Release*, 54 (2), 201-211.
19. Vicent, M.J.,Duncan, R. (2006) Polymer conjugates: nanosized medicines for treating cancer. *Trends Biotechnol*, 24 (1), 39-47.
20. Allen, T.M. (1998) Liposomal drug formulations. Rationale for development and what we can expect for the future. *Drugs*, 56 (5), 747-756.

21. Lee, C.C., MacKay, J.A., Frechet, J.M.,Szoka, F.C. (2005) Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol*, 23 (12), 1517-1526.
22. Lee, J.H., Canny, M.D., De Erkenez, A., Krilleke, D., Ng, Y.S., Shima, D.T. ve diğ erleri. (2005) A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (52), 18902-18907.
23. Torchilin, V.P. (2005) Lipid-core micelles for targeted drug delivery. *Curr Drug Deliv*, 2 (4), 319-327.
24. Torchilin, V.P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*, 4 (2), 145-160.
25. Hitzman, C.J., Elmquist, W.F., Wattenberg, L.W.,Wiedmann, T.S. (2006) Development of a respirable, sustained release microcarrier for 5-fluorouracil I: In vitro assessment of liposomes, microspheres, and lipid coated nanoparticles. *J Pharm Sci*, 95 (5), 1114-1126.
26. Kreuter, J. (1978) Nanoparticles and nanocapsules--new dosage forms in the nanometer size range. *Pharm Acta Helv*, 53 (2), 33-39.
27. Aktas, Y., Yemisci, M., Andrieux, K., Gursoy, R.N., Alonso, M.J., Fernandez-Megia, E. ve diğ erleri. (2005) Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjug Chem*, 16 (6), 1503-1511.
28. Aktas, Y., Andrieux, K., Alonso, M.J., Calvo, P., Gursoy, R.N., Couvreur, P. ve diğ erleri. (2005) Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *Int J Pharm*, 298 (2), 378-383.
29. Pinarbasli, O., Aktas, Y., Dalkara, T., Andrieux, K., Alonso, M.J., Fernandez-Megia, E. ve diğ erleri. (2009) Preparation and evaluation of alpha-phenyl-n-tert-butyl nitron e (PBN)-encapsulated chitosan and PEGylated chitosan nanoparticles. *Pharmazie*, 64 (7), 436-439.
30. Nel, A., Xia, T., Madler, L.,Li, N. (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311 (5761), 622-627.

31. Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J. ve diğeri. (2005) Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science*, 307 (5709), 538-544.
32. Nirmal, M., Norris, D.J., Kuno, M., Bawendi, M.G., Efros, A.L., Rosen, M. (1995) Observation of the "Dark exciton" in CdSe quantum dots. *Phys Rev Lett*, 75 (20), 3728-3731.
33. Lacoste, T.D., Michalet, X., Pinaud, F., Chemla, D.S., Alivisatos, A.P., Weiss, S. (2000) Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (17), 9461-9466.
34. Hohng, S., Ha, T. (2004) Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions. *J Am Chem Soc*, 126 (5), 1324-1325.
35. Gensini, G.F., Conti, A.A., Lippi, D. (2007) The contributions of Paul Ehrlich to infectious disease. *J Infect*, 54 (3), 221-224.
36. Hoag, H. (2006) Seeing the big picture. *Nature*, 440 (7087), 1084-1085.
37. Douglas, S.J., Davis, S.S., Illum, L. (1987) Nanoparticles in drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 3 (3), 233-261.
38. Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R., Allemann, E. (2004) Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J Pharm Sci*, 93 (8), 1980-1992.
39. Cheng, T.L., Cheng, C.M., Chen, B.M., Tsao, D.A., Chuang, K.H., Hsiao, S.W. ve diğeri. (2005) Monoclonal antibody-based quantitation of poly(ethylene glycol)-derivatized proteins, liposomes, and nanoparticles. *Bioconjug Chem*, 16 (5), 1225-1231.
40. McNeil, S.E. (2005) Nanotechnology for the biologist. *J Leukoc Biol*, 78 (3), 585-594.
41. Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O. (2004) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 56 (11), 1649-1659.
42. Chari, R.V. (1998) Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 31 (1-2), 89-104.

43. Suzawa, T., Nagamura, S., Saito, H., Ohta, S., Hanai, N., Kanazawa, J. ve diğeri. (2002) Enhanced tumor cell selectivity of adriamycin-mono-clonal antibody conjugate via a poly(ethylene glycol)-based cleavable linker. *J Control Release*, 79 (1-3), 229-242.
44. Kohler, G., Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256 (5517), 495-497.
45. Abou-Jawde, R., Choueiri, T., Alemany, C., Mekhail, T. (2003) An overview of targeted treatments in cancer. *Clin Ther*, 25 (8), 2121-2137.
46. Glennie, M.J., van de Winkel, J.G. (2003) Renaissance of cancer therapeutic antibodies. *Drug Discov Today*, 8 (11), 503-510.
47. Leamon, C.P., Reddy, J.A. (2004) Folate-targeted chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 56 (8), 1127-1141.
48. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G., Shin, D.M. (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*, 14 (5), 1310-1316.
49. Maeda, H. (2001) The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul*, 41, 189-207.
50. Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2 (10), 750-763.
51. Larsen, A.K., Escargueil, A.E., Skladanowski, A. (2000) Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther*, 85 (3), 217-229.
52. Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2 (1), 48-58.
53. Begley, D.J. (1996) The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J Pharm Pharmacol*, 48 (2), 136-146.
54. Kola, I., Landis, J. (2004) Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*, 3 (8), 711-715.

55. Pardridge, W.M. (2001) Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right? *Drug Discov Today*, 6 (1), 1-2.
56. Pardridge, W.M. (2002) William Pardridge discusses the lack of BBB research. Interview by Rebecca N. Lawrence. *Drug Discov Today*, 7 (4), 223-226.
57. Ohtsuki, S., Terasaki, T. (2007) Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res*, 24 (9), 1745-1758.
58. Pardridge, W.M. (2003) Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv*, 3 (2), 90-105, 151.
59. Silva, G.A. (2007) Nanotechnology approaches for drug and small molecule delivery across the blood brain barrier. *Surgical Neurology*, 67 (2), 113-116.
60. Pardridge, W.M. (2001). Brain drug targeting : the future of brain drug development. Cambridge ; New York: Cambridge University Press.
61. Olivier, J.C. (2005) Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx*, 2 (1), 108-119.
62. Huwyler, J., Wu, D., Pardridge, W.M. (1996) Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (24), 14164-14169.
63. Zhang, Y., Schlachetzki, F., Pardridge, W.M. (2003) Global non-viral gene transfer to the primate brain following intravenous administration. *Mol Ther*, 7 (1), 11-18.
64. Shi, N.Y., Zhang, Y., Zhu, C.N., Boado, R.J., Pardridge, W.M. (2001) Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (22), 12754-12759.
65. Shi, N., Pardridge, W.M. (2000) Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (13), 7567-7572.
66. Gref, R., Couvreur, P., Barratt, G., Mysiakine, E. (2003) Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials*, 24 (24), 4529-4537.

67. Kang, Y.S., Saito, Y., Pardridge, W.M. (1995) Pharmacokinetics of [3H]biotin bound to different avidin analogues. *J Drug Target*, 3 (2), 159-165.
68. Lockman, P.R., Mumper, R.J., Khan, M.A., Allen, D.D. (2002) Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm*, 28 (1), 1-13.
69. Couvreur, P., Dubernet, C., Puisieux, F. (1995) Controlled Drug-Delivery with Nanoparticles - Current Possibilities and Future-Trends. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41 (1), 2-13.
70. Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F. (2006) Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, 2 (1), 8-21.
71. Gurny, R., Peppas, N.A., Harrington, D.D., Banker, G.S. (1981) Development of Biodegradable and Injectable Lattices for Controlled Release of Potent Drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 7 (1), 1-25.
72. Ueda, M., Kreuter, J. (1997) Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly (L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation. *J Microencapsul*, 14 (5), 593-605.
73. Tabata, Y., Ikada, Y. (1989) Protein precoating of polylactide microspheres containing a lipophilic immunopotentiator for enhancement of macrophage phagocytosis and activation. *Pharm Res*, 6 (4), 296-301.
74. Bodmeier, R., Chen, H.G. (1990) Indomethacin Polymeric Nanosuspensions Prepared by Microfluidization. *Journal of Controlled Release*, 12 (3), 223-233.
75. Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, 263 (5153), 1600-1603.
76. Lemarchand, C., Gref, R., Passirani, C., Garcion, E., Petri, B., Muller, R. ve diğ erleri. (2006) Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. *Biomaterials*, 27 (1), 108-118.

77. Koosha, F., Muller, R.H. (1987) Production of Polyhydroxybutyrate (Phb) Microparticles and Nanoparticles. *Archiv Der Pharmazie*, 320 (9), 913-913.
78. Koosha, F., Muller, R.H., Davis, S.S., Davies, M.C. (1989) The Surface Chemical-Structure of Poly(Beta-Hydroxybutyrate) Microparticles Produced by Solvent Evaporation Process. *Journal of Controlled Release*, 9 (2), 149-157.
79. Benoit, J.P., Faisant, N., Venier-Julienne, M.C., Menei, P. (2000) Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications. *J Control Release*, 65 (1-2), 285-296.
80. Cohen, S., Yoshioka, T., Lucarelli, M., Hwang, L.H., Langer, R. (1991) Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm Res*, 8 (6), 713-720.
81. Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P., Jarosz, P. (1991) Pseudoephedrine Hcl Microspheres Formulated into an Oral Suspension Dosage Form. *Journal of Controlled Release*, 15 (1), 65-77.
82. Jain, R.A. (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21 (23), 2475-2490.
83. Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N., Kawashima, Y. (1993) Preparations of Biodegradable Nanospheres of Water-Soluble and Insoluble Drugs with D,L-Lactide Glycolide Copolymer by a Novel Spontaneous Emulsification Solvent Diffusion Method, and the Drug Release Behavior. *Journal of Controlled Release*, 25 (1-2), 89-98.
84. Sun, Y.P., Meziani, M.J., Pathak, P., Qu, L. (2005) Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution. *Chemistry*, 11 (5), 1366-1373.
85. Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P. (1979) Polycyanoacrylate Nanocapsules as Potential Lysosomotropic Carriers - Preparation, Morphological and Sorptive Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31 (5), 331-332.

86. Calvo, P., RemunanLopez, C., VilaJato, J.L.,Alonso, M.J. (1997) Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63 (1), 125-132.
87. Calvo, P., RemunanLopez, C., VilaJato, J.L.,Alonso, M.J. (1997) Chitosan and chitosan ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research*, 14 (10), 1431-1436.
88. Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L.,Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 16 (10), 1576-1581.
89. Tian, X.X.,Groves, M.J. (1999) Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from Mycobacterium vaccae in chitosan nanoparticles. *J Pharm Pharmacol*, 51 (2), 151-157.
90. Tokumitsu, H., Ichikawa, H.,Fukumori, Y. (1999) Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharm Res*, 16 (12), 1830-1835.
91. Kawashima, Y., Handa, T., Kasai, A., Takenaka, H., Lin, S.Y.,Ando, Y. (1985) Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. *J Pharm Sci*, 74 (3), 264-268.
92. Xu, Y.,Du, Y. (2003) Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int J Pharm*, 250 (1), 215-226.
93. Ko, J.A., Park, H.J., Hwang, S.J., Park, J.B.,Lee, J.S. (2002) Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int J Pharm*, 249 (1-2), 165-174.
94. Liechty, W.B., Kryscio, D.R., Slaughter, B.V.,Peppas, N.A. (2010) Polymers for Drug Delivery Systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 1 (1), 149-173.

95. Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S., Shakesheff, K.M. (1999) Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev*, 99 (11), 3181-3198.
96. Pillai, O., Panchagnula, R. (2001) Polymers in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*, 5 (4), 447-451.
97. Angelova, N., Hunkeler, D. (1999) Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol*, 17 (10), 409-421.
98. Saltzman, W.M., Fung, L.K. (1997) Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 26 (2-3), 209-230.
99. Leong, K.W., Mao, H.Q., Shipanova-Kadiyala, I., Haller, M., Liu, S.Q., Li, W.P. (1999) Biodegradable poly(phosphoester)s. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 217, U567-U567.
100. Langer, R. (2000) Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res*, 33 (2), 94-101.
101. Ignatius, A.A., Claes, L.E. (1996) In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 17 (8), 831-839.
102. Jalil, R., Nixon, J.R. (1990) Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). III: Effect of polymer molecular weight on the release kinetics. *J Microencapsul*, 7 (3), 357-374.
103. Ravivarapu, H.B., Burton, K., DeLuca, P.P. (2000) Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm*, 50 (2), 263-270.
104. Gopferich, A. (1996) Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 17 (2), 103-114.
105. Li, S. (1999) Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res*, 48 (3), 342-353.
106. Roskos, K.V., Maskiewicz, R. (1997) Degradable controlled release systems useful for protein delivery. *Pharm Biotechnol*, 10, 45-92.

107. Fitzgerald, J.F.,Corrigan, O.I. (1993) Mechanisms Governing Drug Release from Poly-Alpha-Hydroxy Aliphatic Esters - Diltiazem Base Release from Poly-Lactide-Co-Glycolide Delivery Systems. *Polymeric Delivery Systems*, 520, 311-326
108. Deluca, P.P., Mehta, R.C., Hausberger, A.G.,Thanoo, B.C. (1993) Biodegradable Polyesters for Drug and Polypeptide Delivery. *Polymeric Delivery Systems*, 520, 53-79
109. bme.utexas.edu/faculty/schmidt/Courses/BME379/Notes/Notes-Biomaterials-I.pdf
110. Shive, M.S.,Anderson, J.M. (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*, 28 (1), 5-24.
111. Capan, Y., Woo, B.H., Gebrekidan, S., Ahmed, S.,DeLuca, P.P. (1999) Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *J Control Release*, 60 (2-3), 279-286.
112. Iwata, M., Nakamura, Y.,McGinity, J.W. (1999) Particle size and loading efficiency of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) multiphase microspheres containing water soluble substances prepared by the hydrous and anhydrous solvent evaporation methods. *J Microencapsul*, 16 (1), 49-58.
113. Khor, E.,Lim, L.Y. (2003) Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24 (13), 2339-2349.
114. Van Toan, N., Ng, C.H., Aye, K.N., Trang, T.S.,Stevens, W.F. (2006) Production of high-quality chitin and chitosan from preconditioned shrimp shells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (7), 1113-1118.
115. Prabakaran, M. (2008) Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 23 (1), 5-36.

