



**İNDOMETAZİN YÜKLÜ-NANOPARTİKÜLER
SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO*,
İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Emrah ÖZAKAR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ**

Doktora Tezi – 2019

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDOMETAZİN YÜKLÜ-NANOPARTİKÜLER
SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO*, *İN VİVO*
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Emrah ÖZAKAR

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ**

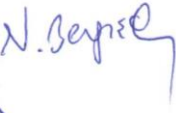
**ERZURUM
2019**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

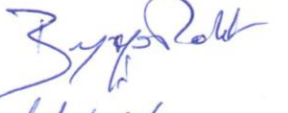
**İNDOMETAZİN YÜKLÜ-NANOPARTİKÜLER
SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO*, *İN VİVO*
DEĞERLENDİRİLMESİ**

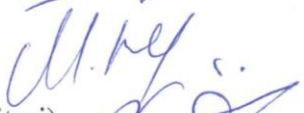
Emrah ÖZAKAR

Tez Savunma Tarihi : 12.06.2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ (T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdülkadir ÖZER (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Beyzagül POLAT (Atatürk Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Melike ÜNER (İstanbul Üniversitesi) 

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Nefise Özlem ŞAHİN (Mersin Üniversitesi) 

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Duygu ARIKAN
Enstitü Müdürü 

**Doktora tezi
ERZURUM – 2019**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	4
2.1.1. Polimerik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	4
2.1.1.1. Biyoparçalanabilen Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	7
2.1.1.2. Poli Laktik Ko-Glikolik Asit (PLGA).....	9
2.1.2. Nanosüspansiyonlar	13
2.2. Polivinil Alkol (PVA).....	16
2.3. Kollicoat® MAE 100P.....	18
2.4. Nanopartiküler Sistemleri Hazırlama Yöntemleri.....	20
2.4.1. Nanopresipitasyon (Çözücü Yer Değiştirme veya Ara Yüzeyde Çöktürme)	23
2.5. Nanopartiküler Sistemlerin Fiziksel Özellikleri.....	28
2.5.1.Partikül Boyutu.....	28
2.5.1.1. Foton Korelasyon Spektroskopisi (PCS) veya Dinamik Işık Saçılımı (DLS).....	28
2.5.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	29
2.5.1.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	29

2.5.1.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....	29
2.5.2. Yüzey Yüğü.....	30
2.5.3. İlaç Salımı.....	30
2.6. İndometazin.....	30
2.7. Ülser.....	33
3. MATERYAL VE METOT.....	36
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	37
3.3. Kullanılan Deney Hayvanları.....	38
3.4. İndometazinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini.....	39
3.4.1. İndometazinin Erime Derecesinin Tayini	39
3.4.2. İndometazinin Ultraviyole (UV) Spektroskopisi ile Analizi.....	39
3.4.3. İndometazinin Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spektroskopisi ile Analizi.....	39
3.4.4. İndometazinin Kütle Spektrumu.....	40
3.4.5. İndometazinin Farklı Ortamlarda Çözünürlüğünün Tayini.....	40
3.5. İndometazinin HPLC ile Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi.....	40
3.6. İndometazine ait Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi.....	41
3.7. Miktar Tayin Yönteminin Validasyonu.....	41
3.8. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	44
3.8.1. Formülasyon Bileşenlerinin Seçimi.....	46
3.9. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması.....	49
3.9.1. İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	49
3.9.2. Boş Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	50
3.9.3. Enterik Kaplı İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin	

Hazırlanması.....	50
3.9.4. Enterik Kaplı Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	51
3.9.5. İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması.....	51
3.9.6. Enterik Kaplı İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması	52
3.10. İşlem Validasyonu.....	52
3.10.1. Nanopartiküler Sistemler.....	52
3.10.2. İndometazin Nanosüspansiyonları.....	53
3.11. Geliştirilen Formülasyonların Fiziksel Özellikleri.....	53
3.11.1. Formülasyonlardaki Etkin Madde Miktarının Tayini.....	53
3.11.2. Formülasyonların Veriminin Tayini.....	54
3.11.3. Partikül Boyutu ve Dağılımı Tayini.....	55
3.11.4. Zeta Potansiyel Tayini.....	55
3.11.5. İndometazinin Piyasada Mevcut Preparatlarının ve İndometazin İçeren/İçermeyen Formülasyonların Yüzey Özelliklerinin Tayini.....	55
3.11.6. Bileşenlerin ve Formülasyonların DSC Termogramları	56
3.11.7. Bileşenlerin ve Formülasyonların FT-IR Spektrumları.....	56
3.12. İndometazinin Formülasyonlardan Salımının Tayini.....	56
3.12.1. İndometazinin Salım Kinetiklerinin Tayini.....	58
3.13. Formülasyonların Stabilesinin Tayini.....	59
3.14. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	59
3.15. İstatistiksel Değerlendirmeler	62
4. BULGULAR.....	63
4.1. İndometazinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini.....	63
4.1.1. İndometazinin Erime Derecesinin Tayini.....	63
4.1.2. İndometazinin Ultraviyole (UV) Spektroskopisi ile Analizi.....	64

4.1.3. İndometazinin Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spektroskopisi ile Analizi.....	65
4.1.4. İndometazinin Kütle Spektrumu.....	66
4.1.5. İndometazinin Farklı Ortamlarda Çözünürlüğünün Tayini.....	67
4.2. İndometazinin HPLC ile Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi.....	67
4.3. İndometazine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi.....	68
4.4. Miktar Tayin Yönteminin Validasyonu.....	69
4.5. Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulgular.....	73
4.5.1. Formülasyon Bileşenlerinin Seçimi.....	73
4.6. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması.....	77
4.6.1. İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	78
4.6.2. Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	79
4.6.3. Enterik Kaplı İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	80
4.6.4. Enterik Kaplı Boş Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	82
4.6.5. İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması.....	83
4.6.6. Enterik Kaplı İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması.....	84
4.7. İşlem Validasyonu.....	86
4.7.1. Nanopartiküler Sistemler.....	86
4.7.2. İndometazin Nanosüspansiyonları.....	89
4.8. Geliştirilen Formülasyonların Fiziksel Özellikleri.....	91
4.8.1. Formülasyonlardaki Etkin Madde Miktarının Tayini.....	91
4.8.2. Formülasyonların Veriminin Tayini.....	91
4.8.3. Partikül Boyutu ve Dağılımı Tayini.....	94
4.8.4. Zeta Potansiyel Tayini.....	96

4.8.5. İndometazinin, Piyasada Mevcut Preparatlarının ve İndometazin İçeren/İçermeyen Formülasyonların Yüzey Özelliklerinin Tayini.....	99
4.8.6. Bileşenlerin ve Formülasyonların DSC Termogramları.....	104
4.8.7. Bileşenlerin ve Formülasyonların FT-IR Spektrumları.....	113
4.9. İndometazinin Formülasyonlardan Salımının Tayini.....	118
4.9.1. İndometazinin Salım Kinetiklerinin Tayini.....	124
4.10. Formülasyonların Stabilitésinin Tayini.....	125
4.11. <i>İn Vivo</i> Çalışmalar.....	130
5. TARTIŞMA.....	146
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	177
KAYNAKLAR.....	178
EKLER.....	189
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	189
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	190
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU.....	191
EK-4. ETİK ALT KURUL ONAY FORMU.....	192

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım süresince bilgisi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, kıymetli zamanlarını harcayıp bana kucak açan, yaşadığım sıkıntılı günlerimde bana şefkatle davranan saygıdeğer hocam, tez danışmanım **Sayın Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ**'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımda sonsuz destek olup ufku açan yardımcı tez danışmanım **Sayın Dr. Öğr. Üyesi B. Ufuk HALLI** ve ailesine şükranlarımı sunarım. Deneysel çalışmalarım süresince kendi Anabilim Dalı laboratuvarını ve temel cihazlarını kullanmama imkân sağlayan dekanımız **Sayın Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU**'na, *in vivo* çalışmalarımda başından sonuna kadar destek olup laboratuvarında çalışmama imkân tanıyan Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sayın Doç. Dr. Beyzagül POLAT**'a ve Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Sayın Prof. Dr. Elif ÇADIRCI**'ya teşekkürlerimi sunarım. Tüm deneysel çalışmalarım süresince, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (DAYTAM) imkânlarından yararlanmamı sağlayan ve destek olan **Sayın Prof. Dr. Hamdullah KILIÇ**'a ve tüm ekibine sonsuz şükranlarımı sunarım. Tez çalışmalarımdeki DSC termogramlarımın alınmasında yardımları ve yakın ilgileri için **Sayın Prof. Dr. Abdülkadir ÖZER**'e ve **Sayın Dr. Öğr. Üyesi Jale NAKTİYOK**'a, doktora eğitimim süresince bilgi birikimlerinden faydalandığım tüm hocalarıma, manevi desteklerini esirgemeyen mesai arkadaşlarıma, çalışmalarım süresince bana verdiği destek ve özgüvenle yoluma devam etmemi sağlayan sevgili eşim **Dr. Öğr. Üyesi Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR**'a ve biricik oğlum **Halil Mete ÖZAKAR**'a ve elbette canım annem ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Emrah ÖZAKAR

ÖZET

İndometazin Yüklü-Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması ve *İn Vitro*, *İn Vivo* Değerlendirilmesi

Amaç: İndometazin içeren ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemleri geliştirmek, fiziksel özelliklerini tespit etmek ve sıçanlarda mide ülseri oluşturma potansiyelleri açısından piyasa preparatları ile istatistiksel olarak karşılaştırmaktır.

Materyal ve Metot: Nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak biyoyumlu PLGA polimeri ile indometazin yüklü nanopartiküler sistemler hazırlanmış ve Kollicoat® MAE 100P ile enterik kaplanmıştır. Aynı yöntem kullanılarak taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın indometazin nanosüspansiyonları ve bunların Kollicoat® MAE 100P ile enterik kaplanması yapılmış, HPLC ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin morfolojileri, partikül boyutları ve dağılımları, yüzey yükleri, enkapsülasyon etkinlikleri ve yükleme kapasitesileri, verimleri ve dissolüsyon profilleri incelenmiştir. Fiziksel özelliklerini pekiştirmek amacıyla ayrıca DSC ve FT-IR ölçümleri yapılmıştır. Hazırlanan tüm nanopartiküler sistemler *in vivo* çalışmalarda kullanılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca indometazine ait serbestleşme profilleri kinetik açıdan incelenmiştir.

Bulgular: Hazırlanan tüm nanopartiküler sistemlerin boyutları ortalama 500 nm'den küçük, zeta potansiyelleri ise en az ortalama -20 mV olarak bulunmuştur. Morfolojileri incelendiğinde PLGA ile nanopartiküllerin küresel, nanosüspansiyonların ise çubuk şeklinde oldukları belirlenmiştir. Hazırlanan sistemlerin en düşük enkapsülasyon değerleri ortalama % 72 olarak bulunmuştur. Dissolüsyon profilleri açısından piyasa preparatları ile benzer sonuçlar tespit edilmiştir. *İn vivo* çalışmalar neticesinde hazırlanan tüm nanopartiküler sistemlerin hem saf indometazinden hem de piyasa preparatlarından daha az ülserojenik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (p<0.05).

Sonuç: İndometazin ile hazırlanan yeni ilaç taşıyıcı sistemleri ve bunların enterik kaplanmış formülasyonlarının, mevcut piyasa preparatlarından daha az yan etkiyle kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İndometazin, Kollicoat® MAE 100P, Nanopartikül, Nanopresipitasyon, Nanosüspansiyon, PLGA, Ülser.

ABSTRACT

Preparation and *In Vitro*, *In Vivo* Evaluation of Indomethacin Loaded-Nanoparticulate Systems

Aims: To develop and physicochemically characterize new nanoparticulate drug delivery systems of indomethacin and to investigate their gastric ulcer potentials in comparison to the marketed products.

Materials and Methods: Indomethacin loaded-PLGA nanoparticles were prepared using nanoprecipitation method and their enteric coated forms with Kollicoat[®] MAE 100P were also developed. In addition nanosuspensions were prepared without using polymeric carrier and their enteric coated forms were also prepared as mentioned above. HPLC method was used for the assay of indomethacin.

Morphological characteristics, particle size and distribution, surface charge, encapsulation efficiency, loading capacity, yield and dissolution profiles of the nanoparticulate systems prepared were investigated. DSC and FT-IR measurements were performed as well. These drug delivery systems were subjected to *in vivo* studies to evaluate in terms of gastric ulcer potential in rats and the results were evaluated statistically.

Results: The particular size of the nanoparticulate systems were found less than 500 nm and the mean zeta potential value was at least -20 mV. In terms of morphological aspects indomethacin-PLGA nanoparticles were in spherical shape while nanosuspensions obtained were rod shaped. The lowest mean value for encapsulation efficiency was found as 72 %.

In vivo studies carried out with all of the nanoparticulate systems prepared in this study showed less ulcerogenic effect compared to parent drug and its marketed products.

Conclusion: It was found that the new drug delivery system prepared with indomethacin and its enteric coated nanoparticulate formulations can be used with less gastric side effects than those currently marketed products.

Keywords: Indomethacin, Kollicoat[®] MAE 100P, Nanoparticle, Nanoprecipitation, Nanosuspension, PLGA, Ulcer.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscope)
a/h	: Ağırlık/Hacim
BH	: Bağlı Hata
BSS	: Bağlı Standart Sapma
DCM	: Diklorometan
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (Differential Scanning Calorimetry)
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency)
ER	: Uzatılmış Salım (Extended Release)
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (Food and Drug Administration)
FT-IR	: Fourier Transform-Infrared Spektroskopisi
G	: Gauge
GI	: Gastrointestinal
h/h	: Hacim/Hacim
HPLC	:Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography)
LOD	: Saptama Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	: Miktar Tayini Sınırı (Limit of Quantification)
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
mV	: Milivolt

nm	: Nanometre
Np	: Nanopartikül
NSAİİ	: Non-Steroid Anti İnflamatuvar İlaçlar
PdI	: Polidispersite İndeksi
PCS	: Foton Korelasyon Spektroskopisi (Photon Correlation Spectroscopy)
PB	: Fosfat Tamponu
PGA	: Poli(Glikolik Asit)
PLA	: Poli(Laktik Asit)
PLGA	: Poli(Laktik-ko-Glikolik Asit)
PVA	: Polivinil Alkol
R²	: Determinasyon Katsayısı
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
SS	: Standart Sapma
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)
Tg	: Camsı Geçiş Sıcaklığı
USP	: Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopoeia)
UV	: Ultraviyole
UV-VIS	: Ultraviyole-Visible
V	: Verim
YK	: Yükleme Kapasitesi
λ_{max}	: Maksimum Dalga Boyu
$\bar{X}$	: Artitmetik Ortalama

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	PLGA ve monomerleri.....	10
Şekil 2.2.	PLGA'nın hidroliz şeması	11
Şekil 2.3.	PVA'nın yapısal formülü.....	17
Şekil 2.4.	Kollicoat® MAE 100P yapısal formülü.....	19
Şekil 2.5.	Polimerik nanopartiküllerin (PNP) hazırlanması için kullanılan çeşitli yöntemler	23
Şekil 2.6.	Nanopresipitasyon yönteminin şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.7.	İndometazinin moleküler yapısı	31
Şekil 2.8.	Sağlıklı ve indometazin kullanılmış midelerin görüntüleri	34
Şekil 3.1.	Varyasyon katsayısı hesaplamasında kullanılan eşitlik.....	43
Şekil 3.2.	Enkapsülasyon etkinliği hesaplamasında kullanılan eşitlik.....	54
Şekil 3.3.	İlaç yükleme kapasitesi hesaplamasında kullanılan eşitlik.....	54
Şekil 3.4.	Verim hesaplamasında kullanılan eşitlik	55
Şekil 4.1.	İndometazinin DSC termogramı.....	63
Şekil 4.2.	İndometazinin UV spektrumu.....	64
Şekil 4.3.	İndometazinin FT-IR spektrumu.....	65
Şekil 4.4.	İndometazinin kütle spektrumu.....	66
Şekil 4.5.	İndometazinin hareketli faz içinde hazırlanan çözeltisinin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen kromatogram piki.....	67
Şekil 4.6.	İndometazin kalibrasyon eğrisi ve denklemi	68
Şekil 4.7.	Kalibrasyon eğrisini oluşturan konsantrasyonlar.....	68
Şekil 4.8.	Formülasyon bileşenlerine ait kromatogram.....	71
Şekil 4.9.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri (Liyofilizasyon	

	sonrası).....	76
Şekil 4.10.	İndometazin nanosüspansiyonları (Liyofilizasyon sonrası).....	77
Şekil 4.11.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait optik mikroskop görüntüsü (100x).....	78
Şekil 4.12.	Boş nanopartiküllere ait optik mikroskop görüntüsü (100x).....	79
Şekil 4.13.	Liyofilizasyon öncesi görüntüler.....	80
Şekil 4.14.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait optik mikroskop görüntüsü (200x).....	81
Şekil 4.15.	Liyofilizasyon öncesi kaplanmış ve kaplanmamış indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri.....	81
Şekil 4.16.	Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait optik mikroskop görüntüsü (200x).....	82
Şekil 4.17.	İndometazin nanosüspansiyonlarına ait optik mikroskop görüntüsü (100x).....	83
Şekil 4.18.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait optik mikroskop görüntüsü (200x).....	84
Şekil 4.19.	Nanopartikül hazırlamada 1.aşama sonrası indometazinin stabilitesi.....	86
Şekil 4.20.	Nanopartikül hazırlamada 2.aşama sonrası indometazinin stabilitesi.....	87
Şekil 4.21.	Nanopartikül hazırlamada 3.aşama sonrası indometazinin stabilitesi.....	88
Şekil 4.22.	Nanosüspansiyon hazırlamada 1.aşama sonrası indometazinin stabilitesi.....	89
Şekil 4.23.	Nanosüspansiyon hazırlamada 2.aşama sonrası indometazinin	

	stabilitesi.....	90
Şekil 4.24.	Nanosüspansiyon hazırlamada 3.aşama sonrası indometazinin stabilitesi.....	90
Şekil 4.25.	Nanosüspansiyon hazırlamada 4.aşama sonrası indometazinin stabilitesi.....	91
Şekil 4.26.	Boş nanopartiküllere ait partikül boyutu dağılımı grafiği.....	94
Şekil 4.27.	Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait partikül boyutu dağılımı grafiği.....	94
Şekil 4.28.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait partikül boyutu dağılımı grafiği.....	94
Şekil 4.29.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait partikül boyutu dağılımı grafiği.....	95
Şekil 4.30.	İndometazin nanosüspansiyonlarına ait partikül boyutu dağılımı grafiği.....	95
Şekil 4.31.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait partikül boyutu dağılımı grafiği.....	95
Şekil 4.32.	Boş nanopartiküllere ait zeta potansiyel grafiği.....	96
Şekil 4.33.	Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait zeta potansiyel grafiği....	96
Şekil 4.34.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel grafiği.....	96
Şekil 4.35.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel grafiği.....	97
Şekil 4.36.	İndometazin nanosüspansiyonlarına ait zeta potansiyel grafiği...	97
Şekil 4.37.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait zeta potansiyel grafiği.....	97

Şekil 4.38.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri.....	99
Şekil 4.39.	Boş nanopartiküller.....	100
Şekil 4.40.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri.....	100
Şekil 4.41.	Enterik kaplı boş nanopartiküller.....	101
Şekil 4.42.	İndometazin nanosüspansiyonu.....	101
Şekil 4.43.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonunu.....	102
Şekil 4.44.	İndometazin.....	102
Şekil 4.45	Ticari geleneksel kapsül içinde yer alan toz karışım.....	103
Şekil 4.46.	Ticari ER kapsül içinde yer alan pellet.....	103
Şekil 4.47.	Saf PVA'ya ait termogram.....	104
Şekil 4.48.	Saf PLGA'ya ait termogram.....	105
Şekil 4.49.	Saf Kollicoat® MAE 100P'ye ait termogram.....	105
Şekil 4.50.	Saf indometazin, saf PLGA ve saf Kollicoat® MAE 100P'nin fiziksel karışımlarına ait termogram.....	106
Şekil 4.51.	Boş nanopartiküllere ait termogram.....	106
Şekil 4.52.	Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait termogram.....	107
Şekil 4.53.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait termogram.....	107
Şekil 4.54.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait termogram.....	108
Şekil 4.55.	İndometazin nanosüspansiyonlarına ait termogram.....	108
Şekil 4.56.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait termogram.	109
Şekil 4.57.	Saf indometazin, saf PLGA ve saf Kollicoat® MAE 100P'ye ait termogramlar.....	109
Şekil 4.58.	Boş nanopartiküller, enterik kaplı boş nanopartiküller, enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ve	

	indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait termogramlar..	110
Şekil 4.59.	Formülasyonlara ait termogramlar.....	110
Şekil 4.60.	Saf indometazin, saf Kollicoat® MAE 100P ve nanosüspansiyonlara ait termogramlar.....	111
Şekil 4.61.	Formülasyonlara ve formülasyon bileşenlerine ait termogramlar.	112
Şekil 4.62.	Saf PLGA'ya ait FT-IR spektrumu.....	113
Şekil 4.63.	Saf PVA'ya ait FT-IR spektrumu.....	113
Şekil 4.64.	Saf Kollicoat® MAE 100P'ye ait FT-IR spektrumu.....	114
Şekil 4.65.	Saf FD&C Red No:3'e ait FT-IR spektrumu.....	114
Şekil 4.66.	Boş nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu.....	115
Şekil 4.67.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu.....	115
Şekil 4.68.	Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu.....	116
Şekil 4.69.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu.....	116
Şekil 4.70.	İndometazin nanosüspansiyonuna ait FT-IR spektrumu.....	119
Şekil 4.71.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonuna ait FT-IR spektrumu.....	117
Şekil 4.72.	pH 1.2'deki tüm örneklerle ait % çözünen ilacın salım profilleri..	119
Şekil 4.73.	pH 7.2'deki tüm örneklerle ait % kümülatif çözünen ilacın salım profilleri.....	121
Şekil 4.74.	pH 6.8'deki tüm örneklerle ait % kümülatif çözünen ilacın salım profilleri.....	123
Şekil 4.75.	Ön deneme çalışması, 6. saat sonunda sıçan mide mukozalarının görüntüsü.....	131

Şekil 4.76.	6. saat sonucunda elde edilen ülser skorlarının grafiksel olarak gösterimi.....	136
Şekil 4.77.	12. saat sonucunda elde edilen ülser skorlarının grafiksel olarak gösterimi.....	137
Şekil 4.78.	İndometazin verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	137
Şekil 4.79.	İndometazin geleneksel kapsül verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	138
Şekil 4.80.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	138
Şekil 4.81.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	139
Şekil 4.82.	İndometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	139
Şekil 4.83.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü	140
Şekil 4.84.	Boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	140
Şekil 4.85.	Enterik kaplı boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	141
Şekil 4.86.	Sağlıklı kontrol grubundaki sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü.....	141
Şekil 4.87.	İndometazin verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	142

Şekil 4.88.	İndometazin geleneksel kapsül verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	142
Şekil 4.89.	İndometazin ER kapsül verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	143
Şekil 4.90.	İndometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	143
Şekil 4.91.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	144
Şekil 4.92.	İndometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	144
Şekil 4.93.	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	145
Şekil 4.94.	Boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	145
Şekil 4.95.	Enterik kaplı boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri.....	145

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1.	İndometazinin miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemine ait parametreler.....	40
Tablo 4.1.	İndometazin çözünürlük çalışması sonuçları.....	67
Tablo 4.2.	Analitik yöntem validasyonu gün içi doğruluk ve kesinlik.....	69
Tablo 4.3.	Analitik yöntem validasyonu günler arası doğruluk ve kesinlik - 1.gün.....	70
Tablo 4.4.	Analitik yöntem validasyonu günler arası doğruluk ve kesinlik - 2.gün.....	70
Tablo 4.5.	Analitik yöntem validasyonu günler arası doğruluk ve kesinlik - 3.gün.....	70
Tablo 4.6.	Varyasyon katsayısı hesaplamasında kullanılan konsantrasyonlar ve eğimleri.....	70
Tablo 4.7.	Saf indometazin stok çözeltisinin stabilitesi	72
Tablo 4.8.	Geliştirilen formülasyonlar ve formülasyon bileşenleri.....	85
Tablo 4.9.	Hazırlanan formülasyonlara ait indometazin miktar tayini sonuçları.....	92
Tablo 4.10.	İndometazin içeren ve içermeyen formülasyonların % EE, % YK ve % V sonuçları.....	93
Tablo 4.11.	İndometazin içeren ve içermeyen formülasyonların partikül boyutu, PdI ve zeta potansiyel sonuçları.....	98
Tablo 4.12.	pH 1.2'de ve 2 saat sonunda % çözünen indometazin.....	118
Tablo 4.13.	pH 7.2 ortamında % kümülatif çözünen indometazin.....	120
Tablo 4.14.	pH 6.8 ortamında % kümülatif çözünen indometazin.....	122

Tablo 4.15.	pH 6.8 ortamındaki indometazine ait salım kinetiği sonuçları.....	124
Tablo 4.16.	pH 7.2 ortamındaki indometazine ait salım kinetiği sonuçları ...	124
Tablo 4.17.	30 gün boyunca sıvı halde bekletilen formülasyonlarda indometazin miktarındaki değişimler	126
Tablo 4.18.	Sıvı halde bekletilen formülasyonların 1.gün sonunda farklı bekletme koşullarındaki zeta potansiyel, partikül boyutu ve Pdl değerleri.....	127
Tablo 4.19.	Sıvı halde bekletilen formülasyonların 15.gün sonunda farklı bekletme koşullarındaki zeta potansiyel, partikül boyutu ve Pdl değerleri.....	128
Tablo 4.20.	Sıvı halde bekletilen formülasyonların 30.gün sonunda farklı bekletme koşullarındaki zeta potansiyel, partikül boyutu ve Pdl değerleri	129
Tablo 4.21.	6. saat sonunda sıçan midelerindeki ülserli alanlar.....	133
Tablo 4.22.	12. saat sonunda sıçan midelerindeki ülserli alanlar.....	134
Tablo 4.23.	Saf indometazine karşılık formülasyonların 6. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%).	135
Tablo 4.24.	İndometazin geleneksel kapsüle karşılık formülasyonların 6. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%).	135
Tablo 4.25.	Saf indometazine karşılık formülasyonların 12. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%).	135
Tablo 4.26.	İndometazin geleneksel kapsüle karşılık formülasyonların 12. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%)...	136
Tablo 4.27.	ER kapsüle karşılık formülasyonların 12. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%).	136

1. GİRİŞ

İlaç taşıyıcı sistemler, insanlar ve hayvanlar üzerinde terapötik etki oluşturmak amacıyla bir farmasötik bileşiğin kontrollü olarak uygulandığı sistemlerdir. Günümüzde nanoteknolojinin ilerlemesiyle birlikte nano-boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler (lipozom, nanopartikül, dendrimer, misel vb.) hızla geliştirilmekte ve dünya ilaç pazarında da kanser, enfeksiyon hastalıkları ve hormonal hastalıklar gibi pek çok farklı hastalığın tedavisinde kullanıma sunulmaktadır.

Nanotaşıyıcılar nanoboyut, geniş yüzey alan ve uygun fizikokimyasal özelliklere sahip olmaları nedeniyle araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir. Nanotaşıyıcılar, etkin maddelerin hem farmakokinetik hem de farmakodinamik profillerini iyileştirirken, aynı zamanda terapötik indekslerini de geliştirmektedirler. Boyutları 1-1000 nm (genellikle 200-300 nm) arasında değişen, doğal ya da sentetik polimerlerden veya yağlardan oluşturulan, katı, küresel yapıda kolloidal partiküllerdir. Etkin madde nanopartikül matriksi içinde çözünebilir, enkapsüle olabilir veya nanopartiküle tutunabilir.

İndometazin, indol asetik asit yapısında, son derece aktif, analjezik, antipiretik ve non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİİ) etkili bir ilaçtır. Akut gut, bursit, tendinit ve travmatik sinovit gibi ciddi durumlarda ve ankilozan spondilit, osteoartrit, romatoid artirit gibi ağır romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Aspirinden yaklaşık 20 kat daha etkin olan indometazinin, tolere edilmesinde aspirinden çok daha etkili bir ilaç olduğu belirtilmiştir. indometazin, hem siklooksijenaz-1 (COX-1) hem de siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini inhibe etmek suretiyle prostaglandinlerin (PG) sentezini durdurarak antiinflamatuvar etkinlik gösterir. PG sentezinin azalması (özellikle de PGE₂'nin), gastrik mukozanın korunmasız kalmasına ve sonunda da gastrointestinal (GI) yolağın hasarına neden olmaktadır. Azalan PG neticesinde mide asidi mukozal membranlarda hasar

oluşturmaya başlar. Mukozal kanamalar (hemoraji), ülser oluşumları ve hatta mide mukozasının delinmesi ile sonuçlanan ciddi yan etkilere neden olmaktadır. Terapötik etkiyi sağlayabilmek için doz aralıklarının sık olması gerekmekte ve sonuçta pek çok yan etkinin (kardiyovasküler, renal vb.) yanı sıra özellikle GI sistem hasarları oluşmaktadır. Oldukça aktif bir antiinflamatuvar etkili terapötik ajan olan indometazinin kullanımı, özellikle GI sistemde oluşturduğu yan etkileri nedeniyle kısıtlanmaktadır.

İndometazinin keşfinden bu yana görülen yan etkilerine karşın, dünyada ve ülkemizde hali hazırda supozituar, göz damlası, geleneksel kapsül ve uzatılmış salımlı kapsül gibi dozaj formları olsa da, GI sistemde oluşturacakları yan etkileri ortadan kaldırmaya yönelik bir ilaç şekli bulunmamaktadır. Bu sebeple, indometazin içeren pek çok yeni ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmış ve çalışılmaya da devam edilmektedir. Literatür ve patent incelemesi sonucunda biyouyumlu PLGA polimeri ile hazırlanacak indometazin içeren nanopartiküllerin ve polimer kullanılmaksızın hazırlanacak indometazin içeren nanosüspansiyonların Kollicoat® MAE 100P ile enterik kaplama yapılmış formülasyonlarının çalışılmamış olduğu görülmüştür.

Bu çalışma kapsamında, indometazinin inflamasyona neden olan hastalıklarda gastrik yan etkileri minimize edilip terapötik açıdan etkin bir şekilde kullanımını sağlayabilmek için yeni ilaç taşıyıcı formülasyonları geliştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanmış olan nanopartiküler sistemlerin; morfolojik özellikleri, yüzey yükleri, partikül boyutları ve dağılımları, yükleme kapasiteleri (YK), enkapsülasyon etkinlikleri (EE), verimleri (V) ve *in vitro* dissolüsyon profilleri incelenmiştir. Biyouyumlu PLGA polimeri ile hazırlanmış olan indometazin içeren nanopartiküler sistemler ve bunların Kollicoat® MAE 100P kullanılarak enterik kaplanmış nanopartikülleri ile polimer kullanılmaksızın hazırlanmış olan indometazin nanosüspansiyonları ve bunların

Kollicoat® MAE 100P kullanılarak enterik kaplanmış nanosüspansiyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonların sıçan mide mukozasında ülser oluşturma potansiyelleri ve dissolüsyon profilleri, piyasada mevcut indometazin içeren oral dozaj formları [geleneksel kapsül ve uzatılmış salım (ER) kapsül] ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Bu çalışmadaki amacımız indometazin içeren yeni nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek, hazırlanan bu sistemleri karakterize etmek ve *in vivo* çalışmalar ile indometazin kaynaklı ülser oluşumunu azaltmaya ve/veya önlemeye yönelik etkinin incelenmesidir. Elde edilen negatif yüklü nanopartiküler sistemlerin, endüstriyel düzeyde üretilmesi durumunda bu tezin başvurulacak önemli bir kaynak olarak kullanılabileceği kanısındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yeni İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bilinen geleneksel tedavi yöntemleri oral, inokülasyon veya deriden emilim şeklindedir. Oral yolla alındığında, ilaçların çoğu, hedeflenen bölgeye ulaşmadan önce metabolize olmaktadır.¹

Genel olarak, etkin bir terapötik sistem oluştururken, göz önünde bulundurulması gereken iki ana husus vardır: (1) istenenilen terapötik etki ve minimum yan etkilere sahip olan bir kimyasal yapı, (2) bu kimyasal yapıyı istenilen veya hedeflenen bölgeye ulaştıran yüksek verimde bir ilaç taşıyıcı sistem.¹

İlaç taşıyıcı sistemler, insan ve hayvanlar üzerinde terapötik etki oluşturmak amacıyla kontrollü olarak uygulanan sistemlerdir. Günümüzde nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte nanometre boyutundaki ilaç taşıyıcı sistemlere (lipozom, nanopartikül, dendrimer, misel vb.) ilgi artmakta ve dünya ilaç pazarında da kanser, enfeksiyon ve hormonal bozukluklar gibi pek çok farklı hastalığın tedavisinde kullanıma sunulmaktadır. İlaç firmaları, yeni bir ilaç keşfetmek yerine piyasada var olan ilaçları nano metre boyutuna indirgeyerek yeni ilaç taşıyıcı sistemler haline dönüştürmeyi tercih etmektedirler. Yeni bir ilacın keşfedilmesi için yaklaşık 10 yıllık bir süre ve yaklaşık 500 milyon dolar bütçe gerektirirken ayrıca klinik denemelerde olumsuzluklarla karşılaşılabilirken, var olan ilacın yeni bir taşıyıcı sistem haline dönüştürülmesi, hem zamanı azaltacak (3-4 yıl) hem de ekonomik açıdan önemli katkı sağlayacaktır (20-50 milyon dolar).²

2.1.1. Polimerik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Son yıllarda tıp ve biyomedikal alanlarda kullanılan nanomateryaller arasında dikkat çeken kuantum noktaları, grafen, karbon nanotüpler, metalik ve metal oksit

nanopartiküller ve polimerik nanopartiküller tıbbi uygulamalar için umut verici gelişmeler olarak bildirilmiştir.³

Nanopartiküller, boyutları 1-1000 nm (genellikle 200-300 nm) arasında değişen, doğal ya da sentetik polimerlerden oluşan, katı, küresel kolloidal partiküllerdir. Etkin madde nanopartikül matriksi içinde çözünebilir, enkapsüle olabilir veya nanopartiküle tutunabilir. Hidrofilik/hidrofobik etkin maddeler, aşılarda ve biyolojik makromoleküllerin nanopartiküller aracılığıyla organizmaya taşınması mümkündür. Nanopartiküller hücre veya organlara hedeflendirilebilirler, kontrollü ilaç taşınmasını sağlayabilirler. Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanmalarındaki asıl hedef, partikül boyutunu, yüzey özelliklerini ve etkin madde/maddelerin salımını kontrol ederek hedeflenen bölgede optimal doz ve hızda terapötik etkinliği sağlamaktır.^{4, 5}

Son on yılda araştırmacılar, ilaçların partiküler formülasyonu ve nanometre düzeyine indirilmesine odaklanmış ve polimer bazlı nanopartikülleri ilaç tasarımında kullanmaya başlamışlardır. İlaç endüstrisi, büyük ölçüde ilaçların salımını geciktirme, biyoyararlanımlarını artırma, bozunmalarını ve toksisitelerini azaltmanın yanı sıra biyolojik olarak parçalanabilen polimer kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin etkili bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmasına odaklanmıştır.⁶

Polimerik nanopartikül terimi, herhangi bir polimerik nanopartikül formu için, özellikle de nanoküre ve nanokapsüller için kullanılan bir terimdir. Nanoküreler matriks tipi katı partiküler sistemlerdir. Moleküller, küre yüzeyinde adsorbe olmuş veya partikül içinde hapsolmuş halde olabilir. Genel olarak, küreseldirler, ancak küresel olmayanlara da literatürde nanoküre denilmektedir.⁷⁻¹⁰ Nanoküreler, oligomer veya polimer ünitelerinin birleşmesi ile oluşmuş matriks iken, nanokapsüller polimer duvarla çevrelenmiş bir çekirdekten oluşan rezervuar tipi sistemlerdir. Suda çözünürlüğü az olan etkin maddelerin organizmaya taşınmasının yanı sıra nanopartiküller, ilaç salımını

kontrol altına almak, ilacın yan etkilerini azaltmak, etkin maddelerin stabilitelerini korumak, hücre içi penetrasyonu ve farmakolojik aktiviteyi artırmak gibi özelliklere sahiptirler.¹¹ Nanokapsüller ise rezervuar tipte veziküler sistemlerdir. Katı bir kabuk ile çevrelenmiş bir sıvı çekirdekten (yağ veya su) meydana gelirler.^{7, 9, 10}

Poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) gibi biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerden oluşturulan nanopartiküller, benzeri geleneksel ilaçlardan büyük ölçüde farklı fizikokimyasal özellikler sergiler. Bu nanopartiküllerin yüzey alanı ile birlikte hücre membranına translokasyon kabiliyetleri artmıştır. Polimerik nanopartiküllerin yan etkileri, boyutları ve endositoz olabilme yetenekleri kapsamlı olarak araştırılmamıştır. Nanopartiküllerin biyolojik dağılımı hakkında elde edilecek bilgiler çok daha üstün ve güvenli nanopartiküllerin tasarlanmasına yardımcı olacaktır.¹² Yüksek enkapsülasyon etkinliği ve maksimum ilaç yükleme kapasitesine sahip nanopartiküler sistemler ile ilaç israfı önlenebilecek ve hedef bölgeye uygulanan etkin madde miktarı da azaltılabilecektir.¹³

Nano boyutlu partiküler sistemler daha geniş yüzey alan / hacim oranına sahip olduklarından, cilt ve bağırsaklar ile mukozal zarlar gibi fizyolojik bariyerlere kolay nüfuz ederler.¹⁴ Nanopartiküler sistemlerin diğer farmasötik dozaj şekillerine göre önemli üstünlükleri vardır.¹⁵ Bunlar arasında:

- Biyoyararlanımın artırılması,
- Alınan doz miktarının azaltılması,
- Sistemin ilaç dozunun azaltılması nedeniyle daha düşük toksisite riski taşınması,
- Yüzey alanının artması nedeniyle etkin maddenin insan vücudu gibi su oranı yüksek bir ortamda daha hızlı çözünmesinin sağlanması sayılabilir.