116. Prabakaran, M., Rodriguez-Perez, M.A., de Saja, J.A., Mano, J.F. (2007) Preparation and characterization of poly(L-lactic acid)-chitosan hybrid scaffolds with drug release capability. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 81 (2), 427-434.
117. Sadeghi, A.M., Dorkoosh, F.A., Avadi, M.R., Saadat, P., Rafiee-Tehrani, M., Junginger, H.E. (2008) Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *Int J Pharm*, 355 (1-2), 299-306.
118. Bowman, K., Leong, K.W. (2006) Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int J Nanomedicine*, 1 (2), 117-128.
119. Dodane, V., Amin Khan, M., Merwin, J.R. (1999) Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int J Pharm*, 182 (1), 21-32.
120. Schipper, N.G., Varum, K.M., Artursson, P. (1996) Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res*, 13 (11), 1686-1692.
121. Illum, L. (1998) Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res*, 15 (9), 1326-1331.
122. Janes, K.A., Calvo, P., Alonso, M.J. (2001) Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv Drug Deliv Rev*, 47 (1), 83-97.
123. Mao, H.Q., Roy, K., Troung-Le, V.L., Janes, K.A., Lin, K.Y., Wang, Y. ve diğ erleri. (2001) Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J Control Release*, 70 (3), 399-421.
124. Ma, Z., Lim, L.Y. (2003) Uptake of chitosan and associated insulin in Caco-2 cell monolayers: a comparison between chitosan molecules and chitosan nanoparticles. *Pharm Res*, 20 (11), 1812-1819.

125. Ma, Z., Lim, T.M., Lim, L.Y. (2005) Pharmacological activity of peroral chitosan-insulin nanoparticles in diabetic rats. *Int J Pharm*, 293 (1-2), 271-280.
126. Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J. (1999) Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm Res*, 16 (10), 1576-1581.
127. Pan, Y., Li, Y.J., Zhao, H.Y., Zheng, J.M., Xu, H., Wei, G. ve diğeri. (2002) Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm*, 249 (1-2), 139-147.
128. Andrade, J.D., Hlady, V., Jeon, S.I. (1996) Poly(ethylene oxide) and protein resistance - Principles, problems, and possibilities. *Hydrophilic Polymers*, 248, 51-59.
129. Peracchia, M.T., Fattal, E., Desmaele, D., Besnard, M., Noel, J.P., Gomis, J.M. ve diğeri. (1999) Stealth (R) PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of Controlled Release*, 60 (1), 121-128.
130. Storm, G., Belliot, S.O., Daemen, T., Lasic, D.D. (1995) Surface Modification of Nanoparticles to Oppose Uptake by the Mononuclear Phagocyte System. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17 (1), 31-48.
131. Gref, R., Luck, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S. ve diğeri. (2000) 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 18 (3-4), 301-313.
132. Choi, S.W., Kim, W.S., Kim, J.H. (2003) Surface modification of functional nanoparticles for controlled drug delivery. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 24 (3-4), 475-487.
133. Klibanov, A.L., Maruyama, K., Torchilin, V.P., Huang, L. (1990) Amphipathic Polyethyleneglycols Effectively Prolong the Circulation Time of Liposomes. *Febs Letters*, 268 (1), 235-237.

134. Neal, J.C., Stolnik, S., Schacht, E., Kenawy, E.R., Garnett, M.C., Davis, S.S. ve diğeri. (1998) In vitro displacement by rat serum of adsorbed radiolabeled poloxamer and poloxamine copolymers from model and biodegradable nanospheres. *J Pharm Sci*, 87 (10), 1242-1248.
135. Gombotz, W.R., Wang, G.H., Horbett, T.A., Hoffman, A.S. (1991) Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *J Biomed Mater Res*, 25 (12), 1547-1562.
136. Bazile, D., Prud'homme, C., Bassoullet, M.T., Marlard, M., Spenlehauer, G., Veillard, M. (1995) Stealth Me.PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocytes system. *J Pharm Sci*, 84 (4), 493-498.
137. Vittaz, M., Bazile, D., Spenlehauer, G., Verrecchia, T., Veillard, M., Puisieux, F. ve diğeri. (1996) Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials*, 17 (16), 1575-1581.
138. Stolnik, S., Dunn, S.E., Garnett, M.C., Davies, M.C., Coombes, A.G., Taylor, D.C. ve diğeri. (1994) Surface modification of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres by biodegradable poly(lactide)-poly(ethylene glycol) copolymers. *Pharm Res*, 11 (12), 1800-1808.
139. Pirolo, K.F., Chang, E.H. (2008) Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake? *Trends Biotechnol*, 26 (10), 552-558.
140. Li, Y., Pei, Y., Zhang, X., Gu, Z., Zhou, Z., Yuan, W. ve diğeri. (2001) PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release*, 71 (2), 203-211.
141. Illum, L., Hunneyball, I.M., Davis, S.S. (1986) The Effect of Hydrophilic Coatings on the Uptake of Colloidal Particles by the Liver and by Peritoneal-Macrophages. *International Journal of Pharmaceutics*, 29 (1), 53-65.
142. Plard, J.P., Bazile, D. (1999) Comparison of the safety profiles of PLA(50) and Me.PEG-PLA(50) nanoparticles after single dose intravenous administration to rat. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 16 (1-4), 173-183.

143. Frank, M.M., Fries, L.F. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*, 12 (9), 322-326.
144. Singer, L., Colten, H.R., Wetsel, R.A. (1994) Complement C3 deficiency: human, animal, and experimental models. *Pathobiology*, 62 (1), 14-28.
145. Nie, S. (2010) Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)*, 5 (4), 523-528.
146. Carstensen, H., Muller, R.H., Muller, B.W. (1992) Particle-Size, Surface Hydrophobicity and Interaction with Serum of Parenteral Fat Emulsions and Model-Drug Carriers as Parameters Related to Res Uptake. *Clinical Nutrition*, 11 (5), 289-297.
147. Muller, R.H., Wallis, K.H., Troster, S.D., Kreuter, J. (1992) In vitro Characterization of Poly (Methyl-Methacrylate) Nanoparticles and Correlation to Their In vivo Fate. *Journal of Controlled Release*, 20 (3), 237-246.
148. Norman, M.E., Williams, P., Illum, L. (1992) Human serum albumin as a probe for surface conditioning (opsonization) of block copolymer-coated microspheres. *Biomaterials*, 13 (12), 841-849.
149. Traverso, N., Patriarca, S., Balbis, E., Furfaro, A.L., Cottalasso, D., Pronzato, M.A. ve diğ erleri. (2003) Anti malondialdehyde-adduct immunological response as a possible marker of successful aging. *Exp Gerontol*, 38 (10), 1129-1135.
150. Alexandrova, M.L., Bochev, P.G. (2005) Oxidative stress during the chronic phase after stroke. *Free Radic Biol Med*, 39 (3), 297-316.
151. Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 59 (5), 1609-1623.
152. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43 (2), 109-142.
153. Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I. (1995) Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 35 (1-2), 7-20.

154. Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 5 (5), 415-418.
155. Halliwell, B. (1997) Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev*, 55 (1 Pt 2), S44-49; discussion S49-52.
156. Stief, T.W. (2003) The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypotheses*, 60 (4), 567-572.
157. Cohen, J.H., Kristal, A.R., Stanford, J.L. (2000) Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, 92 (1), 61-68.
158. Packer, L., Weber, S.U., Rimbach, G. (2001) Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr*, 131 (2), 369S-373S.
159. Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004) Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3 (1), 21-33.
160. Korycka-Dahl, M.B., Richardson, T. (1978) Activated oxygen species and oxidation of food constituents. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*, 10 (3), 209-241.
161. Ashok, B.T., Ali, R. (1999) The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol*, 34 (3), 293-303.
162. Padmaja, S., Madison, S.A. (1999) Hydroxyl radical-induced oxidation of azo dyes: a pulse radiolysis study. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 12 (3), 221-226.
163. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med*, 8 (2), 89-193.
164. Ghafourifar, P., Cadenas, E. (2005) Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 26 (4), 190-195.
165. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M. (1999) Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 65 (18-19), 1865-1874.
166. Koshland, D.E., Jr. (1992) The molecule of the year. *Science*, 258 (5090), 1861.
167. Chiueh, C.C. (1999) Neuroprotective properties of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*, 890, 301-311.

168. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39 (1), 44-84.
169. Klatt, P., Lamas, S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem*, 267 (16), 4928-4944.
170. Carr, A.C., McCall, M.R., Frei, B. (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20 (7), 1716-1723.
171. Chan, P.H. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21 (1), 2-14.
172. Minotti, G., Aust, S.D. (1987) The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*, 44 (2-4), 191-208.
173. Poyer, J.L., McCay, P.B. (1971) Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. IV. Dependence on Fe³⁺. *J Biol Chem*, 246 (1), 263-269.
174. Hochstein, P., Ernster, L. (1963) Adp-Activated Lipid Peroxidation Coupled to the Tpnh Oxidase System of Microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 12, 388-394.
175. Basu, A.K., Marnett, L.J. (1984) Molecular requirements for the mutagenicity of malondialdehyde and related acroleins. *Cancer Res*, 44 (7), 2848-2854.
176. Steinbrecher, U.P., Lougheed, M., Kwan, W.C., Dirks, M. (1989) Recognition of oxidized low density lipoprotein by the scavenger receptor of macrophages results from derivatization of apolipoprotein B by products of fatty acid peroxidation. *J Biol Chem*, 264 (26), 15216-15223.
177. Slater, T.F. (1984) Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J*, 222 (1), 1-15.
178. Shewfelt, R.L., Purvis, A.C. (1995) Toward a Comprehensive Model for Lipid-Peroxidation in Plant-Tissue Disorders. *Hortscience*, 30 (2), 213-218.

179. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91 (2), 179-194.
180. Cejas, P., Casado, E., Belda-Iniesta, C., De Castro, J., Espinosa, E., Redondo, A. ve diğeri. (2004) Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer (Spain). *Cancer Causes & Control*, 15 (7), 707-719.
181. Barrera, G., Pizzimenti, S., Dianzani, M.U. (2004) 4-hydroxynonenal and regulation of cell cycle: Effects on the pRb/E2F pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 37 (5), 597-606.
182. Das, U. (2002) A radical approach to cancer. *Med Sci Monit*, 8 (4), RA79-92.
183. Gago-Dominguez, M., Castela, J.E., Pike, M.C., Sevanian, A., Haile, R.W. (2005) Role of lipid peroxidation in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (12), 2829-2839.
184. Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I. (2004) Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog Lipid Res*, 43 (3), 200-227.
185. Green, A.R., Shuaib, A. (2006) Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today*, 11 (15-16), 681-693.
186. Sydserff, S.G., Borelli, A.R., Green, A.R., Cross, A.J. (2002) Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *Br J Pharmacol*, 135 (1), 103-112.
187. Wardlaw, J.M., Warlow, C.P., Counsell, C. (1997) Systematic review of evidence on thrombolytic therapy for acute ischaemic stroke. *Lancet*, 350 (9078), 607-614.
188. Snape, M.F., Baldwin, H.A., Cross, A.J., Green, A.R. (1993) The effects of chlormethiazole and nimodipine on cortical infarct area after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience*, 53 (3), 837-844.
189. Floyd, R.A., Kopke, R.D., Choi, C.H., Foster, S.B., Doblaz, S., Towner, R.A. (2008) Nitrones as therapeutics. *Free Radic Biol Med*, 45 (10), 1361-1374.

190. Ginsberg, M.D. (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*, 55 (3), 363-389.
191. O'Neil, J.M. (2001) The Merck Index.
192. Nakae, D., Kishida, H., Enami, T., Konishi, Y., Hensley, K.L., Floyd, R.A. ve diğ erleri. (2003) Effects of phenyl N-tert-butyl nitron e and its derivatives on the early phase of hepatocarcinogenesis in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Cancer Sci*, 94 (1), 26-31.
193. Floyd, R.A.,Carney, J.M. (1992) Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol*, 32 Suppl, S22-27.
194. Li, P.A., He, Q.P., Nakamura, L.,Csiszar, K. (2001) Free radical spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron inhibits caspase-3 activation and reduces brain damage following a severe forebrain ischemic injury. *Free Radic Biol Med*, 31 (10), 1191-1197.
195. Schmid-Elsaesser, R., Hungerhuber, E., Zausinger, S., Baethmann, A.,Reulen, H.J. (2000) Neuroprotective effects of the novel brain-penetrating antioxidant U-101033E and the spin-trapping agent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron e (PBN). *Exp Brain Res*, 130 (1), 60-66.
196. Marklund, N., Lewander, T., Clausen, F.,Hillered, L. (2001) Effects of the nitron e radical scavengers PBN and S-PBN on in vivo trapping of reactive oxygen species after traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21 (11), 1259-1267.
197. Fan, L.W., Mitchell, H.J., Rhodes, P.G.,Cai, Z. (2008) Alpha-Phenyl-n-tert-butyl-nitron e attenuates lipopolysaccharide-induced neuronal injury in the neonatal rat brain. *Neuroscience*, 151 (3), 737-744.
198. Miyajima, T.,Kotake, Y. (1997) Optimal time and dosage of phenyl N-tert-butyl nitron e (PBN) for the inhibition of nitric oxide synthase induction in mice. *Free Radic Biol Med*, 22 (3), 463-470.
199. Chen, G., Griffin, M., Poyer, J.L.,McCay, P.B. (1990) HPLC procedure for the pharmacokinetic study of the spin-trapping agent, alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron e (PBN). *Free Radic Biol Med*, 9 (2), 93-98.

200. Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures: Methodology Final Guidance (Rapor No). (1999). Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine.
201. Shabir, G.A. (2003) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987 (1-2), 57-66.
202. Tomiyama, N., Tsuji, H., Watanabe, M., Takeda, M., Harada, T., Kobayashi, H. (2000) High-performance liquid chromatographic method for determination of DDT and its degradation products in rat plasma, liver and brain: validation and application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 748 (2), 361-368.
203. Van Zoonen, P., Hoogerbrugge, R., Gort, S.M., van de Wiel, H.J., van't Klooster, H.A. (1999) Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 18 (9-10), 584-593.
204. Karatas, H., Aktas, Y., Gursoy-Ozdemir, Y., Bodur, E., Yemisci, M., Caban, S. ve diğ erleri. (2009) A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *J Neurosci*, 29 (44), 13761-13769.
205. Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Quinoa, E., Riguera, R. (2007) Conjugation of bioactive ligands to PEG-grafted chitosan at the distal end of PEG. *Biomacromolecules*, 8 (3), 833-842.
206. Trudeau-Lame, M.E., Kalgutkar, A.S., LaFontaine, M. (2003) Pharmacokinetics and metabolism of the reactive oxygen scavenger alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron e in the male Sprague-Dawley rat. *Drug Metab Dispos*, 31 (2), 147-152.
207. Chan, T.Y., Privat, S.J., Narducy, K.W., Chaplin, M.D., Waterbury, L.D. (1997) Pharmacokinetics and bioavailability of N-tert-butyl-alpha-phenyl nitron e in rats and dogs. *Proc West Pharmacol Soc*, 40, 57-59.

208. Owens, D.E., 3rd, Peppas, N.A. (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 307 (1), 93-102.
209. Vila, A., Sanchez, A., Janes, K., Behrens, I., Kissel, T., Jato, J.L.V. ve diğeri. (2004) Low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for nasal vaccine delivery in mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57 (1), 123-131.
210. Kilic, A.C., Capan, Y., Vural, I., Gursoy, R.N., Dalkara, T., Cuine, A. ve diğeri. (2005) Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. *J Microencapsul*, 22 (6), 633-641.
211. Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A.G., Ithakissios, D.S. (2002) PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J Control Release*, 79 (1-3), 123-135.
212. Budhian, A., Siegel, S.J., Winey, K.I. (2005) Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. *J Microencapsul*, 22 (7), 773-785.
213. Wischke, C., Schwendeman, S.P. (2008) Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int J Pharm*, 364 (2), 298-327.
214. Cegnar, M., Kos, J., Kristl, J. (2004) Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22 (5), 357-364.
215. Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F.X. ve diğeri. (2007) Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28 (5), 869-876.
216. Abdelwahed, W., Degobert, G., Fessi, H. (2006) A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): formulation and process optimization. *Int J Pharm*, 309 (1-2), 178-188.

217. http://www.malvern.com/labeng/products/iwtm/zeta_potential.htm.
218. Benita, S., Levy, M.Y. (1993) Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci*, 82 (11), 1069-1079.
219. Lu, Y.H., Chen, Y.Y., Lin, H., Wang, C., Yang, Z.D. (2010) Preparation of Chitosan Nanoparticles and Their Application to *Antheraea pernyi* Silk. *Journal of Applied Polymer Science*, 117 (6), 3362-3369.
220. Choi, S.H., Park, T.G. (2006) G-CSF loaded biodegradable PLGA nanoparticles prepared by a single oil-in-water emulsion method. *Int J Pharm*, 311 (1-2), 223-228.
221. Mallarde, D., Boutignon, F., Moine, F., Barre, E., David, S., Touchet, H. ve diğ erleri. (2003) PLGA-PEG microspheres of teverelix: influence of polymer type on microsphere characteristics and on teverelix in vitro release. *Int J Pharm*, 261 (1-2), 69-80.
222. Mosqueira, V.C., Legrand, P., Morgat, J.L., Vert, M., Mysiakine, E., Gref, R. ve diğ erleri. (2001) Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: effects of PEG chain length and density. *Pharm Res*, 18 (10), 1411-1419.
223. Zhu, W., Fung, P.C. (2000) The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl₄-induced acute liver injury of mice. *Free Radic Biol Med*, 29 (9), 870-880.

EKLER



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

18 Eylül 2009

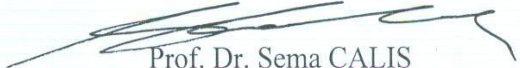
Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/ 54

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 17.09.2009 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2009/8
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2009/41
KARAR NUMARASI	: 2009/41-9
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Yılmaz Çapan
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. Yasemin Gürsoy Özdemir
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Yrd. Doç. Dr. Müge Yemişçi Özkan, Ecz. Kıvılcım Öztürk
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 30 adet Swiss Albino fare
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 6 ay

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Yılmaz Çapan'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2009/41 kayıt numaralı "*Alfa-Fenil-N-Tert-Butil Nitron (PBN) Yüklü Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve İn vivo Olarak Değerlendirilmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkan V.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/ 48

03 Mayıs 2010

Prof. Dr. Yılmaz Çapan
Eczacılık Fakültesi
Farmasotik Teknoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Prof. Dr. Çapan,

Sorumlu araştırmacısı olduğunuz Kurulumuzun 17.09.2009 tarihli toplantısında onaylanan 2009/41 kayıt numaralı ve “*Alfa-Fenil-N-Tert-Butil Nitron (PBN) Yüklü Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve İn vivo Olarak Değerlendirilmesi*” başlıklı çalışmanızda etik kurul izin süresinin 6 ay uzatılmasını talep ettiğiniz 14.04.2010 tarihli dilekçeniz Kurulumuzun 20.04.2010 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey

The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles

K. OZTURK, S. CABAN, S. KOZLU, E. KADAYIFCI, F. YERLIKAYA, Y. CAPAN

Received March 26, 2010, accepted March 30, 2010

Yilmaz Capan, Ph. D., Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey
ycapan@hacettepe.edu.tr

Pharmazie 65: 1–5 (2010)

doi: 10.1691/ph.2010.0084

In this work, PLGA nanoparticles were prepared by an emulsification-diffusion technique. The main objective was to optimize the preparation of formulations by evaluating the influence of the technological parameters on the physicochemical properties of PLGA nanoparticles. The effects of variations in polymer and emulsifier concentrations, and homogenization duration, rate and type on the particle size distribution, surface charge and morphology of nanoparticles were assessed. The smallest nanoparticles (177.53 ± 2.78 nm) were obtained with a 2% PLGA (w/v) concentration in the organic phase and 3% PVA (w/v) in the aqueous phase and were prepared by an emulsification-diffusion method via ultrasonic homogenization at a power of 80 W applied for 30 s. It was observed that nanoparticles prepared by Ultra Turrax[®] were more spherical but larger. In addition, increasing the PVA concentration in the aqueous phase, increasing the PLGA concentration in the organic phase and increasing the homogenization rate decreased the zeta potential values of PLGA nanoparticles.

1. Introduction

Recent studies indicate considerable interest in the nanoparticle field. Theoretical understanding of nanoparticle structure and related characteristics is very important to achieve pharmaceutical properties and functionalities for new applications not available with conventional materials (Venugopal et al. 2009). Nanoparticle structure, size distribution, polydispersity, composition, stability and agglomeration present a number of challenging problems for drug delivery systems (Torchilin 2000).

However, technological parameters such as polymer concentration, polymer composition, and homogenization rate, duration and method have significant influences on the characteristics of nanoparticles. These parameters lead to variations in nanoparticle size and zeta potential which are very important parameters for their trans-membranal passage and tissue targeting properties (Gaumet et al. 2007; Quintanar-Guerrero et al. 1998).

In addition, the physicochemical properties of nanoparticles are very important in brain drug targeting (Kilic et al. 2005; Pinarbasli et al. 2009). Due to the particle size and surface charge of nanoparticles the amount of active substance transferred may vary (Aktas et al. 2005 a,b; Cetin et al. 2007). In this study we evaluated the technological parameters influencing PLGA nanoparticles in order to design more effective formulations for brain drug targeting (Cetin et al. 2008; Karatas et al. 2009; Yemisci et al. 2006). PLGA, a copolymer which is a United States Food and Drug Administration (FDA) approved polymer, is particularly suitable for drug delivery applications. PLGA has been studied for many years as a suitable drug delivery material, mainly due to its chemical biocompatibility, total biodegradability, and non-toxic degradation products (Anderson and Shive 1997).

A common method for the sustained release of drugs is the production of a PLGA microsphere formulation by the oil-in-water emulsion and solvent evaporation technique, where the drug is evenly distributed throughout a soluble PLGA matrix and then emulsified. Once the organic solvent evaporates off, a suspension of solid microparticles is left. The active substance can be co-dissolved in the PLGA if hydrophobic, or prepared as a double emulsion or suspension if not (Kilic et al. 2005). The hydrophilicity of this polymer is defined by the lactide:glycolide ratio and can be used to alter the release rate in a microparticulate formulation (Janoria and Mitra 2007). In this study, Resomer[®] RG 503 H is used, being rich in free carboxylic groups (intrinsic viscosity in chloroform: 0.4 dL/g) and having a polymer composition with molar ratios (D,L-lactide:glycolide) of 48:52 to 52:48. The polymer molecular weight also influences the drug release rate. The rate of degradation is inversely proportional to the proportion of lactide monomer in the polymer strands, and the rate of diffusion of drugs through the polymer matrix is inversely proportional to the molecular weight of the PLGA polymer (Kim et al. 2005).

The main goal of this work is to optimize PLGA nanoparticle preparation so that the efficiency of PLGA nanoparticle formation is high (Lamprecht et al. 1999). Here we report the particle size distribution, morphology and surface charge of PLGA nanoparticles in order to show the effect of technological parameters on their physicochemical properties.

2. Investigations, results and discussion

In order to determine the influences of the technological parameters on the final nanoparticles, the physicochemical properties

ORIGINAL ARTICLES

Table 1: Effect of PLGA concentration and ultrasonic homogenization power on particle size of nanoparticles (nm) (mean \pm standard error)

Ultrasonic homogenization power (W)	PLGA concentration (% w/v)		
	2	3	4
40	184.98 \pm 3.79	185.98 \pm 3.60	186.30 \pm 3.00
80	177.53 \pm 2.78	180.01 \pm 1.86	182.03 \pm 2.92

PVA concentration in aqueous phase 3% (w/v)

of the nanoparticles were evaluated in terms of their particle size distribution, morphology and surface charge.

2.1. Particle size distribution

With respect to particle size analysis, as demonstrated in Tables 1–3, all the systems prepared were on a nano scale (mean diameter <400 nm), exhibiting various size distributions (polydispersity index <0.80) (Fig. 1). It was observed that increasing PVA concentration in the aqueous phase resulted in smaller particle sizes and narrower particle size distributions ($p < 0.05$), because PVA in the water phase enhances the stabilization of water droplets against coalescence and results in a more uniform particle size distribution as the viscosity of the aqueous phase increases (Capan et al. 1999; Yang et al. 2001; Zambaux et al. 1998). Also higher homogenization rates and longer durations with the Ultra Turrax[®] decreased the mean diameter of the nanoparticles ($p < 0.05$). Using an ultrasonic homogenizer instead of the Ultra Turrax[®] yielded smaller particles, and with a rise of ultrasonic power from 40 W to 80 W smaller nanoparticles were also obtained ($p < 0.05$) (Abismail et al. 1999). No statistically significant difference was observed when the PLGA concentration in the organic phase was increased from 2% (w/v) to 4% (w/v) when using ultrasonic homogenization, but a statistically significant difference was observed when the Ultra Turrax[®] was used. Further, increasing the polymer concentration in the organic phase with increasing duration of homogenization did not affect the particle size of the nanoparticles. The smallest nanoparticles (177.53 \pm 2.78 nm) were obtained with a 2% (w/v) PLGA concentration in the organic phase and 3% (w/v) PVA in the aqueous phase, and were prepared by the emulsification-diffusion method using an ultrasonic homogenizer at a power of 80 W applied for 30 s.

2.2. Morphology

TEM micrographs of nanoparticles prepared using 2% (w/v) PLGA in organic phase and 3% (w/v) PVA in aqueous phase homogenized by both Ultra Turrax[®] (at 11000 rpm for 4 min.)

Table 2: Effect of PVA concentration, Ultra Turrax[®] homogenization rate and duration on particle size of nanoparticles (nm) (mean \pm standard error)

Homogenization duration (min)	PVA concentration (% w/v)					
	1		3		5	
	Homogenization rate (rpm)					
	11000	16000	11000	16000	11000	16000
2	329.00 \pm 5.81	241.32 \pm 2.43	265.55 \pm 4.02	238.68 \pm 7.28	256.77 \pm 2.88	217.43 \pm 2.20
4	282.21 \pm 8.51	227.64 \pm 4.59	263.72 \pm 4.94	209.78 \pm 3.31	250.62 \pm 1.42	209.35 \pm 1.73

PLGA concentration in organic phase 2% (w/v)

Table 3: Effect of PLGA concentration and Ultra Turrax[®] homogenization duration on particle size of nanoparticles (nm) (mean \pm standard error)

Homogenization duration (min)	PLGA concentration (% w/v)		
	2	3	4
2	265.55 \pm 4.02	304.01 \pm 1.27	325.27 \pm 8.24
4	263.72 \pm 4.94	300.75 \pm 8.87	317.68 \pm 2.74

Ultra Turrax[®] homogenization rate 11000 rpm and PVA concentration in aqueous phase 3% (w/v)

and ultrasonic homogenizer (at a power of 40 W applied for 30 s) are presented in Fig. 2. Nanoparticles which were prepared by ultrasonication exhibit smaller but nonspherical shaped particles probably because of the high power applied. It is observed that nanoparticles prepared by Ultra Turrax[®] were better separated and were spherical with larger sizes.

2.3. Surface charge

All nanoparticle formulations exhibited a net negative charge with zeta potential values ranging from -0.59 ± 0.52 to -18.81 ± 0.23 mV. It was observed that increasing PVA concentration in the aqueous phase, increasing PLGA concentration in the organic phase and increasing homogenization rate decreased zeta potential values, as well as affecting the particle size analyses ($p < 0.05$). Homogenization duration was the only variable not to affect the zeta potential of the nanoparticles (Tables 4–6) (Fig. 3). Surface charge is recognized to affect the stability and influence interactions with the biological milieu after *in vivo* administration, as well as affecting the release rate of a loaded substance and interactions with cells of colloidal systems. It is known that both PLGA and PVA have negative zeta potential values and increasing concentrations of both polymers can cause a decrease in the zeta potential of nanoparticles (Kumar et al. 2004; Vandervoort and Ludwig 2002).

The results obtained show that the technological parameters selected in this study permitted reproducible formation of nanometric, almost spherical and homogenous PLGA nanoparticles. Moreover, it is shown that increasing homogenization rate and duration; increasing ultrasonic homogenization power and increasing PVA concentration in the aqueous phase decrease the mean diameter of PLGA nanoparticles. Based on these results, it can be concluded that the technological experimental conditions developed in this study can be used to design specific drug delivery systems in which the physicochemical properties of the nanoparticles are important and for scale-up studies of nanoparticle formulations.

ORIGINAL ARTICLES

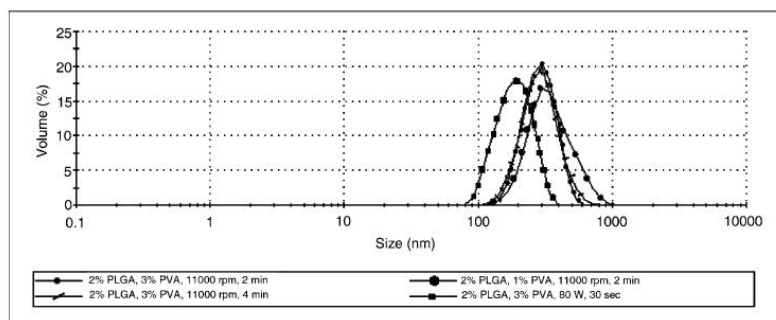


Fig. 1: Effects of PVA concentration, homogenization type and duration on particle size distribution of PLGA nanoparticles

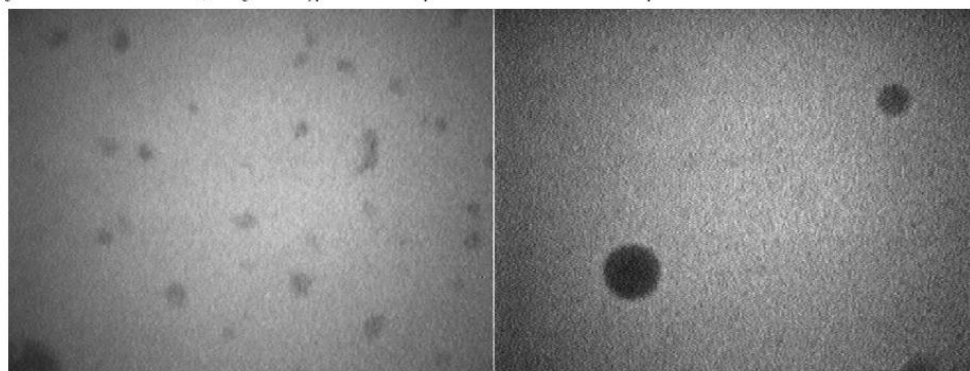


Fig. 2: Transmission electron micrographs of nanoparticles prepared using (a) ultrasonic homogenization (40 W for 30 s) with 2% (W/V) PLGA concentration in organic phase and 3% (w/v) PVA concentration in aqueous phase (x100000 magnification); (b) Ultra Turrax® (11000 rpm for 4 min) with 2% (w/v) PLGA concentration in organic phase and 3% (w/v) PVA concentration in aqueous phase (x16700 magnification)