İlaçların, proteinlerin, monoklonal antikorların, nükleik asitlerin, biyolojik ekstrelerin ve benzeri çeşitli biyolojik olarak aktif moleküllerin taşıyıcısı olarak polimerik

nanopartiküller kullanılabilir. ³ Bu sistemlerin suda çözünürlüğü zayıf maddelerin uygulanması zorluğunun giderilmesi için kullanılması da mümkündür. ¹¹ Ayrıca bu taşıyıcı sistemler ile:

- İlaçların vücutta kalış süresinin uzatılması,
- İlaçların stabilitelerinin artırılması,
- İlaçların hedeflendirilmesi ve yüksek konsantrasyonda terapötik maddenin hedef bölgeye iletilmesi,
- Hedeflenen bölgede tekdüze dağılımın gerçekleşmesi,
- Termodinamik stabilitenin artırılması,
- İlaçların biyolojik bariyerlerden geçişlerinin kolaylaştırılması, ^{3, 8}
- Uçucu maddelerin stabilitelerinin artırılması,
- Etki ve verimlilik açısından geleneksel (oral ve intravenöz) uygulamaya kıyasla hasta uyuncunun artırılması,
- Doku mühendisliğinde de kolaylıkla kullanılabilmesi mümkündür. ¹⁶

2.1.1.1. Biyoparçalanabilen Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknolojideki son gelişmeler, nanopartikürlere yüklenebilen etkin maddeler için geniş bir polimer yelpazesi sağlamaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilen/parçalanamayan, biyouyumlu polimerler de dâhil olmak üzere çok sayıda sentetik ve doğal polimerik materyal, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Sentetik ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerik yapılar arasında, PLGA ve poli laktik asit (PLA) en yaygın olanlardır. ³

Biyoparçalanabilir nanopartiküller, suda çözünebilen/çözünemeyen birçok etkin maddenin ve biyoaktif molekülün biyoyararlanımını, etkinliğini, spesifikliğini, tolere edilebilirliğini ve çözünürlüğünü artırır. İlacın yan etkileri ve toksisitesinin ortaya çıkma riski en aza indirilirken sistemin retiküloendotelial sistem (RES) tarafından hızla

parçalanmaya karşı korunması da sağlanır. Böylece ilacın hedeflenen bölgeye ulaşarak hücre içine alımı sağlanır. Tedavinin maliyeti düşürülür.¹⁷

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımında önemli yer tutar. Çünkü sistemik dolaşıma geçen parçalanma ürünlerinin toksik olmaması gerekir. Parçalanma ve aşınma, sıklıkla birbirinin yerine kullanılan iki terim olmasına rağmen, parçalanma kimyasal reaksiyonlar sonucunda kovalent bağların kopması olayıdır. Aşınmada ise moleküler yapıda kimyasal değişiklikler olmaksızın çapraz-bağlanmamış sistemlerde zincir yapıları kopar. Bu çözünmenin gerçekleşmesi için polimerin, etrafındaki çözücüyü absorbe etmesi, çekme ya da itme kuvvetleri ve/veya hidrojen bağları aracılığıyla suyla etkileşmesi gerekir. Parçalanmada polimer, yüzeyden kademeli olarak uzaklaşır. Kütlesel parçalanmada, aşınma bitene kadar polimer taşıyıcının fiziksel boyutunda önemli bir değişiklik olmaz, ancak kalan polimer oranı zamanla azalır. Süreç, polimere çözücünün penetrasyonu, parçalanma ürününün difüzyonu ve makromoleküler yapının yıkımı veya çözünmesi ile sonuçlanır.¹⁸

Biyolojik olarak parçalanabilir materyaller doğal veya sentetik kaynaklı olup. metabolik yollarla (enzimatik/enzimatik olmayan veya her ikisi ile birden) parçalanabilmektedir.

İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan başlıca parçalanabilir polimerler:

(1) hidroksi asitler (PLGA), polianhidritler vb. gibi nispeten hidrofobik yapılar içeren sentetik biyoparçalanır polimerler,

(2) kompleks şekerler (hiyalüronan, kitosan) ve inorganik maddeler (hidroksiapatit) gibi doğal polimerlerdir.¹⁹

Biyouyumluluk oldukça önemlidir ama materyal açısından temel bir özellik değildir. Esas olan biyolojik ortam ve spesifik ilaç-polimer-doku etkileşimleri açısından tolere edilebilirliğidir.¹⁹

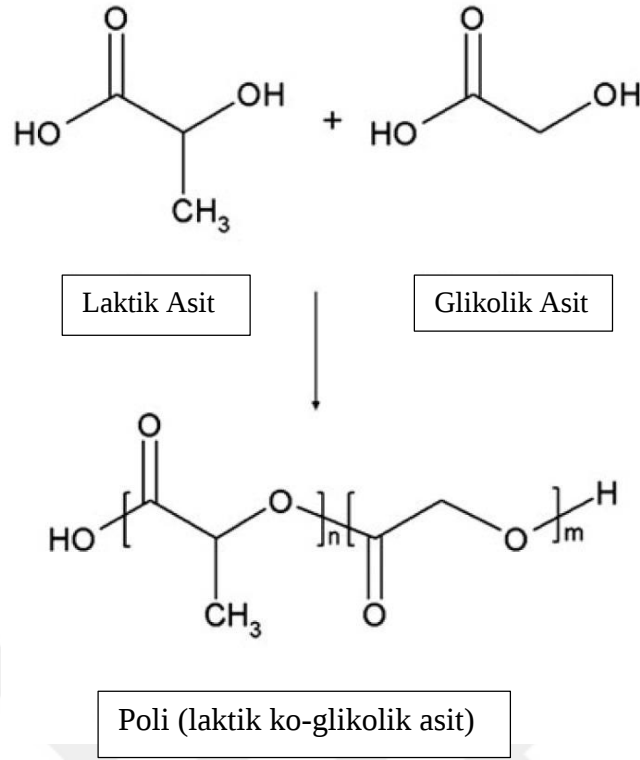
2.1.1.2. Poli Laktik Ko-Glikolik Asit (PLGA)

İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında doğal/sentetik ve/veya biyoparçalanabilen/biyoparçalanamayan polimerler sıklıkla kullanılmaktadır.

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (European Medicines Agency-EMA) PLGA'nın çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanımına onay vermiştir.^{20, 21}

Konvansiyonel ilaçların yanı sıra kontraseptif steroidler, antikanserojen ilaçlar ve NSAİİ'ler, kısa biyolojik yarı ömre sahip makromoleküller ve biyolojik terapötik maddeler de dâhil olmak üzere geniş bir aralıktaki aktif farmasötik bileşen (Active Pharmaceutical Ingredient, API), PLGA kullanılarak organizmaya taşınmaktadır.²²

PLGA, vücutta hidrolize uğrayarak biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu metabolit monomerlerine (laktik asit ve glikolik asit) dönüşen, sitrik asit döngüsü ile vücuttan uzaklaştırılan polimerlerden biridir (Şekil 2.1). PLGA'nın biyoparçalanma ürünleri çok yavaş oluşur ve dolayısıyla normal hücre fonksiyonunu etkilemezler. İlaç taşıyıcı sistemler veya biyomateryal uygulamaları için PLGA'nın kullanılmasıyla bazı çalışmalara göre çok az, bazı çalışmalara göre de hiçbir sistemik toksisite saptanmamıştır. PLGA matriks sistemi içindeki ilaç, difüzyon ve polimer matriksin parçalanması ile sürekli ve sabit bir hızda salınmış olur.²³

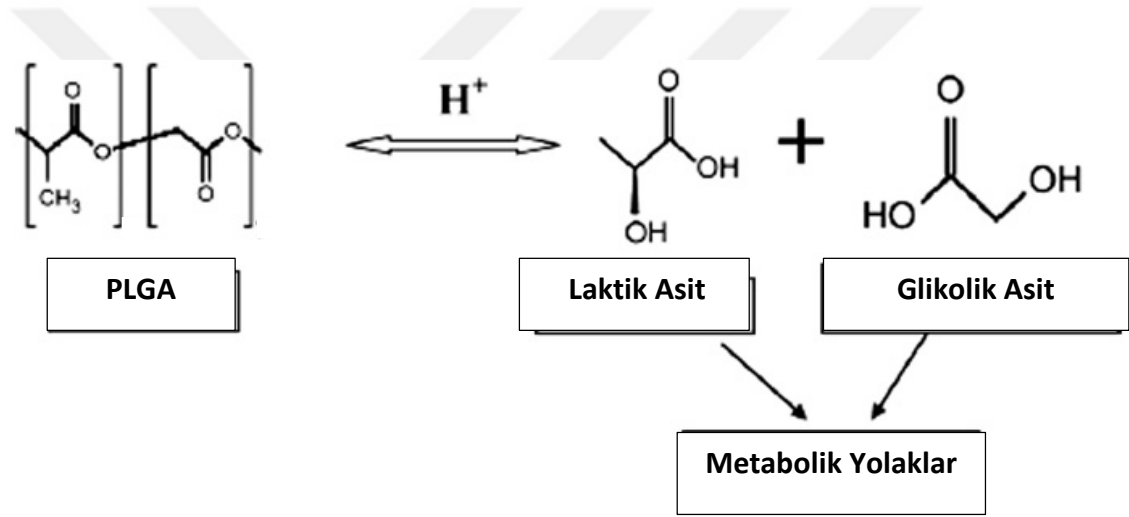


Şekil 2.1. PLGA ve monomerleri (m ve n tekrar sayısı)²⁴

Poli laktik asit (PLA), laktik asitten elde edilen bir siklik dimer olan laktidin polimerizasyonu ile üretilen lineer alifatik bir termoplastik poliesterdir. Kiral bir moleküldür ve poli (L-laktit), poli (D-laktit) ve rasemik poli (D, L-laktit) olarak üretilir. PLA, yaygın olarak organik çözücüler içinde çözünür. Poli glikolik asit (PGA) ise en basit lineer, alifatik poliesterdir. PGA kristal yapıda olduğundan, yüksek erime noktasına ve organik çözücülerde düşük çözünürlüğe sahiptir. PGA'nın kristalinitesi, PLA'nın aksine metil grubundan yoksun olan kimyasal yapısından kaynaklıdır. PGA rastgele bir şekilde PLA ile kopolimerize edildiğinde (% 30-50), oluşan kopolimer (PLGA) daha kolay işlenebilir fiziksel özelliklere sahiptir. PLGA'nın parçalanma hızı, yapıdaki glikolik asit oranına bağlıdır. Dolayısıyla glikolik asit ve laktik asit miktarları değiştirilerek parçalanma hızı ayarlanabilmektedir.²³

PLGA, su varlığında hidrolize uğrayarak metabolitleri olan laktik asit ve glikolik asit monomerlerine parçalanır (Şekil 2.2). Bu iki monomer vücut içinde Sitrik Asit

Döngüsü (Krebs Döngüsü) aracılığıyla kolayca metabolize olur, su ve karbondioksit dönüştürerek atılır. PLGA'nın, farklı molekül ağırlıklarına ve içerdiği PLA:PGA oranlarına göre ticari çeşitleri bulunmaktadır. Bu özelliklerine bağlı olarak parçalanma/salım süresi farklılığı (birkaç aydan birkaç yıla kadar) göstermektedir. PLGA, yapısındaki monomerlerin oranlarına göre tanımlanır. Örneğin, PLGA 50:50, % 50 laktik asit ve % 50 glikolik asitten oluşmaktadır.^{25, 26} PLGA içindeki glikolik asit miktarı ne kadar fazlaysa, parçalanma süresi de o kadar kısadır. Ancak bir istisna olarak en hızlı parçalanma diğer PLGA türlerine kıyasla PLGA 50:50'de görülmektedir.²⁷



Şekil 2.2. PLGA'nın hidroliz şeması^{17, 26}

PLGA kopolimerinin hidroliz veya biyoparçalanma sonucu yapısındaki ester bağları kopar, oligomerlere ve son olarak da monomerlere ayrılır. Bu polimer için parçalanma işlemi esas olarak matriksin su penetrasyonunu takiben önce yığın degradasyonu ile başlayıp polimer parçalanması ile devam eder. Biyoparçalanmada otokatalizin bir sonucu olarak karboksilik uç gruplarının artışı başlar. PLGA kopolimerinin parçalanması sırasıyla, önce difüzyon sonra aşınma ile devam eder. Parçalanma sürecini etkileyen birçok değişken olduğundan, salım olgusu genellikle tahmin edilemez.¹⁹ PLGA kopolimerlerinin biyodegradasyon hızı, polimer zincirindeki

laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin moleköl ağırlığına, kristalinite derecesine ve polimerin Camsı Geçiş Sıcaklığı'na (Tg) bağlıdır.

PLGA'nın biyodegradasyonu iki aşamada gerçekleşir:

(1) İlaç salımındaki başlangıç patlaması (burst effect) etkin maddenin yapısına, konsantrasyonuna ve polimerin hidrofobik özelliğine bağlıdır. Ortamla temas eden yüzeydeki ilaç, çözünürlüğünün bir fonksiyonu olarak ve ayrıca suyun polimer matrikse nüfuz etmesi oranında serbestleşir. Bu esnada PLGA zincirlerinin rastgele kopması gerçekleşir.

(2) İlaç daha kalın bir tabakadan kademeli olarak salınır. Matriks içine giren su, polimeri çözündürmeye başlar, hidroliz sonucu oligomerik ve monomerik ürünler meydana gelir. Bu durum, polimerin tamamen çözünmesine kadar ilacın difüzyon ve aşınma yoluyla salınması için bir geçiş oluşturur. İlacın yapısı da sulu fazın matrikse çekilmesinde önemli bir rol oynar. Herhangi bir PLGA biyodegradasyonunda enzimlerin rolü belirsizdir. Literatürdeki kayıtların çoğu PLGA biyodegradasyonunun herhangi bir enzim aktivitesi yerine sadece hidroliz yoluyla olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bazı araştırmacılar, enzimlerin de rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. İkinci aşama sonunda PLGA polimeri laktik ve glikolik asitlere dönüşür. Laktik asit Krebs döngüsüne girer, metabolize olur ve vücuttan karbondioksit ile birlikte su olarak, glikolik asit ise böbreklerden değişmeden veya trikarboksilik asit döngüsüne girerek karbondioksit ve su olarak atılır.¹⁹

PLGA degradasyon süresine etki eden çeşitli faktörler vardır. PLGA'nın içerdiği PLA:PGA oranları, polimerin hidrofilik özelliğini dolayısıyla da parçalanma hızını etkiler ve PGA oranı arttıkça bu özelliği artar. PGA oranına bağlı olarak degradasyon süresi ayarlanabilmektedir. Tg ve kristal yapının varlığı degradasyon süresini etkiler. PLGA'nın kristal yapısı arttıkça degradasyon süresinin uzadığı görüşü hakimdir. Bu sav, PLA

oranındaki artış ile açıklanmaktadır. Yüksek moleköl ağırlığına ve uzun polimer zincirlerine sahip PLGA, daha düşük moleköl ağırlığı ve kısa polimer zincirlerine sahip olanlardan daha uzun sürede degradasyona uğrar. Yüzey alanı / hacim oranı PLGA'nın degradasyon süresini etkileyen faktörlerdendir. Yüzey alanı arttıkça parçalanma hızlanır. Polimerin *in vitro* biyodegradasyonu / hidrolizinin, hem alkali hem de kuvvetli asitli ortamda daha hızlı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte hafif asitli ve nötr ortamda PLGA'nın parçalanması, karboksilik uç gruplarının otokatalizlenmesiyle daha yavaştır. PLGA'nın parçalanmasının hidroliz ile gerçekleştiği öne sürülse de enzimatik parçalanmanın varlığı da önemsenmektedir. Farmasötik preparat hazırlarken polimere yüklenen ilaç miktarı, salım oranı ve hızı üzerinde etkindir. Yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip polimerler az olanlara nazaran başlangıçta daha yüksek bir patlama etkisine sahiptir.¹⁹

Tüm bu özellikler PLGA'nın, kan dolaşımında terapötik ilaç konsantrasyonunu artırabilir ve böylece çok dozlu ilaç kullanımlarını azaltabilir. Bununla birlikte PLGA'nın yüzeyindeki fonksiyonel grupların eksikliğinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemlerde aktif hedeflendirme gibi işlevselliklerin gerçekleştirilmesi zordur. PLGA yüzeyindeki negatif yük, hücre afinitesini ve hücreye immobilizasyonunu azaltır. Bu nedenle, PLGA bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey modifikasyonu, sistemin en iyi şekilde kullanılabilmesi için gereklidir.²⁸

2.1.2. Nanosüspansiyonlar

Suda çözünürlük problemi olan etkin maddelerin formülasyonunu hazırlamak, ilaç endüstrisinde aşılması gereken bir problemidir. Bu problemi aşmak ve biyoyararlanımı artırmak için yüzey aktif maddeden yararlanma, inklüzyon kompleksi hazırlama, ko-solvan kullanma, mikronize etme ve katı dispersiyon hazırlama gibi birçok yol denenmiştir. Partiköl boyutunu nanometrik seviyeye getirmek de bu problemi çözmek

için geliştirilen yollardan birisidir. Noyes-Whitney teorisine göre, partiküller küçüldükçe yüzey alanları, çözünme hızları, doygunluk konsantrasyonları ve biyoyararlanımları artmaktadır.^{29, 30} Son yıllarda, araştırmacılar tarafından umut vadeden bir yöntem olarak suda ve yağda çözünürlüğü az olan etkin maddelerin nanosüspansiyon halindeki tasarımları geliştirilmeye başlanmıştır.³¹

Nanosüspansiyonlar, taşıyıcı/matriks yapı içermeyen, boyutu 1000 nm'nin altında olan, stabiliteyi sağlamak için minimum seviyede yüzey aktif madde kullanılarak saf etkin madde ile hazırlanan kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Dispersiyon ortamı olarak sulu ve susuz ortamlar (organik çözeltiler) kullanılabilir. Bu sistemleri stabil hale getirmek amacıyla da yüzey aktif madde ve polimerik stabilizanlar kullanılabilir. Üretimleri kolaydır ve ölçek büyütmeye uygundur.^{32, 33}

Boyutların küçülmesi ve yüzey alanının genişlemesiyle çözünme, permeasyon ve biyoyararlanım oranı artarken uygulanan doz, yan etkiler, toksisite ve dolayısıyla ilaç tüketimi ve maliyeti azalmaktadır. Ek olarak, nanosüspansiyonlar, toksikolojik çalışmalarda da çok kullanılmaktadır. Böyle çalışmalarda, çözünürlüğü artırmak için ko-solvan kullanımı, çalışmaları karmaşıklaştırmakta ve toksisitenin ko-solvandan mı yoksa formüldeki diğer bileşenlerden mi kaynaklandığını belirlemede güçlük çıkarmaktadır. Nanosüspansiyonlarda ko-solvan kullanma gereğinin olmaması büyük bir avantajdır. Nanosüspansiyonlarda yüzey alan ile birlikte yüzeyler arası geriliminin ve sistemin serbest yüzey enerjisinin de artması söz konusudur. Bundan dolayı nanosüspansiyonlar termodinamik olarak stabil olmayan sistemlerdir. Nanosüspansiyonlar, yüzey enerjilerini azaltmak için flokülasyon, agregasyon ya da kristal büyümesi gibi durumları gerçekleştirebilmektedir. Ancak bu durum nanosüspansiyonların özelliklerini olumsuz yönde etkiler. Bu sistemlerin yüzey enerjilerini azaltmak için stabilizanlar ilave edilir.³⁴ Polivinil pirolidonlar (PVP), selüloz türevleri, pluronikler, polisorbitatlar, polietilen

glikoller (PEG), polivinil alkoller (PVA) ve lesitin sıklıkla kullanılan ve toksik olmayan stabilizanlardır.^{35, 36} Nanosüspansiyonlar, oral, parenteral, dermal, oküler ve pulmoner yollarla uygulanabilmekte ve istenilen dokuya hedeflendirilebilmektedirler.³³ Etkin maddeler ile nanosüspansiyonlar hazırlandığında maksimum plazma konsantrasyonuna daha hızlı ulaşılır. Zayıf çözünürlük ve permeabilite ya da her ikisini gösteren moleküller için nanosüspansiyon preparat şekli tercih edilir.³⁷

Nanosüspansiyonların hazırlanmasında genellikle iki teknolojiye bahsedilmektedir: “Aşağıdan Yukarıya (Bottom-Up)” ve “Yukarıdan Aşağıya (Top-Down)”. Aşağıdan yukarıya teknolojisinde presipitasyon, nanopresipitasyon, mikroemülsiyon ve eritme yoluyla emülsiyon oluşturma yöntemleri bulunmaktadır. Nanopresipitasyon yöntemi, mikro ve nano boyutlu partikülleri hazırlamak için etkin bir yoldur.^{29, 35} Yüksek enerji, sıcaklık ve pahalı ekipman gerektirmeyen, kolay ve hızlı bir yöntem olması önemli avantajlarıdır. Bu yöntemde etkin madde, su ile karışabilen aseton, alkol gibi bir çözücü içinde çözündürülmekte ve nano boyutta çöktürmek amacıyla stabilizan içeren su gibi bir polar çözücü içerisine hızla aktarılmaktadır. Organik çözücü, vakumda buharlaştırma ya da oda sıcaklığında uçurma gibi uygun bir yöntemle uzaklaştırılmaktadır. Yukarıdan aşağıya doğru yöntemlerde ise genellikle bulk materyalden litografi gibi teknikler kullanılarak nano boyutlara inilmesi gerçekleştirilmektedir.^{29, 31, 33, 35}

Partikül boyutunun küçültülmesinin bir sonucu olarak, suda çözünürlüğü olmayan ilaçların intravenöz uygulanma olasılığı meydana gelmektedir.³⁸

Ayrıca nanosüspansiyonlar ile:³⁸

- İlaçların çözünürlüğü ve biyoyararlanımının artırılması,
- Hidrofilik ilaçlara da uygulanabilmesi,
- Daha yüksek ilaç yükleme kapasitesi elde edilmesi,
- Doz aralıklarının azaltılması,

- İlaçların fiziksel ve kimyasal stabilitesinin artırılması,
- Pasif hedeflendirme yapılması mümkündür.

Nanosüspansiyonlar, bu avantajlarının yanı sıra azaltılmış toksisite ve yan etkiler nedeniyle de hasta uyuncu açısından önemlidir. Bu durum aslında kullanılan yardımcı maddelerin az miktarda ilave edilmesinin bir neticesidir. Böylece yardımcı maddelerden kaynaklı toksisite riski de azaltılmış olur. Özellikle daha fazla ilacın doğrudan hedeflenen alana taşınması da önemli bir avantajdır.³⁹

Stabilizanlar, agregasyon ve aglomerasyonu önlemek için nanosüspansiyon formülasyonlarında vazgeçilmez maddeler arasında yer alır. Nanosüspansiyonları stabilize etmek için yaygın olarak kullanılan stabilizanlar arasında polimerler (örneğin, polivinil pirolidon, hidroksipropil metil selüloz ve hidroksipropil selüloz, D-alfa-tokoferol, polietilen glikol 1000 süksinat, polietilen glikoller, PVA, amfifilik amino asit kopolimerleri, kristalize selüloz), iyonik yüzey aktif maddeler (örneğin, sodyum dodesil sülfat, sodyum lauril sülfat, poli etilen imin, kitosan) ve noniyonik yüzey aktif maddeler [örneğin, Tweenler, Pluronic® olarak da bilinen poli (etilen oksit)-poli (propilen oksit) blok kopolimerleri] vardır. Nanosüspansiyonların hazırlanmasında kullanılan bu stabilizanlar, ilaç nanopartiküllerinin yüzeylerine adsorbe olur ve yapılarındaki hidrofobik kısımlardan kaynaklanan sterik bir engel veya elektrostatik bir çekim oluştururlar. Böylece, nanopartiküllerin yüzeyleri bu stabilizanlar tarafından kaplanır. Nanopartiküllerin sahip olduğu termal hareketliliğin bir sonucu olarak stabilizanlar aglomerasyonu engellerler.³⁹

2.2. Polivinil Alkol (PVA)

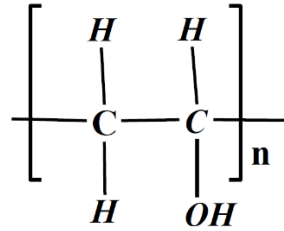
Yüzey aktif maddeler; anyonik (negatif yüklü), katyonik (pozitif yüklü), zwitteriyonik veya amfoterik (yükleri ortamın pH'sına bağlı) ve non-iyonik (yüksüz) olmak üzere sınıflandırılırlar. Özellikle non-iyonik olanlar, suda çözünmeyen maddelerin

biyoyararlanımını artırmak için oral farmasötik formülasyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.¹⁴

Non-iyonik yüzey aktif maddeler çeşitli avantajlar sunar.¹⁴ Bunlar:

- (i) İyonik yüzey aktif maddelerden daha hidrofobiktirler,
- (ii) Suda çözünmeyen ilaçları çözündürmek için en iyi kapasiteye sahiptirler,
- (iii) Genellikle biyolojik membranlar için daha az toksiktirler,
- (iv) Bazıları P-glikoprotein gibi akış pompalarını modüle ederek ilaç farmakokinetiğini etkilerler.

Esasen polivinil asetatın hidroliz yoluyla elde edilen PVA, biyolojik organizmalar tarafından kolayca parçalanabilen ve kristal yapıda suda çözünen bir polimeridir. PVA, yapısındaki karbon atomları üzerinde var olan hidroksil grupları nedeniyle hidroliz yoluyla parçalanabilirliği artmıştır. Ayrıca hidrofilik bir doğaya da sahiptir.⁴⁰



Şekil 2.3. PVA'nın yapısal formülü⁴¹ (n, tekrar sayısı)

PVA'nın hidroliz oranı, % 80'den % 99'a kadar değişir. Hemen hemen tamamen hidrolize olmuş PVA formları, polimer zincirleri üzerinde çapraz bağlanmış PVA hidrojellerinin oluşmasına sebep olur.⁴⁰

PVA'nın suda tamamen çözünmesi için su sıcaklığının ~ 100 °C'de olması ve sürenin de 30 dakika tutulması gereklidir. PVA'nın sudaki çözünürlüğü ve fiziksel

özellikleri, hidroliz derecesi, molekül ağırlığı ve kristal yapısından büyük ölçüde etkilenmektedir. PVA'nın benzer fiziksel özellikleri onu insan dokularıyla uyumlu hale getirir.⁴⁰

PVA aynı zamanda, çeşitli biyomedikal alanlarda ilaç taşıyıcı sistemlerden tıbbi görüntülemeye, vasküler hastalıkların ve bozuklukların düzeltilmesine kadar farklı uygulamalara sahip bir non-iyonik yüzey aktif maddedir.¹⁴ PVA, nanopartiküllerin yüzeyine kimyasal veya fiziksel olarak bağlanabilir.⁴⁰

PVA, nanopartikül ve nanosüspansiyon hazırlamada sıklıkla agregasyonu önlemek ve biyolojik olarak uyumu sağlamak amacıyla kullanılan hidrofilik yapıda biyouyumlu bir polimerdir.^{30, 42} Agregasyonu, nanopartiküllerin/nanosüspansiyonların yüzeyinde sterik bir bariyer oluşturarak önlemektedir.³⁵ PLGA nanopartiküllerin formülasyonunda PVA yaygın olarak kullanılan bir yüzey aktif madde olarak belirtilmiştir. Ayrıca PVA'nın, tekdüze partikül boyutu dağılımı ile PLGA nanopartikülleri oluşturduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda PVA'nın sitotoksik olmadığı da kanıtlanmıştır.⁴³

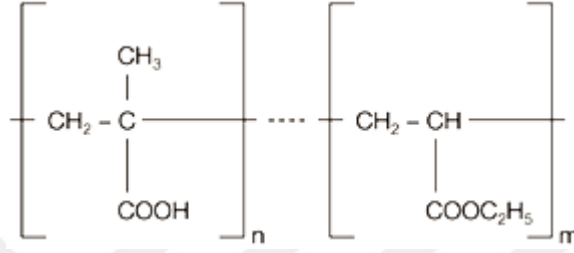
2.3. Kollicoat® MAE 100P

Kaplamalar, kötü tatları maskeleyerek, ilaçları neme karşı korumak ve katı oral dozaj formlarından ilaç salımını kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kaplama maddeleri arasında hidroksipropil metilselüloz, poliakrilat/polimetakrilat kopolimerleri, polivinilasetat / polivinilpirrolidon veya etil selüloz gibi polimerler bulunmaktadır.⁴⁴

Arzulanan ilaç salım profilini elde etmek için farklı formülasyon ve proses parametreleri (kaplama kalınlığı, polimer tipi ve ilave edilen plastikleştiricinin türü ve miktarı) türetilmiştir. Bununla birlikte, bu parametrelerin değişimi genellikle sınırlıdır.

Örneğin, film kaplamanın kırılması ve/veya yırtılması, doz kaybı ve çok uzun işlem sürelerini önlemek için çok kalın kaplamalardan kaçınılmalıdır.⁴⁴

GI sistemde çözünmeyen polimerler kullanılarak yapılan film kaplamalar sayesinde pH'ya bağımlı ilaçların çözünürlük problemlerinin üstesinden gelinebileceği belirtilmiştir.⁴⁴



Şekil 2.4 Kollicoat® MAE 100P yapısal formülü⁴⁵ (m ve n tekrar sayısı)

Kollicoat® MAE 100P; güvenilir, yüksek performanslı enterik kaplamada kullanılan USP (Amerikan Farmakopesi) ve Ph. Eur.'da (Avrupa Farmakopesi) kayıtlı olan metakrilik asit:etil akrilat (1:1) kopolimeridir. Hızla redisperse olabilmesi için kısmen nötralize edilmiştir ve sulu ortamda da kolayca dağılabilir. pH 5.5'in üzerinde çözünerek etkin madde salımı başlar.^{46, 47}

Tg değeri 110 °C'dir.⁴⁷ Literatürde pek çok ilaç için nano ve mikro partikül hazırlamada enterik kaplama materyali olarak kullanılmaktadır.⁴⁷⁻⁴⁹ Özellikle NSAİİ'lerle ilişkili yan etkileri tamamen önleyebilecek hiçbir formülasyon yoktur. Bu bağlamda enterik nanopartiküller, NSAİİ'lerin neden olduğu GI irritasyonları azaltmak için potansiyel taşıyıcılar olarak kabul edilmektedir. Enterik nanopartiküller, değişmeden mide içeriğinden geçip ve daha sonra bağırsakta çözünmeye başlaması üzere tasarlanmış katı kolloidal partiküllerdir. Bu partiküller sayesinde yan etkiler azalırken, geleneksel NSAİİ'lerin etkinliği ve güvenilirliği devam ettirilmektedir.⁵⁰

Enterik kaplama, oral uygulamadan sonra ilacın spesifik bağırsakta salımı için etkili bir teknolojidir. Enterik kaplama, midenin asidik ortamında kararsız etkin maddelerin bozulmasını önlemek, mideyi tahriş edici bileşiklerden korumak veya bağırsakta ilacın salınımını sağlamak için kullanılır. pH'ya duyarlı polimerler genellikle enterik dozaj formlarını hazırlamak için kullanılırlar, asit ortamda bozulmadan kalır ve artan pH koşullarında ise çözünürler. Son yıllarda araştırmalar, nanopartiküller üzerine odaklanmıştır. Enterik kaplı nanopartiküller, sadece hücre içi penetrasyonu, hücrede kalış süresinin iyileştirilmesi veya ilacın salımının kontrol edilmesini içeren birtakım avantajlara sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda ilacı asit ortamdaki bozulmaya karşı da korur. Enterik kaplı nanopartiküller yapılarına göre iki kategoriye ayrılabilirler; biri çekirdek-kabuk yapısı ve pH'ya duyarlı bir polimer ile, diğeri ise iskelet materyali olarak pH'ya duyarlı polimer ile kaplı nanopartiküllerdir.⁵¹

2.4. Nanopartiküler Sistemleri Hazırlama Yöntemleri

Nanopartiküllerin hazırlanması için farklı yöntemler mevcuttur. Genel olarak bu yöntemler üretim prensiplerine dayalı olarak aşağıdan yukarıya (Bottom Up) ve yukarıdan aşağı (Top Down) şeklinde iki kategoride sınıflandırılabilirler. Yukarıdan aşağıya yöntemler büyük katı parçacıklar ile başlar ve onları mekanik olarak nano veya mikropartiküllere ayırır. Oysa aşağıdan yukarıya yöntemlerde ise daha küçük partiküller birleştirilerek küçük partiküller elde edilir. Bu son yöntem ile elde edilen partiküllerin boyutu, morfolojisi ve kristal yapısı yukarıdan aşağıya yöntemlerle karşılaştırıldığında daha iyi kontrol sağlar.⁵²

Nanopartiküller, önceden oluşturulmuş polimerlerden uygun şekilde hazırlanabilmektedirler. Bu yöntemler arasında tuzla çöktürme, çözücü buharlaştırma, diyaliz ve süperkritik akışkan teknolojisi kullanılarak önceden hazırlanmış polimerler aracılığıyla nanopartiküller oluşturulabilir. Hazırlama yönteminin seçimi, polimerik

sistemin tipi, uygulama alanı, boyut gereksinimi, vb. gibi bir takım faktörler göz önüne alınarak yapılır.⁷ Ayrıca, nanopartiküllerin hazırlanması için uygun yöntem seçimi, polimerin ve kullanılacak olan ilacın özelliklerine de bağlıdır. Bu nedenle, istenilen niteliklerin sağlanması gerekir.

Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı yöntemlere aşağıda kısaca değinilmiştir^{7, 53}:

Nanopartiküllerin hazırlanması için geliştirilen ilk yöntem “Çözücü Buharlaştırma” yöntemidir. Suda çözünmeyen organik çözücüler ile sulu faz arasında bir emülsiyon oluşturulur. Organik fazda çözünmüş halde polimer ve ilaç bulunur. Sonrasında organik fazın uzaklaştırılması ile sulu fazda nanopartiküler elde edilmiş olur. Nanopartikülleri hazırlama sırasında çözücünün buharlaştırılması ile var olan emülsiyon, bir nanopartikül süspansiyonu haline dönüşür. Bu aşamada hızlı bir homojenizasyon veya ultrasonikasyon kullanır. Bu işlemi, oda sıcaklığında sürekli manyetik karıştırma ya da vakum altında çözücünün buharlaştırılması, ultrasantrifüj, nanopartiküllerin elde edilmesi, ardından yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması için yıkama ve son olarak da liyofilizasyon işlemi takip eder.

“Emülsifikasyon ya da Çözücü Difüzyonu” denilen bir diğer yöntem ise çözücü buharlaştırma yönteminin modifikasyonu ile elde edilmiştir. Nanopartiküller, suyla karışabilen bir çözücünün suyla karışmayan bir organik çözücü ile karıştırılması sonucunda bu iki faz arasında kendiliğinden yayılır ve buna bağlı olarak meydana gelen türbülans ile oluşurlar.

Emülsifikasyon difüzyon yönteminin modifikasyonu olan “Tuzla Çöktürme”, suyla karışabilen organik bir çözücünün, tuzla çöktürülme işlemi ile sulu çözeltiden ayrılması esasına dayanır. Başlangıçta polimer ve ilaç, aseton gibi bir çözücü içinde çözündürülür, daha sonra magnezyum klorür, kalsiyum klorür, magnezyum asetat gibi

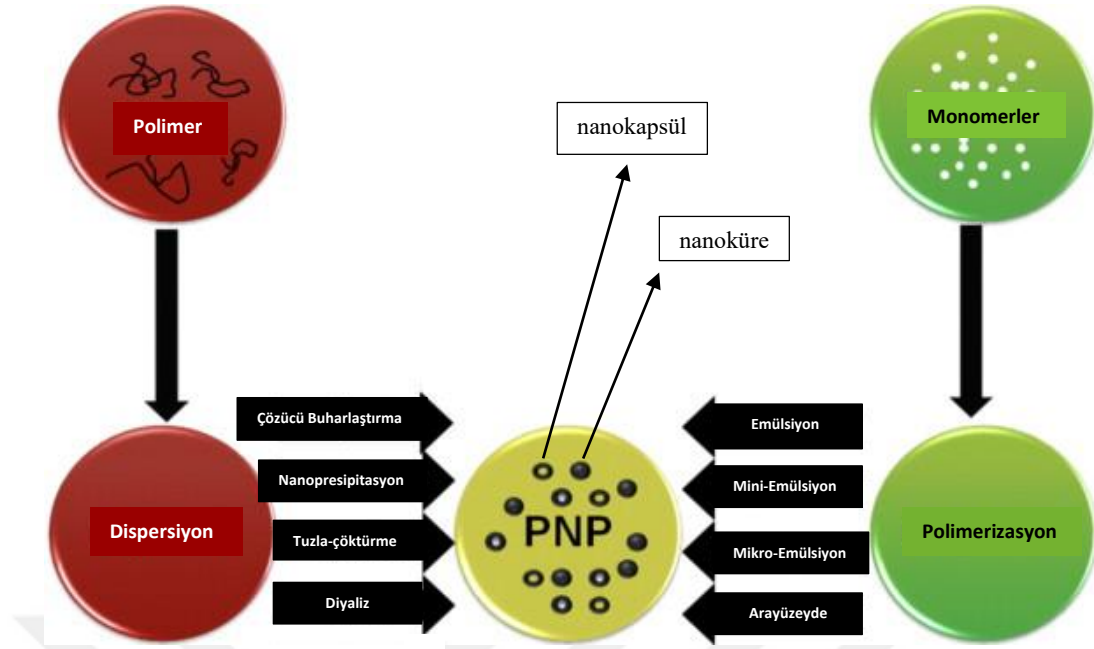
elektrolitlerin ilavesiyle emülsiyon meydana getirecek jel elde edilir. Tuz ilavesine bağı olarak polimerin çökmesi ve nanopartiküllerin oluşumu gerçekleşir.

“Diyaliz” yönteminde ise polimerin organik bir çözücü içinde çözündürüldüğü ve uygun bir diyaliz tüpünün içine yerleştirildiği, çözücünün yer değiştirmesiyle oldukça küçük ve dar bir partikül boyutu dağılımına sahip nanopartiküllerin elde edildiği basit ve etkili bir yöntemdir.

“Süperkritik Akışkan Teknolojisi”nde, süper kritik akışkanlar yardımıyla nanopartiküller hazırlanmaktadır. Süper kritik akışkan ise basınçtan bağımsız olarak kritik sıcaklığın üstünde bir sıcaklıktaki çözücü olarak tanımlanmaktadır. Biyoparçalanabilen mikro ve nanopartikülleri hazırlamak için alternatif olarak geliştirilmiştir. Süper kritik akışkanlar çevre açısından da güvenlidir.

“Nanopresipitasyon”, polimerik nanopartiküllerin elde edilmesi için kolay, basit ve düşük enerji gerektiren bir işlemdir.

Yukarıda bahsi geçen teknikler, önceden hazırlanmış polimerler kullanılarak nanopartikül hazırlamayı gerektirirken herhangi bir polimerizasyon işlemini içermez. Diğer yandan nanopartiküller, çeşitli polimerizasyon (emülsiyon, mikroemülsiyon, miniemülsiyon, yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon ve arayüzey polimerizasyonu gibi) yöntemleri kullanılarak da monomerlerin polimerizasyonu ile doğrudan da hazırlanabilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Polimerik nanopartiküllerin (PNP) hazırlanması için kullanılan çeşitli yöntemler⁷

2.4.1. Nanopresipitasyon (Çözücü Yer Değiştirme veya Ara Yüzeyde Çöktürme)

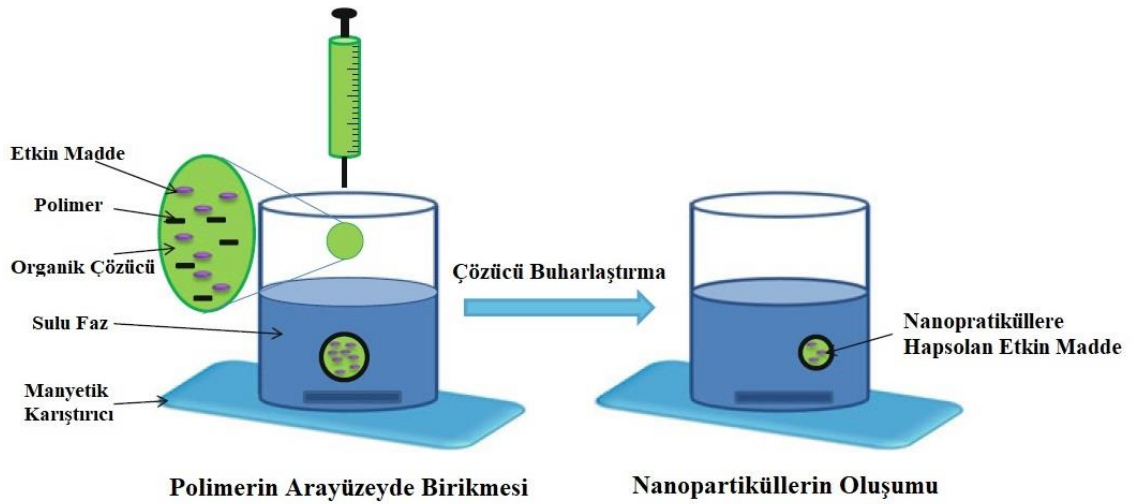
Nanopresipitasyon, çözücü yer değiştirme veya arayüzeyde çöktürme yöntemi olarak da adlandırılır.^{16, 54}

Biyoparçalanabilen mikro ve nanopartiküllerin hazırlanması için mevcut yöntemler lipofilik ilaçlara uygulanabilir. Bu yöntem Fessi ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Lipofilik ilaçların matriks (nanoküre) veya veziküler (nanokapsül) şeklinde kolloidal taşıyıcılarını oluşturmak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem organik bir çözelti içindeki polimerin nanopresipitasyonudur. Organik çözücünün sulu ortam içinde bir yüzey aktif madde varlığında difüzyonu gerçekleşir. Bu yöntem, organik çözücünün sulu fazla karışabilmesine bağlı olarak lipofilik ilaçlara da uygulanabilmektedir.^{54, 55}

Çok sayıda polimer üretilmiş olmasına rağmen ilaç taşıyıcı sistemlerde, araştırma ve endüstriyel uygulamalarda başlıca biyoparçalanır poliesterlerden PLA, PLGA ve PCL

nanopresipitasyon yönteminde kullanılmaktadır. Salım kinetikleri, ilacın karakterine ve işlem parametrelerine bağlıdır. Bu şekilde, Klonazepam, Paklitaksel, Siklosporin A, indometazin, Valproik asit, Ketoprofen, Dijitoksin, Siklosporin, Risperidon, Tamoksifen gibi hidrofobik ilaçlar, insülin, Vankomisin, Fenobarbital, peptitler veya proteinler gibi hidrofilik maddeler poliestер matriksi için uygundur.⁵⁶

Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan nanopresipitasyon yönteminde seçilen polimer, etkin madde ve lipofilik bir stabilizan (örneğin, fosfolipidler) su ile karışabilen aseton ve alkol gibi bir organik çözücü içinde çözündürülür. Bu karışım, ikinci bir stabilizan (örneğin PVA veya poloksamer) içeren sulu faza karıştırma aşamasında ilave edilir ya da enjekte edilir, bu esnada organik çözücünün hızlı difüzyonu nedeniyle nanopartiküller anında oluşur. Organik çözücü daha sonra buharlaştırma yoluyla uzaklaştırılır (Şekil 2.6).^{10, 57, 58}



Şekil 2.6. Nanopresipitasyon yönteminin şematik gösterimi⁵⁴

Nanopresipitasyon, dar bir partikül boyutu dağılımı gösteren basit ve tekrarlanabilir bir tekniktir. Birbiri ile karışabilen iki faz gerektirir: biri organik diğeri ise sulu fazdır. Partikül oluşum süreci üç aşamada gerçekleşir: çekirdek oluşumu,

tabakalanma ve agregasyon. Süperdoygunculuk, tüm bu olguların itici gücü olarak tanımlanır. Aşırı doygunculuk, organik çözücüdeki polimer konsantrasyonunun polimerin çözünürlüğüne oranı ile tanımlanır. Aşırı doygunculuk çok önemlidir, çünkü çekirdek oluşumu oranını belirler. Burada akış dinamikleri ve fazların karıştırılması önemli rol oynar. Bunlar, aşırı doygunluğu etkiler dolayısıyla partikül oluşum sürecinin hızını ve çekirdek oluşum oranını da belirlerler. Sonuç olarak, daha yavaş karıştırma işlemi birkaç büyük nanopartikül ile sonuçlanırken, uygun hızda karıştırma sağlandığında yüksek çekirdek oluşum oranı ile daha küçük nanopartiküller elde edilir. Bununla birlikte fazlar arasındaki yüzey gerilimi farklılığı sonucunda da nanopartiküller meydana gelir. Bu bulgu Gibbs – Marangoni etkisi denilen, iki sıvı arasındaki kütle aktarımı üzerine yapılan araştırmaya dayanmaktadır. Aslında, yüksek yüzey gerilimine sahip sulu faz, onu çevreleyen düşük yüzey gerilimine sahip organik faza doğru çekilir. Su ve organik fazının yüzey gerilimleri arasındaki fark, ara yüzeyinde türbülansa ve sistemdeki termal farklılıklara neden olur. Bu, her iki sıvının arayüzünde sürekli çözücü girdaplarının oluşumuna ve organik fazın düşük yüzey gerilimine sahip bölgelerden diffüze olmasına yol açar. Bu durumun bir sonucu olarak da polimer kademeli olarak çökmeye başlar ve nanopartiküller oluşur.⁵⁴

Nanopresipitasyonda kolloidal düzeye ulaşıldığında agregasyon durur. Sonuçta elde edilen nanopartikül boyutu, polimer konsantrasyonu ve çözeltinin viskozitesi ile yakından ilişkilidir. Sistemde viskozite düşük olmalıdır. Yüksek viskozite nanopartikül oluşum oranını azaltır. Burada polimer, Ostwald-ripping yoluyla nanopartiküllerin büyümesini önler, aksi halde stabilize edici maddelerin ilave edilmesi gerekir. Nanopresipitasyon sırasında toplam polimer miktarı homojen olarak dağıldığı için, partiküller küresel şekil alırlar.⁵⁶

Bu yöntemde dikkate alınması gereken önemli parametreler: polimer/yüzey aktif madde oranı, polimer konsantrasyonu, yüzey aktif maddenin yapısı ve konsantrasyonu, çözücünün yapısı, viskozite, etkin maddenin yapısı ve organik fazın miktarı ve enjeksiyon hızıdır.⁵⁸

Nanopresipitasyon tekniği esas olarak hidrofobik molekülleri hapsetmek için kullanılır. Ancak, hidrofilik moleküller ile de yapılan çalışmalar mevcuttur.⁵⁴ Genel bir kural olarak, hidrofobik etkin maddelerin tutulması, hidrofiliklere oranla daha küçük nanoküre oluşumuna sebep olur. İlaç yükleme ve enkapsülasyon etkinliğini artırmak için çözücü, polimer ve etkin madde arasındaki etkileşim dikkate alınmalıdır.⁵⁸

Organik faz, etanol veya aseton gibi suyla karışabilen organik çözücülerden oluşur. Organik faz ayrıca polimeri ve hidrofobik ilacı da içerir. Trigliseritler, mineral veya bitkisel yağlar veya hidrofobik yüzey aktif maddeler gibi başka bileşenler de gerektiğinde çözücüye ilave edilebilir. Mineral veya bitkisel yağlar, nanokürelerden ziyade nanokapsül elde edilmesine olanak tanır. Yüzey aktif maddelerin, partiküllerin agregasyonunu önlediği bilinmektedir.⁵⁴

Sulu faz genellikle distile sudur, ancak partiküllerin agregasyonunu önlemek için hidrofilik yüzey aktif maddeler gibi yardımcı maddeler ilave edilebilir. Bu yüzey aktif maddeler doğal veya sentetik olabilir. Bazı polimerler, kaplama materyali olarak sulu faza ilave edilebilir. Hidrofilik ilaçlar sulu fazda çözündürülür.⁵⁴

Nanopresipitasyon ile nanopartikülleri hazırlamak için çok sayıda polimer kullanılmaktadır. *In vivo* uygulamalar için, polimerlerin biyoparçalanabilir ve biyouyumlu olması gerekir. En çok kullanılan poliesterler arasında PLGA, PCL, PLA ve Eudragit® yer almaktadır. Kaplama materyalleri ayrıca, mukoadesyon, retiküloendotelyal sistemden koruma veya hidrofilik özelliği ayarlamak gibi yeni yüzey özellikleri kazandırmak için başlangıç polimeriyle birlikte kullanılabilir.⁵⁴

Nanopresipitasyon diğer yöntemlere kıyasla aşağıdaki avantaj ve dezavantajlara sahiptir:

- Hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonu için kullanışlı basit bir yöntemdir.¹¹
- Çok toksik olmayan çözücüler (örneğin aseton) kullanılır.^{56, 58}
- Sadece düzenli olarak karıştırma işlemi gerektirir. Yüksek enerji (yani sonikasyon veya mikrofluidizasyon) gerektirmez.^{56, 58}
- Çeşitli katkı maddeleri nanopartikül boyutunun küçültülmesi için kullanılabilir.⁵⁸
- Nanopresipitasyon, fazla ekipman gerektirmeyen, düşük enerji maliyetleri ile yürütülen hassas bir işlem olarak kabul edilebilir. Emülsifikasyon difüzyon tekniğinin aksine, nanopartikül oluşumu için yüzey özellikleri etkileyebilecek bir yüzey aktif madde gerekli değildir.⁵⁶
- Hazır polimerler ile emülsiyon polimerizasyon teknikleri kullanılarak polimerik sistemlerin aksine herhangi bir monomer kalıntısı olmadan nanopartikül oluşumunu garanti eder.⁵⁶
- Diklorometan veya hekzan gibi yüksek uçuculuğa sahip organik çözücülerin kullanılmasını gerektiren emülsifikasyon difüzyon tekniğinin aksine uçucu olmayan organik solvanlar da kullanılabilir.⁵⁶
- Temel dezavantajı, çözücünün difüzyonu sırasında ilaç kaybını en aza indirmek için ilaçların aseton, etil asetat gibi çözücülerde çok çözünür, daha polar suda ise az çözünmesi koşuludur.⁵⁸
- Organik çözücü buharlaştırma ile uzaklaştırılır (zaman alıcı bir işlem).⁵⁸
- İlaç yükleme kapasitesi, hidrofobik ilaçlar ile karşılaştırıldığında hidrofilik ilaçlar için daha düşüktür.^{56, 58}
- Nanopartiküllerin boyutu, polimer konsantrasyonundan çok fazla etkilenir. Yüksek polimer konsantrasyonlarında büyük nanopartiküller elde edilir.⁵⁸

Bu basit yöntemin kısıtlayıcı parametreleri ise sadece suyla kısmen karışabilen çözücüler kullanılmasıdır.^{10, 57}

2.5. Nanopartiküler Sistemlerin Fiziksel Özellikleri

Nanopartiküller, Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope, TEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscope, AFM) gibi gelişmiş optik teknikler kullanılarak genellikle boyutlarına, morfolojilerine ve yüzey yüklerine göre karakterize edilirler. Ortalama partikül çapı ile partikül boyutu dağılımı ve yükü, nanopartiküllerin fiziksel stabilitesini ve *in vivo* dağılımını etkiler. Elektron mikroskobu teknikleri, polimerik nanopartiküllerin genel şeklinin belirlenmesinde çok kullanışlıdır ve bu yönüyle toksisitelerinin belirlenebilmesine de olanak tanır. Nanopartiküllerin yüzey yükü, fiziksel stabilitelerini, yeniden dağılılabirliklerini ve *in vivo* performanslarını da etkiler.^{15, 59}

2.5.1. Partikül Boyutu

Nanopartiküllerin fiziksel özellikleri öncelikle partikül boyutu dağılımı ve morfolojisi ile değerlendirilir. Nanopartikül kullanılarak ilaçların salımı ve hedeflendirilmesi, çeşitli gereçler ve tekniklerle belirlenebilmektedir. Nanopartiküllerin partikül boyutu, ilaç salımı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Küçük partiküller geniş yüzey alanlarından dolayı hızlı bir ilaç salımı gerçekleştirirler. Ancak bu partiküller depolanma ve taşınma esnasında agregasyona eğilimlidirler. Bu sebeple boyut ve stabilite arasında bir ilişki mevcuttur. Partikül boyutu ölçümünde değişik teknikler kullanılmaktadır. Bunlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.^{15, 59}

2.5.1.1. Foton Korelasyon Spektroskopisi (PCS) veya Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Mikron altı ve nano boyutlardaki kolloidal süspansiyonlarda partikül boyutunu

belirleme konusunda en hızlı ve en popüler yöntemler PCS veya DLS'dir. Bu teknikler partiküllerin Brown hareketleri esas alınarak geliştirilmiştir. Monokromatik bir lazer ışını küresel partiküller üzerine gönderildiğinde yansıyan ışığın dalga boyunda bir kayma meydana gelir. Partikülün hareketinden kaynaklanan dalga boyundaki bu değişim otokorelasyona tabi tutularak partikülün boyutu belirlenir. DLS, partikül boyutu ve dağılımının doğru tahmin edilmesinde en sık kullanılan yöntemdir.^{15, 59}

2.5.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM ile nanopartiküllerin doğrudan boyut, şekil ve yüzey morfolojisi belirlenebilir. Ancak, partikül boyutu dağılımı ve ortalaması hakkında sınırlı bilgi sunar. Numuneye odaklanmış bir elektron ışını gönderilir ve taranarak analize tabi tutulur. Numuneden yayılan ikincil elektronlar, numunenin yüzey özelliklerini belirler. Bu elektron ışın demeti, genellikle nanopartikül polimerine zarar verebilir. Bu teknikle ölçüm yapıldığında polimer, oluşturulan vakum ortamına dayanıklı olmalıdır. SEM ile elde edilen partikül boyutu verilerinin DLS yöntemi kullanılarak elde edilen boyut verileri ile karşılaştırılması mümkündür.^{15, 59}

2.5.1.3. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

TEM ile numunenin eş zamanlı olarak, görüntülenmesi, difraksiyonu ve spektroskopik bilgileri alınabilir. TEM, SEM'den farklı prensipte çalışır, ancak genellikle aynı türde veriler sunar. TEM tekniğinde, elektron geçirgenliği açısından hazırlanan numunenin oldukça ince bir film halinde olması gerekmektedir. Bu nedenle karmaşık ve zaman alıcıdır.^{15, 59} Biyolojik numunelerin incelenebilir olması önemli avantajdır.⁵⁹

2.5.1.4. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Bu teknik, numuneyi tarayan bir prob kullanılarak yüzeylerin çok yüksek çözünürlüklü görüntülenmesini sağlar. AFM tekniği, örneklerin fiziksel olarak taranmasına dayanır ve partikül boyutu ölçümünde çok fazla çözünürlük sunar. Temaslı

veya temassız modda tarama gerçekleştirilebilir. Temaslı modda probun numune boyunca yüzeye vurulması ve temassız modda ise iletken yüzey üzerinde hareket ettirilmesi esastır. AFM'nin en önemli avantajlarından biri iletken olmayan numunelerin görüntülenmesidir. Bu özellik hassas biyolojik ve polimerik nano ve mikro yapıların ek bir işleve gerek duyulmadan görüntülenmesini sağlar.^{15, 59}

2.5.2. Yüzey Yükü

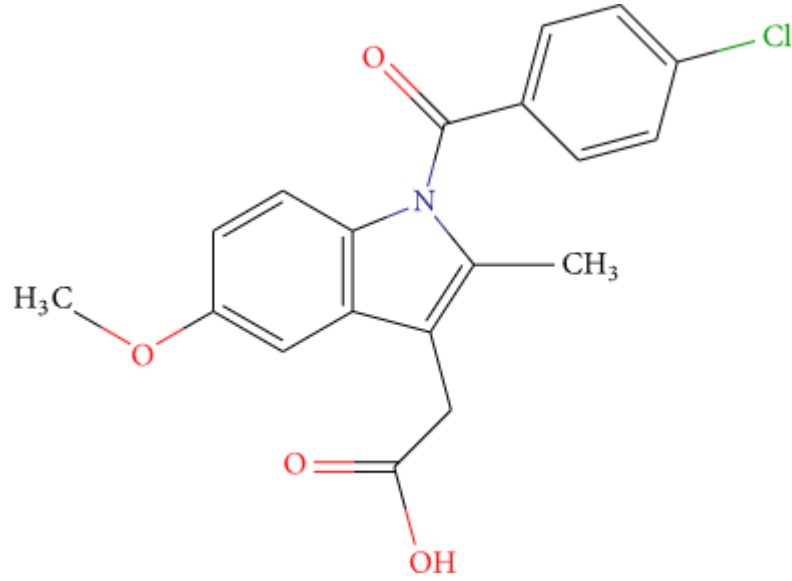
Yüzey yükü ve yoğunluğu, nanopartiküllerin biyolojik ortamla ve biyoaktif bileşiklerle elektrostatik olarak etkileşimlerini belirler. Kolloidal materyalin stabilitesi genellikle nanopartiküllerin zeta potansiyeli ile değerlendirilir. Zeta potansiyel, yüzey yükünün dolaylı bir ölçüsüdür. Helmholtz tabakası ve kayma yüzeyi arasındaki potansiyel farkı değerlendirilerek elde edilir. Dolayısıyla kolloidal dispersiyonların zeta potansiyeli, depolama esnasında stabilitelerini değerlendirmek açısından yardımcı olur. Stabilitayı sağlamak ve partiküllerin agregasyonunu önlemek için yüksek zeta potansiyel değerleri (pozitif veya negatif) ölçülmelidir.^{15, 59}

2.5.3. İlaç Salımı

İlacın salım oranını belirlemek çok önemlidir. Nanopartiküllerin ilaç yükleme kapasitesi, herbir polimer kütesine bağlı ilacın miktarı olarak tanımlanır ve polimere göre yüzde olarak verilebilir. Bu parametreyi belirlemek için ultra-santrifüj, ultra-filtrasyon, jel filtrasyonu, UV spektroskopisi veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi çeşitli teknikler kullanılmaktadır.^{15, 59}

2.6. İndometazin

İndometazin, indol asetik asit yapısına sahip, son derece aktif, analjezik, antipiretik ve antiinflamatuvar etkili bir ilaçtır.⁶⁰ Molekül ağırlığı 357.8 g/mol, pKa'sı 4.5 olan indometazin, suda hemen hemen hiç çözünmez.⁶¹ Bu yüzden zayıf çözünürlüğe ve yüksek geçirgenliğe sahip Sınıf II ilaç olarak sınıflandırılır.⁶²



Şekil 2.7. İndometazinin moleküler yapısı⁶³

Oral uygulanmasını takiben GI sistemden tamamına yakın kısmı absorbe edilir ve yaklaşık 2 saat içinde plazmada maksimum pik konsantrasyonuna (C_{max}) erişir.⁶⁴ Vücuttaki dağılımı yüksek olan (% 99 oranında proteinlere bağlanır) indometazin, karaciğerde glukuronik asit konjugasyonu ile metabolize olup enterohepatik sıklusa girer. Vücutta antiinflamatuvar aktiviteye sahip olmayan O-desmetilindometazin, N-desklorobenzoilindometazin ve O-desmetil-N-desklorobenzoilindometazine metabolize edilir.⁶⁵ Eliminasyonunun ana yolağı idrar ile (% 60) olmakla birlikte feçesle de (% 40) atılım gerçekleşmektedir.^{65, 66} Plazmadaki yarılanma ömrü ise yaklaşık 2.5 saattir. Basit bir analjezik olmadığı gibi akut gut, bursit, tendinit ve travmatik sinovit gibi ciddi durumlarda ve ankilozan spondilit, osteoartrit, romatoid artirit gibi ağır romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.⁶⁷

İndometazin, ışığa hassas, nötr veya hafif asitli ortamlarda stabil, kuvvetli alkali ortamlarda ise stabil değildir.⁶⁸ Kalitatif tayin yöntemlerinden biri olan İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) kullanılarak teşhis edilebilmektedir.⁶⁹

Aspirinden yaklaşık 20 kat daha aktif bir ilaç olan indometazin, tolere edildiğinde aspirinden çok daha etkili olduğu belirtilmiştir.⁷⁰ İndometazin, hem siklooksijenaz-1 (COX-1) hem de siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini inhibe etmek suretiyle prostaglandinlerin (PG) sentezini durdurarak antiinflamatuvar etki gösterir.^{71, 72} İndometazin kaynaklı mide-bağırsak toksisitesinin, COX-1'in inhibisyonunun bir sonucu olduğuna, analjezik ve antiinflamatuvar etkilerinin ise COX-2 inhibisyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır.⁷²

PG'ler, araşidonik asit yolağının son ürünü olarak hücre membranından COX ve lipoksijenaz enzimleri aracılığıyla salınan mediatörlerdir. COX-2'nin daha çok hastalık durumlarında aktif olduğu, COX-1'in ise yaşamsal olaylarda rol aldığı bilinmektedir. Özellikle prostaglandin E₂ (PGE₂), COX-1 aracılığıyla sentezi yapılan ve vücutta en çok bulunan prostaglandinlerdendir. İmmün cevabın oluşturulması, kan basıncı ve GI mukozal bütünlüğün korunması dâhil pek çok yaşamsal faaliyetin düzenlenmesinde görevlidirler. PG sentezinin azalması (özellikle de PGE₂), gastrik mukozanın korunmasız kalmasına ve sonucunda da GI yolağın hasarına yol açmaktadır.⁷¹ Azalan PG neticesinde mide asidi mukozal membranlarda hasar oluşturmaya başlar; mukozal kanamalar (hemoraji), ülser oluşumları ve hatta mide mukozasının delinmesi ile sonuçlanan ciddi yan etkilere neden olmaktadır.⁷³ Özellikle indometazini terapötik dozlarda kullanan hastaların % 30 - 50'sinde bu ciddi yan etkilerin görüldüğü bildirilmiştir.⁷⁰

İndometazinin sudaki çözünürlüğünün az olması onun non-iyonize halde absorbe edilmesini sağlar. Kısa yarı ömürlü olması sebebiyle de terapötik etkiyi sağlayarak plazmada kararlı hal (steady state) elde edebilmek için sık ilaç alımı yapılması gerekmektedir. indometazin terapötik dozu yaklaşık 0.5-3.0 µg/mL'dir.⁶⁰ Sık ilaç almanın bir sonucu olarak pek çok yan etkinin yanı sıra (kardiyovasküler, renal vb.) özellikle GI sistem hasarları oluşmaktadır.⁷⁴ Özellikle kullanan hastaların belirli bir yüzdesinde ciddi

mide ülserasyonuna neden olur.⁷² Oldukça aktif bir antiinflamatuvar ilaç olan indometazinin kullanımı, özellikle GI sistemde oluşturduğu yan etkileri nedeniyle kısıtlıdır.