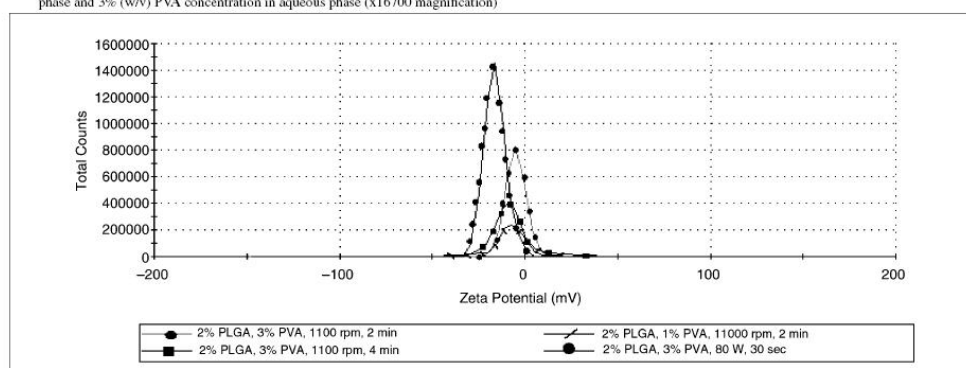


Fig. 3: Effects of PVA concentration, homogenization type and duration on zeta potential values of PLGA nanoparticles

Table 4: Effect of PVA concentration, Ultra Turrax® homogenization rate and duration on zeta potential of nanoparticles (mV) (mean \pm standard error)

Homogenization duration (min)	PVA concentration (% w/v)					
	1		3		5	
	Homogenization rate (rpm)					
	11000	16000	11000	16000	11000	16000
2	-2.09 ± 1.52	-7.59 ± 0.35	-5.02 ± 0.82	-16.25 ± 2.15	-10.93 ± 1.19	-18.81 ± 0.23
4	-0.59 ± 0.52	-6.95 ± 0.47	-5.87 ± 1.60	-14.86 ± 0.54	-11.29 ± 0.38	-17.64 ± 0.20

PLGA concentration in organic phase 2% (w/v)

ORIGINAL ARTICLES

Table 5: Effect of PLGA concentration and ultrasonic homogenization power on zeta potential of nanoparticles (mV) (mean \pm standard error)

Ultrasonic homogenization power (W)	PLGA concentration (% w/v)		
	2	3	4
40	-7.15 ± 1.87	-10.53 ± 3.37	-12.13 ± 0.35
80	-6.05 ± 1.28	-10.45 ± 0.51	-11.70 ± 0.50

PVA concentration in aqueous phase 3% (w/v)

Table 6: Effect of PLGA concentration and Ultra Turrax[®] homogenization duration on zeta potential of nanoparticles (mV) (mean \pm standard error)

Homogenization duration (min)	PLGA concentration (% w/v)		
	2	3	4
2	-5.02 ± 0.82	-10.90 ± 0.76	-13.70 ± 3.09
4	-5.87 ± 1.60	-10.40 ± 1.00	-14.30 ± 2.12

Ultra Turrax[®] homogenization rate is 11000 rpm and PVA concentration in aqueous phase 3% (w/v)

3. Experimental

3.1. Materials

PLGA (50:50; Resomer[®] RG 503 H, M_w : 28000 Da) was purchased from Boehringer Ingelheim Pharma GmbH (Ingelheim, Germany). Polyvinyl alcohol (PVA) (M_w : 30000–70000 Da) was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA). Ethyl acetate was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Deionized water was obtained by a Millipore Milli-Q[®] System (Bedford, USA).

3.2. Preparation of blank PLGA nanoparticles

Nanoparticles were prepared by the emulsification-diffusion method (Kilic et al. 2005). We used PVA, since it is one of the most commonly used polymer surfactants to stabilize the dispersed phase. Briefly, 10 mL of PLGA solution in ethyl acetate was added into 20 mL of aqueous PVA solution. Then, the emulsion was homogenized with an IKA[®] T25 Basic Ultra Turrax[®] (Staufen, Germany) at 11000 rpm for 2 min, and under magnetic stirring conditions 20 mL of deionized water was added into the dispersion in 2 min, to achieve diffusion of the organic phase into the aqueous phase. The organic phase was then evaporated at room temperature with magnetic stirring for 24 h. The nanosuspension obtained was centrifuged at 13000 rpm for 20 min to collect nanoparticles. To remove the residual PVA adsorbed on the nanoparticles, the centrifugate was washed three times with deionized water, since it is very difficult to remove and potentially carcinogenic (Carrio et al. 1995).

In an attempt to investigate the influence of technological parameters on the physicochemical properties of PLGA nanoparticles, different experimental conditions were evaluated. Two distinct methods for the homogenization of emulsion were tested: (i) homogenization by Ultra Turrax[®] (Ding and Shah 2009) and (ii) homogenization by a Bandelin Electronic Sonoplus HD 2200 ultrasonic homogenizer (Berlin, Germany) (Lee et al. 2008). When using the Ultra Turrax[®], different homogenization rates (11000 and 16000 rpm) and durations (2 and 4 min) were assessed. Different conditions (40 and 80 W of ultrasonic power) of ultrasonic homogenization were also evaluated.

In addition to the experimental conditions, the effects of formulation variables such as PVA concentration in the aqueous phase (1%, 3% and 5%, w/v) and PLGA concentration in the organic phase (2%, 3%, and 4%, w/v) were also investigated.

3.3. Physicochemical characterization

3.3.1. Particle size distribution

Mean particle diameter and polydispersity index was determined by dynamic light scattering using a Malvern Instruments Zetasizer Nano Series (Malvern, UK). For each sample, the mean diameter of six determinations was calculated. For a monodisperse system, the polydispersity index should be between 0.03 and 0.06 (Zambaux et al. 1998).

3.3.2. Morphology

The morphology of the nanoparticles was screened using a Sony LEO 906E transmission electron microscope (TEM) (Tokyo, Japan). A drop of the nanoparticle suspension was placed on copper electron microscopy grids and stained with 2% (w/v) uranyl acetate. After 24 h the dried samples were examined.

3.3.3. Surface charge

Nanoparticles were also characterized with respect to zeta potential using a Malvern Instruments Zetasizer Nano Series (Malvern, UK). Samples of prepared suspensions were diluted in deionized water and placed in disposable measurement cells and then measured.

Acknowledgement: The authors would like to acknowledge the Department of Histology-Embryology, Faculty of Medicine, Ankara University for TEM micrographs.

References

- Abismail B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C (1999) Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrason Sonochem* 6: 75–83.
- Aktas Y, Andrieux K, Alonso MJ, Calvo P, Gursoy RN, Couvreur P, Capan Y (2005a) Preparation and *in vitro* evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *Int J Pharm* 298: 378–383.
- Aktas Y, Yemisci M, Andrieux K, Gursoy RN, Alonso MJ, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quinoa E, Riguera R, Sargon MF, Celik HH, Demir AS, Hincal AA, Dalkara T, Capan Y, Couvreur P (2005b) Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjugate Chem* 16: 1503–1511.
- Anderson JM, Shive MS (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Del Rev* 28: 5–24.
- Capan Y, Woo BH, Gebrekidan S, Ahmed S, DeLuca PP (1999) Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA. *J Control Release* 60: 279–286.
- Carrio A, Schwach G, Coudane J, Vert M (1995) Preparation and degradation of surfactant-free PLGA microspheres. *J Control Release* 37: 113–121.
- Cetin M, Aktas Y, Vural I, Capan Y, Dogan LA, Duman M, Dalkara T (2007) Preparation and *in vitro* evaluation of bFGF-loaded chitosan nanoparticles. *Drug Delivery* 14: 525–529.
- Cetin M, Youn Y, Capan Y, Lee K (2008) Preparation and characterization of salmon calcitonin-biotin conjugates. *AAPS PharmSciTech* 9: 1191–1197.
- Ding WK, Shah NP (2009) Effect of homogenization techniques on reducing the size of microcapsules and the survival of probiotic bacteria therein. *J Food Sci* 74: M231–236.
- Gaumet M, Gurny R, Delie F (2007) Fluorescent biodegradable PLGA particles with narrow size distributions: preparation by means of selective centrifugation. *Int J Pharm* 342: 222–230.
- Janoria KG, Mitra AK (2007) Effect of lactide/glycolide ratio on the *in vitro* release of ganciclovir and its lipophilic prodrug (GCV-monobutylate) from PLGA microspheres. *Int J Pharm* 338: 133–141.
- Karatas H, Aktas Y, Gursoy-Ozdemir Y, Bodur E, Yemisci M, Capan S, Vural A, Pinarbasli O, Capan Y, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Riguera R, Andrieux K, Couvreur P, Dalkara T (2009) A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection. *J Neurosci* 29: 13761–13769.
- Kilic AC, Capan Y, Vural I, Gursoy RN, Dalkara T, Cuine A, Hincal AA (2005) Preparation and characterization of PLGA nanospheres for the targeted delivery of NR2B-specific antisense oligonucleotides to the NMDA receptors in the brain. *J Microencapsul* 22: 633–641.
- Kim JM, Seo KS, Jeong YK, Lee HB, Kim YS, Khang G (2005) Co-effect of aqueous solubility of drugs and glycolide monomer on *in vitro* release rates from poly(D,L-lactide-co-glycolide) discs and polymer degradation. *J Biomater Sci-Polym Ed* 16: 991–1007.
- Kumar MNVR, Bakowsky U, Lehr CM (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials* 25: 1771–1777.
- Lamprecht A, Ubrich N, Hombreiro Perez M, Lehr C, Hoffman M, Maincent P (1999) Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *Int J Pharm* 184: 97–105.
- Lee LY, Wang CH, Smith KA (2008) Supercritical antisolvent production of biodegradable micro- and nanoparticles for controlled delivery of paclitaxel. *J Control Release* 125: 96–106.

ORIGINAL ARTICLES

- Pinarbasli O, Aktas Y, Dalkara T, Andrieux K, Alonso MJ, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Riguera R, Couvreur P, Capan Y (2009) Preparation and evaluation of alpha-phenyl-n-tert-butyl nitrene (PBN)-encapsulated chitosan and PEGylated chitosan nanoparticles. *Pharmazie* 64: 436–439.
- Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E (1998) Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm* 24: 1113–1128.
- Torchilin VP (2000) Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* 11: S81–S91.
- Vandervoort J, Ludwig A (2002) Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int J Pharm* 238: 77–92.
- Venugopal J, Prabhakaran MP, Low S, Choon AT, Deepika G, Dev VRG, Ramakrishna S (2009) Continuous nanostructures for the controlled release of drugs. *Cur Pharm Des* 15: 1799–1808.
- Yang YY, Chung TS, Ng NP (2001) Morphology, drug distribution, and *in vitro* release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials* 22: 231–241.
- Yemisci M, Vural I, Bozdog S, Cetin M, Soylemezoglu F, Capan Y, Dalkara T (2006) Treatment of malignant gliomas with mitoxantrone-loaded poly (lactide-co-glycolide) microspheres. *Neurosurgery* 59: 1296–1302.
- Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alonso MJ, Labrude P, Vigneron C (1998) Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Control Release* 50: 31–40.

International Microencapsulation Society



17th International Symposium on MICROENCAPSULATION



September 29 – October 1, 2009
Nagoya Congress Center
Nagoya, Japan

THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-BASED NANOPARTICLES



SEÇİL ÇAPAN¹, EZGİ KADAYIĞÇI¹, SERHAT KOZLU¹, KIVILCIM ÖZTÜRK¹, FIRAT YERLİKAYA¹, EDUARDO FERNANDEZ-MEGIA², RAMÓN NOVDA-CARBALLAL³, EMILIO QUIÑOÁ⁴, RICARDO RIGUERA⁴, YESİM AKTAŞ⁵, TURGAY DALKARA⁵, YILMAZ ÇAPAN¹

¹Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ahi Evran University, Ahi Evran, Turkey
²Department of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela, Spain
³Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Ataturk University, Erzurum, Turkey
⁴Department of Technology, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum, Turkey
⁵Department of Nanotechnology, Faculty of Medicine, Ataturk University, Ahi Evran, Turkey
seccapan@ahievran.edu.tr



INTRODUCTION

Chitosan, a (1-4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan, has structural characteristics similar to glycosaminoglycans. This polycationic biopolymer is generally obtained by alkaline deacetylation of chitin, which is the main component of the exoskeleton of crustaceans, such as shrimps [1]. Chitosan has interesting biopharmaceutical characteristics such as pH sensitivity, biocompatibility and low toxicity [2,3]. Moreover, chitosan is metabolized by certain human enzymes, especially lysozyme, and is considered as biodegradable [4]. Due to these favorable properties, the interest in chitosan and its derivatives as excipients in drug delivery has been increased in recent years [5,6]. The interest in chitosan arises mainly from the fact that this natural polysaccharide allows the production of biocompatible and biodegradable drug delivery systems. It is extremely important that chitosan be aqueousoluble and positively charged. These properties enable it to interact with negatively charged polymers, macromolecules and polyions on contact in an aqueous environment. Chitosan has the special feature of adhering to mucosal surfaces, a fact that makes it a useful polymer for mucosal drug delivery [7,8]. Many studies have reported the use of chitosan in the formation of gels, particles, and microspheres. The main objective of this work is to optimize the preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles.

EXPERIMENTAL METHODS

Preparation of CS, CS-PEG and CS-PEG-BIOTIN Nanoparticles

CS, CS-PEG and CS-PEG-BIOTIN nanoparticles were prepared according to the ionotropic gelation process [9, 10]. Chitosan nanoparticles were obtained upon the addition of a TPP aqueous solution (0.4 mg/ml) to a CS solution (1.75 mg/ml) stirred at room temperature, whereas in CS-PEG and CS-PEG-biotin nanoparticle formulations, the concentrations are 1 mg/ml for CS-PEG and CS-PEG-Biotin and 0.04 mg/ml for TPP. The formation of nanoparticles was a result of the interaction between the negative groups of TPP and the positively charged amino groups of chitosan. Nanoparticles were collected by centrifugation at 10 000 rpm on a 10 µl glycerol bed for 1 hr and supernatants were discarded (Fig. 1).

Characterization of Nanoparticles

The freshly prepared nanoparticles were centrifuged and washed with deionized water and later resuspended. The size (Z-average) and zeta potential of the nanoparticles were analyzed by light scattering method in triplicate using a Zetasizer Nanoseries-ZS (Malvern Instruments, UK). The morphology of the nanoparticles was screened by Transmission Electronic Microscopy (TEM) (LEO 906E, Sony, Japan).



Figure 1. Preparation of chitosan nanoparticles.

RESULTS AND DISCUSSION

The particle diameters (Z-average) of CS, CS-PEG and CS-PEG-Biotin nanoparticles are 351.76±24.88 nm, 142.87±13.56 nm, 398.96±62.75 nm, respectively. All formulations have exhibited almost spherical particle shapes (Table 1) (Fig. 2).