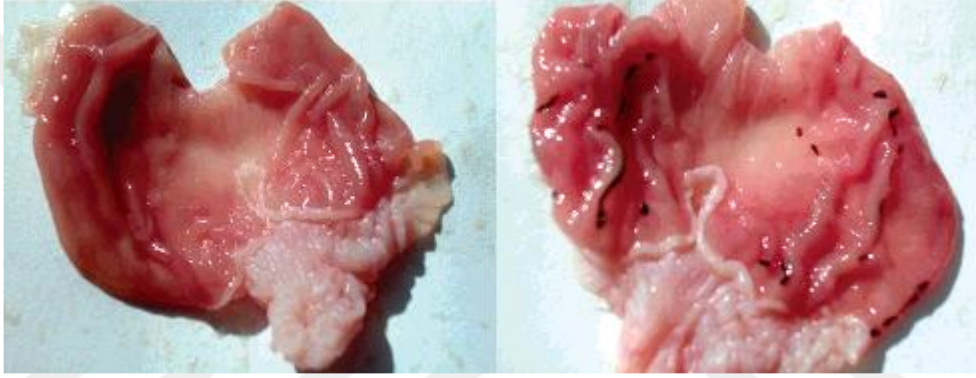
NSAİİ'ler osteoartrit, romatoid artrit, inflamasyon ve çeşitli ağrıların tedavisinde yaygın olarak kullanılır. En güçlü NSAİİ'lerden biri olan indometazin etkin olarak oral tedavide kullanılır. Ancak kullanımı genellikle GI mukozanın irritasyonu ve ülserasyonu ile sınırlıdır. Plazmadaki yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle sık sık alınması gerekir. Bu problemlerden dolayı, indometazin kullanımı için etkili bir farmasötik tasarımın geliştirilmesine yönelik çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. İndometazini uzun sürede serbestleştiren bir taşıyıcı sistemi geliştirilmesi ile geleneksel antiinflamatuvar bileşiklere kıyasla önemli ölçüde yan etki azalacaktır. İndometazinin mevcut geleneksel ticari formülasyonları kontrollü salım sağlamadığından, kronik ağrının tedavisi için indometazinin klinik kullanımı sınırlıdır.⁷⁵

İlginç bir şekilde literatürdeki çalışmalar çeşitli ilaçların, polimer bazlı nanopartiküler halde enkapsüle edilerek ve oral yoldan verildiklerinde, ilaçlarla ilişkili olan GI ve renal yan etkilerde bir azalma kaydettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, oral yoldan verilen toksik ilaçlarla ilişkili potansiyel yan etkilerin azaltılması ve/veya ortadan kaldırılmasında nanopartikül formülasyonlarının etkinliğini göstermektedir.⁶

2.7. Ülser

Ülser, çeşitli agresif faktörlerin (*Helicobacter pylori* (*H.pylori*), NSAİİ, gastrik asit) ve koruyucu faktörlerin (müsin, bikarbonat, prostaglandinler) arasındaki dengesizlik sonucu mide sıvısına maruz kalan mukozal membranlarda aşırı ağrı ve rahatsızlık hissi oluşturan mukozal aşınmalarla karakterize bir hastalıktır.⁷⁶ Abdominal rahatsızlık ile beliren şiddetli mide ağrıları, kanlı ya da siyah dışkı, kanlı kusmuk gibi semptomlar ile seyreder. Endojen (asetilkolin, gastrin, histamin, somatostatin, genetik faktörler) ve

eksojen (H.pylori, NSAİİ, alkol, sigara, beslenme alışkanlıkları) sebepler hastalığın kaynağını oluşturmaktadır. Mide ülseri hastalarının yaklaşık % 25'i hemoraji ve perforasyon gibi ciddi komplikasyonlar geçirmektedir. Mide ülserlerinde majör komplikasyonlar, NSAİİ kullanımı ile ilişkilendirilmektedir.⁷⁷ Son zamanlarda yapılan çalışmalar ile NSAİİ kullanan hastaların % 50'sinden fazlasında, üst GI yol ile ilgili bazı hasarların olduğu görülmüştür. Bu bağlamda, en yaygın NSAİİ kaynaklı yan etkiler arasında midede rahatsızlık, ülser ve kanama vardır.⁵⁰



Şekil 2.8. Sağlıklı ve indometazin kullanmış midelerin görüntüleri⁷²

NSAİİ'ler dünyada en sık reçeteye yazılan ilaçlar arasındadır. NSAİİ'ler, enzimlerin siklooksijenaz ailesinin inhibisyonu yoluyla analjezik ve antiinflamatuvar etkiler sergileyen farmasötik ajanlardır.^{6, 50} NSAİİ'ler ve gastroduodenal hasarlar arasındaki ilişki günümüzde iyice bilinmektedir. Önceden, sadece COX-1 inhibisyonunun, bağırsak mukozasında kan akışının azalmasına ve mukozal hasarın artmasına ve mukozal yaralanmalara neden olduğu düşünülmekteydi. Son zamanlarda yapılan bir hayvan modeli çalışmasında, ince bağırsak mukozal yaralanmalarının, hem COX-1 hem de COX-2'nin inhibe edilmesinden sonra meydana geldiği gösterilmiştir.⁵⁰ NSAİİ kullanan romatoid artrit (RA) ve osteoartrit (OA) hastaları yaklaşık % 15-20 oranında ülser insidansına sahiptir. Hastalarda hemoraji ve perforasyon gibi ülser hastalığının komplikasyonları, kontrol hasta gruplarına kıyasla çok daha sık ortaya

çıkılmaktadır. NSAİİ alan hastalarda ciddi GI yan etki oluşma riski, kontrol gruplarına kıyasla yaklaşık üç kat daha fazladır.⁷⁸

Türkiye İstatistik Kurumu'nun (TÜİK) 2014 yılında yayınlamış olduğu “İstatistiklerle Türkiye” kılavuzunda, Türkiye’de hekimlerin 2012 yılı itibariyle 15 yaş ve üzeri hastalarda teşhis ettiği ilk beş hastalık/sağlık sorunu içinde mide ülserlerinin dördüncü sırada yer aldığı belirtilmiştir. Mide ülserlerinin görülme sıklığı tüm hastalıklar içinde % 7.2 olarak tespit edilmiştir.⁷⁹ Yine Sağlık Bakanlığı’nın 2008 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, Türkiye’de ulusal düzeyde ölüme neden olan ilk 20 hastalık içinde tüm ölümlerin % 0.9’unun mide ülseri kaynaklı olduğu belirtilmiştir.⁸⁰ Dünyada her yıl yaklaşık 4 milyon insanın bu hastalıktan etkilendiği görülmektedir.⁸¹ Sadece Amerika Birleşik Devletleri’nde her yıl mide ülseri vakalarına ait sağlık harcamalarının (ilaç maliyetleri hariç) 5.65 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir.⁸² 33 milyondan daha fazla sayıda insanın günlük NSAİİ aldığı ve bu ilaçların dünya çapında en yaygın kullanılan ilaç grubu olduğu düşünüldüğünde, yan etkilerinin en önemlisi olan GI sistemde oluşturdıkları ülserler kaçınılmaz bir son olarak karşımıza çıkmaktadır.⁸³

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Absolü Etanol	(Sigma-Aldrich [®] , ABD)
Asetik Asit	(Sigma-Aldrich [®] , ABD)
Aseton	(Sigma-Aldrich [®] , ABD)
Asetonitril	(Sigma-Aldrich [®] , ABD)
Diklorometan	(Sigma-Aldrich [®] , ABD)
Dimetilsülfoksit	(Alfa Aesar [®] , Almanya)
Etil Asetat	(Merck [®] , Almanya)
FD&C Red No:3	(Dolder Ltd., İsviçre)
Hidroklorik Asit	(Isolab [®] , Almanya)
İndometazin	(Acros Organics, Belçika)
Kollicoat [®] MAE 100P	(Sigma-Aldrich [®] , ABD)
PLGA (50:50)	(Acros Organics, Belçika)
Potasyum Dihidrojen Fosfat	(Merck [®] , Almanya)
Potasyum Klorür	(Riedel-de Haën, Almanya)
PVA	(Merck [®] , Almanya)
Sodyum Hidroksit	(Merck [®] , Almanya)

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	(Arçelik, Türkiye)
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	(2mag, MIX 15 eco, Almanya)
Çözünme Hızı/Dissolüsyon Cihazı	(Pharma Test PTWS IIIIE/CE, Almanya)
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Cihazı	(Netzsch, STA 409 PC, Luxx [®] , Almanya)
Etüv	(Mettler GmbH & Co., Almanya)
FT-IR Spektroskopi Cihazı	(Bruker, VERTEX 70v, Almanya)
Homojenizatör	(IKA [®] , T-18 Digital Ultra-Turrax, Almanya)
Hassas Terazi	(Denver Instruments, TP 214, Almanya)
Kütle Spektroskopi Cihazı	(Agilent 6530 Accurate-Mass)
Liyofilizatör	(Martin Christ, Alpha 1-4 LD plus, Almanya)
Manyetik Karıştırıcı	(IKA [®] , RH Basic 2, Almanya)
Optik Mikroskop	(Carl Zeiss, Primo Star, Almanya)
pH Metre	(Inolab, WTW 1F10-220 Level 1, Almanya)
Rotavapor	(Heidolph, Laborata 4000, Almanya)
Soğutmalı Santrifüj	(Beckman Coulter [®] , Allegra X-30R, ABD)
Taramalı Elektron Mikroskobu	(Zeiss, Sigma 300, Almanya)
Ultra Saf Su Cihazı	(Barnstead [™] , Thermo Scientific [™] , ABD)
UV-VIS-NIR Spektrometre Cihazı	(Shimadzu, UV-3600 Plus, Japonya)
UV-VIS Spektrofotometre Cihazı	(Beckman Coulter [®] , DU 730, ABD)
Vorteks	(IKA [®] , MS 1 Shaker, Almanya)
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Cihazı	(Shimadzu, Prominence LC-20A, Japonya)
Zeta Potansiyel ve Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı	(Malvern, Zetasizer Nano ZSP, İngiltere)

3.3. Kullanılan Deney Hayvanları

Bu tez kapsamında, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (ATADEM) temin edilen 100 adet Wistar albino cinsi, 180-200 g ağırlığındaki dişi sıçanlar kullanılmıştır. Deney öncesi hayvanlar, gruplara ayrılmış, laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22-25 °C), 12 saat gündüz/12 saat gece döngüsü uygulanmış ve beslenmiştir. Çalışmanın tüm aşamaları etik kurallara uygun olarak yapılmıştır. Bu çalışma için 31 Mart 2017 tarihli ve 75296309-050.01.04-E.1700100755 sayılı yazısı ile “Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK)” ve 07 Haziran 2017 tarihli ve 93722986.12/33 sayılı yazısı ile de “Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanlığı Etik Alt Kurulu” onay vermiştir.

3.4. İndometazinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

3.4.1. İndometazinin Erime Derecesinin Tayini

İndometazinin erime derecesinin ölçümü, İngiliz Farmakopesi 2013'e göre yapılmıştır. Yaklaşık 10 mg indometazin⁸⁴ örneği tartılmış ve amber renkli cam şişe içinde (ışıktan ve nemden korunarak) DSC cihazı kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz, 30 mL/dakika azot gazı akış hızında ve 20-1000 °C sıcaklık aralığında 10 °C/dakika ısıtma hızı ile gerçekleştirilmiştir. Referans olarak da alüminyum disk kullanılmıştır.

3.4.2. İndometazinin Ultraviyole (UV) Spektroskopisi ile Analizi

Bu ölçüm, Amerikan Farmakopesi'ne (USP30-NF25) göre yapılmıştır. Tam olarak tartılmış 25 mg indometazin 1 mL 1M HCl ve 9 mL metanol içinde çözündürülmüştür. Bu çözelti 100 mL lik bir balon joje içerisine aktarılmış ve üzerine 9 mL 1M HCl ve 81 mL metanol ilave edilerek stok çözelti 25 mg/100 mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltiden 10 mL alınarak, 9 mL 1M HCl ve 81 mL metanol ilavesiyle seyreltilerek konsantrasyon 25 µg/mL'ye getirilmiştir. UV-VIS-NIR spektrofotometresi ile 190-400 nm arasında dalga boyu taramasına tabi tutulan bu çözeltinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu saptanmıştır.

3.4.3. İndometazinin Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spektroskopisi ile Analizi

İndometazinin karakteristik spektrumunu almak için 10 mg tartılmış (ışıktan ve nemden korunarak) ve FT-IR spektrofotometre cihazı kullanılarak 400 cm⁻¹ - 4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında analize tabi tutulmuştur.

3.4.4. İndometazinin Kütle Spektrumu

USP30-NF25'e göre yapılan bu ölçüm için 10 mg indometazinin 100 mL metanol içinde 100 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi-triple quadrapol kütle spektrofotometresi ile indometazinin kütle spektrumu alınmıştır.

3.4.5. İndometazinin Farklı Ortamlarda Çözünürlüğünün Tayini

Distile su, pH 1.2, pH 6.8 ve pH 7.2 tampon çözeltisinde indometazinin çözünürlüğü tayin edilmiştir. Bu amaçla 5 mL ortama 50 mg indometazin ilave edilmiş ve yatay çalkalayıcılı su banyosunda 25 ± 2 °C'de, 100 rpm hızda 48 saat süreyle deney sürdürülmüştür. Deney sonunda 0.45 µm membran filtreden süzülen örneklerde HPLC yöntemi ile indometazinin miktarı tayin edilmiştir. Bu çalışma her çözünme ortamı için 3 kez tekrar edilmiştir.

3.5. İndometazinin HPLC ile Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi

USP30-NF25'te yer alan safsızlık analizi tayini yöntemi⁸⁵ ve Keishiro Tomoda ve ark.⁸⁶'nın geliştirdiği yöntem kullanılarak indometazinin miktar tayini yöntemi belirlenmiştir. İndometazinin 0.1 M asetik asit:asetonitril (9:11, h:h) karışımında 1 mg/mL konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiden hareketle 10, 50, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlardaki seyreltik çözeltileri 200-800 nm dalga boyu aralığında HPLC'de ölçülmüştür. Maksimum absorbansın alındığı dalga boyu seçilmiştir. Alınan kromatogramların pik alanına göre verileri değerlendirilmiştir.

Tablo 3.1. İndometazinin miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemine ait parametreler

Kolon	Develosil® ODS-HG-5, 150 x 4.6 mm
Dedektör ve Dalga Boyu	PDA, 254 nm
Akış Miktarı ve Süresi	1.5 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Hareketli Faz	İzokratik, 0,1 M asetik asit/asetonitril (9/11, h:h)

3.6. İndometazine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi

İndometazinin 0.1 M asetik asit:asetonitril (9:11, h:h) karışımında 1 mg/mL stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden hareketle 6 farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmış ve 254 nm’de kromatogramları alınmıştır. Regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon eğrisi ve yapılan tüm analizlerde kullanılmak üzere doğru denklemi elde edilmiştir. Bu çalışma her nokta için 6 kez tekrar edilmiştir.

3.7. Miktar Tayin Yönteminin Validasyonu

İndometazinin miktar tayin yöntemin validasyonunda yöntemin doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik (özgünlük), duyarlılığı ve stabilitesi tayin edilmiştir.⁸⁷

Duyarlılık (Sensitivity)

Miktar tayini yönteminin duyarlılığını kanıtlamak üzere indometazinin belirli bir doğruluk ve kesinlikle tayin edilebildiği en düşük konsantrasyonu (Limit of Quantification, LOQ) ve analitik yöntemin saptayabildiği en düşük konsantrasyonu (Limit of Detection, LOD) tespit edilmiştir.

Miktar Tayini Limiti (Limit of Quantification, LOQ)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddeyi belirli bir kesinlik ve doğruluk ile nicel olarak tayin edebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal/gürültü oranının 10/1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir.⁸⁸ Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken deneysel veriler üzerinden miktar tayin sınırı belirlenmiştir.

Teşhis Alt Limiti (Lower Limit of Detection, LOD)

Analizi yapılan maddenin nicel olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal/gürültü oranının 3/1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir.⁸⁸ Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken deneysel veriler üzerinden saptama sınırı belirlenmiştir.

Doğrusallık (Linearity)

Geliştirilen analitik yöntemin önceden belirlenmiş bir konsantrasyon aralığında, saptanan etkin maddenin her bir konsantrasyonuna karşılık alınan matematiksel cevapların doğru orantılı olmasını sağlama yeteneğidir.^{87, 88} Bu amaçla indometazinin 0.1 M asetik asit/asetonitril (9/11, h:h) karışımı içindeki stok çözeltisi (1 mg/mL) hazırlanmış ve bu çözeltiden hareketle 0.3, 3, 25, 50, 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin kromatogramları 254 nm dalga boyunda HPLC’de çizilmiştir. Etkin madde konsantrasyonuna karşı elde edilen analitiksel cevapların doğrusallığı karşılaştırılmıştır. Eğim (m) ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplanmıştır.

Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen sonuçların olması gereken gerçek değerlere yakınlığının ölçütüdür.⁸⁷ Gün içi (intra-assay) doğruluğun saptanabilmesi amacıyla kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyon 0.5, 75 ve 225 µg/mL (düşük, orta, yüksek) seçilmiştir. Her bir konsantrasyon için altı adet standart çözelti hazırlanmış ve aynı gün içinde art arda ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler ile ilgili günler arası (inter-assay) doğruluğun tespit edilebilmesi için yine kalibrasyon eğrisinde yer alan bu üç farklı konsantrasyon 0.5, 75 ve 225 µg/mL (düşük, orta, yüksek) kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon için altı adet standart çözelti hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün süreyle tayinler yapılmıştır. Doğruluk, % Bağlı Hata (% BH) ile ifade edilmektedir. Sonuçlar aritmetik ortalama ($\bar{X}$) ve standart sapma (SS) olarak verilmiştir.

Keskinlik (Precision)

Bir yöntemin önceden belirlenmiş koşullarda birbirini takip eden ölçümleri arasındaki benzerliğin derecesi olup, tekrarlanabilirlik (repeatability) ve tekrar elde

edilebilirlik (reproducibility) bakımından saptanmasıdır. Kesinlik, bağıl standart sapma (BSS), standart hata veya % Varyasyon Katsayısı (% VK) ile ifade edilmektedir.⁸⁷

Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Kısa bir süre içinde aynı işlem koşullarındaki kesinliği ifade eder ve gün/deney içi kesinlik olarak da ifade edilir.⁸⁸ Geliştirilen analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır. Bu amaçla kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyon 0.5, 75 ve 225 µg/mL (düşük, orta, yüksek) seçilmiştir. Her bir konsantrasyon için altı adet standart çözelti hazırlanmış ve aynı gün içinde art arda ölçümleri gerçekleştirilmiştir. % BSS hesaplanarak sonuçlar $\bar{X}$ ve SS şeklinde verilmiştir. Ayrıca % VK'da hesaplanmıştır.

Tekrar Elde Edilebilirlik (Reproducibility)

Deneyler arası kesinliğin bir ölçüsüdür.⁸⁸ Aynı konsantrasyondaki çözülden hareketle, aynı kişi ile aynı laboratuvar ve aynı cihazın kullanımı sonucundaki elde edilen deney sonuçlarının uyum ve uygunluğu incelenmiştir. Deneyler/Günler arası (inter-assay) tekrar elde edilebilirliğin tespit edilebilmesi için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyon 0.5, 75 ve 225 µg/mL (düşük, orta, yüksek) seçilmiştir. Her bir konsantrasyon için altı adet standart çözelti hazırlanmış ve aynı gün içinde art arda ölçümleri gerçekleştirilmiştir. % BSS hesaplanarak sonuçlar $\bar{X}$ ve SS şeklinde verilmiştir. Ayrıca % VK'da hesaplanmıştır.

% VK hesaplanırken kalibrasyon eğrisindeki her bir konsantrasyona ait eğimler, bu eğimlerin standart sapmaları ve aritmetik ortalamaları hesaplanmıştır. % VK hesapları için aşağıdaki Şekil 3.1'de verilen eşitlik kullanılmıştır.

$$\% \text{ Varyasyon Katsayısı} = (\text{Eğimlerin SS} / \text{Eğimlerin } \bar{X}) \times 100$$

Şekil 3.1. Varyasyon katsayısı hesaplamasında kullanılan eşitlik

Özgünlük/Seçicilik (Specificity/Selectivity)

Geliştirilen analitik yöntemin özgünlüğü; etkin madde dışında ortamda bulunan tüm yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında dahi analiz edebilme yeteneğidir.⁸⁷ Bu parametrenin değerlendirilmesinde; indometazin dışında nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan tüm yardımcı maddeler (PLGA, PVA, Kollicoat® MAE 100P gibi) aynı formülasyon ve analiz ortamında HPLC sistemine enjekte edilmiş ve herhangi bir pik verip vermediği; indometazin piki ile girişim yapıp yapmadığı incelenmiştir.

Stabilite (Stability)

Tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek, indometazinin analiz boyunca stabilitesini göstermek üzere üç farklı konsantrasyonda 1.5, 70 ve 215 µg/mL (düşük, orta, yüksek) mobil faz içinde hazırlanmış olan çözeltileri 24. saatte oda sıcaklığı ve + 37 °C’de (ilerisinde yapılacak olan dissolüsyon çalışmaları açısından), 15.günde (oda sıcaklığında) ve 30.günde (oda sıcaklığında) ölçülmüştür. Sonuçlar olması gerekenler ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak belirlenmiştir.

3.8. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

İndometazin içeren nanopartikülleri ve indometazin nanosüspansiyonlarını hazırlayabilmek için parametreler optimize edilmiştir. Bu amaçla etkin madde kullanılmaksızın ve etkin madde varlığında kullanılması gereken parametreler denenerek tek tek belirlenmiştir. Cihaz, ekipman ve yardımcı maddelerin yanı sıra hazırlama yönteminin de optimum hale getirilmesi amaçlanarak formülasyon geliştirme çalışmaları yapılmıştır.

Bu amaçla aşağıdaki parametreler deney protokolü çerçevesinde değerlendirilmiştir:

- a) PLGA miktarı ve organik faz:sulu faz oranının belirlenmesi
- b) Etkin madde miktarının belirlenmesi
- c) Organik çözücünün seçimi
- d) Kullanılan stabilizan (PVA) miktarının belirlenmesi
- e) Organik fazın damlatılma süresinin belirlenmesi
- f) Homojenizasyon sağlayıcı cihazın ve hızının belirlenmesi
- g) Organik çözücünün uzaklaştırılması için rotovapor şartlarının belirlenmesi
- h) Nanopartikülleri biriktirmek için santrifüj süresi ve hızının belirlenmesi
- i) Enterik kaplama materyali miktarının belirlenmesi.

İndometazin içeren nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılması öngörülen nanopresipitasyon yöntemi; suda çözünürlüğü olmayan etkin maddeler için oldukça kullanışlı, basit, tekrarlanabilir, yüksek verimli ve kolay bir yöntemdir. Bu yöntem ile nano metre boyutunda partiküller elde edilebilmektedir.

Formülasyonlar geliştirilirken yukarıdaki parametrelerin tümü göz önüne alınarak çok sayıda formülasyon geliştirme çalışması yapılmıştır. Elde edilen formülasyonların seçiminde ilk olarak optik mikroskop ile inceleme yapılmıştır. Nano metre boyutuna sahip olan formülasyonlar elde edildikten sonra bir sonraki aşamaya geçilmiştir. Bu aşamada formülasyonların yükleme kapasitesi, hazırlama verimi ve partiküllerin elektriksel yükü değerlendirilmiştir. Son olarak formülasyonların içerdiği İndometazin bakımından miktar tayinleri ve stabiliteleri de değerlendirilerek en uygun formülasyonlar seçilmiştir. Bu çalışmada etkin madde, polimer ve kullanılan stabilizan miktarının belirlenmesi, organik faz:sulu faz oranının belirlenmesi işlemleri ile paralel yürütülmüştür.

3.8.1. Formülasyon Bileşenlerinin Seçimi

- Organik Çözücünün Seçimi

Minimum miktarda hem polimeri hem de etkin maddeyi tamamen çözüdüren, su ile kısmen ya da tamamen karışabilen, nanopresipitasyon yöntemine uygun çözücüler ile çalışılmıştır.⁸⁹ Bu amaçla aseton, asetonitril, etanol, etil asetat gibi çözücüler ve bunların belirli oranlarda karışımları yüksek miktardan başlanarak (15, 10, 5 ve 2,5 mL) denenmiştir.

- Kullanılan Stabilizan (PVA) Miktarının Belirlenmesi

Stabilizan olarak nanopresipitasyon yönteminde sıkça kullanılan PVA seçilmiştir. PVA'nın formülasyonlarda % 3, % 2, % 1, % 0.9, % 0.7, % 0.5, % 0.3, % 0.1 (a/h)⁹⁰⁻⁹² oranlarında kullanılmasına karar verilmiştir.

- PLGA Miktarı ve Organik/Sulu Faz Oranının Belirlenmesi

Konuyla ilgili yapılan literatür incelemelerinde, organik faz:sulu faz oranları ile polimer miktarları incelenmiş ve daha sonra yüksek miktar polimerden (100, 75, 50, 25 mg gibi) başlanarak 1:1, 1:2, 1:4, 1:5 ve 1:10 organik faz:sulu faz oranları denenerek çalışmalar yapılmıştır.^{89, 92}

- Etkin Madde Miktarının Belirlenmesi

Polimer miktarı (25 mg) ve organik faz:sulu faz oranları (1:1) belirlendikten sonra literatür taramaları ışığında ve indometazinin geleneksel preparatlardaki dozları da dikkate alınarak yüksek miktarlardan başlanıp (50, 25, 10, 5 ve 2.5 mg) etkin madde miktarı seçimi üzerinde çalışmalar devam ettirilmiştir. Bu çalışmalar içinde literatürlerde nanopresipitasyon yöntemlerinde denenmiş olan etkin madde:polimer oranları da dikkate alınmıştır.^{93, 94} Ayrıca nanosüspansiyon formülasyonları geliştirilirken indometazin miktarı literatür taramaları ışığında ve piyasada mevcut preparatlar dikkate alınarak

yüksek miktarlardan (50, 25, 10, 5 ve 2.5 mg) başlanarak nanopresipitasyon yöntemiyle denemeler yapılmıştır.

- Organik Fazın Damlatılma Süresinin Belirlenmesi

Formülasyon bileşenlerinin belirlenmesi aşamasında arttırılan veya eksiltile organik faz:sulu faz miktarları için farklı damlatma süreleri denenmiştir. Bu aşamada kullanılan organik faz miktarı, damlatma süresinin belirlenmesinde etkili olmuştur.^{89, 95}

- Karıştırıcının Tipi ve Hızının Belirlenmesi

Hazırlama esnasında literatürdeki kayıtlı bilgiler ışığında, formülasyonlardaki nano yapıları homojenize etmek için çeşitli mekanik karıştırıcılara ihtiyaç vardır.^{89, 90} Bu amaçla ultraturrax ve diğer mekanik karıştırıcılar denenmiştir. Ultraturrax için 3000, 5000, 10000 ve 15000 rpm hızlarda denemeler yapılmıştır. Ancak istenilen verimde, büyüklük ve karalılıkta nanopartiküler sistemler elde edilememiştir. Bunun üzerine çok noktalı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. 500 ve 1000 rpm hızlarında çalışmalar denenmiştir.

- Organik Çözücünün Uzaklaştırılması için Rotovapor Şartlarının Belirlenmesi

İndometazinin stabilitesini göz önünde bulundurarak, organik çözücüyü en kısa sürede uzaklaştırmak ve kullanılan polimerin camsı geçiş sıcaklığını aşmamak amacıyla literatürlerde yapılan çalışmalar taranmış, çeşitli süre, hız ve sıcaklıklarda rotovaporda çalışılmıştır.^{89, 95-97}

- Nano Yapıları Biriktirmek için Santrifüj Süresi ve Hızının Belirlenmesi

Nano yapıları çöktürerek elde etmek için değişik hız ve sürelerde santrifüj aşaması denenmiştir.⁹⁰ Öncelikle PLGA ile elde edilen nanopartiküllerdeki yüklenmemiş etkin maddeyi ve büyük kalıntıları bertaraf etmek için ön santrifüj çalışmaları yapılmıştır. Sonrasında elde edilen üst kısımdaki homojen ve partikül boyutu dağılımı birbirine çok yakın (yaklaşık 200-300 nm civarında) nanopartikülleri çöktürmek, ortamdaki fazla

PVA'dan uzaklaştırmak için çeşitli rpm ve sürelerde santrifüj işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Nanosüspansiyon formülasyonları geliştirilirken organik çözücünün sulu faza damlatılıp karıştırılması sonucunda homojenizasyonun tam sağlanabilmesi için sonikasyon uygulanmıştır.^{98, 99}

Nanosüspansiyon formülasyonları geliştirilirken değişik hız ve sürelerde santrifüj aşaması tekrar denenmiştir. Elde edilen nanosüspansiyonlardaki homojen ve partikül boyutu dağılımı birbirine çok yakın (yaklaşık 450-500 nm civarında) indometazin nanosüspansiyonlarını çöktürmek, fazla PVA'dan uzaklaştırmak için çeşitli hız ve sürelerde santrifüj işlemleri denenmiştir.

- Enterik Kaplama Materyali Miktarının Belirlenmesi

Seçilen yönteme uygunluğu açısından hazırlanan nanopartiküler sistemleri kaplamak için enterik kaplama materyali olarak Kollicoat® MAE 100P polimeri seçilmiştir.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ Bu amaçla Kollicoat® MAE 100P'nin etanol içinde hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki (10, 20, 30 mg/mL) çözeltileri kullanılmıştır. Burada indometazin ve PLGA miktarı (5 + 25 mg) dikkate alınarak daha konsantre kaplama çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon haldeki nanopartiküler sistemler manyetik karıştırıcıda karışmakta olan bu çözeltiler içine damlatılarak denemeler yapılmıştır. Ayrıca üst üste 2 ve 3 defa kaplama çalışmaları da denenmiştir.

Nanosüspansiyon formülasyonları çalışılırken taşıyıcı bir polimer kullanılmadığı için kaplama materyali olan Kollicoat® MAE 100P'nin etanol içinde çeşitli konsantrasyonlardaki (2, 4 ve 6 mg/mL) çözeltileri denenmiştir. Burada indometazin miktarı (5 mg) dikkate alınarak daha seyreltik kaplama çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan nanosüspansiyonlar manyetik karıştırıcıda karışmakta olan bu çözeltiler içerisine damlatılarak denemeler yapılmıştır. 5 mg indometazin üzerine yaklaşık 5, 10 ve

15 mg Kollicoat® MAE 100P içeren kaplamalar denenmiştir. Ayrıca üst üste 2 ve 3 defa kaplama çalışmaları da denenmiştir.

3.9. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması

Biyouyumlu PLGA (50:50, MA~19.000 Da) polimeri kullanılarak indometazin içeren ve içermeyen nanopartiküler sistemler ve bunların Kollicoat® MAE 100P kullanılarak enterik kaplanması ile indometazin içeren nanosüspansiyonlar ve yine bunların Kollicoat® MAE 100P kullanılarak enterik kaplanması şeklinde yeni ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistem formülasyonları geliştirilmiştir.

3.9.1. İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Nanopartiküllerin hazırlanmasında “Nanopresipitasyon” yöntemi kullanılmıştır.⁵⁶ 25 mg PLGA ve 5 mg indometazin, 2.5 mL asetonitril içinde 30 dk süreyle 750 rpm’de çok noktalı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözündürülmüştür. Hazırlanan bu organik faz çok noktalı manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda karışmakta olan 2.5 mL sulu PVA (% 0.1, a/h) çözeltisine 5 dk süreyle 5cc enjektör (22G) yardımıyla sabit bir hızla damla damla damlatılmıştır. Damlatma işleminden sonra 10 dk karıştırmaya devam edilmiştir. Ardından organik çözücüü vakum yoluyla ortamdan uzaklaştırmak için 5 dk süreyle 60 rpm hıza ve 40 °C sıcaklığa ayarlanmış rotovapor kullanılmıştır. Yüklenmemiş etkin maddeyi ve kaba partikülleri uzaklaştırmak için 4000 rpm’de 5 dk süreyle ön santrifüj yapılmıştır. Elde edilen üst kısım alınarak 30 dk süreyle 10000 rpm (10.304xg)’de santrifüj edilmiştir. Bu sayede nanopartiküller çöktürülmüş ve kalıntı PVA uzaklaştırılmıştır. Çöken nanopartiküller ultra saf su ilavesi ile süspande edilerek -20 °C’de dondurulmuştur. Bu formülasyonlar 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir.^{105, 106} Elde edilen nanopartiküller çalışmada kullanılmak üzere desikatörde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.9.2. Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

İndometazin içermeyen boş nanopartiküller hazırlanırken 25 mg PLGA organik faz içerisinde çözündürülmüştür. Devamındaki işlemler Bölüm 3.9.1’de anlatıldığı şekilde indometazin eklenmeksizin yapılmıştır. Elde edilen nanopartiküller çalışmada kullanılmak üzere desikatörde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.9.3. Enterik Kaplı İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmaları neticesinde en iyi enterik kaplama oranı tespit edilmiştir. İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri hazırlandıktan sonra Kollicoat® MAE 100P enterik kaplama polimeri kullanılarak nanopartiküler sistemler kaplanmıştır.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ Öncelikle indometazin içeren nanopartiküllerin hazırlanması işlemleri yukarıda Bölüm 3.9.2’de anlatıldığı gibi son santrifüj aşamasına kadar aynı şekilde yapılmıştır. Elde edilen nanopartikül süspansiyonu; 1000 rpm hızda, çok noktalı manyetik karıştırıcı ile, 2.5 mL absöü etanol içinde hazırlanmış % 2 (a/h) Kollicoat® MAE 100P’nin çözeltisi üzerine damla damla ilave edilmiştir (kaplamanın farkedilmesi açısından içerisinde % 0.01 FD&C Red No:3 ilave edilmiştir). Damlatma işlemi 5 dk süreyle ve 5cc enjektör (22G) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Ardından organik çözücüyü ortamdan uzaklaştırmak için 5 dk süreyle 60 rpm hıza ve 40 °C sıcaklığa ayarlanmış rotovapor kullanılmıştır. Elde edilen kırmızı renkli süspansiyon, kaplamanın homojen olması açısından 2 dk ultasonik banyoda bekletilmiştir. Sonrasında 30 dk süreyle 10000 rpm (10.304xg)’de santrifüj edilmiş, nanopartiküller çöktürülmüş, fazla PVA ve kaplanmamış Kollicoat® MAE 100P kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Çöken nanopartiküller ultra saf su ilavesi ile süspande edilmiştir. -20 °C’de dondurulmuş ve devamında 24 saat süreyle liyofilize edilmişlerdir.^{100, 101} Elde edilen enterik kaplı nanopartiküller, deneylerde kullanılmak üzere desikatörde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.9.4. Enterik Kaplı Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Kollicoat® MAE 100P ile boş PLGA nanopartikülleri kaplanmadan önce Bölüm 3.9.3'te anlatıldığı yönteme göre İndometazin ilave edilmeden santrifüj işlemine kadar aynı şekilde yapılmıştır. Aynı oranlarda kaplama materyali ile kaplanmıştır. Elde edilen enterik kaplı boş PLGA nanopartikülleri, deneylerde kullanılmak üzere desikatörde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.9.5. İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması

Nanosüspansiyonların hazırlanmasında “Nanopresipitasyon” yöntemi kullanılmıştır.^{56, 107} 5 mg indometazin, 2.5 mL aseton içinde 30 dk süreyle 750 rpm’de çok noktalı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözündürülmüştür. Hazırlanan organik faz çok noktalı manyetik karıştırıcıda 1000 rpm hızda karışmakta olan 2.5 mL sulu PVA (% 0.1, a/h) çözeltisi içerisine 5 dk süreyle 5cc enjektör (22G) yardımıyla damla damla damlatılmıştır. Damlatma sonrasında ilave 5 dk süre ile daha kendi halinde karışmaya bırakılmıştır. Elde edilen nanosüspansiyonların homojen olması açısından 2 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiş ve daha sonra organik çözücüyü ortamdan uzaklaştırmak için 2 dk süreyle 60 rpm hıza ve 40 °C sıcaklığa ayarlanmış rotovapor kullanılmıştır. Elde edilen nanosüspansiyonlar tekrardan 10 dk süreyle ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutulmuş, homojen haldeki nanosüspansiyon 30 dk süreyle 10000 rpm (10.304xg)’de santrifüje edilmiş, nanosüspansiyonlar çöktürülmüş ve kalıntı PVA uzaklaştırılmıştır. Üstteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çöken nanosüspansiyon partikülleri ultra saf su ilavesiyle yeniden süspande edilmiştir. -20 °C’de dondurulmuş ve devamında 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir.^{29, 108} Elde edilen liyofilize nanosüspansiyonlar deneylerde kullanılmak üzere desikatörde oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.9.6. Enterik Kaplı İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmaları neticesinde en iyi enterik kaplama oranı tespit edilmiş ve deney tasarımı aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

İndometazin nanosüspansiyonları hazırlandıktan sonra Kollicoat® MAE 100P ile polimeri kullanılarak enterik kaplama yapılmıştır.¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ Öncelikle indometazin nanosüspansiyonlarını hazırlama işlemleri yukarıda Bölüm 3.9.5'te santrifüj etme aşamasına kadar aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nanosüspansiyon; 1000 rpm hızda, çok noktalı manyetik karıştırıcı kullanılarak, 2.5 mL absolü etanol içinde hazırlanmış % 0.2 (a/h) Kollicoat® MAE 100P'nin çözeltisi üzerine damla damla ilave edilmiştir. Damlatma işlemi 5 dk süreyle ve 5 cc enjektör (22G) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kırmızı renkli nanosüspansiyon, kaplamanın homojen olması açısından 1 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Organik çözücü için 2 dk süreyle 60 rpm hıza ve 40 °C sıcaklığa ayarlanmış rotovapor kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Konsantre haldeki nanosüspansiyonlar tekrardan 5 dk süreyle ultrasonik banyoda sonikasyona tabi tutulmuşlardır. Homojen kaplanmış bu nanosüspansiyonlar 30 dk süreyle 10000 rpm (10.304xg)'de santrifüje edilmiştir. Nanosüspansiyonlar çöktürülmüş ve kalıntı PVA uzaklaştırılmıştır. Üstteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çöken nanosüspansiyon partikülleri ultra saf su ilavesiyle yeniden süspande edilmiş, -20 °C'de dondurulmuş ve devamında 24 saat süreyle liyofilize edilmiştir.