Table 1
Particle size and zeta potential of blank chitosan based nanoparticles.

Polymer	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
CS	351.76±24.88	21.15±1.68
CS-PEG	142.87±13.56	17.04±2.01
CS-PEG-BI0	398.96±62.75	16.23±1.89

The magnitude of the measured zeta potential is an indication of the repulsive force that is present and can be used to predict the long-term stability of the product. If all the particles in suspension have a large negative or positive zeta potential then they will tend to repel each other and there is no tendency for the particles to come together. However, if the particles have low zeta potential values then there is no force to prevent the particles coming together and flocculating. The zeta potentials of CS, CS-PEG and CS-PEG-BI0 nanoparticles are measured as 21.15±1.68 mV, 17.04±2.01 mV, 16.23±1.89 mV, respectively (Table 1).



Figure 2. (A) TEM of blank chitosan nanoparticles, (B) TEM of blank chitosan-PEG nanoparticles, (C) TEM of blank chitosan-PEG-BI0 nanoparticles.

Consequently the physicochemical properties of chitosan and modified chitosan nanoparticles display a significant difference due to preparation parameters.

CONCLUSION

According to the data obtained, the parameters effective on nanotechnological production are evaluated. As a result of numerous trials, the optimization for preparation and characterization of chitosan-based nanoparticles is assessed providing the repeatability and reproducibility of the preparation method. Chitosan-based nanotechnology opens a new and interesting perspective for drug delivery development.

Over the last few years, an impressive number of chitosan derivatives have been developed as carriers for drug delivery. The approach of chemical modification of chitosan or grafting chitosan with other functional materials such as stimuli-responsive polymers, cyclodextrins and biomolecules has received potential importance in drug delivery fields since the resulted materials exhibit an improved drug loading capacity and sustained release behavior with other unique properties such as stimuli-sensitivity, good mechanical strength, biocompatibility, and biodegradability.

REFERENCES

1. TN. Yan et al., J. Chem. Tech. Biotech., 81(7): 1513–1518, (2006).
2. M. Prabhakaran et al., Carbohydr. Polym., 63(2): 153–166, (2006).
3. M. Prabhakaran et al., Mater. Sci. Forum., 514–516(1): 1010–1014, (2006).
4. M. Prabhakaran et al., J. Biomed. Mater. Res., Part B: Appl. Biomater., 81B(2): 427–434, (2007).
5. S. Mia et al., Eur. J. Pharm. Sci., 19(5): 345–353, (2003).
6. M. Prabhakaran et al., Drug Delivery, 12(1): 41–57, (2005).
7. C. Lehr et al., Int. J. Pharm., 70(1–3): 43–48, (1992).
8. H.L. Luoben et al., Pharm. Res., 13(11): 1668–1672, (1996).
9. Y. Aktas et al., Int. J. Pharm., 290:378–383, (2005).
10. P. Cabo et al., J. Appl. Polym. Sci., 63:125–132, (1997).

**REGISTER AS
A GROUP AND SAVE
HUNDREDS OF DOLLARS!
See page 86
for details**

Preliminary Program

2009 AAPS Annual Meeting and Exposition

November 8–12, 2009
Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, USA

CLICK HERE TO REGISTER

**Ampen, DPT, AstraZeneca,
Lilly, Catalent and Pfizer
Employees Received a \$125.00
registration discount.
See page 87 for details**

aaps American Association of
Pharmaceutical Scientists

For Up-to-Date Information, Log on to:
www.aapspharmaceutica.com/annualmeeting

Tuesday Morning Contributed Papers

OSTER LEGEND M1000 series: Monday afternoon session
W4000 series: Wednesday morning session

T2000 series: Tuesday morning session
W5000 series: Wednesday afternoon session

T3000 series: Tuesday afternoon session
R6000 series: Thursday morning session

- 2233 Novel Nano/Microparticulate Oral Melanoma Vaccine**
T. Bhowmik, B. D'Souza, M. D'Souza, S. Perisamy, R. Shashidharamurthy
- 2234 A Nano-medicine Transports a Peptide Caspase-3 Inhibitor Across the Blood-brain Barrier (BBB) and Provides Neuroprotection**
H. Karatas, Y. Aktas, Y. Gursoy-Ozdemir, E. Bodur, M. Yemisci, O. Pinarbasli, S. Caban, Y. Capan, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, R. Riguera, K. Andrieux, P. Couvreur, T. Dalkara
- 2235 Brain Delivery of Fluorescent Dyes Loaded Chitosan Based Nanoparticles**
H. Karatas, Y. Aktas, Y. Gursoy-Ozdemir, E. Bodur, M. Yemisci, O. Pinarbasli, S. Caban, Y. Capan, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, R. Riguera, K. Andrieux, P. Couvreur, T. Dalkara
- 2236 The Influence of Technological Parameters on the Physicochemical Properties of Blank PLGA Nanoparticles**
K. Ozturk, S. Caban, E. Kadayifci, S. Kozlu, F. Yerlikaya, Y. Capan
- 2237 Controlled Release of Fxiii Inhibitors From Self-lubricating Silicone Elastomers to Produce a Novel Bioactive Biomaterial for the Treatment of Catheters and Medical Device Related Infection**
N. Daneshpour, Y. Perrie, R. Collighan, A. Mongeot, D. Rathbone, M. Griffin
- 2238 Dissolution Profiles of Natural Anti-diabetic Product 5-O-[β -D-Apiofuranosyl-(1 β -D-Glucopyranosyl)-7-Methoxy-3',4'-Dihydroxy-4-Phenylcumarine, (AG-4-Phenylcumarine), in Capsules at Three pHs**
I. Fuentes, R. Cañas, K. Rubio, L. Mayet
- 2239 Investigation of Integrin $\alpha_{v\beta_3}$ and Matrix Metalloprotease-2 (MMP-2) Cooperation on the Surface of Cancer and Endothelial Cells**
D. Vartak, R. Gemeinhart
- T2240 Anti-RON Antibody-directed Immunoliposomes Enhance Doxorubicin Cytotoxicity in Colon Cancer Cells Under Chronic Hypoxia**
S. Guin, S. Padhye, M. Wang
- T2241 Particle Manufacture for Targeted Oral Delivery in a Rodent Model**
S. Jang, S. Thitinan, J. McConville, A. Ficht
- T2242 Biowaiver Extension to Biopharmaceutics Classification System Class III Drug Products: Amlodipine Besylate**
H. Jung-Cook, L. Mayet-Cruz, K. Valero, I. Fuentes, K. Rubio
- T2243 Evaluation of the Kinetics of siRNA Mediated Apolipoprotein-B Gene Silencing Using Two Types of siRNA**
M. Lambros, H. Mulamalla, B. Mack, M. Davis
- T2244 Characterization of Processability and Drug Release from Isomalt and Sucrose Based Starter Pellets**
O. Luhn, N. Kállai, J. Drédan, J. Bernard, I. Klebovich, I. Antal
- T2245 Erythropoietin (EPO) Coated Microprojection Transdermal System: Pre-clinical Formulation, Stability and Delivery**
M. Ameri, E. Peters, X. Wang, P. Daddona, Y. Maa
- T2246 Comparison of Dissolution Profiles for Ketorolac Tromethamine Tablets Using Three Different Media**
L. Mayet-Cruz, H. Jung, L. López, I. Fuentes, K. Rubio, K. Valero
- T2247 Enhancing Thermal Stability and Activity of Proteins: Sugar Based Chiral Ionic Liquids**
V. Mudhivarthi, Z. Waqar, M. Duff Jr., C. Kumar
- T2248 Nanomaterials-cell Interactions: The Role of Caveolae Mediated Endocytosis in Trafficking of Cross-linked Polymer Micelles in Normal and Cancer Cells**
G. Sahay, J. Kim, A. Kabanov, T. Bronich
- T2249 Targeted Combinatorial Treatment of Ovarian Cancer and Intraperitoneal Metastases**
M. Zhang, O. Garbuzenko, L. Rodriguez, T. Minko
- Drug Delivery Biopharmaceutics/Large Molecule/Targeted Drug Delivery and Prodrugs**
- T2250 In Vitro and In Vivo Gene Delivery Mediated by Folate-PEG Appended Dendrimer/ α -Cyclodextrin Conjugates into Tumor Cells**
H. Arima, A. Yoshimatsu, M. Arizono, H. Ikeda, K. Motoyama, K. Hattori, T. Takeuchi, F. Hirayama, K. Uekama
- T2251 Design and Synthesis of Therapeutic Macromolecular Scaffolds to Overcome Multi-drug Resistant Hepatocellular Carcinoma**
S. Benhabbour, R. Mumper
- T2252 The Comparison of Solution and Controlled Release Formulations of Bifunctional Peptide Inhibitors (BPI) in Suppressing Rheumatoid Arthritis in an Animal Model**
B. Buyuktimkin, P. Kiptoo, C. Berkland, T. Siahaan
- T2253 Guanidinium Containing Cationic Lipid Delivers siRNA and Enhances Anticancer Effect in B16F10 Murine Melanoma Model**
Y. Chen, L. Huang
- T2254 Characterization of the Complexes of Amphiphilic Peptides and Plasmid DNA Conjugated with Glycoprotein Asialofetuin**
X. Cui, P. Gupta
- T2255 Brain-targeting Gene Delivery and Cellular Internalization Mechanisms for Angiopep-modified Complexes**
W. Ke, C. Jiang
- T2256 Engineering a Targeted Delivery System for Oral Vaccination Using Invasin**
T. Khan, J. Maynard
- T2257 Efficient Delivery of siRNA Using New Amino Lipid-based Cationic Liposomes**
H. Kim, U. Jeong, E. Davaa, J. Park
- T2258 In Vivo Efficacy and Pharmacokinetics of a Bifunctional Peptide Inhibitor (BPI) for the Suppression of Experimental Encephalomyelitis (EAE)**
P. Kiptoo, R. Ridwan, T. Siahaan

THE INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF BLANK PLGA NANOPARTICLES

KIVILCIM ÖZTÜRK, SEÇİL ÇABAN, EZGİ KADAYIFCI, SERHAT KOZLU, FIRAT YERLİKAYA, YILMAZ ÇAPAN
Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey
ycapan@hacettepe.edu.tr



INTRODUCTION

Nanoparticle structure, size distribution, polydispersity, composition, stability and agglomeration are numerous challenging problems for drug delivery systems. However, technological parameters such as polymer concentration and polymer composition, homogenization rate, homogenization time and homogenization type have a significant influence on characterization of nanoparticles. PLGA is particularly suitable to be used for the drug delivery application. PLGA has been studied for many years as a suitable drug delivery material, mainly due to its chemical biocompatibility [1, 2], total biodegradability, and non-toxic degradation products [3]. A common method for the sustained release of drugs is the production of a PLGA microsphere formulation by the oil-in-water emulsion and solvent evaporation technique, where the drug is evenly distributed throughout a soluble PLGA matrix and then emulsified. Once the organic solvent evaporates off, a suspension of solid microparticles is left. The bioactive can be co-adsorbed in the PLGA if hydrophobic [4], or produced as a double emulsion or suspension if not [5]. In this study, the main objective is to standardize the PLGA nanoparticles having higher efficiency in drug delivery systems.

METHODOLOGY

Preparation of Blank PLGA nanoparticles

Nanoparticles were prepared by the emulsification-diffusion method. Briefly, an organic solution of PLGA in ethyl acetate (10 ml) was added into an aqueous PVA solution (20 ml, 1% w/v). Then, the emulsion was homogenized by Ultra-Turrax® (T25 Basic, IKA, Germany) at 11 000 rpm speed for two minutes and under magnetic stirring conditions 20 ml deionized water was added into dispersion for two minutes to obtain the diffusion of organic phase to aqueous phase. Organic phase was evaporated under room temperature by magnetic stirring in 24 hours. The obtained nanosuspension was centrifuged at 13 000 rpm for 20 minutes to collect nanoparticles. To remove the residual PVA which has adsorbed onto the nanoparticles, the centrifugate were washed with deionized water.

Experimental Conditions

In an attempt to investigate the influence of technological parameters on nanoparticle properties, different experimental conditions were evaluated. Two different homogenization methods are tested using Ultra-Turrax® and ultrasonic probe with different homogenization speeds and times. In addition to these experimental conditions, formulation variables like PVA concentration in aqueous phase (1%, 3% and 5% w/v) and PLGA concentration in organic phase (2%, 3%, and 4% w/v) were also investigated.

Characterization of Nanoparticles

The freshly prepared nanoparticles were centrifuged and washed with deionized water and later resuspended. Particle size distribution (mean diameter and polydispersity index) was determined by dynamic light scattering using a Malvern Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, U.K.). The morphology of the nanoparticles was screened by Transmission Electronic Microscopy (TEM) (LEO 900E, Sony, Japan). Nanoparticles were also characterized with respect to zeta (ζ) potential using a Malvern Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, U.K.). Samples of prepared suspensions were diluted in deionized water and placed in the measurement cells and then measured.

RESULTS

In order to evaluate the influences of technological parameters, the physico-chemical properties of the nanoparticles, in terms of their particle size distribution, morphology and surface charge were evaluated. All prepared systems exhibited a narrow size distribution (polydispersity index < 0.05). It is observed that increasing PVA concentrations in aqueous phase resulted smaller particle sizes and narrower particle size distributions ($P < 0.05$). Also higher homogenization rates and longer durations with Ultra-Turrax® has decreased the size of nanoparticles ($P < 0.05$) (Table 1).

Table 1. Effect of PVA concentration, Ultra-Turrax® homogenization time and homogenization speed on the particle size of PLGA nanoparticle (nm)

Homogenization time (min)	PLGA concentration (2% w/v)			
	11 000	11 000	11 000	11 000
2	177.53±2.78	141.52±1.43	140.05±0.62	139.40±2.28
4	161.04±0.85	151.04±0.87	149.70±0.55	149.61±0.62

Using ultrasonic homogenizator instead of Ultra-Turrax® provided smaller particles and with a rise of ultrasonic power from 40 W to 80 W smaller nanoparticles were obtained ($P < 0.05$). The smallest nanoparticles (177.53±2.78 nm) were obtained with 2% (w/v) PLGA concentration in organic phase, 3% (w/v) in aqueous phase which were prepared by using emulsification-diffusion method via ultrasonic homogenizator at a power of 80 W applied for 30 seconds (Table 2).

Table 2. Effect of PLGA concentration and ultrasonic homogenization power on the particle size of nanoparticles (nm)

Ultrasonic homogenization power (W)	PLGA concentration (2% w/v)		
	2	3	4
40	144.56±1.79	146.96±1.64	146.30±2.00
60	151.04±0.74	149.70±0.58	149.61±0.62

Nanoparticles which were prepared by ultrasonication exhibits smaller but non-spherical shaped particles. It is observed that nanoparticles prepared by using Ultra-Turrax® had more spherical particle shapes but larger sizes (Fig. 1).

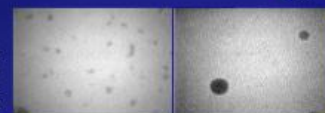


Figure 1. TEM images of PLGA nanoparticles obtained using Ultra-Turrax® homogenization (left) and ultrasonic homogenization (right) in organic phase and PLGA concentration in aqueous phase are 2% (w/v) and 3% (w/v) respectively. Scale bar: 100 nm. (Left: Ultra-Turrax® at 11 000 rpm for 4 min; right: ultrasonic homogenization at 80 W for 30 sec)

All nanoparticle preparations exhibited a net negative charge with zeta potential values ranging from -0.59 ± 0.52 to -18.81 ± 1.23 mV (Fig. 2).

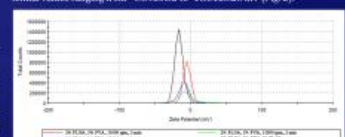


Figure 2. Effect of PVA concentration, homogenization by probe and time on the zeta potential values of PLGA nanoparticles.

CONCLUSIONS

The results obtained showed that the technological parameters selected in this work allowed reproducible formation of nanometric, almost spherical and homogeneous PLGA nanoparticles. Based on this results, it can be concluded that technological experimental conditions developed in this study can be used for designing specific drug delivery systems in which physico-chemical properties of nanoparticles are important.

REFERENCES

- [1] K.R. Sekka, A. Tobias, Biodegradable microspheres for protein delivery. *J. Control. Release* 50 (2002) 261-280.
- [2] A. Vila, A. Sanchez, H. Tobia, D. Calvo, M. Alonso, Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control. Release* 76 (2002) 15-24.
- [3] S. Froberg, S.S. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* 202 (2004) 3-10.
- [4] K.R. Sekka, A. Tobias, Biodegradable microspheres for protein delivery. *J. Control. Release* 50 (2002) 261-280.
- [5] J.L. Cleland, E.T. Lewis, A. Park, A. Dougherty, J. Kohn, J. Kowalski, A. Cullis, Development of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres for cell-based gene transfer. *J. Control. Release* 72 (2001) 13-24.

Tuesday Morning Contributed Papers

POSTER LEGEND M1000 series: Monday afternoon session T2000 series: Tuesday morning session T3000 series: Tuesday afternoon session
W4000 series: Wednesday morning session W5000 series: Wednesday afternoon session R6000 series: Thursday morning session

Analytical Methodology/HPLC (Small Molecule)/Biological Matrix

- T2001** Measurement of Solubility in Simulated Gastrointestinal Fluids (FaSSIF, FeSSIF, and FaSSGF) for a Diverse Set of 160 Molecules
R. Carrier, E. Gamsiz, M. Ashtikar, J. Crison, R. Fraczek, M. Waldman, W. Woltoz, M. Bolger
- T2002** Development and Validation of an Isocratic, Reverse Phase Liquid Chromatographic Method for Analysis of Lamivudine in Human Plasma
V. Kabra, V. Agrahari, C. Karthikeyan, P. Trivedi
- T2003** Simple HPLC Method with Spectrophotometric Detection for the Assay of Acetaminophen-Protein Adducts in the Liver
C. Lau-Cam, M. Acharya
- T2004** Effects of Structural- and Concentration-dependence on the Isoform-specific Glucuronidation of Seven Hydroxyflavones by Recombinant Human-UGT Isoforms
J. Zhang, L. Tang, L. Ye, Z. Liu, M. Hu
- T2005** Effect of Anticoagulant on the Stability of ON 013105 — A Novel Anti-tumor Agent
C. Ren, A. Gillum, M. Maniar
- T2006** Determination of 21-Desacetyldeflazacort (21-Oh Deflazacort) in Human Plasma by LC/MS/MS Assay
K. Rodríguez Valero, O. Alderete, N. Olivera, O. Galindez
- Analytical Methodology/HPLC (Small Molecule)/Non-biological Matrix**
- T2007** WITHDRAWN BY AUTHOR
- T2008** A Validated Reversed-phase High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) Method for the In Vitro Determination of Alpha-Phenyl-N-Tert-Butyl Nitrene (PBN)
K. Ozturk, F. Yelikaya, Y. Capan
- T2009** Simultaneous Determination of Water- and Fat-soluble Vitamins by HPLC
P. DeLand, D. Hurum, B. DeBorja, J. Rohrer
- T2010** Investigation of Critical Pair Resolution Inconsistencies in an Impurity Method Between HPLC Systems
H. Fyfe, R. Brice, Y. Shi, B. Kleintop
- T2011** Forced Degradation of Fentanyl: Identification and Analysis of Impurities and Degradants
A. Garg, D. Solas, L. Takahashi, J. Cassela
- T2012** Determination of Residual Morpholine in Drug Substance by High-Performance Liquid Chromatography with Chemiluminescent Nitrogen Detector (HLPC-CLND)
J. Han, D. Yeung, F. Wang, G. Guo
- T2013** Development and Validation of Reverse Phase HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Saquinavir and Ketoconazole in Solid Lipid Nanoparticles
K. Harinder Reddy, V. Vinay Kumar, A. Raghuram Reddy, T. Ranjith Kumar
- T2014** Detecting Free Radical Activity in Solid-State HPMC by Ibuprofen Vapor
J. Humphrey, P. Ramsey, J. Fubara
- T2015** Development and Validation of Two Improved LC/UV Methods to Quantitate Vitamins A, D₂, and K₁ in a Complex Mixture
E. Hwang, S. Zelechonok, C. McGinley, P. Bigwarfe
- T2016** Development and Validation of a HPLC Method for Ciprofloxacin Hydrochloride to Establish a Beyond-use Date in Oral Suspension
N. Jain, J. Khurana, A. Dash
- T2017** Development and Validation of a HPLC Method for Clonidine Hydrochloride to Establish a Beyond-use Date in Oral Suspension
N. Jain, A. Nagvekar, A. Pandit, A. Dash
- T2019** Development of Stability-indicating Reversed Phase HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Antiretroviral Drugs in a Fixed Dose Combination (FDC) Pharmaceutical Formulation
A. Joshi, F. Esseku, M. Adeyeye
- T2020** Development of a High-performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Captopril Using Electrochemical Detection
M. Khamanga, R. Walker
- T2021** Development and Validation of an Ultra-Performance Liquid Chromatography (Uplc) Stability-indicating Method for Dantrolene
M. Tawakkul, P. Faustino, V. Sayeed, M. Khan, S. Khan
- T2022** Design and Utility of a DOE Based HPLC Columns and Conditions Screening Database for Common APIs in OTC Products
R. Lau, D. Gambrah, C. Kish, C. Summit, J. Fubara
- T2023** Contents of Major Bioactive Flavones in Proprietary Products of *Radix Scutellariae* and Its Reference Herb
C. Li, L. Zhou, G. Lin, Z. Zuo
- T2024** Comparison of Sub-2µm Porous Particle Column to the Conventional 3.5 µm Porous Particle and 2.7 µm Fused-Core Columns in Analysis of a Developmental Drug by Ultra Performance Liquid Chromatography
J. Li, S. Shao, L. Fan
- T2025** Stability of the Oral Formulation of the Novel Anti-tumor Agent LC-1 in Various Soft Beverages
S. Neelakantan, P. Crooks
- T2026** Rapid Single HPLC Analysis for the Preservatives and Benzaldehyde of Four Different Heparin Sodium Injection Formulas
P. Nguyen, J. Daigneault, C. Balan, A. Danion, Y. Leblanc, A. Carrier
- T2027** Multiobjective Strategies for the Quantitation of Drug Content from Enteric Coated tablet in a Complex Polymeric Matrix
N. Onyewuanyi, B. Ford, S. Spence, S. Nyarady

A VALIDATED REVERSED-PHASE HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHOD FOR THE IN VITRO DETERMINATION OF ALPHA-PHENYL-N-TERT-BUTYL NITRONE (PBN)

KIVILCIM ÖZTÜRK, FIRAT YERLİKAYA, YILMAZ ÇAPAN

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey
ycapan@hacettepe.edu.tr



INTRODUCTION

The aim of this study is to develop a sensitive and validated method for the in vitro quantitation of PBN.

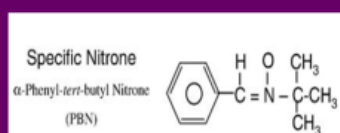


Figure 1. Chemical Structure of PBN

METHODOLOGY

Stroke is a major clinical problem and acute pharmacological intervention with neuroprotective agents have been unsuccessful so far. Nitron compounds have been shown to be beneficial in animal models of various diseases, and the prototypic compound alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) has been extensively demonstrated to be neuroprotective in rat models of transient and permanent focal ischemia. A reversed-phase HPLC method has been developed for the in vitro determination of PBN. PBN stock and standart solutions have been prepared in ethanol-water (1:9, v/v). An Agilent 1200 series HPLC system (Agilent, USA) equipped with UV detector and a reversed-phase column (Nucleosil®, 100-5 C18 250x4.6 mm i.d., 5 µm particle size) was used. The mobile phase was composed of methanol:water (55:45, v/v) at a flow rate of 1.0 ml/min and UV detection was performed at 286 nm. The column oven temperature was 25 °C and the injection volume was 30 µl.

RESULTS

Retention time was 5,6 min for PBN. The linearity range was found to be between 25-400 ng/ml. At this range, correlation coefficient of the regression line was 0.9999. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were found to be 2.06 ng/ml and 6.86 ng/ml, respectively. Bias of accuracy and relative standard deviation (RSD) for precision (repeatability) were smaller than 2% at three concentration levels (low, medium and high).

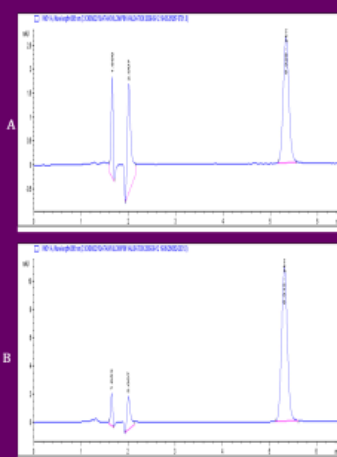


Figure 2. Representative chromatograms at 286 nm (A) 200 ng/ml of PBN solution (B) 800 ng/ml of PBN solution

Table 1. Evaluation of accuracy

Samples	Concentration (ng/ml)	Recovery (ng/ml)	Accuracy (%)
1	25	25.37	98.5
2	100	100.32	99.7
3	400	413.61	96.6

Table 2. Evaluation of precision

Samples	Concentration (ng/ml)	Repeatability (CV %)	Reproducibility (CV %)
1	25	1.96	1.36
2	100	0.35	1.01
3	400	0.032	0.75

CONCLUSIONS

The method was validated and it was concluded that the developed method was linear, accurate, sensitive, precise and selective. Therefore, the developed method can be useful for sensitive in vitro analyses of PBN in pharmaceutical research area.

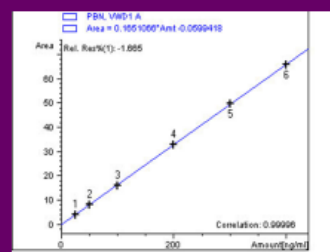


Figure 3. Calibration curve of PBN

REFERENCES

- [1] R.A. Floyd, R.D. Kopke, C.H. Choi, S.B. Foster, S. Do blas, R.A. Townner, Nitrones as therapeutics, *Free Radical Biology & Medicine* 45 (2008) 1361-1374.
- [2] A.R. Green, T. Ashwood, T. Odergren, D.M. Jackson, Nitrones as neuroprotective agents in cerebral ischemia, with particular reference to NXY-059, *Pharmacology and Therapeutics* 100 (2003) 195-214.
- [3] G.T. Balogh, Z. Szanto, E. Forrai, W. Gröyffy, A. Lopata, Use of reversed-phase liquid chromatography for determining the lipophilicity of α-aryl-N-cyclopropylnitrones, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 1057-1062.

37th Annual Meeting & Exposition of the
Controlled Release Society

CRS 2010 Program

July 10-14, 2010 • Oregon Convention Center • Portland, Oregon, U.S.A.

Personalized Medicines and Products for the Next Generation

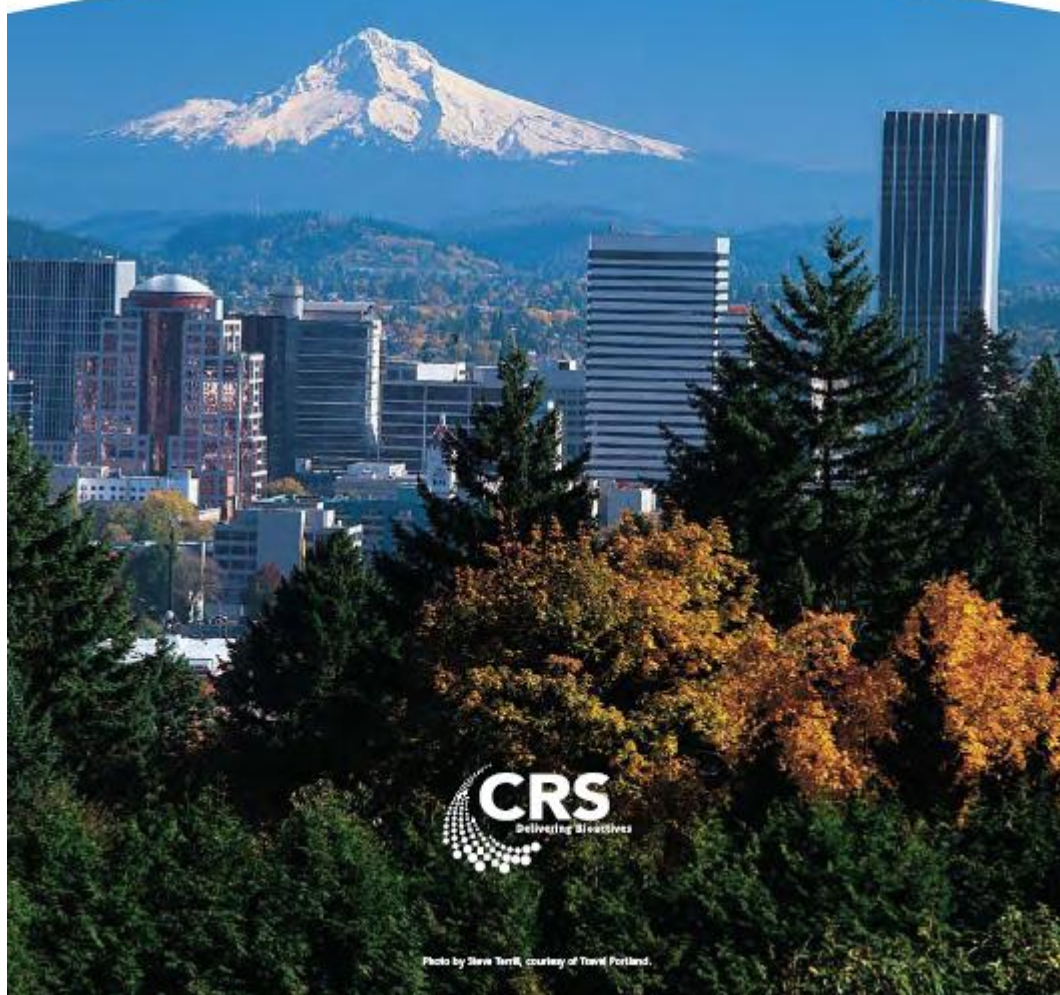


Photo by Steve Terrell, courtesy of Terrell Portland.