3.10. İşlem Validasyonu

3.10.1. Nanopartiküler Sistemler

Bu amaçla 3 aşama tespit edilmiş ve her aşama sonunda elde edilen ürün valide edilmiş, HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. İndometazin miktarındaki azalma ve/veya

kromatogram üzerindeki farklı piklerin varlığı incelenmiştir. Sonuçlar başlangıç miktarına kıyasla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

1.Aşama: Asetonitril içinde çözünmüş haldeki indometazin+PLGA'da indometazin stabilitesinin değerlendirilmesi,

2.Aşama: Birinci aşamanın sonunda elde edilen çözeltinin hazırlanmış olan % 0.1 PVA içerisine damlatılıp karıştırıldıktan sonra indometazin stabilitesinin değerlendirilmesi,

3.Aşama: İkinci aşamanın sonunda organik çözücünün uzaklaştırılması amacıyla ürünün 40 °C sıcaklığa ve vakuma maruz bırakılması sonucu indometazin stabilitesinin değerlendirilmesidir.

3.10.2. İndometazin Nanosüspansiyonları

Bu amaçla 4 aşama tespit edilmiş ve her aşama sonunda elde edilen ürün Bölüm 3.10.1'deki gibi çalışılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

1.Aşama: İndometazinin asetondaki çözeltisinin stabilitesinin değerlendirilmesi,

2.Aşama: Birinci aşamadaki indometzin çözeltisinin % 0.1 PVA çözeltisine ilave edildikten sonraki indometazin stabilitesinin değerlendirilmesi,

3.Aşama: Organik çözücünün uzaklaştırılması işleminde indometazinin 40 °C sıcaklık ve vakum altında stabilitesinin değerlendirilmesi,

4.Aşama: Üçüncü aşamada elde edilen ürünün enterik kaplanması sonucu indometazin stabilitesinin değerlendirilmesidir.

3.11. Geliştirilen Formülasyonların Fiziksel Özellikleri

3.11.1. Formülasyonlardaki Etkin Madde Miktarının Tayini

Elde edilen indometazin içeren liyofilize nanopartiküler sistemlerin ve nanosüspansiyon formülasyonların tamamı % 44 asetonitril + % 36 0.1 M asetik asit + % 20 etanol (h/h) organik faz karışımı içeren çözelti içinde 30 mL'lik renkli vialler

kullanılarak 4 saat boyunca çok noktalı manyetik karıştırıcı yardımıyla 750 rpm’de karıştırılmış ve 0.45 µm membran filtreden süzölmüştür. Süzöntüler, HPLC yöntemi kullanılarak indometazin miktar tayini yapılmıştır. Tayinler indometazin içeren her bir formülasyon grubu için 6 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen miktar tayin sonuçları üzerinden aşağıdaki eşitlikler kullanılarak indometazinin yüzde enkapsülasyon etkinliği (% EE) ve yüzde ilaç yükleme kapasitesi (% YK) hesaplanmıştır. Sonuçlar $\bar{X}$ ve SS şeklinde değerlendirilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği hesabı aşağıda Şekil 3.2’de, ilaç yükleme kapasitesi hesabı ise Şekil 3.3’te verilmiştir.

$$\% EE = \frac{\text{Pratik Olarak Yüklenen Etkin Madde Miktarı (mg)}}{\text{Teorik Olarak Konulan Etkin Madde Miktarı (mg)}} \times 100$$

Şekil 3.2. Enkapsülasyon etkinliği hesaplamasında kullanılan eşitlik¹⁰⁹

$$\% YK = \frac{\text{Pratik Olarak Yüklenen Etkin Madde Miktarı (mg)}}{\text{Elde Edilen Toplam Madde Miktarı (mg)}} \times 100$$

Şekil 3.3. İlaç yükleme kapasitesi hesaplamasında kullanılan eşitlik¹⁰⁹

3.11.2. Formülasyonların Veriminin Tayini

İndometazin içeren ve içermeyen nanopartiküler sistemlerin verimlerinin hesaplanması aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

Liyofilize edildikten sonra elde edilen nanopartiküler taşıyıcı sistem ve nanosüspansiyon miktarının, taşıyıcı sistemleri hazırlarken kullanılan toplam madde (etkin madde, polimerler gibi) miktarına bölünmesi ve sonucunda çıkan değer % olarak ifade edilmesi şeklinde değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar üzerinden aşağıdaki eşitlik kullanılarak formülasyonların yüzde verimleri hesaplanmıştır. Deney, her bir

formülasyon grubu için n=6 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar $\bar{X}$ ve SS şeklinde verilmiştir.

Yüzde verim (% V) hesabında kullanılan eşitlik ise aşağıda Şekil 3.4'te verilmiştir.

$$\% V = \frac{\text{Pratik Olarak Elde Edilen Toplam Formülasyon Miktarı (mg)}}{\text{Teorik Olarak Konulan Toplam Madde Miktarı (mg)}} \times 100$$

Şekil 3.4. Verim hesaplamasında kullanılan eşitlik¹³

3.11.3. Partikül Boyutu ve Dağılımı Tayini

Bu ölçüm formülasyonlar hazırlandıktan hemen sonra gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların partikül boyutu ve dağılımına ait veriler Zetasizer cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Her formülasyon grubu 6 kez hazırlanmış ve peş peşe cihazda ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 100 µL süspande haldeki formülasyon ve üzeri 900 µL saf su ile seyreltilerek zetacell hücrelerinde oda sıcaklığında tayin edilmiştir. Sonuçlar $\bar{X}$ ve SS olarak verilmiştir.

3.11.4. Zeta Potansiyel Tayini

Formülasyonlardaki nanopartiküllerin yüzeylerini etkileyen net yüke (Zeta Potansiyel) ait değerleri saptayabilmek için Zetasizer cihazı kullanılmıştır. Her formülasyon grubu 6 kez tekrarlanmıştır. 100 µL süspande haldeki formülasyon, 900 µL saf su ile seyreltilerek zetacell hücrelerinde oda sıcaklığında tayin edilmiştir. Sonuçlar $\bar{X}$ ve SS olarak verilmiştir.

3.11.5. İndometazinin Piyasada Mevcut Preparatlarının ve İndometazin İçeren/İçermeyen Formülasyonların Yüzey Özelliklerinin Tayini

İndometazinin, piyasada mevcut indometazin preparatlarının ve geliştirdiğimiz nanopartiküler formülasyonların liyofilize örnekleri morfolojik yapılarının incelenmesi amacıyla SEM cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Formülasyonlar yalıtkan olduğu için yaklaşık 100 Å kalınlığında altın ile kaplanmıştır.

3.11.6. Bileşenlerin ve Formülasyonların DSC Termogramları

İndometazin ve formülasyon bileşenlerinin sıcaklık artışına bağlı olarak etkileşimlerini incelemek ve formülasyonlardaki maddeler arasında herhangi bir geçimsizlik olup olmadığını değerlendirmek üzere ölçümler gerçekleştirilmiştir. Saf etkin maddenin, polimerlerin, bunların fiziksel karışımlarının ve hazırlanan liyofilize nanopartiküler sistemlerin ayrı ayrı örnekleri hazırlanmış, DSC cihazı kullanılarak termogramları alınmıştır. Ölçümler 30 mL/dakika azot gazı akış hızında ve 20-1000 °C sıcaklık aralığında dakikada 10 °C sıcaklık artışı ile gerçekleştirilmiştir.

3.11.7. Bileşenlerin ve Formülasyonların FT-IR Spektrumları

Saf indometazinin, polimerlerin, formülasyonların ve formülasyonlara giren diğer bileşenlerin toz örnekleri hazırlanmıştır. 4000 – 400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, doğrudan toz numune üzerinden FT-IR (ATR) spektrofotometresi ile infrared spektrumları alınmıştır.

3.12. İndometazinin Formülasyonlardan Salımının Tayini

Hazırlamış olduğumuz liyofilize nanopartiküler sistemler ile mevcut dünya ilaç piyasasında mevcut indometazinin katı oral dozaj şekilleri, dissolüsyon cihazı kullanılarak çözünme hızları açısından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla USP30-NF25'e kayıtlı olan “İndometazin Kapsül” ve “İndometazin Extended-Release Kapsül” şekillerine ait monograf bilgileri dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Deney için, saf indometazin, indometazin geleneksel 25 mg kapsül, indometazin ER 75 mg kapsül ve geliştirdiğimiz indometazin içeren nanopartiküler sistemler kullanılmıştır. Tutarlılık olması ve karşılaştırılabilmesi açısından geliştirdiğimiz nanopartiküler sistemler de dahil olmak üzere *in vitro* çalışmaya 25 mg indometazin içerecek şekilde örnekler kullanılmıştır. Ölçümler valide edilmiş HPLC yöntemi ile 3 tekrar şeklinde yapılmıştır.

USP30-NF25'e kayıtlı geleneksel indometazin kapsüllerine ait monografıta yer alan dissolüsyon şartları aşağıda sıralanmıştır:

- Ortam hacmi 750 mL, 37 ± 0.5 °C
- Ortam: 4 kısım saf su + 1 kısım pH 7.2 Fosfat Tamponu (USP'ye göre hazırlanmış)
- Aparat 1 (Sepet, Basket)
- 100 rpm
- Süre: 20 dk
- Tolerans Limiti: % 80

USP30-NF25'e kayıtlı indometazin extended-release kapsüllerine ait monografıta yer alan dissolüsyon şartları (Test 3) aşağıda sıralanmıştır:

- Ortam hacmi 750 mL, 37 ± 0.5 °C
- Ortam: pH 6.8 Fosfat Tamponu (USP'ye göre hazırlanmış)
- Aparat 1 (Sepet, Basket)
- 75 rpm
- Süre: 1, 2, 4, 6, 12 ve 24 saat
- Tolerans Limitleri:

Zaman (Saat)	Çözünen Miktar
1	% 15 ila % 40 arasında
2	% 35 ila % 55 arasında
4	% 55 ila % 75 arasında
6	% 65 ila % 85 arasında
12	% 75'ten az olmamalı
24	% 85'ten az olmamalı

pH 1.2 HCl tamponu (USP'ye göre hazırlanmış) içinde saf indometazin, geleneksel preparatların ve hazırlanan formülasyonların ilaç salımı gerçekleştirip gerçekleştirmediğini tespit etmek amacıyla 2 saat süreyle dissolüsyon çalışması da ayrıca

yapılmıştır. Deney için, saf indometazinden, indometazin içeren jelatin kapsülden, indometazin ER kapsülden ve her bir formülasyon grubundan 25 mg indometazin içerecek şekilde liyofilize sistemler tartılarak kullanılmıştır. Ölçümler valide edilmiş HPLC yöntemi ile 3 tekrar şeklinde yapılmıştır.

Tüm dissolüsyon çalışmalarında verilen zaman aralıklarında 10'ar mL örnekler alınmış ve 0,45 µm membran filtreden süzülerek önceden valide edilmiş olan HPLC yöntemi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Örneklerden alınan hacim kadar aynı hacimde taze dissolüsyon ortamı örnekler üzerine ilave edilmiş ve sink koşulların sürdürülmesi sağlanmıştır.

3.12.1. İndometazinin Salım Kinetiklerinin Tayini

Çözünme hız profilleri, etkin maddenin vücuda alınmasını takiben emilim, dağılım, metabolizma ve atılımının anlaşılması açısından önemlidir.

Birinci derece kinetik model, etkin maddenin polimer içinde homojen olarak dağıldığı ve ilacın salımının polimer matriks içindeki konsantrasyonu ile bağlantılı olduğu, matriks tipi sistemlerden etkin maddenin salımını ifade etmek için geliştirilmiştir. Birinci derece kinetik modelde reaksiyon hızı, birim zamanda çözünmeden kalan etkin maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Reaksiyon hızı konsantrasyona bağlı olarak başlangıçta hızlı, sonrasında daha yavaş olmaktadır. Sıfırıncı derece kinetik modelde ise etkin maddenin çözünmesinin konsantrasyondan bağımsız olduğu durumlarda görülür. Sabit bir hızda sürekli etkin madde çıkışı gerçekleşir. Birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarı, ortamdaki etkin madde konsantrasyonundan etkilenmez ve sabit bir hızda sürekli etkin madde çıkışı gerçekleştirmektedir.¹¹⁰

Korsmeyer-Peppas modeli, ilaç salımının hem difüzyon hem de aşınma kontrollü mekanizmalar ile birlikte yürüdüğünü açıklayan bir modeldir. İlaç salımı aynı anda hem difüzyon hem de aşınma ile polimerik matriksten olmaktadır.¹¹⁰

Higuchi model ise karekök kanunu olarak bilinmektedir. Açığa çıkan etkin madde miktarı, zamanın kareköküne karşı grafiğe geçirilir. Eğer etkin maddenin salımı difüzyon kontrollüyse, eğimi k sabitine eşit olan bir doğru elde edilir. Bu modelde, etkin maddenin önce matriksin yüzey tabakasından çözündüğü, bu tabakanın bitmesini takiben bir sonraki tabakadan etkin maddenin çözünme ve difüzyon vasıtasıyla dıştaki ortama doğru çıkmaya başladığı varsayılmaktadır.¹¹¹

Uygun kinetik modeli belirlemek adına indometazin içeren tüm formülasyonların ve piyasa preparatlarının pH 6.8 ve pH 7.2 fosfat tamponlarındaki salım profili sonuçları bilgisayar programına uygulanmış ve sıfıncı derece, birinci derece, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi modellerinden hangisine uyum gösterdiği incelenmiştir.

3.13. Formülasyonların Stabilitésinin Tayini

Hazırlanan formülasyonların bir ay süreyle +4 °C (buzdolabı) ve 18-25 °C'deki (oda sıcaklığı) stabiliteleri, 24. saat, 15.gün ve 30.gün sonunda partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli ve miktar tayini sonuçları bakımından yeni hazırlanmış formülasyon verileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ölçümler her bir formülasyon grubu ve parametre açısından 3 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.14. *In Vivo* Çalışmalar

Hazırlanmış indometazin içeren nanopartiküler sistemler, midede ülser oluşturma potansiyelleri açısından saf indometazin, ticari indometazin geleneksel kapsül ve indometazin extended-release (ER) kapsül formları ile karşılaştırılmıştır. Mevcut ilaçlar içinde geleneksel kapsül 25 mg indometazin, ER kapsül ise 75 mg indometazin içermektedir. Standart olması ve karşılaştırılabilmesi açısından geliştirdiğimiz nanopartiküler sistemler de dahil olmak üzere *in vivo* çalışmaya 25 mg indometazin içerecek şekilde örnekler hazırlanmıştır. Deneyde, Wistar albino cinsi, 180-220g

ağırlığında, 6-8 haftalık 100 adet sıçan kullanılmıştır. İki farklı zaman diliminde (6. ve 12. saatlerde) formülasyonların ve piyasa preparatlarının sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyelleri istatistiksel olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında hazırlanan indometazin içeren nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin sıçan mide dokularında ülser oluşturma potansiyelleri, saf indometazin ve ticari preparatlar ile karşılaştırmak üzere bir ön çalışma ardından da asıl deney tasarımı oluşturulmuştur. Deney için literatürde bilindiği şekliyle; 25 mg/kg dozda indometazinin, yaklaşık 180-200 g ağırlığındaki, bir gece önceden aç bırakılan sıçanlara verildiğinde yaklaşık 6 saat içinde mide dokularında ülser oluşturmaya dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.^{112, 113}

In vivo Deneyler için Ön Çalışmalar

Bu çalışma ile yapılacak asıl deneyin tasarımı belirlenmiştir. Bu amaçla aşağıda sıralanan işlemler gerçekleştirilmiştir:

- 10 Adet Wistar albino cinsi, 180-200 g ağırlığında, 6-8 haftalık dişi sıçanlar kullanılmıştır.
- Deney hayvanları 2 gruba ayrılmış, 1.grup ilk 6 saat sonundaki ilaç uygulanması sonucunu, 2.grup ise 12 saat sonundaki ilaç uygulanması sonucunu görmek amacıyla oluşturulmuştur.
- Kilogram başına 25 mg indometazin içerecek şekilde liyofilize halde nanopartiküler formülasyonlar kullanılmıştır.
- Formülasyonlar ile karşılaştırma amacıyla her grupta 1 hayvana ticari indometazin geleneksel kapsül 25 mg/kg kullanılmıştır.
- Ön denemede kullanılan dört indometazin içeren formülasyon:
1-İndometazin nanosüspansiyonu,
2-Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu,

3-İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri,

4- Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri.

- Deneyden bir gün önce sıçanların önlerinden yemler alınmış ve sadece su ile beslenecek şekilde 24 saat aç bırakılmışlardır.
- Deneyin sağlıklı bir şekilde yürütülmesi açısından altı delikli (torlu) kafesler kullanılmıştır (dışkılarını yemelerine engel olunmuştur).
- Ertesi gün formülasyonlar ve ticari indometazin geleneksel kapsül, 25 mg/kg indometazin içerecek şekilde çeşme suyunda ultrasonik banyo kullanılarak süspande edilmiş ve her sıçana 1'er mL olarak oral yoldan gavaj ile verilmiştir.
- Dört formülasyon grubunun uygulandığı 4 sıçan ve geleneksel kapsül verilen bir sıçan 6. saatte, diğer 4 formülasyon grubunun uygulandığı 4 sıçan ve geleneksel kapsül verilen diğer bir sıçan ise 12. saatte “Servikal Dislokasyon” ile sakrifiye edilmiştir.
- Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve asıl deney kısmına geçilmiştir.
- Asıl deney için 90 Adet Wistar albino cinsi, 180-200 g ağırlığında, 6-8 haftalık dişi sıçanlar kullanılmıştır. 2 gruba ayrılmıştır. 1.grup ilk 6 saat sonundaki ilaç uygulaması sonucunu, 2.grup ise 12 saat sonundaki ilaç uygulaması sonucunu görmek amacıyla oluşturulmuştur. 25 mg/kg indometazin içerecek şekilde formülasyonlar ve preparatlar tartılmıştır.

- Geliştirdiğimiz altı ayrı formülasyon:

1-İndometazin nanosüspansiyonu,

2- Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu,

3-İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri,

4- Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri,

5- Boş nanopartiküller,

6- Enterik kaplı boş nanopartiküller, liyofilize halde deneylerde kullanılmıştır.

Denev grupları:

- 1. Grup:** 25 mg/kg saf indometazin
- 2. Grup:** 25 mg/kg ticari indometazin geleneksel kapsül
- 3. Grup:** 25 mg/kg ticari indometazin ER kapsül (yalnız 12. saat için)
- 4. Grup:** 25 mg/kg indometazin içeren PLGA nanopartikül formülasyonu
- 5. Grup:** 25 mg/kg indometazin içeren enterik kaplı PLGA nanopartikül formülasyonu
- 6. Grup:** 25 mg/kg indometazin içeren nanosüspansiyon formülasyonu
- 7. Grup:** 25 mg/kg indometazin içeren enterik kaplı nanosüspansiyon formülasyonu
- 8. Grup:** Boş nanopartikül formülasyonu
- 9. Grup:** Enterik kaplı boş nanopartikül formülasyonu
- 10. Grup:** Sağlıklı Kontrol (3 sıçan, oral olarak sadece su verilmiştir.)

Grupların (1-7) her birinde 12 sıçan bulunurken, 6 sıçan 6., diğer 6 sıçan 12. saatlerde kurifiye edilmiştir. 8 ve 9. gruplarda 2'şer sıçan, 4. grupta ise sadece 6 sıçan bulunmaktadır (ER kapsül formunun prospektüs bilgisine göre günde 12 saatte bir doz uygulaması baz alınmıştır. O nedenle yalnız 12. saat sonunda kurifiye edilerek midelerine bakılmıştır).

3.15. İstatistiksel Değerlendirmeler

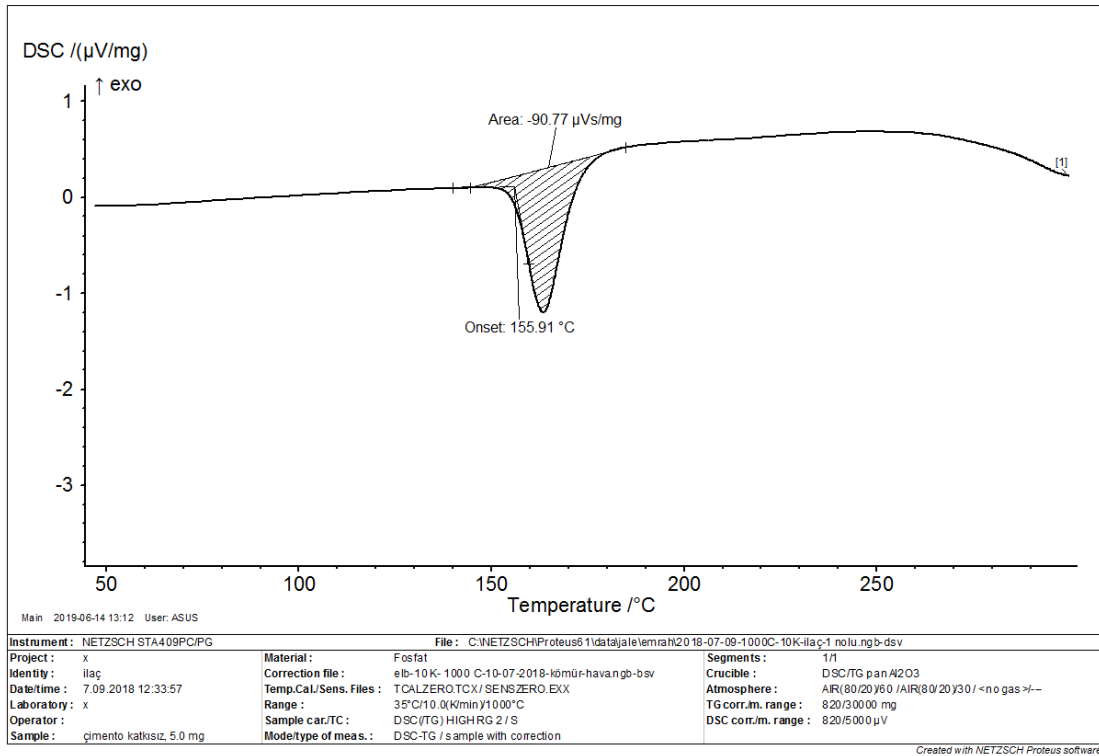
Geliştirilen formülasyonlar arasında enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi, partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, verimi, stabilite ve dissolüsyon verileri açısından farklılığın anlamlı olup olmadığı, IBM SPSS Statistics 20 programı içerisinde yer alan Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel yönden değerlendirilmesi yine IBM SPSS Statistics 20 programı içerisinde yer alan “One-Way Analyses of Variance (ANOVA)” testi kullanılarak değerlendirilmiş ve $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. İndometazinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

4.1.1. İndometazinin Erime Derecesinin Tayini

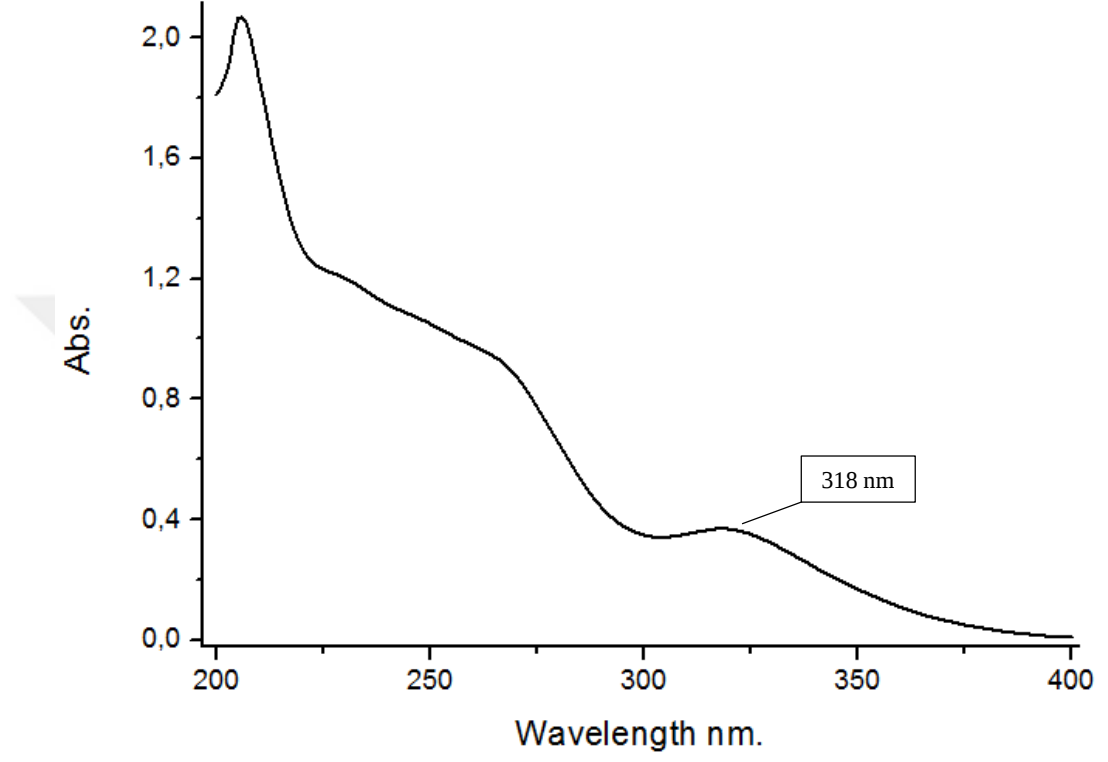
Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekliyle yapılan termal analiz sonucu saf indometazine ait termogram Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. İndometazinin DSC termogramı

4.1.2. İndometazinin Ultraviyole (UV) Spektroskopisi ile Analizi

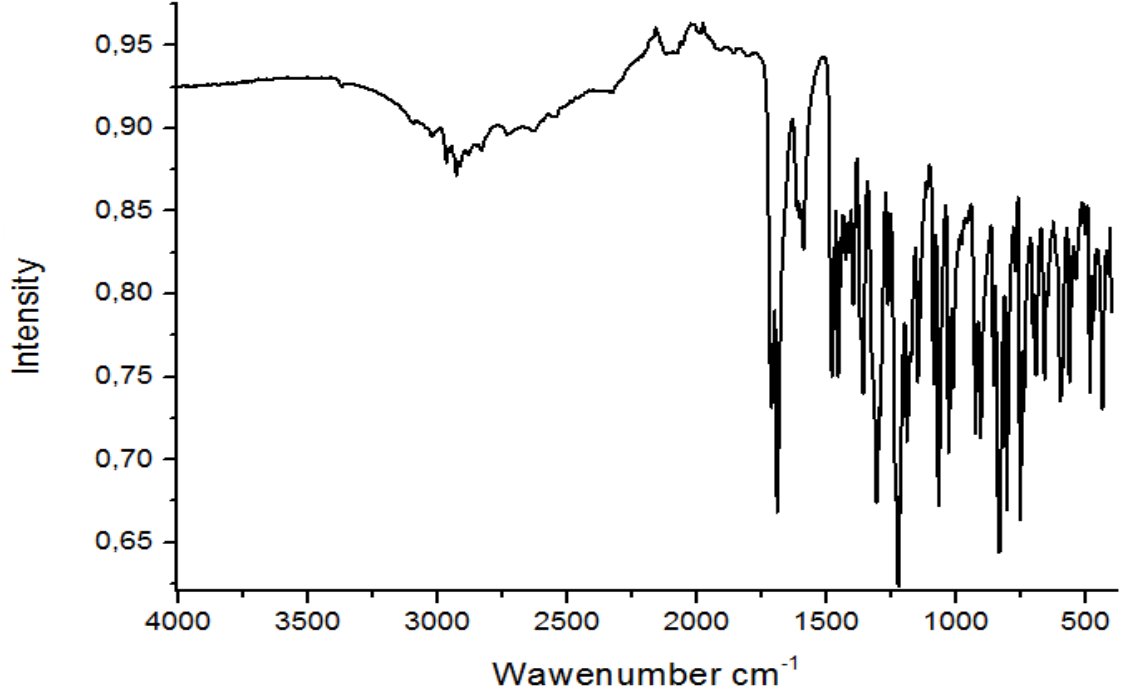
Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı şekilde indometazinin stok çözeltisi hazırlanmış ve UV spektrumu elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İndometazinin UV spektrumu

4.1.3. İndometazinin Fourier Transform-Infrared (FT-IR) Spektroskopisi ile Analizi

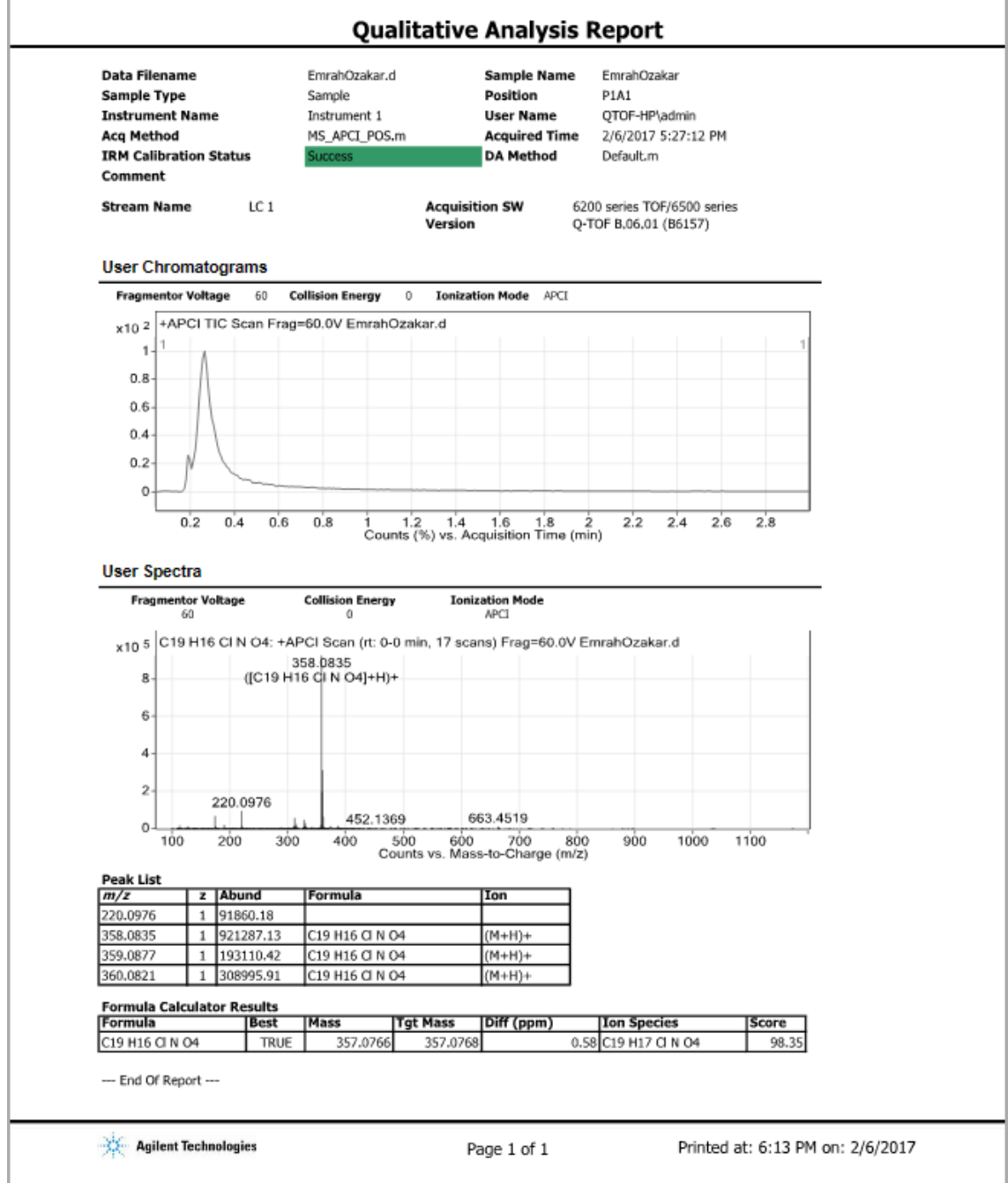
Bölüm 3.4.3'te anlatıldığı şekliyle yapılan analiz sonucu saf indometazinin FT-IR spektrumu elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İndometazinin FT-IR spektrumu

4.1.4. İndometazinin Kütle Spektrumu

Bölüm 3.4.4’te anlatıldığı şekliyle yapılan kütle analizi sonucu saf indometazine ait spektrum elde edilmiştir (Şekil 4.4). İndometazinin moleküler ağırlığının 357.0766 g/mol olduğu tayin edilmiştir.



Şekil 4.4. İndometazinin kütle spektrumu

4.1.5. İndometazinin Farklı Ortamlarda Çözünürlüğünün Tayini

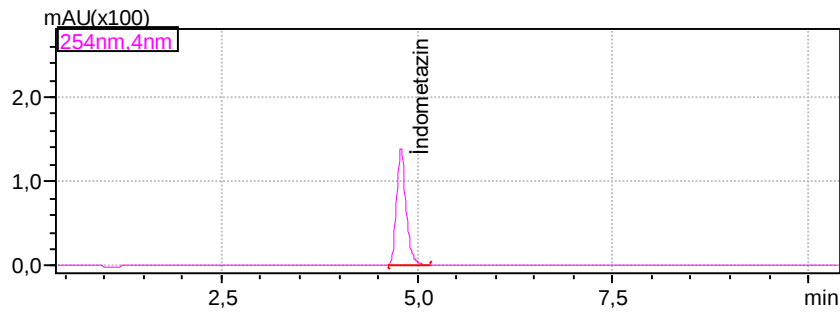
Bölüm 3.4.5'te anlatıldığı gibi saf indometazine ait çözünürlük çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. İndometazin çözünürlük çalışması sonuçları ($\mu\text{g/mL}$, $\bar{X} \pm \text{SS}$, $n=3$)

Distile su	pH 1.2 HCl Tamponu	pH 6.8 Fosfat Tamponu	pH 7.2 Fosfat Tamponu
4.10 ± 1.58	0.37 ± 0.07	70.76 ± 1.62	184.78 ± 0.90

4.2. İndometazinin HPLC ile Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi

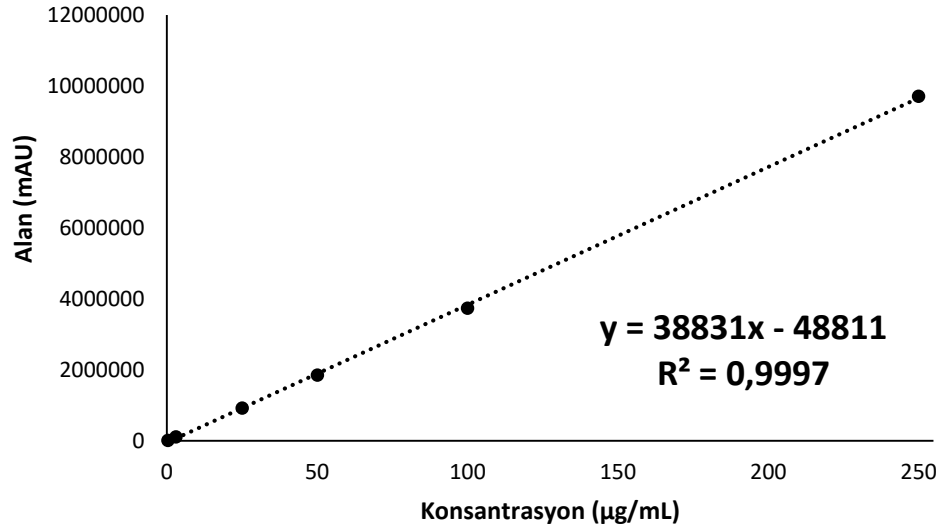
Bölüm 3.5'te anlatıldığı şekilde indometazinin stok çözeltisi (1 mg/mL) hazırlanmış ve bu çözeltiden hareketle çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik çözeltilerin spektrumları HPLC'de alınmıştır. Dalga boyu taraması sonucu maksimum absorbansın alındığı dalga boyu 254 nm olarak tespit edilmiştir. 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda indometazin içeren çözeltiliye ait kromatogram örneği aşağıda Şekil 4.5'te verilmiştir.



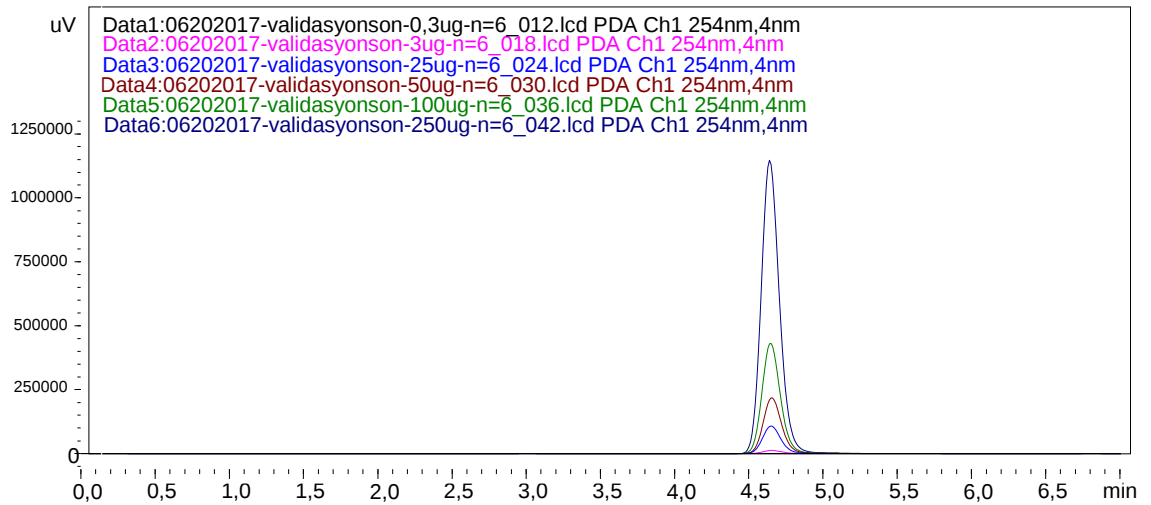
Şekil 4.5. İndometazinin hareketli faz içinde hazırlanan çözeltisinin HPLC'ye enjekte edilmesiyle elde edilen kromatogram piki.

4.3. İndometazine Ait Kalibrasyon Eğrisinin Elde Edilmesi

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi 6 farklı konsantrasyon ve her bir seriden 6 adet olacak şekilde örnekler hazırlanmış, HPLC’de 254 nm’de ölçümü yapılmıştır. Her bir konsantrasyon ve karşılık gelen pik alan değerleri grafiğe geçirilmiş, regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon eğrisi ve yapılan tüm analizlerde kullanılmak üzere denklemi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisi ve denklemi Şekil 4.6’da, piklerin kromatogramları ise Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.6. İndometazin kalibrasyon eğrisi ve denklemi



Şekil 4.7. Kalibrasyon eğrisini oluşturan konsantrasyonlar

4.4. Miktar Tayin Yönteminin Validasyonu

Kromatogramlar incelenerek deneysel olarak sinyal/gürültü oranının 3/1 olduğu ve indometazinin nicel olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyon değerinin 0.1 µg/mL olarak tespit edilmiştir (LOD).

Yöntemin belirli bir doğruluk ve kesinlikle saptayabildiği minimum indometazin miktarı için yapılan denemeler neticesinde kromatogramlar incelenerek deneysel olarak sinyal/gürültü oranının 10/1 olduğu konsantrasyon değeri 0.3 µg/mL olarak tespit edilmiştir (LOQ). Bu değer aynı zamanda kalibrasyon eğrisinin de en düşük noktası olarak seçilmiştir.

Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde indometazinin stok çözeltisinden hareketle seyreltik örneklerinin ölçümleri yapılmış ve indometazin konsantrasyonuna karşı elde edilen analitiksel cevapların doğrusallığı karşılaştırılmıştır. 250 µg/mL konsantrasyon örneğinden sonraki konsantrasyonların doğrusallıktan saptığı tespit edilmiştir. Denklemin eğimi (m) ve determinasyon katsayısı (R^2) hesaplanmıştır. R^2 ’nin 1’e yakın olması doğrusallığı pekiştirmiştir.

Yöntem doğruluğunu ve kesinliğini saptayabilmek için Bölüm 3.7’de anlatıldığı şekilde hesaplamalar yapılmıştır. % BSS ve % BH değerleri % 2’nin altında, % VK değeri ise % 0,22 olarak bulunmuştur. Sonuçlar aşağıda Tablolar 4.2 - 4.6 arasında verilmiştir.

Tablo 4.2. Analitik yöntem validasyonu gün içi doğruluk ve kesinlik (n=6)

	0.5 µg/mL	75 µg/mL	225 µg/mL
	0.502 ± 0.008	75.305 ± 0.417	221.291 ± 1.485
% BSS	1.516	0.554	0.671
% BH	0.354	0.407	-1.649

Tablo 4.3. Analitik yöntem validasyonu günler arası doğruluk ve kesinlik -1.gün (n=6)

	0.5 µg/mL	75 µg/mL	225 µg/mL
	0.505 ± 0.007	75.294 ± 0.506	224.098 ± 3.157
% BSS	1.330	0.672	1.409
% BH	0.958	0.392	-0.401

Tablo 4.4. Analitik yöntem validasyonu günler arası doğruluk ve kesinlik -2.gün (n=6)

	0.5 µg/mL	75 µg/mL	225 µg/mL
	0.496 ± 0.008	73.839 ± 1.260	223.654 ± 2.056
% BSS	1.515	1.707	0.919
% BH	-0.705	-1.548	-0.598

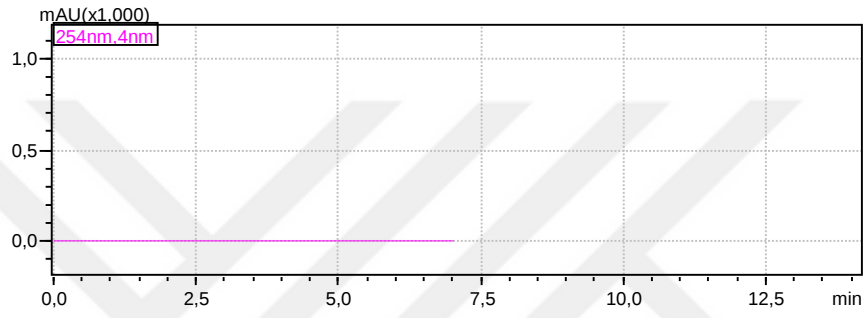
Tablo 4.5. Analitik yöntem validasyonu günler arası doğruluk ve kesinlik -3.gün (n=6)

	0.5 µg/mL	75 µg/mL	225 µg/mL
	0.494 ± 0.007	74.355 ± 0.932	224.931 ± 3.971
% BSS	1.447	1.253	1.765
% BH	-1.131	-0.860	-0.031

Tablo 4.6. Varyasyon katsayısı hesaplamasında kullanılan konsantrasyonlar ve eğimleri

Konsantrasyon (µg/mL)								
n	0.3	3	25	50	100	250		
1	0.295	3.093	25.072	48.554	97.672	251.352		
2	0.302	3.113	24.939	49.477	97.115	250.474		
3	0.303	2.797	24.947	48.921	97.013	251.299		
4	0.299	3.101	25.203	48.459	97.701	251.901		
5	0.297	3.123	25.031	49.605	97.727	250.887		
6	0.304	2.773	24.774	49.238	97.076	251.430		
Ort.	0.300	3.000	24.994	49.042	97.384	251.224		
SS.	0.003	0.152	0.132	0.435	0.318	0.447		
Her bir serinin	1	2	3	4	5	6	Ort.	SS
eğimi (m)	38859	38697	38849	38940	38769	38873	38831.167	85.502

İndometazinin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda indometazin içermeyen nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan tüm yardımcı maddeler (PLGA, PVA, Kollicoat® MAE 100P gibi) aynı formülasyon ve analiz ortamında HPLC cihazına enjekte edildiğinde kromatogramda indometazin piki ile aynı sürede gelen herhangi bir pik veya herhangi bir farklı pik olmadığı tespit edilmiştir. Formülasyon bileşenlerine ait kromatogram Şekil 4.8’de, stabilite sonuçları ise Tablo 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.8. Formülasyon bileşenlerine ait kromatogram

Tablo 4.7. İndometazin stok çözeltisinin stabilitesi (n=3)

1.Gün / +25 ± 2 °C				15.Gün / +25 ± 2 °C			30.Gün / +25 ± 2 °C			1.Gün / +37 ± 2 °C		
Örnek	Miktar	%	% BH	Miktar	%	% BH	Miktar	%	% BH	Miktar	%	% BH
(µg/mL)	(µg/mL)	BSS		(µg/mL)	BSS		(µg/mL)	BSS		(µg/mL)	BSS	
1.5	1.734 ± 0.004	0.22	15.58	1.729 ± 0.006	0.35	15.29	1.745 ± 0.01	0.58	16.33	1.854 ± 0.209	11.28	23.58
70	71.410 ± 0.06	0.08	2.01	71.741 ± 0.52	0.07	2.49	73.671 ± 3.232	4.39	5.24	71.891 ± 0.06	0.08	2.70
215	215.458 ± 0.297	0.14	0.21	216.321 ± 0.109	0.05	0.61	216.231 ± 0.066	0.03	0.57	216.199 ± 0.297	0.14	0.56

4.5. Formülasyon Geliştirme Çalışmalarına Ait Bulgular

4.5.1. Formülasyon Bileşenlerinin Seçimi

- Organik Çözücünün Seçimi

Liyofilizasyon işlemine kadar yapılan denemeler sonucunda PLGA polimeri ile hazırlanacak olan nanopartiküller için asetonitril, nanosüspansiyonlar için ise aseton organik faz olarak belirlenmiştir. Belirlenen hem polimer hem de indometazin miktarını tam olarak çözüdüren, yöntemin verimliliği ve buharlaştırma süresinin kısa tutulması açısından minimum miktar organik çözücü hacmi 2.5 mL olarak saptanmıştır.

- Kullanılan Stabilizan (PVA) Miktarının Belirlenmesi

Nanopartiküller, hazırlama aşamasında organoleptik yönden kontrol edilmiş ve optik mikroskop görüntüleri incelenmiştir. En yüksek verimde, en stabil nanopartikülleri elde ettiğimiz, minimum miktar kullanarak kalıntı PVA miktarını en aza indirdiğimiz % 0,1 (a/h) konsantrasyonu seçilmiştir.

- PLGA Miktarının ve Organik /Sulu Faz Oranının Belirlenmesi

Farklı miktar PLGA ile oluşturulan nanopartiküllerin optik mikroskop görüntüleri incelenmiştir. Görüntüler sonucunda homojen dağılmış, agregat oluşmamış, küçük boyutlarda (200-300 nm) ve partikül boyutu dağılımı oldukça iyi olan, kalıntı bırakmayan polimer miktarı ile organik faz:sulu faz oranı belirlenmiştir. PLGA ile sürdürülecek olan deneylerimizin tüm aşamaları için 25 mg polimer ve 1:1 organik faz:sulu faz oranının seçilmesine karar verilmiştir.

- Etkin Madde Miktarının Belirlenmesi

Neticede oluşturulan PLGA nanopartiküllerin optik mikroskop görüntüleri ışığında kalıntı oluşturmayan, partikül boyutu ve dağılımı uygun, 25 mg PLGA nanopartiküllerine en yüksek yüklemenin görüldüğü indometazin miktarı 5 mg olarak seçilmiştir. Ayrıca belirlenen organik faz:sulu faz oranları (1:1) ve stabilizan (% 0.1 a/h) konsantrasyonu

ışığında en iyi nanosüspansiyonun elde edildiği (etkin madde yüklü-PLGA nanopartiküllerine kıyaslama açısından da) indometazin miktarı 5 mg olarak belirlenmiştir.

- Organik Fazın Damlatılma Süresinin Belirlenmesi

Organik faz:sulu faz oranının 1:1 ve miktarlarının da 2.5 mL olarak belirlenmesi sonucu damlatma süresinin de optimum 5 dakika olduğu belirlenmiştir.

- Karıştırıcının Tipi ve Hızının Belirlenmesi

Optik mikroskop görüntüleri ışığında stabil, yüksek verimde ve en önemlisi de uygun nano boyutlarda hazırlandığı görülen nanopartiküler sistemleri homojenize etmek için çok noktalı manyetik karıştırıcı ve hız olarak ise 1000 rpm seçilmiştir.

- Organik Çözücünün Uzaklaştırılması için Rotovapor Şartlarının Belirlenmesi

Çalışma kapsamında yapılan denemeler sonucunda organik çözücülerini uzaklaştırmak için 40 °C sıcaklık, 60 rpm dönüş hızı ve 5 dakika uçurma süresinin optimum yeterli olduğu görülmüştür. Daha yüksek sıcaklıklarda nanopartiküler yapının hasar gördüğü, daha düşük sıcaklıklarda ise organik çözücünün tamamen uzaklaştırılması işleminin yetersiz kaldığı ve bu sürede oluşan nanopartiküler yapıların bozulduğu tespit edilmiştir.

- Nanopartikülleri Biriktirmek için Santrifüj Süresi ve Hızının Belirlenmesi

PLGA ile hazırlanacak olan nanopartiküler sistemlerdeki yüklenmemiş etkin maddeyi ve nanopartiküle dönüşmemiş polimer kalıntılarını bertaraf etmek için 4000 rpm hızda 5 dakika süreyle ön santrifüj yapılması öngörülmüştür.

Elde edilen süpernatandaki nanopartiküler yapıları toplayabilmek, Sulu ortam içinde kalan fazla PVA'yı uzaklaştırabilmek için optimum hız 10000 rpm (10.304xg) ve süre olarak da 30 dakika belirlenmiştir.

Ayrıca elde edilen nanosüspansiyonlar içindeki indometazin partiküllerini çöktürmek, fazla PVA'dan uzaklaştırmak için yine optimum hız ve süre olarak 10000 rpm (10.304xg) ve 30 dakika belirlenmiştir.

Daha düşük rpm hızlarda ve/veya daha kısa sürelerde yapılan denemelerde nano yapıların tamamen çökmediği tespit edilmiştir.

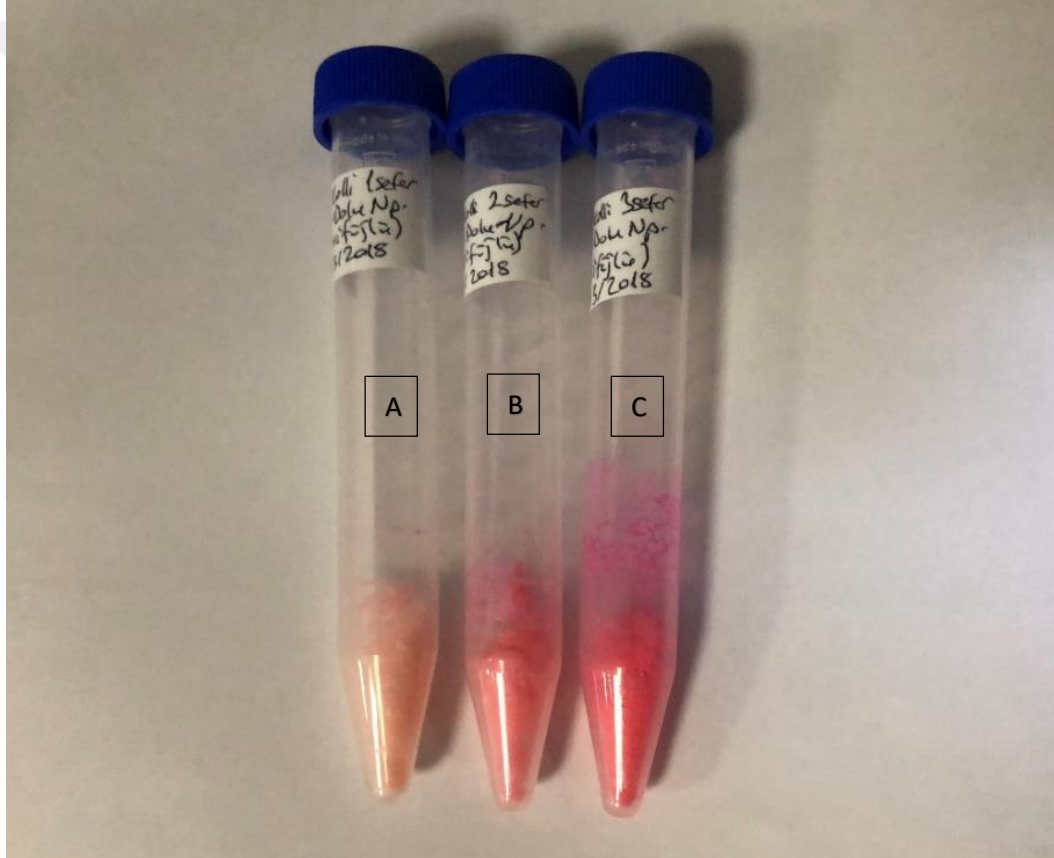
- Enterik Kaplama Materyalinin Miktarının Belirlenmesi

Enterik kaplama materyali olarak Kollicoat® MAE 100P'nin etanol içinde hazırlanan 10, 20, 30 mg/mL gibi farklı konsantrasyonlarındaki çözeltileri kullanılmış, çok sayıda deneme yapılmıştır. PLGA polimeri ile hazırlanan nanopartiküllerin (indometazin içeren ve içermeyen) enterik kaplanması sonrası elde edilen veriler; partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, verimi, enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi açısından değerlendirilmiştir. Sonuçta daha küçük boyutlu, daha yüksek zeta potansiyele sahip nanopartiküllerin elde edildiğinden dolayı Kollicoat® MAE 100P'nin etanol içinde hazırlanmış 20 mg/mL'lik çözeltisinden 2.5 mL kullanılmasına karar verilmiştir (organik faz:sulu faz oranlarındaki 1:1 uyumu sağlamak üzere). Burada mL'nin belirlenmesinde elde edilen nanopartiküler sistemlerin ön santrifüj sonrası hacminin yaklaşık 2.5 mL olmasıdır. Üst üste yapılan enterik kaplamalar neticesinde de verimi en yüksek olan bir defa kaplamaya karar verilmiştir.

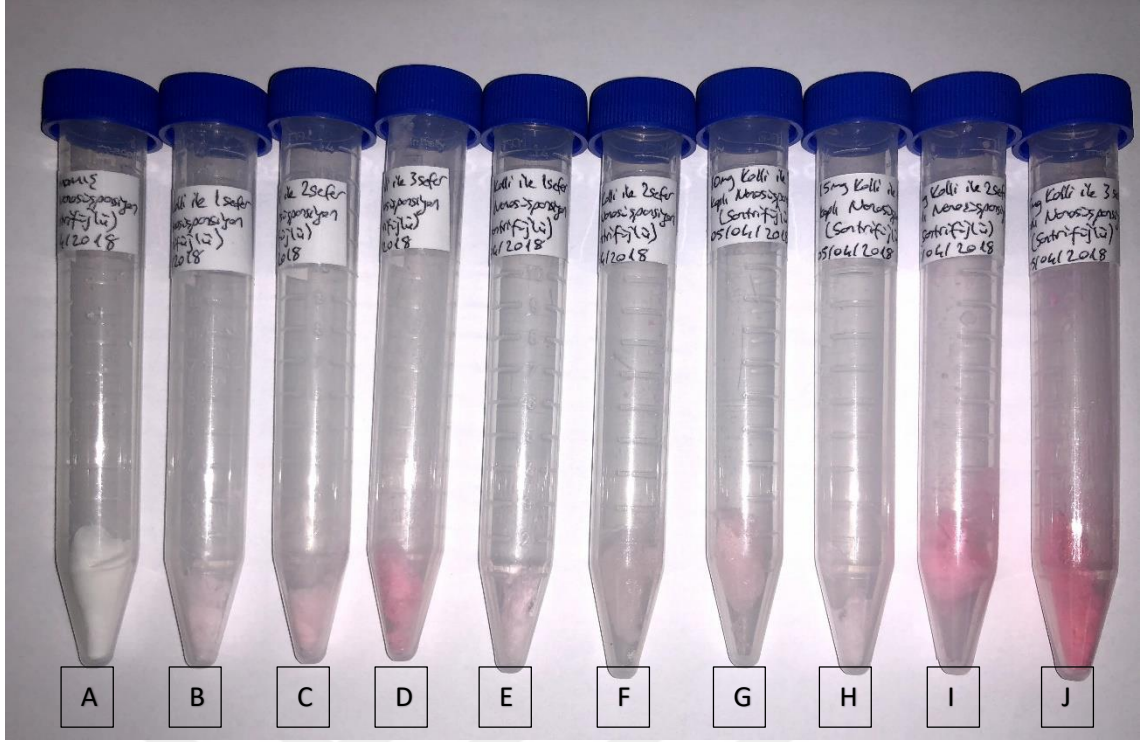
Nanosüspansiyon formülasyonları çalışılırken Kollicoat® MAE 100P'nin etanol içinde hazırlanan çözeltileri daha seyreltik konsantrasyonlarda denenmiştir (2, 4, 6 mg/mL). Nanosüspansiyonların çok sayıda yapılan enterik kaplanması sonrası elde edilen veriler; partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, verimi, enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi açısından değerlendirilmiştir. Sonuçta daha küçük boyutlu, daha yüksek zeta potansiyele sahip, enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve verimi daha yüksek formülasyonun Kollicoat® MAE 100P'nin etanol içindeki

2 mg/mL’lik çözeltisinden 2.5 mL kullanılması ile elde edildiği saptanmış (organik faz:sulu faz oranlarındaki 1:1 uyumu sağlamak üzere) ve bu oranlara karar verilmiştir. Burada mL’nin belirlenmesinde elde edilen nanosüspansiyonların hacminin yaklaşık 2.5 mL olmasıdır. Üst üste yapılan enterik kaplamalar neticesinde de verimi en yüksek olan bir defa kaplamaya karar verilmiştir.

Üst üste 2 ve 3 defa enterik kaplama yapılan formülasyonların liyofilizasyon sonrası görüntüleri aşağıda Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.9. İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri (Liyofilizasyon sonrası)
A) 1 defa kaplama B) Üst üste 2 defa kaplama C) Üst üste 3 defa kaplama



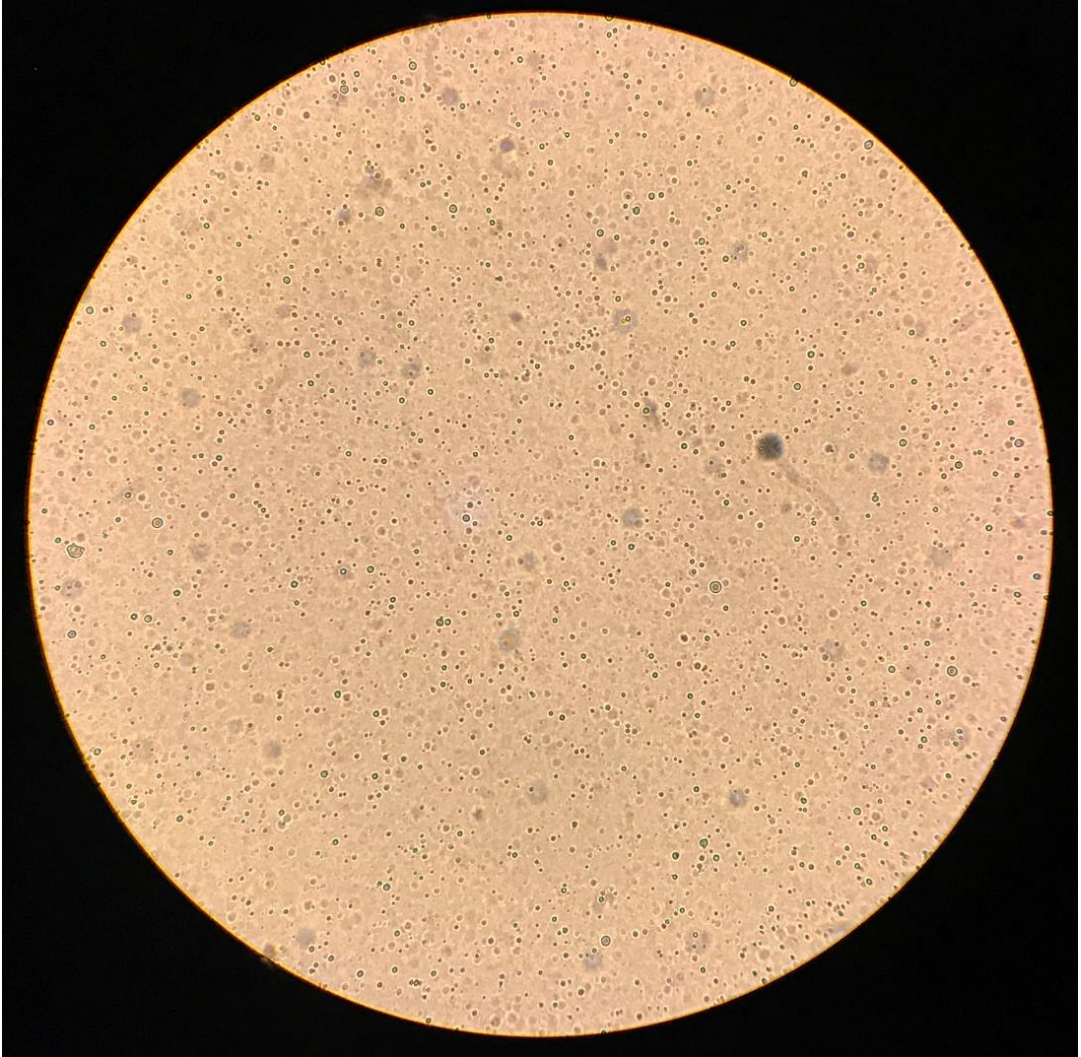
Şekil 4.10. İndometazin nanosüspansiyonları (Liyofilizasyon sonrası). A) Kaplanmamış nanosüspansiyon B) 2 mg/mL Kollicoat® ile 1 defa kaplama C) 2 mg/mL Kollicoat® ile 2 defa kaplama D) 2 mg/mL Kollicoat® ile 3 defa kaplama E) 4 mg/mL Kollicoat® ile 1 defa kaplama F) 4 mg/mL Kollicoat® ile 2 defa kaplama G) 4 mg/mL Kollicoat® ile 3 defa kaplama H) 6 mg/mL Kollicoat® ile 1 defa kaplama I) 6 mg/mL Kollicoat® ile 2 defa kaplama J) 6 mg/mL Kollicoat® ile 3 defa kaplama

4.6. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması

Bölüm 3.9’da anlatıldığı şekliyle PLGA (50:50, MA~19.000 Da) polimeri kullanılarak nanopartiküler sistemler ve bunların Kollicoat® MAE 100P ile enterik kaplanması gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda indometazin içeren nanosüspansiyonlar ve yine bu nanosüspansiyonların Kollicoat® MAE 100P ile enterik kaplanması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Bölüm 3.9.1’de anlatıldığı gibi nanopartiküller hazırlanmıştır. Şekillerinin küresel olduğu saptanmıştır. Bu formülasyona ait 100x büyütme gücünde çekilen optik mikroskop görüntüsü aşağıda Şekil 4.11’de verilmiştir.



Şekil 4.11. İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait optik mikroskop görüntüsü (100x)

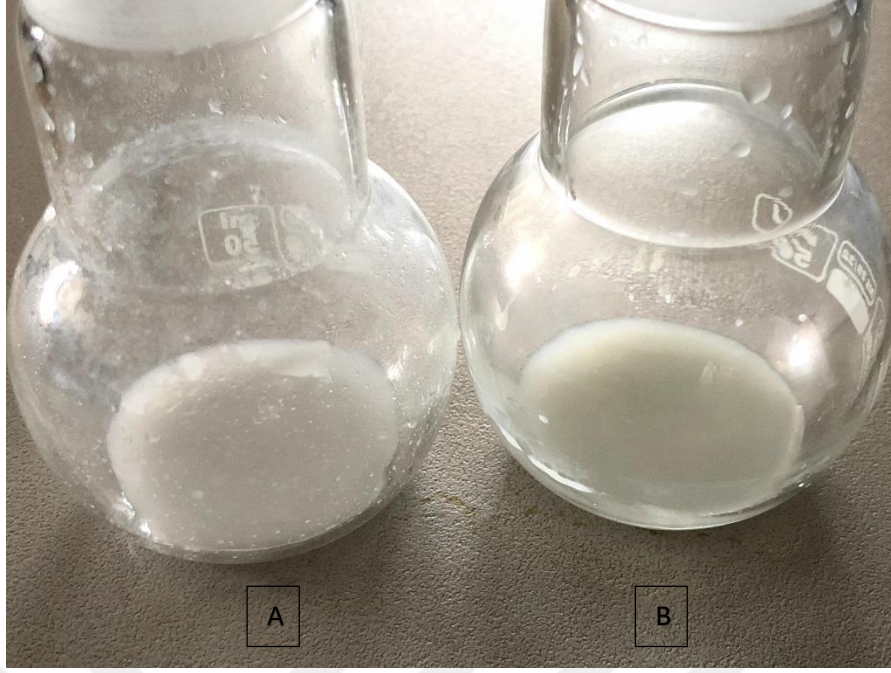
4.6.2. Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bölüm 3.9.2’de anlatıldığı gibi nanopartiküller hazırlanmıştır. Şekillerinin küresel olduğu saptanmıştır. Bu formülasyona ait 100x büyütme gücünde çekilen optik mikroskop görüntüsü aşağıda Şekil 4.12’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Boş nanopartiküllere ait optik mikroskop görüntüsü (100x)

Hazırlık safhasında indometazin yüklü-PLGA ve boş nanopartiküllere ait görüntüler Şekil 4.13’te verilmiştir.



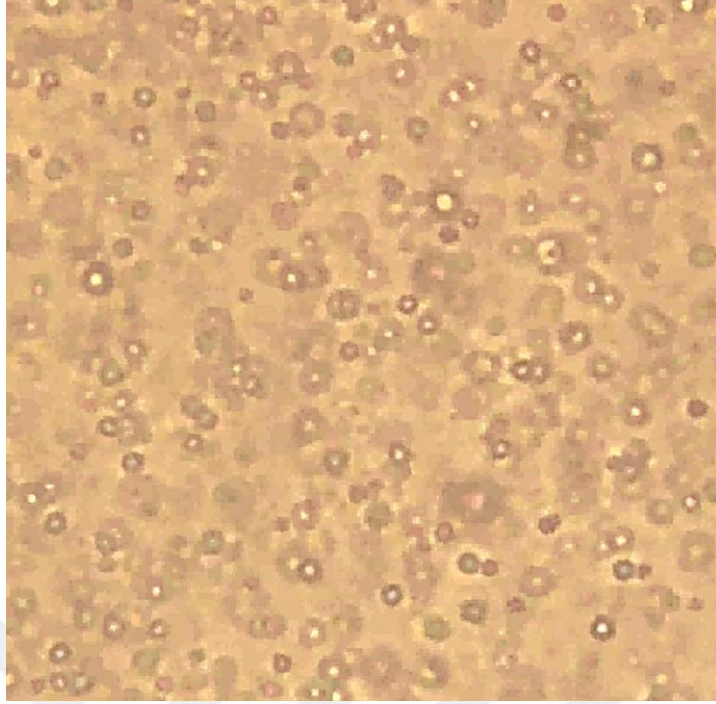
Şekil 4.13. Liyofilizasyon öncesi görüntüler

A) Boş nanopartiküller B) İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri

4.6.3. Enterik Kaplı İndometazin yüklü-PLGA Nanopartiküllerinin

Hazırlanması

Elde edilen kırmızı küre şeklindeki enterik kaplanmış nanopartiküllere ait optik mikroskop görüntüsü Şekil 4.14'te verilmiştir. Görüntü optik mikroskop kullanılarak 200x büyütme gücü ile çekilmiştir. Damlatma süresi bittikten sonra organik çözücünün buharlaştırılmasından sonra elde edilen enterik kaplanmış ve kaplanmamış nanopartikül formülasyonlarına ait görüntü ise aşağıda Şekil 4.15'te verilmiştir.