Poster Session I

Nanoparticles (continued)

- 315 **Novel Solid Lipid Nanoparticle Formulations for the Chemoprevention of Pancreatic Cancer**
D. Sutaria, Y. Huang, S. Prabhu
 Western University, USA
- 316 **Nuclear inclusion of inert and chromatin-targeted polystyrene beads and plasmid DNA containing nanoparticles**
N. Symens, R. Walzack, J. Demeester, I. Mattaj, S. De Smedt, K. Remaut
 Ghent University, Belgium
- 317 **Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles**
S. Ghaffari
 Isfahan University of Medical Sciences, Iran
- 318 **pH-Sensitive Nanoparticles of Curcumin-Celecoxib Combination for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease**
D. Gugulothu, A. Kulkarni, P. Dandekar, V. Patravale
 Institute of Chemical Technology, India
- 319 **Preparation and Characterization of Amorphous Cefdinir Using Spray Drying and Supercritical Antisolvent Process**
K. Jeong, J. Park, D. Gu, E. Cho, S. Seo, S. Hwang
 Chungnam National University, South Korea
- 320 **Preparation and Characterization of Human Serum Albumin Nanoparticles for the Delivery of Apo2L/TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)**
K. Lee, T. Kim, S. Lim, H. Jiang, C. Park
 Sungkyunkwan University, Korea
- 321 **Preparation and Characterization of PBN-loaded Poly(α -lactide-co-glycolide) Nano/microparticles**
K. Ozturk, Y. Capan
 Hacettepe University, Turkey
- 322 **Preparation and evaluation of cyclosporin A nanosuspension by top-down, media milling methods**
S. Han, H. Hwang, S. Jang, J. Kim, S. Kim
 Donga Pharmaceutical Co. Ltd., South Korea
- 323 **Production of a Powder Formulation of Fenofibrate Nanocrystals Through Antisolvent Precipitation Followed by *In Situ* Spray Drying**
J. Hu, W. Ng, Y. Dong, S. Shen, R. Tan
 Institute of Chemical and Engineering Sciences, Singapore
- 324 **Production of Singlet Oxygen on Irradiation of Photosensitizer-Polylactide-formed Nanoparticles**
P. Lai, C. Hsu, M. Shieh
 National Chung-Hsing University, Taiwan
- 325 **Pulsed Release from Nanotubes**
D. Bassett, J. Barralet
 McGill University, Canada
- 326 **Quantification of the cellular binding, uptake and localization of propidium iodide-labelled nanoparticles**
 A. Neumeyer, M. Bukowski, M. Veith, C. Lehr, **N. Daum**
 Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland, Germany
- 327 **Role of Non-solvent Phase on Particle Shape of Glycerolmonostearate Lipomer**
A. Jindal, R. Patil, P. Devarajan
 Institute of Chemical Technology, India
- 330 **Surface Properties Determine Intracellular Localization and Toxicity of Anionic Silica Nanoparticles**
A. Malugin, H. Ghandehari
 University of Utah, USA
- 332 **Synthesis of Molecularly Imprinted Nanospheres for Dipyridamole**
 M. Esfandyari-Manesh, M. Javanbakht, A. Mohammadi, **R. Dinarvand**, F. Atyabi
 Tehran University of Medical Sciences, Iran

- 333 **Targeted Doxorubicin Delivery to Hepatocellular Carcinoma by Galactosylated Nanogel**
J. Wu
 University of Science and Technology, China
- 334 **Temperature- and pH-Sensitive Nanogels by Soap-less Emulsion Polymerization Using Amphiphilic Acid Monomers**
 A. Serrano-Medina, **J. Cornejo-Bravo**, A. Licea-Claverie
 UABC, Mexico
- 335 **Temperature-Dependent Synthesis of NIPAM-VP Copolymer for Controlled Drug Delivery**
S. Aray, D. Majumdar, S. Mozumdar
 University of Delhi, India
- 336 **The PRINT® Nanoparticle Platform as a Paradigm for Examining Intracellular Protein Delivery**
P. Mack, C. Clark, H. Carroll, A. Beletskii, M. Diem, K. Roberts, A. King, K. O'Neill, Z. Zhou
 Liquidia Technologies, USA
- 337 **Use of Anionic and Cationic Surfactants in Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticle Production**
P. Heshmati, A. Raiche, K. Miller
 SurModics Pharmaceuticals, USA

Nasal Drug Delivery

- 338 **ATIS Gelling Nasal Spray of Sumatriptan Succinate: Pharmacokinetics and Brain Uptake Study**
S. Pranatharhitharan, P. Devarajan
 Institute of Chemical Technology, India
- 340 **Intranasal Delivery of Zidovudine by PLA and PLA-PEG Blend Nanoparticles**
M. Gremiao, R. Mainardes
 Unesp, Brazil
- 341 **Intranasal Drug Delivery Systems: Nasal Absorption of Insulin in Rabbits Using Pluronic F127 as a Carrier**
A. Sallam, A. Mousali, E. Khalil
 TQPharma, Jordan
- 342 **Nasal Topical Application of New Mometasone Furoate Formulation**
M. Kang
 Chonnam National University South Korea

New Chemistries

- 344 **Design, Synthesis and Evaluation of Novel 1,3,4-Thiadiazole Derivatives as Potent Anticonvulsant Agents with Lesser Neurotoxicity**
A. Verma, M. Kumar
 Panjab University, India

Non-parenteral Delivery of Biologics

- 346 **Novel Poloxamer Hydrogel Formulations for Sustained Inner Ear Drug Delivery**
 L. Dellamary, X. Wang, R. Fernandez, A. Harrop, F. Piu, J. Lichter, J. Harris, R. Friedman, C. Lebel, **Q. Ye**
 Otonomy Inc., USA

Novel Materials and Release Systems

- 347 **An *in vitro* controlled release study of valproic acid encapsulated in a titania ceramic matrix**
 M. Uddin, D. Mondal, C. Morris, U. Diebold, **R. Gonzalez**
 Tulane University, USA

Preparation and Characterization of PBN Loaded Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nano/Microparticles



Kivileim Ortak, Yilmaz Capan

Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, 06100, Turkey
ycapan@hacettepe.edu.tr

ABSTRACT SUMMARY

PLGA nano/microparticle formulation was developed to increase blood residence time of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrene (PBN) and thereby providing controlled release. Loading of therapeutic dose of PBN to PLGA nano/microparticles and providing controlled release, blood residence time of PBN was increased. For this purpose, we prepared nano/microparticle formulations. Polyethylene glycol provides an hydrophilic layer on the particles. Macrocyclic polyoxyethylene copolymer hydrophilic compounds more than hydrophilic compounds. According to this knowledge, we prepared PLGA and PLGA-PEG formulations and then compared them each other.

INTRODUCTION

Biodegradable nano/microparticles are widely investigated delivery systems for bioactive compounds such as low molecular weight and macromolecular therapeutics, antigens or DNA. Owing to their excellent biocompatibility, the biodegradable polymers poly(lactic acid) (PLA) and poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) are the most frequently used biomaterials for the microencapsulation of therapeutics. The classic emulsification solvent evaporation technique (ESE) is commonly used for encapsulation of various substances from simple pharmaceutical products to proteins and DNA. It is well known that ESE is mainly a two-step process: the emulsification of a polymer solution containing the encapsulated substance, followed by particle hardening through solvent evaporation and polymer precipitation. During emulsification, the polymer solution is broken up in microdroplets by the shear stress produced either by homogenizer, agitator or whirl mixer in the presence of a surface active agent. This first step mainly determines the microparticle's size distribution and it has been extensively investigated along with the influence of various process parameters.

It is well known that alpha-phenyl-N-tert-butyl nitrene (PBN), a spin trap, has neuroprotective effects *in vivo*. The neuroprotective effects of PBN have been attributed to its scavenging activity against reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals (OH^\cdot). In addition to these ROS, singlet oxygen (1O_2) has become known as an effector of neuronal damage. However, to the best of our knowledge, it is unknown whether PBN scavenges 1O_2 . Chemical structure of PBN is shown in Figure 1.

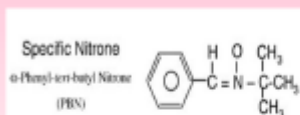


Figure 1. Chemical Structure of PBN



Figure 2. Some of the pathways proposed to be involved in cell death and cell survival mechanisms following cerebral ischemia

It is shown in Figure 2 primarily to illustrate possible future targets for drug therapy. It is simplified and illustrates only major pathways, so it does not show that some pathways can lead to either cell death or cell survival depending on the severity or duration of the ischemia and that there remains discord among investigators.

EXPERIMENTAL METHODS

The conventional oil-in-water (O/W) emulsion method was applied to produce PBN loaded PLGA nano/microparticles since PBN is a slightly water-soluble drug (Fig. 3). Ethylacetate was used as oil phase because of its lower toxicity, ease of removal, and excellent ability to dissolve the polymer. We encapsulated PBN in PLGA nano/microparticles using an O/W method that was followed by solvent evaporation. PLGA and PBN were dissolved in ethylacetate and then emulsified by drop in water phase containing 1-3% PVA as an emulsifier. Ethylacetate was removed at room temperature by evaporation. As the solvent was being removed, the emulsifier continued to maintain the oil droplets in their spherical configuration and prevented from aggregating until the solvent was completely removed, and the nano/microparticles were hardened as discrete particles. Finally, the hardened PBN-loaded nano/microparticles were washed, centrifuged at 10000 rpm for 20 min.

Polyoxyethyl alcohol concentration was chosen as 3% and PLGA concentration was chosen as 2%. Homogenization speed time was determined as 2000 rpm and 2 minutes respectively. PBN was added as two different amounts (2 and 3 mg) and evaluated of entrapment efficiency between 20 and 60%.

Particle size and zeta potential were measured by Zetabster Nano. Association efficiency of PBN to nano/microparticles was analyzed indirectly using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

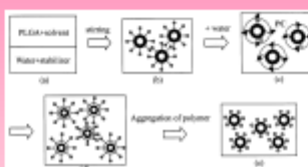


Figure 3. Schematic description of the proposed formation mechanism of PLGA nanoparticles by emulsification-diffusion method.

RESULTS AND DISCUSSION

Particle size distributions and surface charge properties of PLGA nano/microparticles are shown at Table 1 and Figure 4. Formulation studies and characterization of PLGA-PEG nanoparticles are presented at Table 2 and 3.

Table 1. Blank PLGA (Resomer® RG 502 H) nano/microparticle formation studies.

Formulation	Particle size (nm)	Poly dispersity index	Zeta potential (mV)
PVA 2% PLGA 2% 1500 rpm, 2 min	452	0.127	-19.34
PVA 3% PLGA 3% 1500 rpm, 2 min	555.1	0.138	-9.47
PVA 2% PLGA 2% 11000 rpm, 1 min	324.9	0.142	-9.70
PVA 3% PLGA 3% 11000 rpm, 2 min	798.1	0.237	-19.00
PVA 2% PLGA 2% 1800 rpm, 2 min	3519	0.807	-11.78
PVA 3% PLGA 3% 1800 rpm, 2 min	2116	1.0	-16.75
PVA 2% PLGA 2% 1800 rpm, 2 min	3016	1.0	-19.07

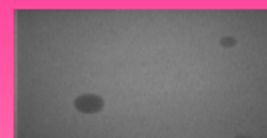


Figure 24 TEM micrographs of PLGA nano/microparticles (x 27 020).

Table 2. Blank PLGA-PEG nanoparticle formation studies.

Formulation	Formulation code	Concentration of PBN (mg)	Concentration of PEG (g/L)	Homogenization Speed	Centrifuge	Depositional temperature
Blank	PLGA2	5.17500-PLGA	5.10%	1200 rpm, 1 min	10000 rpm	Refrigerator, 4°C
Blank	PLGA3	5.17500-PLGA	5.10%	1800 rpm, 2 min	10000 rpm	Refrigerator, 4°C

Table 3. Blank PLGA-PEG nanoparticle characterization results.

Formulation code	Particle size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
PLGA2	374.21	0.047	-25.31
PLGA3	341.01	0.128	-5.94

CONCLUSION

The widespread interest in nano/microencapsulated drugs brought forth the need to prepare such particles in larger quantities and in sufficient quality suitable for clinical trials and commercialization. The most frequently described solvent extraction/evaporation based technology using simple heater/stirrer setup is inappropriate for producing larger amounts of microspheres in an economic, robust and well-controlled manner. The rapid solvent extraction may require relatively large amounts of processing fluids and their subsequent recycling. Therefore, combined extraction and evaporation represents a compromise in terms of both time and waste-efficient microsphere production.

REFERENCES

1. S. Freilich, H. F. Morillo, B. Gander, *Journal of Controlled Release* 102 (2005) 313-332
2. H. S. Choi, S. Seo, G. Khang, J. M. Bhae, H. B. Lee, *International Journal of Pharmaceutics* 234 (2002) 195-203
3. A. Kozul, Y. Nishizuka, T. Arai, K. Hirota, H. Mori, N. Endo, T. Miyoshi, K. Yamashita, and M. Sawada, *J Pharmaceut Sci* 100, 545-549 (2000/6)
4. H. Y. Swen, J. Y. Lee, S. W. Choi, Y. Jang, J. H. Kim, *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects* 182 (2001) 125-130
5. A. B. Green and A. Shaikh, *Drug Discovery Today* 11 (2006) 681-692


HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
ARGE PROJE PAZARI 2010
HÜ-ARGEPP'10

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
PATENT BİLGİ GÜNLERİ 2010
HÜ-PBG'10

KOSGEB
20. KURULUŞ YILI
ETKİNLİĞİ



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
AR-GE PROJE PAZARI - 2010 PROJE KATALOĞU

10 - 11 MAYIS 2010
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAHİHYE YERLEŞKESİ KÜLTÜR MERKEZİ - M SALONU

Destekleyen Kuruluşlar

 TUBITAK	 TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ	 KOSGEB	 ANKARA SANAYİ ODASI	 TEKNOKENT A.Ş.
 Milli Prodüktivite Merkezi <i>"Zeki ve Sorumluluk Merkezi"</i>	 TSE	 ANKARA İHTİSAS ORGANİZE SANAYİ BÖLGESİ	 OSTİM	 POLATLI ORGANİZE SANAYİ BÖLGESİ

www.argeprojepazari.org www.huargepatent.org

POSTERLER
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SERGİ SALONU

POSTER ADI	HAZIRLAYAN
The Effect of the Hydrogen Peroxide Colloidal-AG on Reducing The Colonization and Growth of Heterotrophic Bacteria in Dental Unit Waterlines	Ömer Engin Bulut, Meral Özalp, Atilla Ataç, Hamdi Çelik, Melike Ekizöğlü, Didem Öztürk, İlkan Tatar
Veteriner Ve Beşeri Hekimlikte Kullanılacak Girişimsel Olmayan (Mukozal) İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi	Prof.Dr. Sevda Şenel
Bezne Hedeflendirilmiş Bazık Fibroblast Büyüme Faktörü (BFGF) Taşıyan Nanopartiküllerin Hazırlanması, Bezne Geçiş ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi	Secil Caban, Muge Yemisci, Yasemin Gursoy-Ozdemir, Eduardo Fernandez-Megia, Roman Novoa-Carballal, Ricardo Riguera, Karine Andrieux, Patrick Couvreur, Yilmaz Caban, Turgay Dalkara
Bezne Hedeflendirilmiş Kaspaz-3 Enzim İnhibitörü Taşıyan Nanopartiküllerin Hazırlanması, Bezne Geçiş ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi	Secil Caban, Hülya Karatas, Muge Yemisci, Yasemin Gursoy-Ozdemir, Eduardo Fernandez-Megia, Ramon Novoa-Carballal, Ricardo Riguera, Karine Andrieux, Patrick Couvreur, Yilmaz Çapan, Turgay Dalkara
Diyabetik Nöropatinin Siçan Beyninde ve Siyatik Sinirinde Transkripsiyon Faktörleri Üzerine Etkisinin İmmunoreaktivite Yöntemleriyle İncelenmesi	Pelin Kelicen Uğur, Can Pekiner
Farmakolojik Aktivite Tarama Testleri	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
Siçan Primer Kortikal Astrostilerinde Kolesterolün Srebp ve Aromataz Enzimi Üzerine Olan Etkileri	Nihan Burul Bozkurt, Pelin Kelicen Uğur
Karaciğerde İskemi-Reperfüzyon Hasarı Öncesinde Uygulanan Sodyum Nitrit'in Etkilerinin İncelenmesi "Düz Kas Reaktivitesi" Projeleri	Bülent Gümüşel, Gülberk Uçar, Samiye Yabanoğlu, Petek Korkusuz
Sitotoksikbeyin Odemi Tedavisine Yönelik Akuporin4 Antisenseoligonukleotidylü Bezne Hedeflendirilmiş Nanopartiküler Sistem Tasarımı	Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Serhat Kozlu, Yasemin Gürsoy-Ozdemir, Muge Yemisci, Sevdä Lüle, Eduardofernandez-Megia, Ramonnovoa-Carballal, Ricardo Riguera, Karine Andrieux, Patrick Couvreur, Turgay Dalkara, Yilmaz Çapan
Serebral İskemi Tedavisinde Kullanılmak üzere Serbest Radikal Temizleyici Madde Olarak (Alfa-Fenil-N-Tert-Butil Nitron) PBN İçeren Nano/Mikropartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı İn Vitro ve İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi	Kıvılcım Öztürk, Muge Yemisci, Yasemin Gursoy-Ozdemir, Eduardo Fernandez-Megia, Ramon Novoa-Carballal, Ricardo Riguera, Karine Andrieux, Patrick Couvreur, Turgay Dalkara, Yilmaz Çapan
Siklodekstrin Kompleksi Oluşturarak, Ekzemestan'ın Çözünmesinin Geçirgenliğinin Arttırılması	Burçin Yavuz, Eren Bilensoy, Murat Şumnu
Bazı Türkiye Tıbbi Bitkileri Üzerinde Biyolojik Aktivite Çalışmaları	Ü. Şebnem Harput, İcral Saraçoğlu
Sanayide Kullanılabilecek Uçucu Yağların Elde Edilmesi ve Kalite Kontrolleri	Dilek Ercil, A. Ahmet Başaran, İcral Saraçoğlu, Duygu Kaya, Merve Yüzbaşıoğlu
İncek (Ankara) Çevresinde Tıbbi Etnobotanik Çalışmalar	S. Arabacı, M. Koyuncu, N. Ezer
İyon Kanal Modulatorleri: Kalsiyum ve Potasyum Kanalları Üzerine Etkili Yeni Bileşiklerin Tasarım, Sentez ve Aktivite Araştırmaları	Prof. Dr. Cihat Şalak, Prof. Dr. Rahime Şimşek, Uzm. Ecz. Miyase Gözde Gündüz



Serebral İskemi Tedavisinde Kullanılmak Üzere Serbest Radikal Temizleyici Madde Olarak (Alfa-Fenil-N-Tert-Butil Nitron) PBN İçeren Nano/Mikropartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı İn Vitro ve İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi

Kivrim Öztürk¹, Muğla Yemliçli², Yasemin Gursoy-Codemir², Eduardo Fernandez-Megias³, Ramon Novoa-Carballa³, Ricardo Riguero³, Karine Andreu⁴, Patrick Couvreur⁵, Turgay Dalkara², **Yılmaz Capan¹**

¹Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey
²Department of Neurology, Faculty of Medicine and, Institute of Neurological Sciences and Psychiatry, Hacettepe University, Ankara, Turkey
³Department of Neurology, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey ⁴Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, and Unidad de RMN de la Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain
⁵Université de Strasbourg de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France
 yilmazc@hacettepe.edu.tr



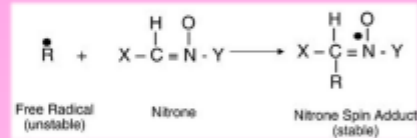
GENEL BİLGİLER

Beyni besleyen damarların çeşitli patolojileri nedeniyle kan akımının azalması, bazilme ya da damarların yırtılmasına bağlı olarak beyin damar dışına çıkması sonucu ortaya çıkan tablolara beyin damar hastalıkları (BDH) adı verilmektedir (1). Merkezi sinir sistemi hastalıkları içerisinde en sık görülen ve yarattığı fiziksel, gelişimsel bütüncül verileri göre ölüm sebebi olarak kalp hastalıkları ve kanserden sonra üçüncü, morbidite nedeni olarak da birinci sırada yer alan özellikle de yaşın ilerlemesiyle birlikte görülmesi ile daha da önem kazanan medikal-sosyal bir problemdir (2). İskemi, kan akımının, hücreleri fonksiyonları için gerekli olan düzeyin altında olması durumudur. Başka bir deyişle islemi, dokulara kan sağlayan damarların, bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokunun beslenmesinin bozulması durumudur (3). Serebral islemi sonucu birinci hasar geri dönüşüzlü olup ancak koruyucu tedbirler ile önlenir. Birinci hasar bileyen süre içinde başlayan ikinci hasar ile nöron kaybının devam etmesine neden olur ve "bu hasar önlenir mi?" sorusu deneysel araştırmaların temel hareket noktasıdır (4). Merkezi sinir sistemi yaralanmalarında, ikinci hasarın önlenmesi için bazı hedefler bulunmaktadır. Bunlar arasında; serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyon, kalsiyum ve diğer iyon kanalları, büyüme faktörleri, glutamaterjik, kolinerjik ve katekolinerjik nörotransmisyon sistemleri, enfeksiyon süreci, endojen opioid reseptörleri, enzimler, apoptotik hücre ölümü ve regenerasyon mekanizmaları bulunmaktadır (5). İkinci hasar patofizyolojisinin açıklanmasında çok çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar arasında proje konusunu da kapsayanlar; lipid peroksidasyonu ve serbest radikal oluşumudur. Lipid peroksidasyon, polimerizasyon için oksidatif yoldur (6). Bu yolum zincir reaksiyonları şeklinde ilerler. Zincir reaksiyonların içerisinde en önemli hidroksil radikalının (OH[•]) yeniden ületilmesi reaksiyonu olarak lipid peroksidasyonu başlımsadır. Lipid peroksidasyonu sonucu malondialdehid (MDA) oluşur. Bu oluşum tipik bir oksidatif stres reaksiyonu yardımıyla gösterilebilir (7). Reaktif oksijen türlerine bağlı felç oluşum yolakları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Kronik felç hastalarında oksidatif hasarın ve serbest radikal oluşumunun devam etmesi durumunda, inflamasyon, koagülasyon ve ateroskleroz arasındaki var olan kompleks ilişkiler (8).

Nöroprotektif ajan olarak nitron türetilen serbest radikal temizleyici ajanların potansiyel terapötik yararları büyük ilgi çekmiştir. Çeşitli hastalıkların hayvan modellerinde nitron bileşiklerinin yararlı olduğu gösterilmiştir. Nitron bileşik, "spin adduct" denilen bir ürün oluşumuna üzere serbest radikale ile reaksiyona girer. Oluşan ürün serbest radikale göre daha stabildir. Serbest radikal inaktif edilmiş olur ve böylece dokulara, hücrelere ve biyokimyasal proseslere zarar vermez. Spin adduct oluşumu Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Nitron bileşiklerinin serbest radikalleri tuzağa düşürüp spin adduct oluşumunun gerçekleştiği reaksiyon (9).

Nitron bileşiklerinin biyoyararlanımın genelikle yüksektir ve yarı ömürleri 3 saat civarında fakat, PBN'nin kendisi stabilitesi oldukça düşüktür ve ayrıca kanda kalış süresi de kısadır (10). Başlıca polimer (poli-2-vinilpirrolidon) (PVP) ve kitosan gibi polimerik nano/mikropartiküler taşıyıcı sistemler üzerine bağlanarak ile kendisi stabilitesi artırılabilir. Ancak konvansiyonel polimerik sistemler kan akımından retikulo-endothelial sistem (RES) tarafından hızla uzaklaştırılmakta ve bu durum farmakolojik etkinin önemli ölçüde azalmasına neden olmaktadır. Hazırlanan nano/mikropartiküler taşıyıcı sistemlerin yüzey polimerleri kitosan (KS) gibi hidrofilik bir polimerle kaplanarak sistemin kan dolağında kalış süresi artırılmakta ve farmakokinetik özellikleri optimize edilmektedir. Moleküllerin geçirilmesini, hem etki bölgesinde meydana gelebilecek olan bir steric engel ortadan kaldırır, hem de taşıyıcı sistemin RES tarafından uzaklaştırılmaması önlenerek dolağında kalış süresini uzatır (11).

PROJENİN AMACI

Kendisi stabilitesi düşük ve kanda kalış süresi kısa olan PBN'nin monokükleer fosforik sistemin elemanları tarafından kan dolağında kolaylıkla uzaklaştırılmayan bir ilaç taşıyıcı sistem için en kapsamlı şekilde ve sistemin optimizasyonunun sağlanması ile serebral islemi tedavisinde etkin ve güvenilir bir şekilde kullanıma olarak sağlanabilecektir.

SONUÇ VE ÖNGÖRÜLER

Proje kapsamında biyoyararlanabilir ve biyobiyararlanabilir polimerlerle hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri, ilacın en kapsamlı kullanımını ve sisteminin değerlendirilmesi değerlendirilmiştir. Bu sonuçlarla araştırmaların devamında in vivo çalışmalarını yapılması hedeflenmektedir. İn vivo deney modelinde gösterilmesi amaçlanan sonuç, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistem ile PBN'nin kan dolağında kalış süresini uzatabilmek, farmakolojik aktivitesini artırabilecektir.

REFERANSLAR

- 1) Kimbrow, H.S., Biles, J., Callahan, J.S., A., Long-Term Therapy to Prevent Stroke, *The Journal of the American Board of Family Practice*, 18 (6), 523-540, 2005
- 2) Margolis, L., Plotkin, M., Lencost, D., Antioxidant strategies in the treatment of stroke, *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 429-443, 2005
- 3) Levi, J.A., Rapine, J.E., Blood cells and ischemia-reperfusion injury, *Blood cells*, 16, 183-192, 1990
- 4) Tolia, C.W., Bullock, M.R., Critical Appraisal of Neuroprotection Trials in Head Injury: What Have We Learned?, *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, 73-79, 2004
- 5) Katsuragi, E., Tera, C.H., Omurilik yaralanması sonrası radikal koruma stratejileri (Strategies for neuroprotection after spinal cord injury), *Omurilik ve omurga cerrahisi*, (Ed. M. Zeki, F. Gök) (Ed. İsmik, s. 613-632), 2002
- 6) Anderson, D.K., Demedick, P., Spinal cord injury and protection, *Annals of Emergency Medicine*, 14, 616-621; 1985
- 7) Freeman, P.H., Free radicals in brain metabolism and pathology, *British Medical Bulletin*, 46, 577-587; 1993
- 8) M.L. Alexandrova, P.G. Bochev, Oxidative stress during the chronic phase after stroke, *Free Radical Biology & Medicine* 39 (2005) 297-316
- 9) R.A. Boyd et al., Nitron as a neuroprotectant, *Free Radical Biology & Medicine* 45 (2003) 1361-1374
- 10) Chen T.Y., Privat S.I., Nardany R.W., Chaplin M.D., Waterbury L.D., Pharmacokinetics and Bioavailability of N-tert-butyl-alpha-phenyl Nitron in Rats and Dogs, *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 40: 57-60; 1997.
- 11) Qian, Z.M., Li, H., Sun, H., Ho, X., Targeted Drug Delivery via the Tumor-Associated Receptor-Mediated Endocytosis Pathway, *Pharmacol. Rev.* 54, 561-587; 2002.

Ecz. (B.U.) Kıvılcım ÖZTÜRK



KİŞİSEL BİLGİLER

İş Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
06100 Ankara- TÜRKİYE

İş Telefonu : 90 312 305 12 41

İş Faks : 90 312 311 47 77

E-mail : k.ozturk@hacettepe.edu.tr
kivilcimozturk@gmail.com

Doğum Günü : 15 Aralık 1985

Doğum Yeri : Ankara

EĞİTİM BİLGİLERİ

2010 - Doktora
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

2008 – 2010 Yüksek Lisans
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara
Not Ortalaması: 3,72/4,00

2004 - 2008 Lisans
Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Not Ortalaması: 3,18/4,00

MESLEKİ DENEYİM

2009 - Araştırma Görevlisi
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÇALIŞMA ALANLARI

- Nanoteknoloji
- Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler

YAYINLAR

• MAKALELER

K. Ozturk, S. Caban, S. Kozlu, E. Kadayifci, F. Yerlikaya, Y. Capan, The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles, *Pharmazie* 65: 1–5 (2010)

• BİLDİRİLER

S. Caban, E. Kadayifci, S. Kozlu, K. Ozturk, F. Yerlikaya, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quiñoá, R. Riguera, Y. Aktas, T. Dalkara, Y. Capan; The Preparation And Characterization Of Chitosan–Based Nanoparticles; 17th International Symposium on Microencapsulation, 29.09.2009 – 01.10.2009, Nagoya, JAPAN

K. Ozturk, S. Caban, E. Kadayifci, S. Kozlu, F. Yerlikaya, Y. Capan; The Influence Of Technological Parameters On The Characterization Of Blank PLGA Nanoparticles; 17th International Symposium on Microencapsulation, 29.09.2009 – 01.10.2009, Nagoya, JAPAN

K. Ozturk, F. Yerlikaya, Y. Capan; A validated reversed-phase high pressure liquid chromatography (HPLC) method for the in vitro determination of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN); 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 8-12, 2009, Los Angeles, CA, USA

K. Ozturk, S. Caban, E. Kadayifci, S. Kozlu, F. Yerlikaya, Y. Capan; The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles; 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 8-12, 2009, Los Angeles, CA, USA

Y.Çapan, K.Öztürk; In Vitro Evaluation of PBN Loaded Poly(DL-lactide-co-glycolide) PLGA Nano/Microparticle Formulations; 2010 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 14-18, 2010, New Orleans, Louisiana, USA

BİLİMSEL DERNEKLERE ÜYELİKLER

AAPS American Association of Pharmaceutical Scientists