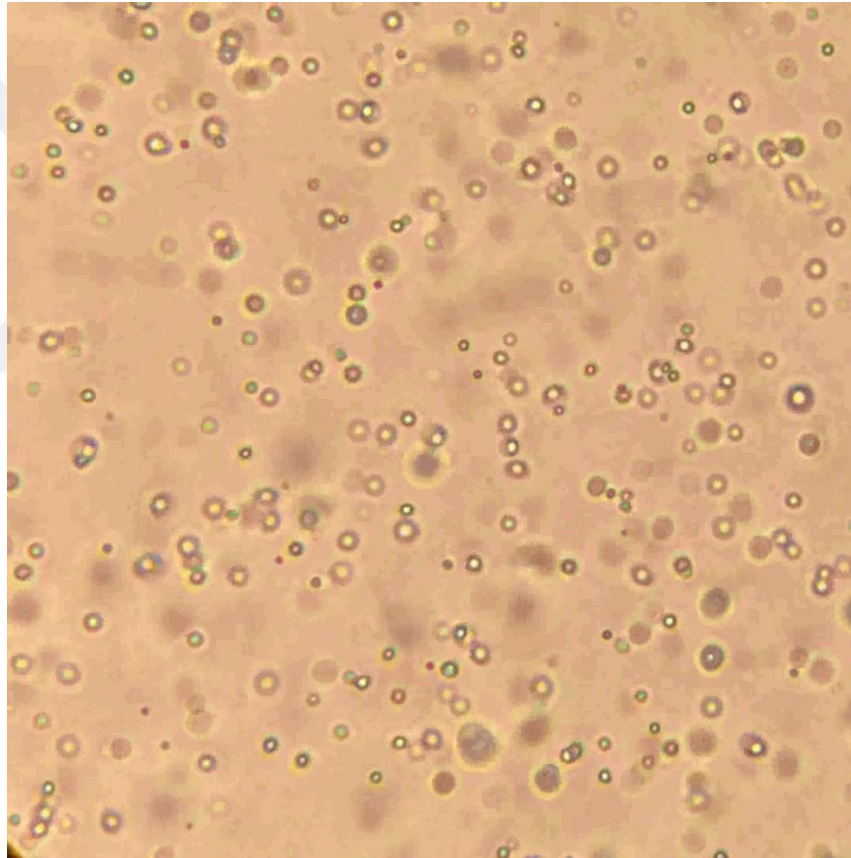
Şekil 4.14. Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait optik mikroskop görüntüsü (200x)



Şekil 4.15. Liyofilizasyon öncesi kaplanmış ve kaplanmamış indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri

4.6.4. Enterik Kaplı Boş Nanopartiküllerin Hazırlanması

Bölüm 3.9.4’te anlatıldığı gibi yalnız PLGA polimeri kullanılarak hazırlanmış olan boş nanopartiküller, devamlı karıştırılan Kollicoat® MAE 100P çözeltisine damlatılarak enterik kaplama gerçekleştirilmiş ve sonuçta nanopartiküler sistemler kaplanmıştır. Oldukça küçük boyutlu kırmızı küre şeklindeki kaplanmış boş nanopartiküllere ait optik mikroskop görüntüsü Şekil 4.16’da verilmiştir. Görüntü optik mikroskopta 200x büyütme gücü ile çekilmiştir.



Şekil 4.16. Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait optik mikroskop görüntüsü (200x)

4.6.5. İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması

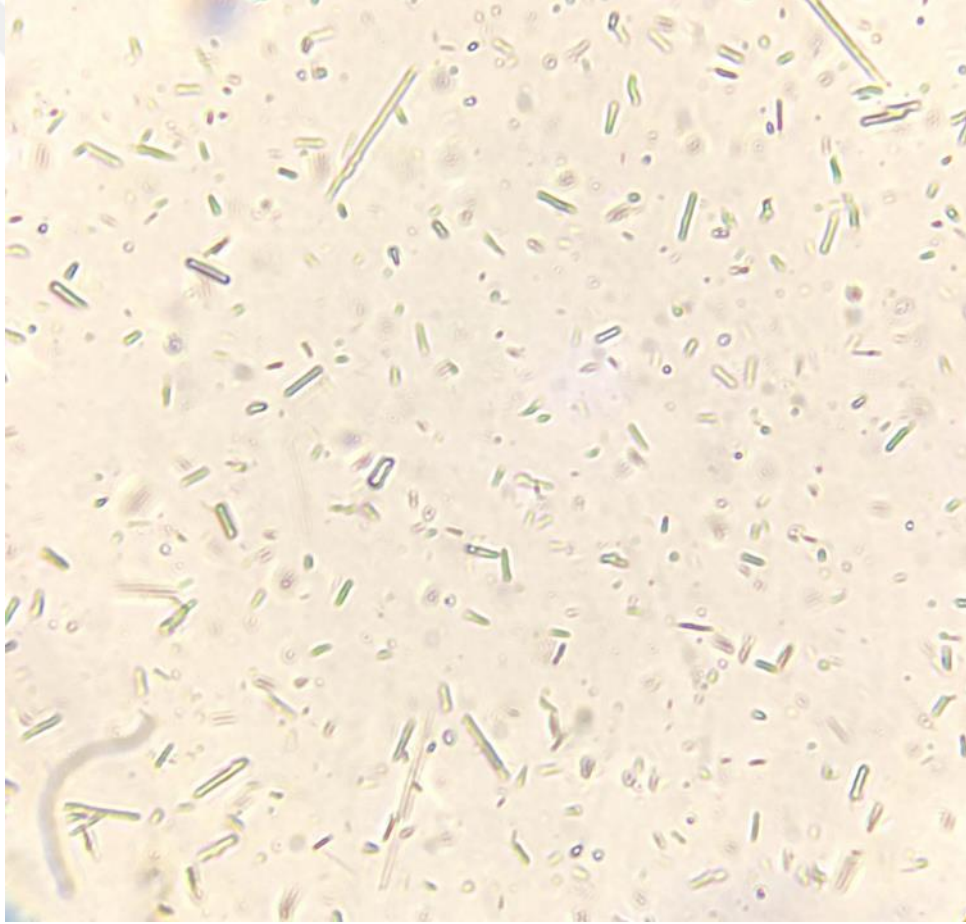
Bölüm 3.9.5’te bahsedildiği gibi taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın hazırlanan indometazin nanosüspansiyonları hazırlanmıştır. Çubuk şeklindeki nanosüspansiyonların optik mikroskop ile 100x büyütme gücünde çekilen görüntüsü aşağıda Şekil 4.17’de verilmiştir.



Şekil 4.17. İndometazin nanosüspansiyonlarına ait optik mikroskop görüntüsü (100x)

4.6.6. Enterik Kaplı İndometazin Nanosüspansiyonlarının Hazırlanması

Formülasyon geliştirme çalışmaları sonunda optimum verimin elde edildiği en iyi kaplama oranı olarak 2 mg/mL seçilmiş ve Kollicoat® MAE 100P ile enterik kaplı nanosüspansiyonlar oluşturulmuştur. Kaplanmamış nanosüspansiyonlara göre daha küçük boyutlu yine çubuk şeklinde nanosüspansiyonlar elde edilmiştir. Hazırlanan enterik kaplı nanosüspansiyonlara ait optik mikroskop ile 200x büyütme gücünde çekilen görüntü aşağıda Şekil 4.18’de verilmiştir.



Şekil 4.18. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait optik mikroskop görüntüsü (200x)

In vitro ve *in vivo* deneylerde kullanılmak üzere geliştirilen tüm formülasyonlar ve bu formülasyonları oluşturan bileşen ve oranları aşağıda Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Geliştirilen formülasyonlar ve formülasyon bileşenleri (mg)

Formülasyonlar	İndometazin	PVA	PLGA	Kollicoat® MAE 100P
Boş nanopartiküller	-	2.5	25	-
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	5	2.5	25	-
Kaplı boş nanopartiküller	-	2.5	25	50
Kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	5	2.5	25	50
İndometazin nanosüspansiyonu	5	2.5	-	-
Kaplı indometazin nanosüspansiyonu	5	2.5	-	5

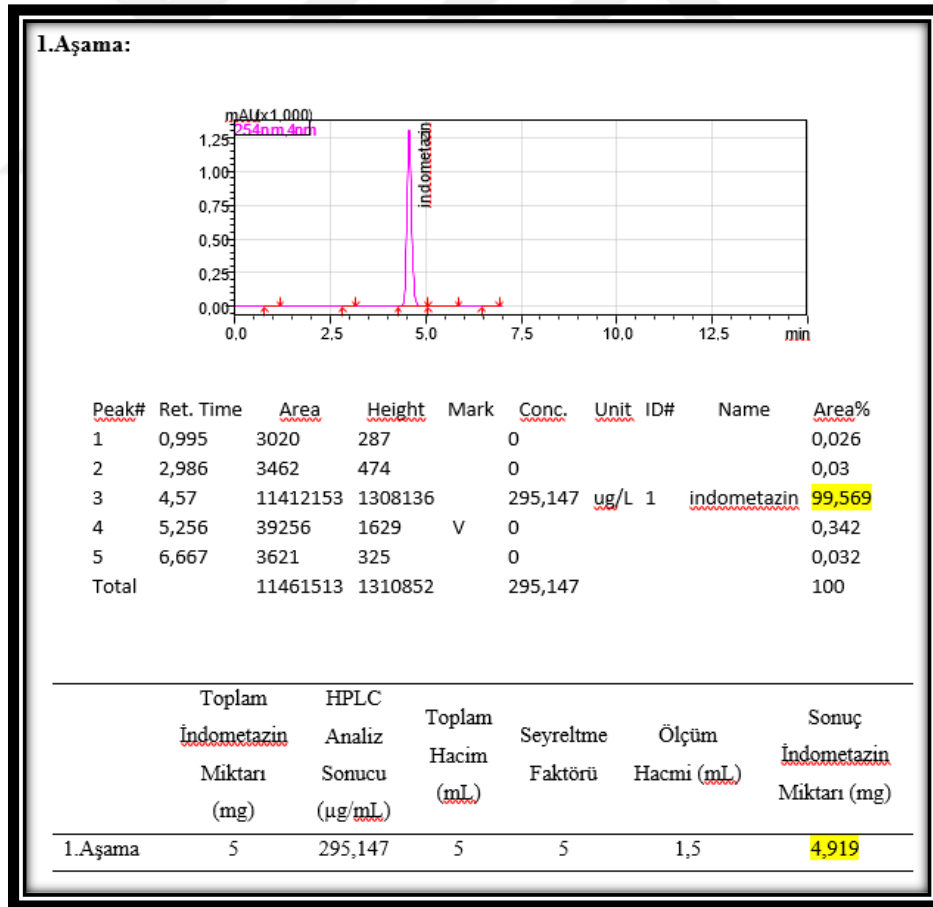
4.7. İşlem Validasyonu

Formülasyon geliştirme aşamasında:

1. İndometazinin organik çözelti içindeki stabilitesi,
2. İndometazinin organik faz:sulu faz birleşmesi sonucu stabilitesi,
3. İndometazinin organik çözücünün uçurulması sonrası stabilitesi,
4. İndometazinin enterik kaplama çözeltisi içindeki stabilitesi incelenmiştir.

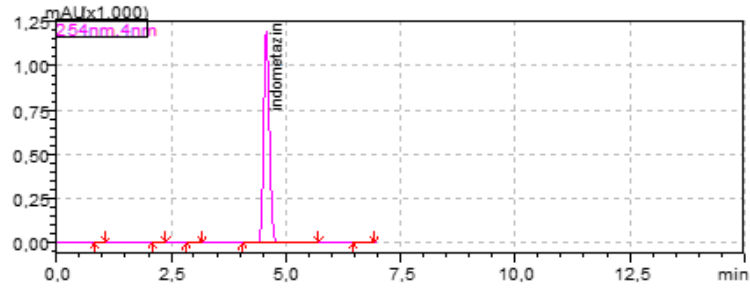
4.7.1. Nanopartiküler Sistemler

PLGA polimeri kullanılarak hazırlanmış olan indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait işlem aşamaları stabilite yönünden ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sonuçlar aşağıda Şekil 4.19 - 4.21’de verilmiştir.



Şekil 4.19. Nanopartikül hazırlamada 1.aşama sonrası indometazinin stabilitesi

2.Aşama:

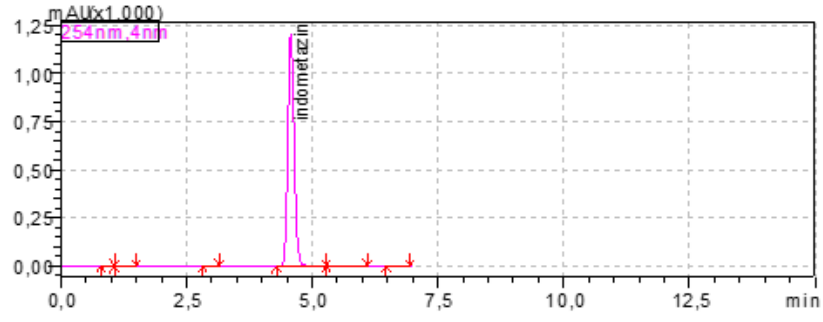


Peak#	Ret. Time	Area	Height	Mark	Conc.	Unit	ID#	Name	Area%
1	0,992	1456	183	0					0,014
2	2,206	1033	164	0					0,01
3	2,991	3165	430	0					0,03
4	4,576	10419976	1195650		269,596	ug/L	1	indometazin	99,914
5	6,677	3321	287	0					0,032
Total		10428950	1196715		269,596				100

Toplam <u>İndometazin</u> Miktarı (mg)	HPLC Analiz Sonucu (<u>µg/mL</u>)	Toplam Hacim (<u>mL</u>)	Seyreltme Faktörü	Ölçüm Hacmi (<u>mL</u>)	Sonuç <u>İndometazin</u> Miktarı (mg)	
2.Aşama	5	269,596	5	5	1,5	4,493

Şekil 4.20. Nanopartikül hazırlamada 2.aşama sonrası indometazinin stabilitesi

3.Aşama:



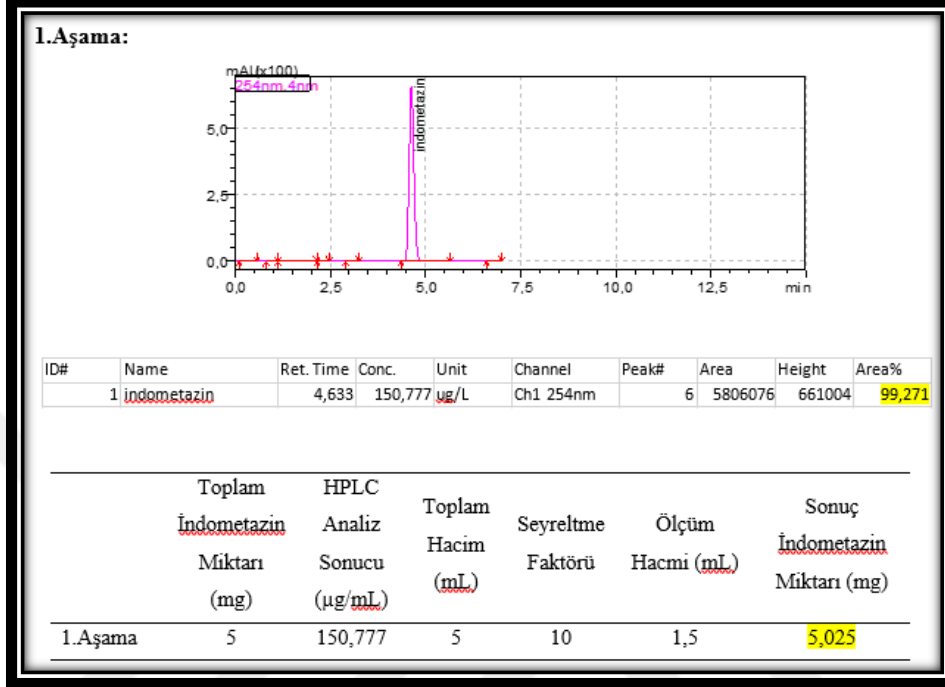
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Mark	Conc.	Unit	ID#	Name	Area%
1	0,985	1325	168		0				0,013
2	1,343	2231	198	V	0				0,021
3	2,986	3128	431		0				0,03
4	4,575	10489421	1205419		271,384	ug/L	1	indometazin	99,633
5	5,568	28630	1204	V	0				0,272
6	6,674	3326	289		0				0,032
Total		10528060	1207709		271,384				100

Toplam	HPLC	Toplam	Seyreltme	Ölçüm	Sonuç
İndometazin	Analiz	Hacim	Faktörü	Hacmi (mL)	İndometazin
Miktarı	Sonucu	(mL)			Miktarı (mg)
(mg)	(µg/mL)				
3.Aşama	5	271,384	5	1,5	4,523

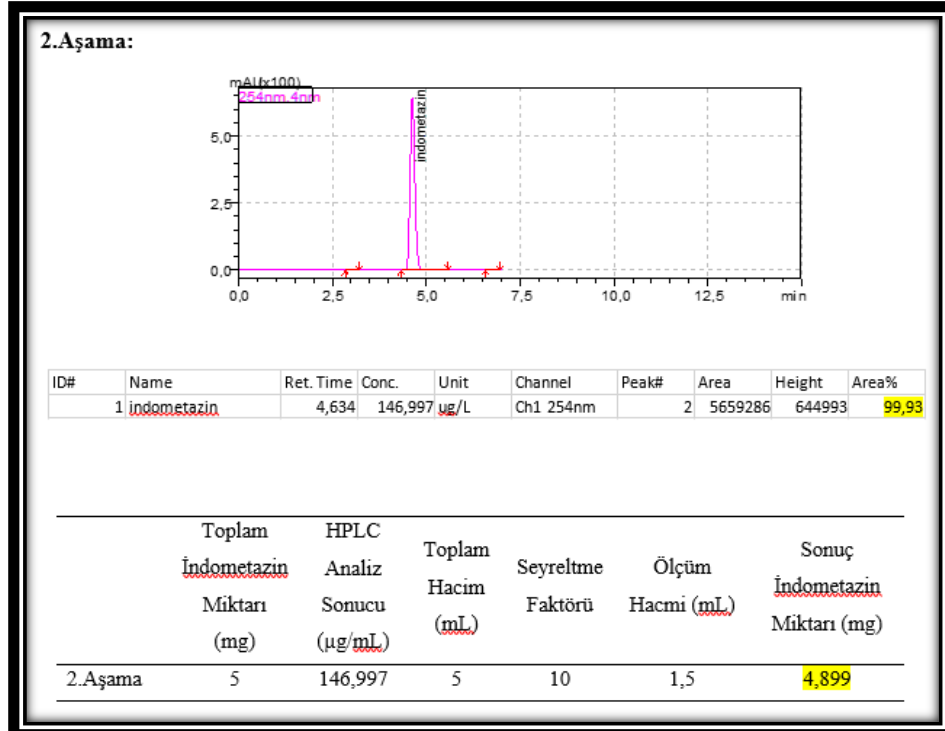
Şekil 4.21. Nanopartikül hazırlamada 3.aşama sonrası indometazinin stabilitesi

4.7.2. İndometazin Nanosüspansiyonları

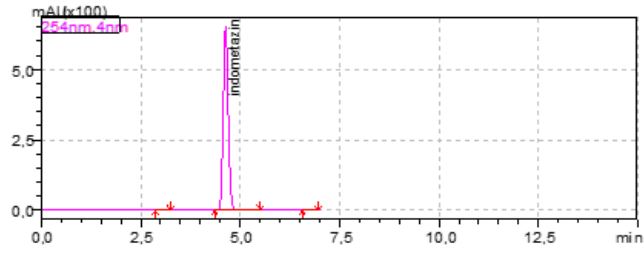
İndometazin nanosüspansiyonlarına ait işlem aşamaları stabilite yönünden ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sonuçlar aşağıda Şekil 4.22 - 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.22. Nanosüspansiyon hazırlamada 1.aşama sonrası indometazinin stabilitesi



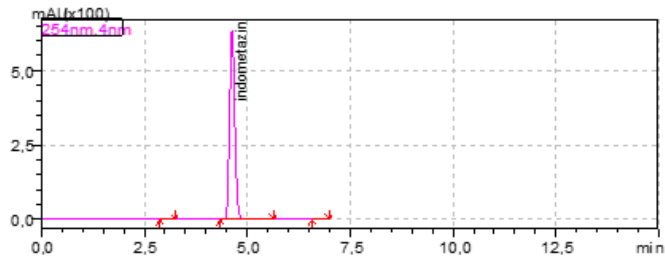
Şekil 4.23. Nanosüspansiyon hazırlamada 2.aşama sonrası indometazinin stabilitesi

3.Aşama:

ID#	Name	Ret. Time	Conc.	Unit	Channel	Peak#	Area	Height	Area%
1	indometazin	4,635	148,05	µg/L	Ch1 254nm	2	5700173	649692	99,931

	Toplam İndometazin Miktarı (mg)	HPLC Analiz Sonucu (µg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Seyreltme Faktörü	Ölçüm Hacmi (mL)	Sonuç İndometazin Miktarı (mg)
3.Aşama	5	148,05	5	10	1,5	4,935

Şekil 4.24. Nanosüspansiyon hazırlamada 3.aşama sonrası indometazinin stabilitesi

4.Aşama:

ID#	Name	Ret. Time	Conc.	Unit	Channel	Peak#	Area	Height	Area%
1	indometazin	4,632	144,791	µg/L	Ch1 254nm	2	5573637	636633	99,927

	Toplam İndometazin Miktarı (mg)	HPLC Analiz Sonucu (µg/mL)	Toplam Hacim (mL)	Seyreltme Faktörü	Ölçüm Hacmi (mL)	Sonuç İndometazin Miktarı (mg)
4.Aşama	5	144,791	5	10	1,5	4,826

Şekil 4.25. Nanosüspansiyon hazırlamada 4.aşama sonrası indometazinin stabilitesi

4.8. Geliştirilen Formülasyonların Fiziksel Özellikleri

4.8.1. Formülasyonlardaki Etkin Madde Miktarının Tayini

Nanopartiküler sistemlerin ve nanosüspansiyon formülasyonların içerdikleri indometazine ait miktar tayini HPLC yöntemi ile belirlenmiş, Bölüm 3.11.1’de anlatıldığı şekilde valide edilmiştir. Formülasyonlara ait miktar tayini sonuçları aşağıda Tablo 4.8’de verilmiştir.

Miktar tayini sonucu sistemlerin % EE değerleri ve % YK değerleri Bölüm 3.11.1’de verilen eşitlikler ile hesaplanmıştır. Sonuçları ise aşağıda Tablo 4.9’da verilmiştir.

4.8.2. Formülasyonların Veriminin Tayini

Liyofilizasyon sonrası elde edilen nanopartiküler sistemlerin % V değerleri Bölüm 3.11.2’de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar aşağıda Tablo 4.9’da verilmiştir.

Tablo 4.9. Hazırlanan formülasyonlara ait indometazin miktar tayini sonuçları (mg)

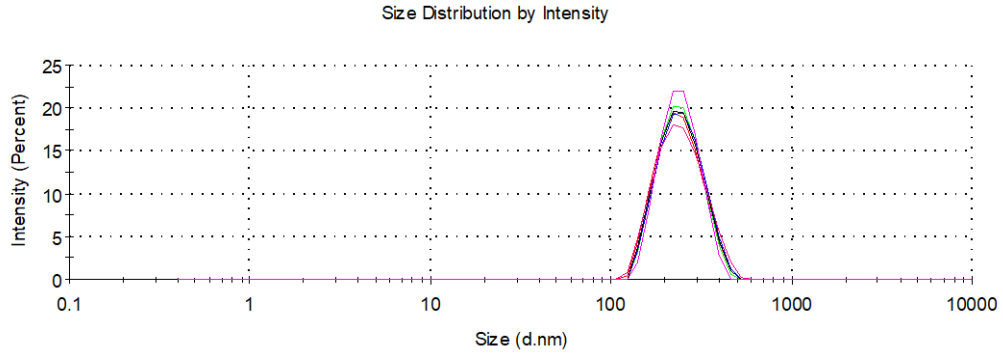
n	İndometazin yükü-PLGA nanopartikülleri	Enterik kaplı indometazin yükü-PLGA nanopartikülleri	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
1	3.510	4.416	3.224	4.334
2	3.348	4.028	3.872	4.424
3	4.010	4.358	3.655	4.388
4	3.563	4.355	3.297	4.490
5	3.862	4.419	3.893	4.690
6	4.145	4.324	3.957	4.436
$\bar{X}$	3.740 ± 0.313	4.317 ± 0.146	3.650 ± 0.319	4.460 ± 0.124

Tablo 4.10. İndometazin içeren ve içermeyen formülasyonların % EE, % YK ve % V sonuçları (n=6)

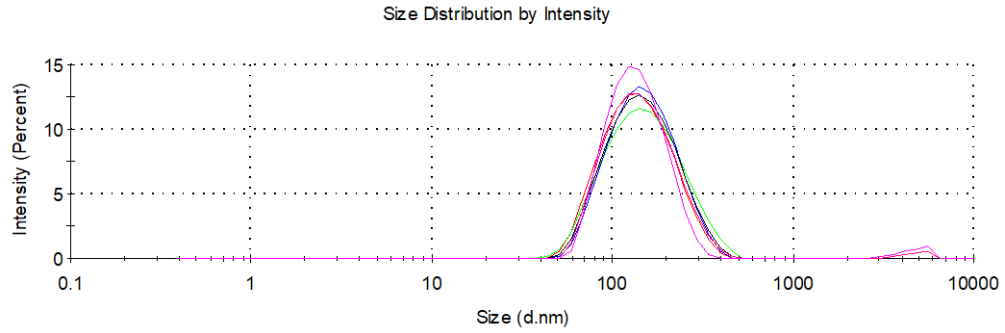
Formülasyonlar	% EE	% YK	% V
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	72.45 ± 6.26	17.49 ± 0.91	65.7 ± 3.23
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	86.33 ± 2.92	6.16 ± 0.33	85.2 ± 4.53
İndometazin nanosüspansiyonu	72.99 ± 6.38	-	84.2 ± 4.42
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	89.21 ± 2.48	-	91.2 ± 3.58
Boş nanopartiküller	-	-	69.3 ± 5.46
Enterik kaplı boş nanopartiküller	-	-	71.5 ± 4.38

4.8.3. Partikül Boyutu ve Dağılımı Tayini

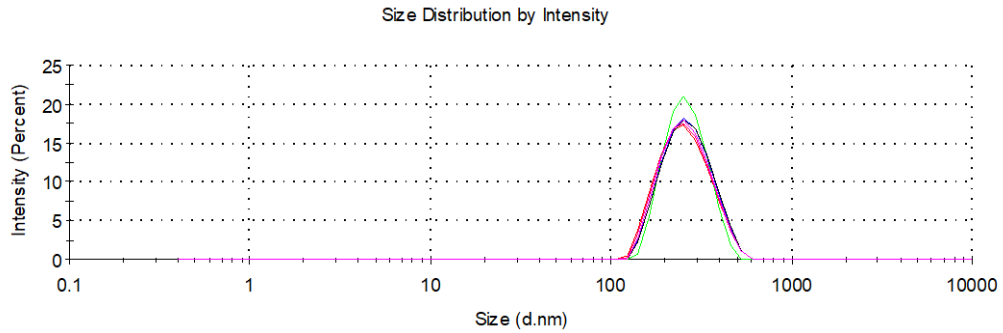
Bölüm 3.11.3'te anlatıldığı gibi formülasyonların partikül boyutu ve dağılım analizi yapılmıştır (Şekil 4.26 - 4.31, Tablo 4.10).



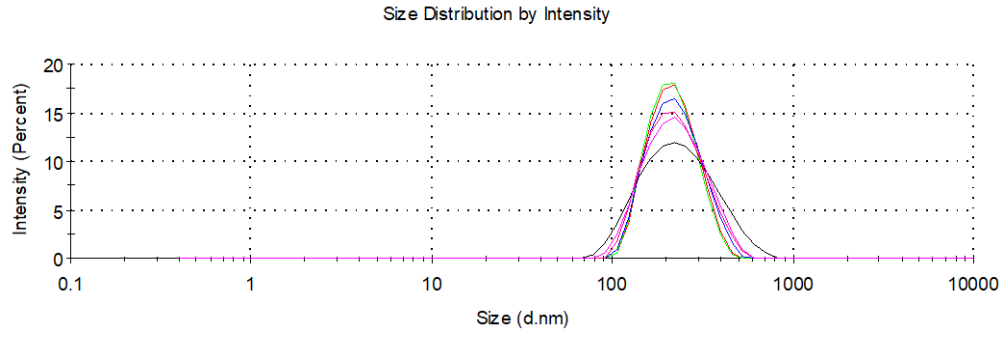
Şekil 4.26. Boş nanopartiküllere ait partikül boyutu dağılımı grafiği (n=6)



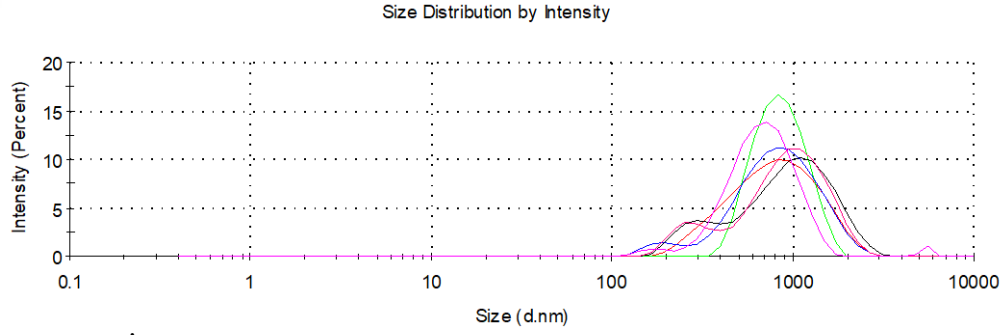
Şekil 4.27. Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait partikül boyutu dağılımı grafiği (n=6)



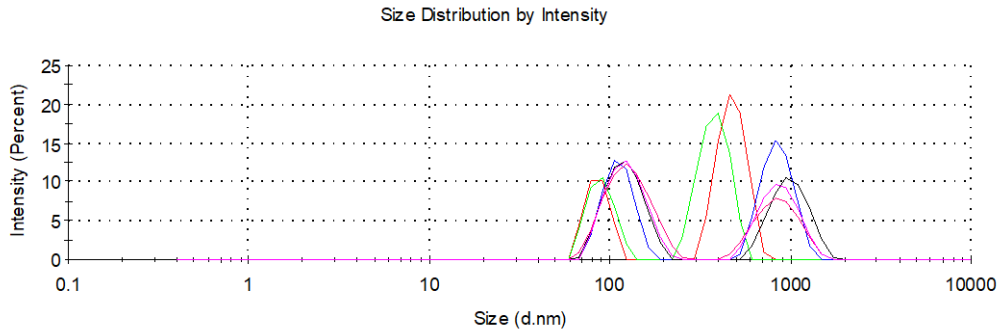
Şekil 4.28. İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait partikül boyutu dağılımı grafiği (n=6)



Şekil 4.29. Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait partikül boyutu dağılımı grafiği (n=6)



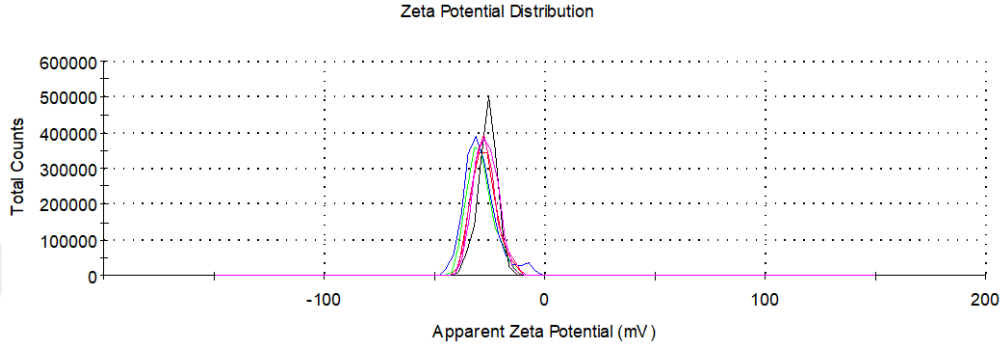
Şekil 4.30. İndometazin nanosüspansiyonlarına ait partikül boyutu dağılımı grafiği (n=6)



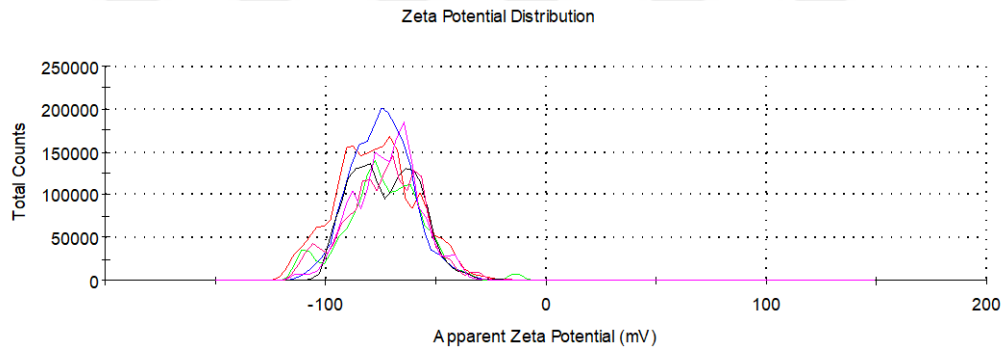
Şekil 4.31. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait partikül boyutu dağılımı grafiği (n=6)

4.8.4. Zeta Potansiyel Tayini

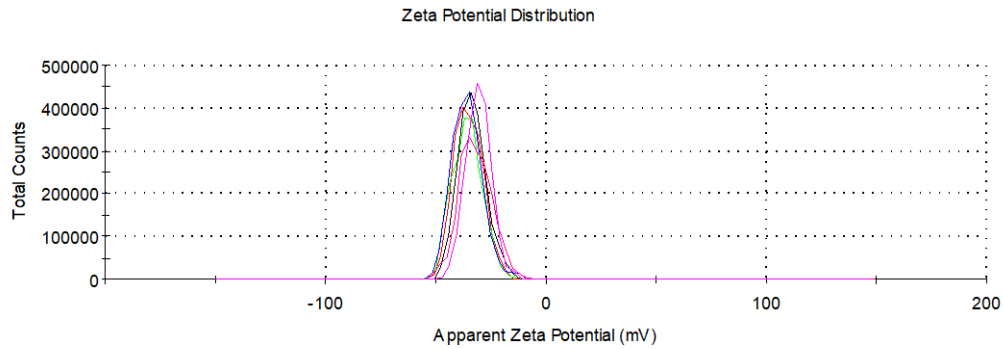
Formülasyonlar hazırlandıktan sonra Zeta Potansiyel ölçümleri Bölüm 3.11.4'te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Zeta Potansiyel ölçümlerine ait grafikler Şekil 4.32 - 4.37'de, sonuçlar ise Tablo 4.10'da verilmiştir.



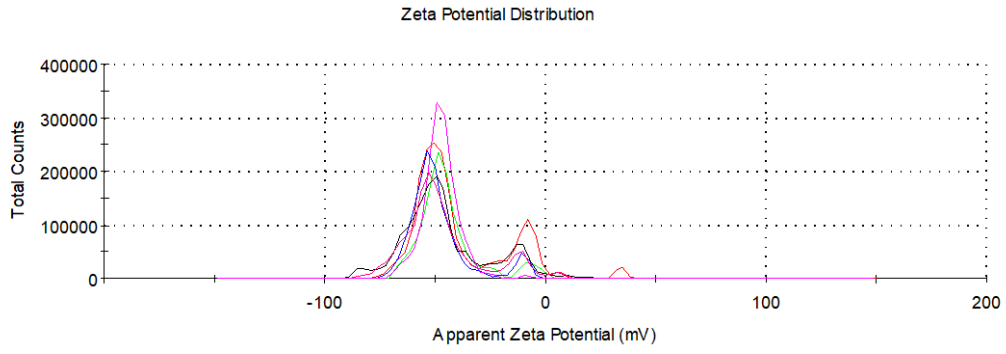
Şekil 4.32. Boş nanopartiküllere ait zeta potansiyel grafiği (n=6)



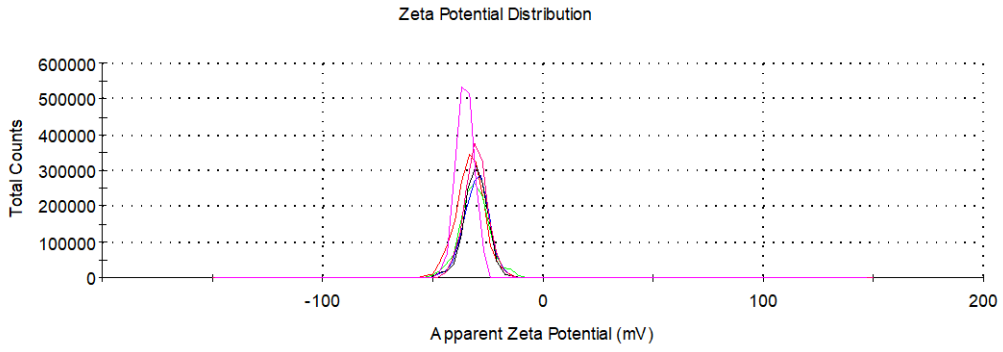
Şekil 4.33. Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait zeta potansiyel grafiği (n=6)



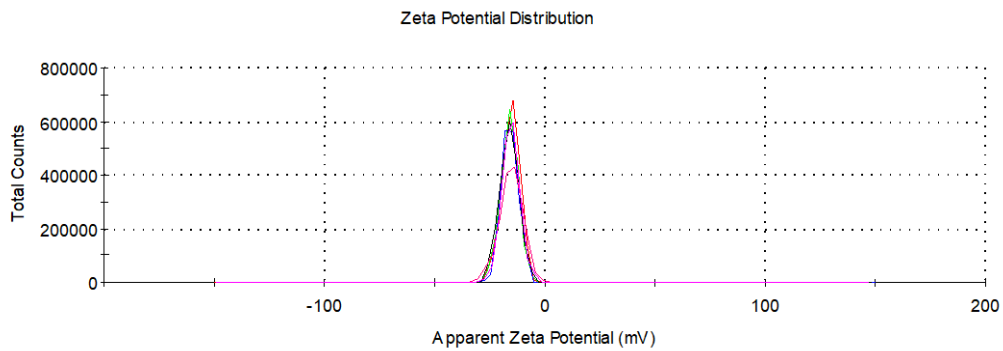
Şekil 4.34. İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel grafiği (n=6)



Şekil 4.35. Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel grafiği (n=6)



Şekil 4.36. İndometazin nanosüspansiyonlarına ait zeta potansiyel grafiği (n=6)



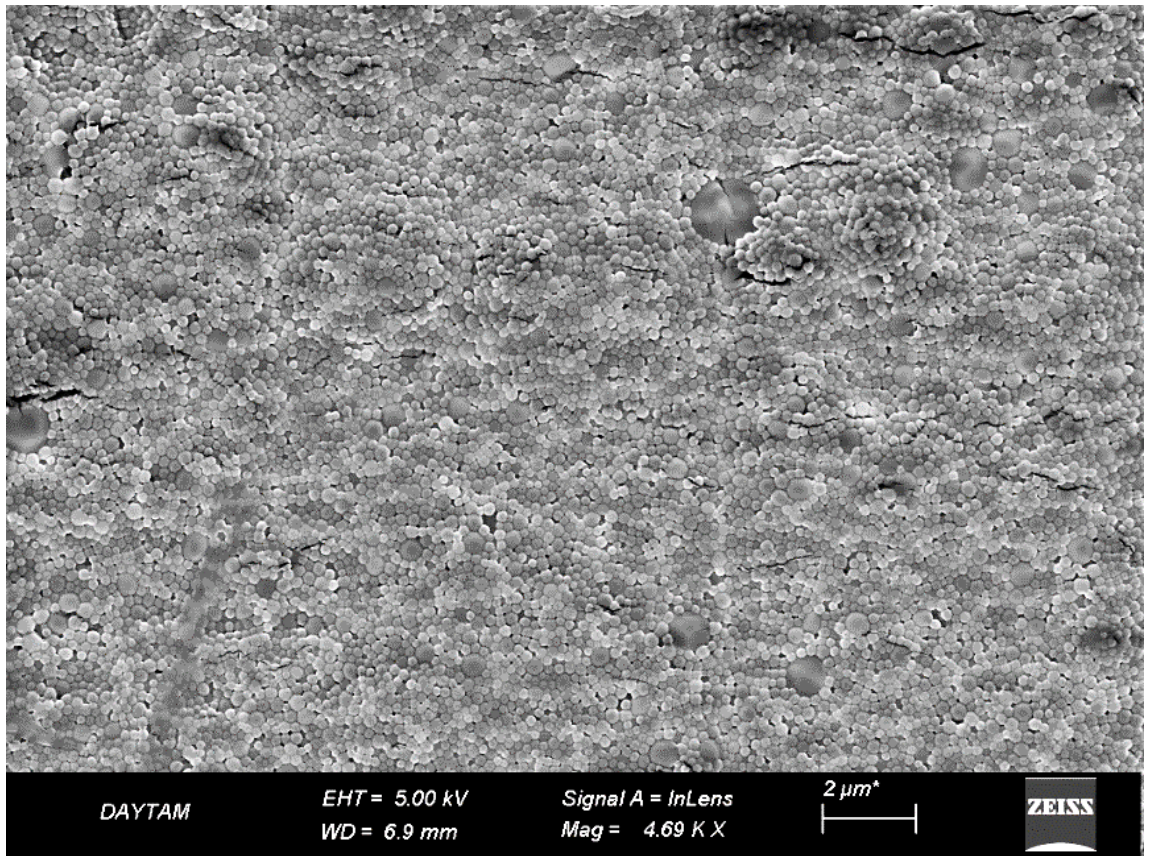
Şekil 4.37. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait zeta potansiyel grafiği (n=6)

Tablo 4.11. İndometazin içeren ve içermeyen formülasyonların partikül boyutu, PdI ve zeta potansiyel sonuçları (n=6)

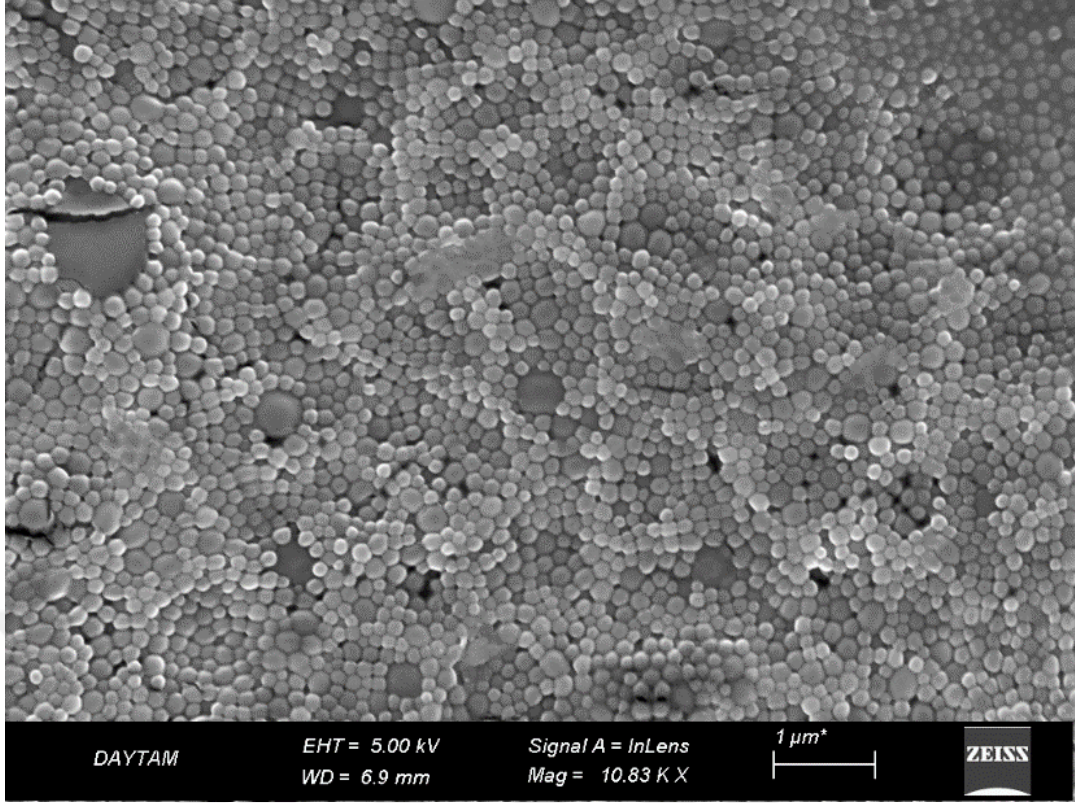
Formülasyonlar	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	245.73 ± 3.92	0.15 ± 0.03	-45.47 ± 1.46
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	192.55 ± 1.95	0.14 ± 0.02	-54.37 ± 1.14
İndometazin nanosüspansiyonu	504.12 ± 23.84	0.27 ± 0.06	-20.15 ± 0.80
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	429.98 ± 28.17	0.53 ± 0.06	-26.80 ± 1.50
Boş nanopartiküller	234.17 ± 3.76	0.11 ± 0.03	-39.45 ± 3.97
Enterik kaplı boş nanopartiküller	139.27 ± 0.88	0.10 ± 0.02	-60.48 ± 2.50

4.8.5. İndometazinin, Piyasada Mevcut Preparatlarının ve İndometazin İçeren/İçermeyen Formülasyonların Yüzey Özelliklerinin Tayini

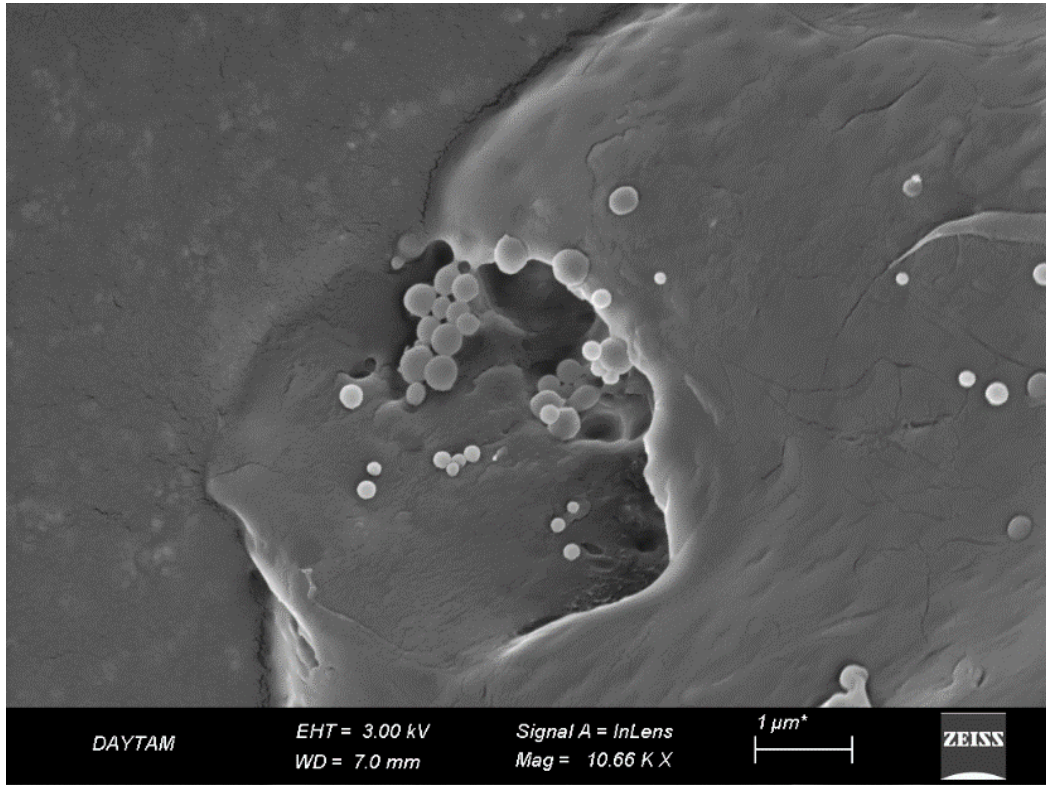
Liyofilize formülasyonların, indometazinin, ticari geleneksel kapsül ve ticari ER kapsülün morfolojik özelliklerini tayin etmek için Bölüm 3.11.5'te anlatıldığı gibi SEM görüntüleri alınmıştır. Formülasyonlara ait SEM görüntüleri aşağıda Şekil 4.38 – 4.46'da verilmiştir.



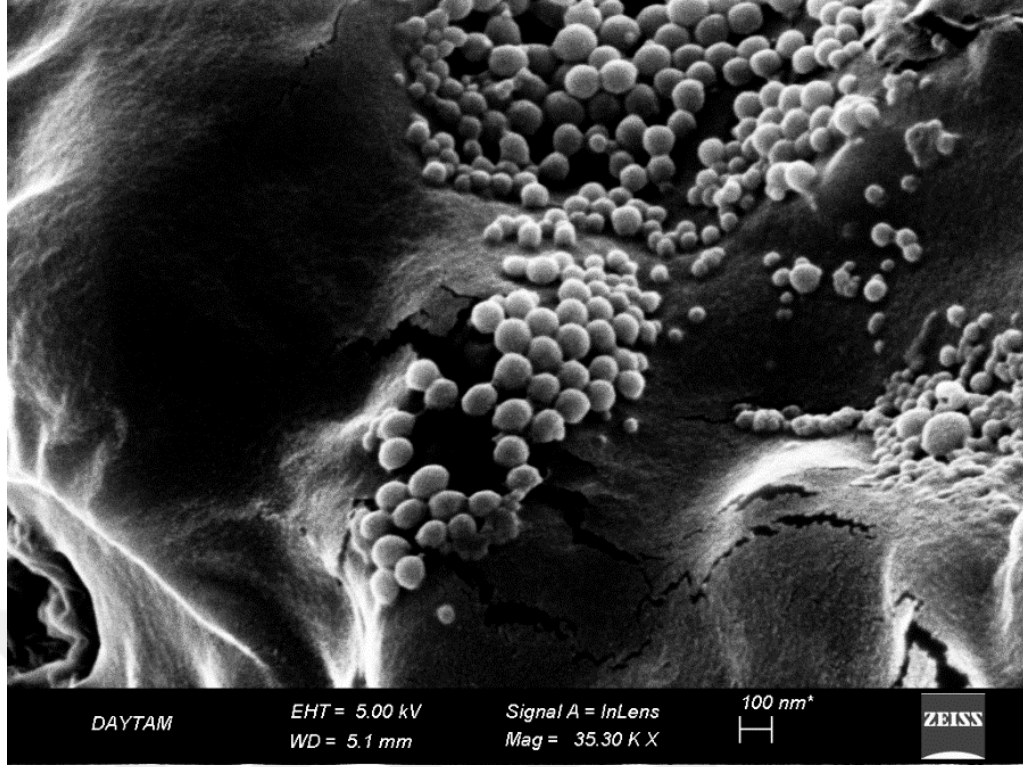
Şekil 4.38. İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri



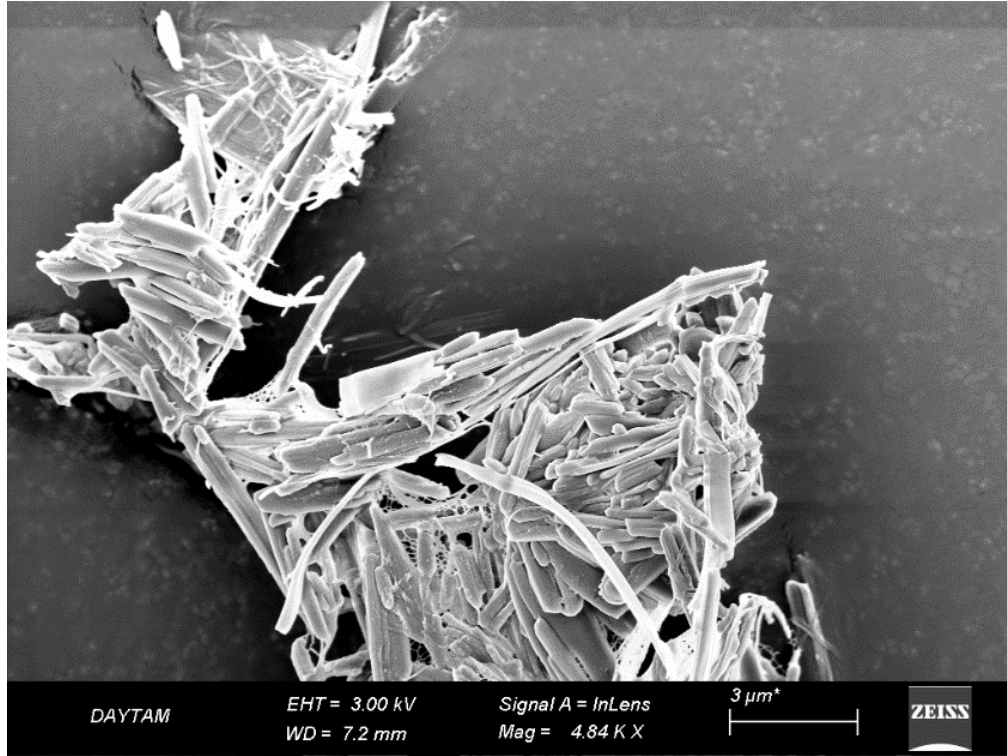
Şekil 4.39. Boş nanopartiküller



Şekil 4.40. Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri



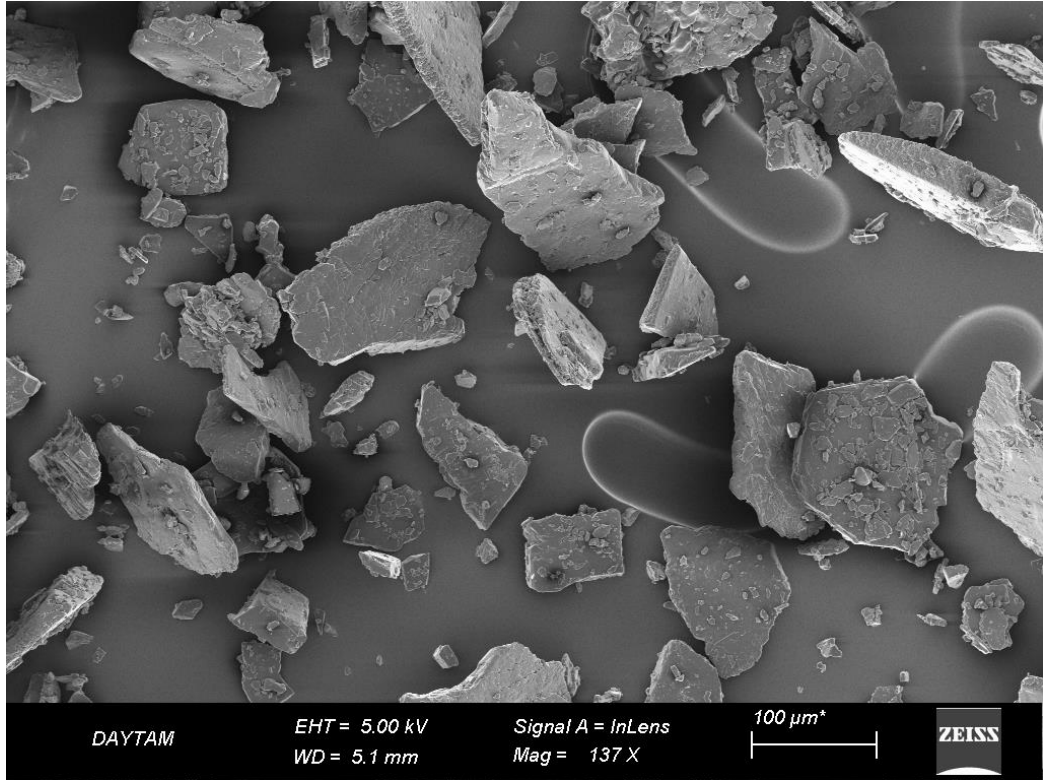
Şekil 4.41. Enterik kaplı boş nanopartiküller



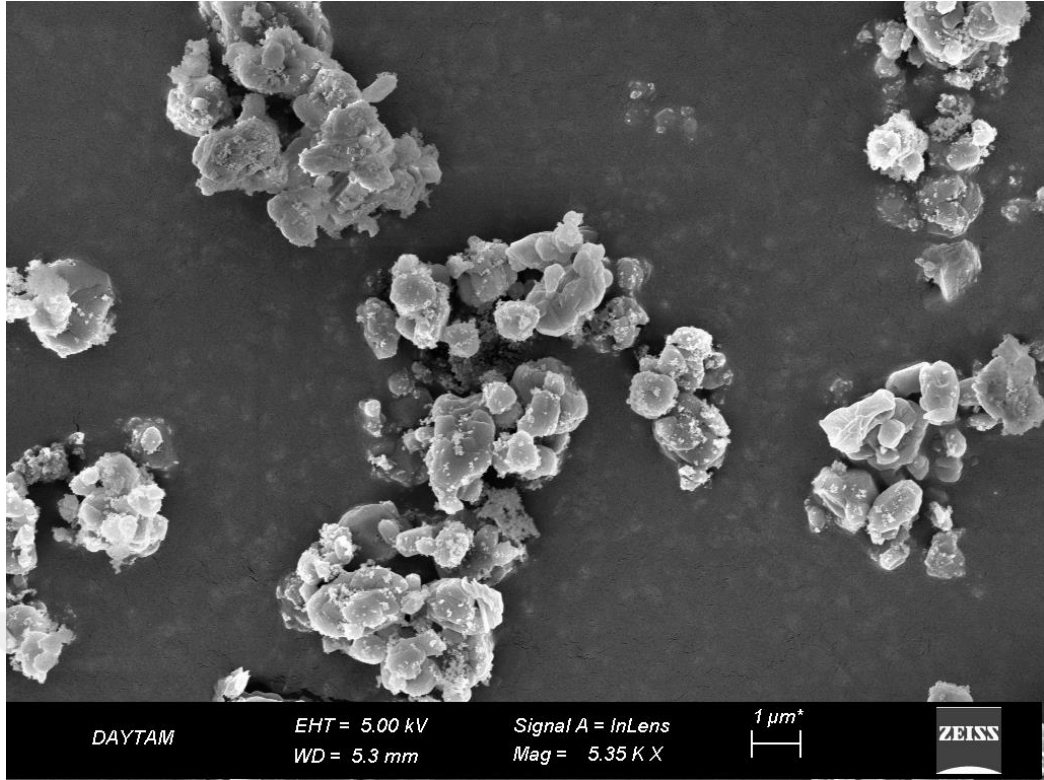
Şekil 4.42. İndometazin nanosüspansiyonu



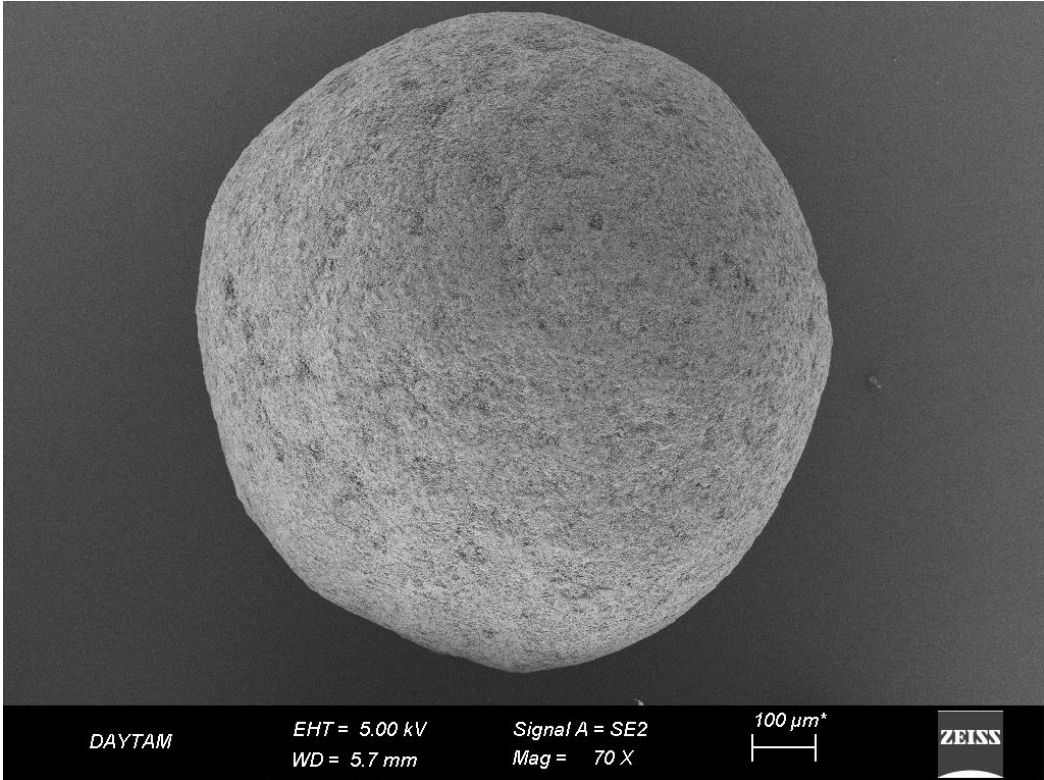
Şekil 4.43. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonunu



Şekil 4.44. İndometazin



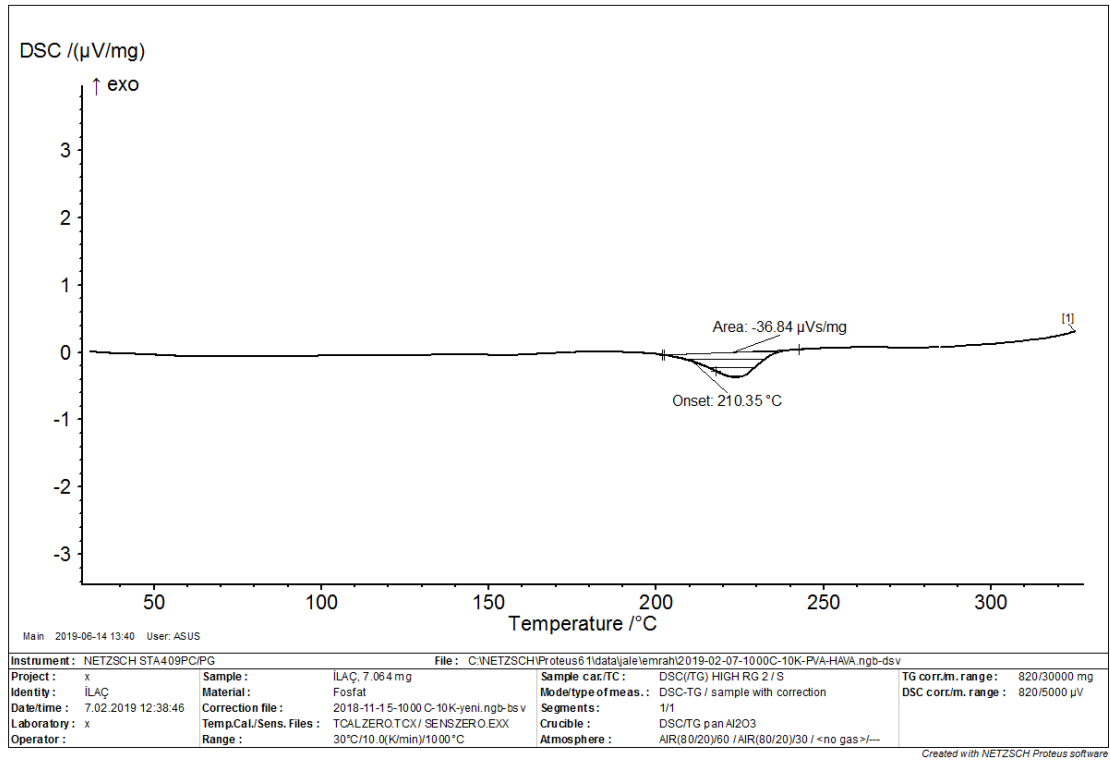
Şekil 4.45. Ticari geleneksel kapsül içinde yer alan toz karışım



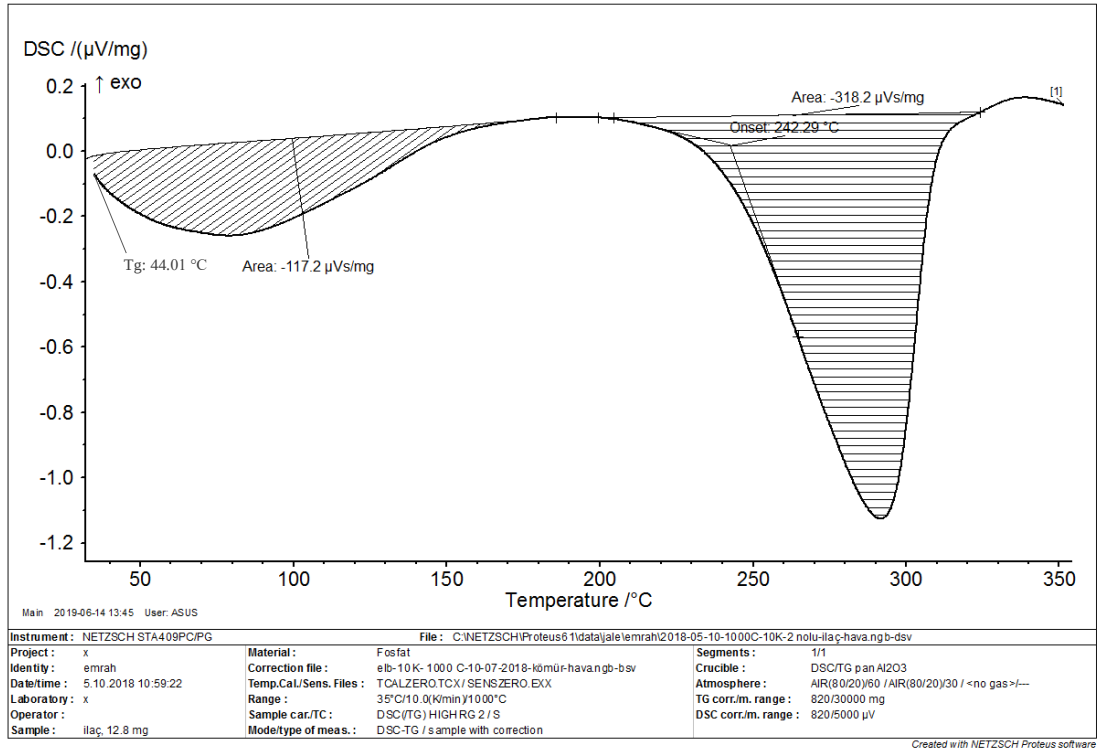
Şekil 4.46. Ticari ER kapsül içinde yer alan pellet

4.8.6. Bileşenlerin ve Formülasyonların DSC Termogramları

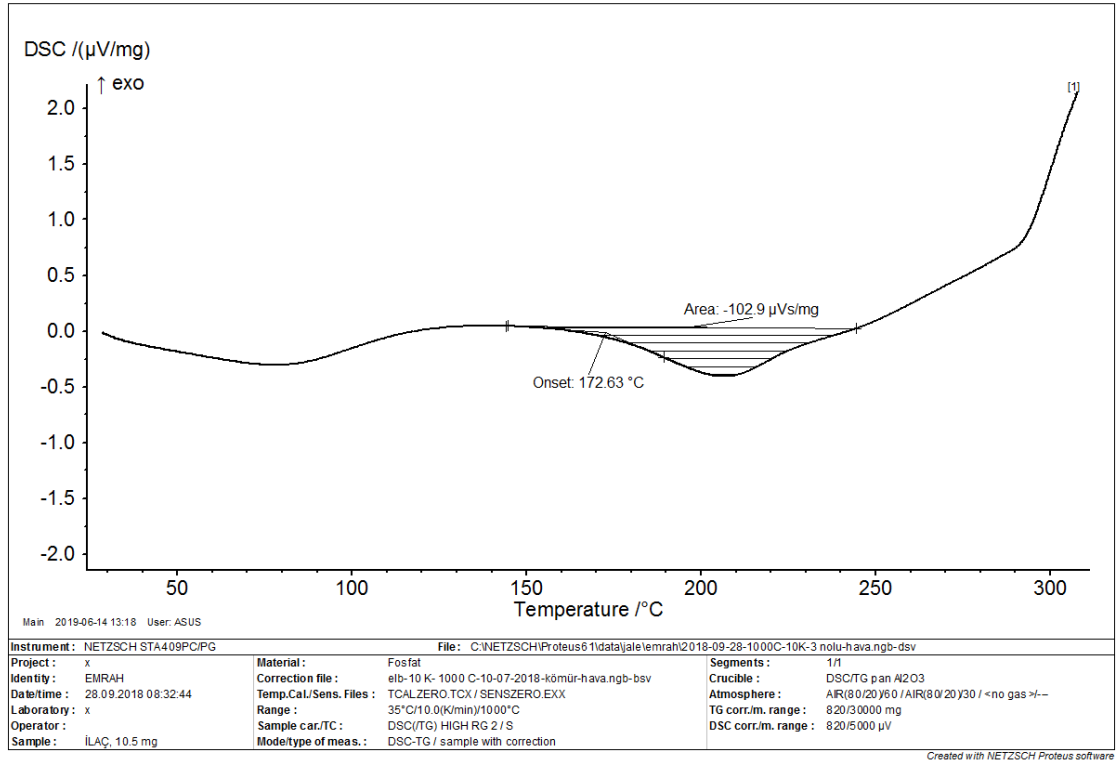
Formülasyonlarda kullanılan bileşenlerin ve geliştirilen nanopartiküler formülasyonların liyofilize örneklerinin, Bölüm 3.11.6’da anlatıldığı şekilde DSC cihazı kullanılarak termogramları alınmıştır. Ölçümler sonucu bileşenlerin, formülasyonların ve fiziksel karışımların elde edilen termogramları aşağıda Şekil 4.47 - 4.61’de verilmiştir.



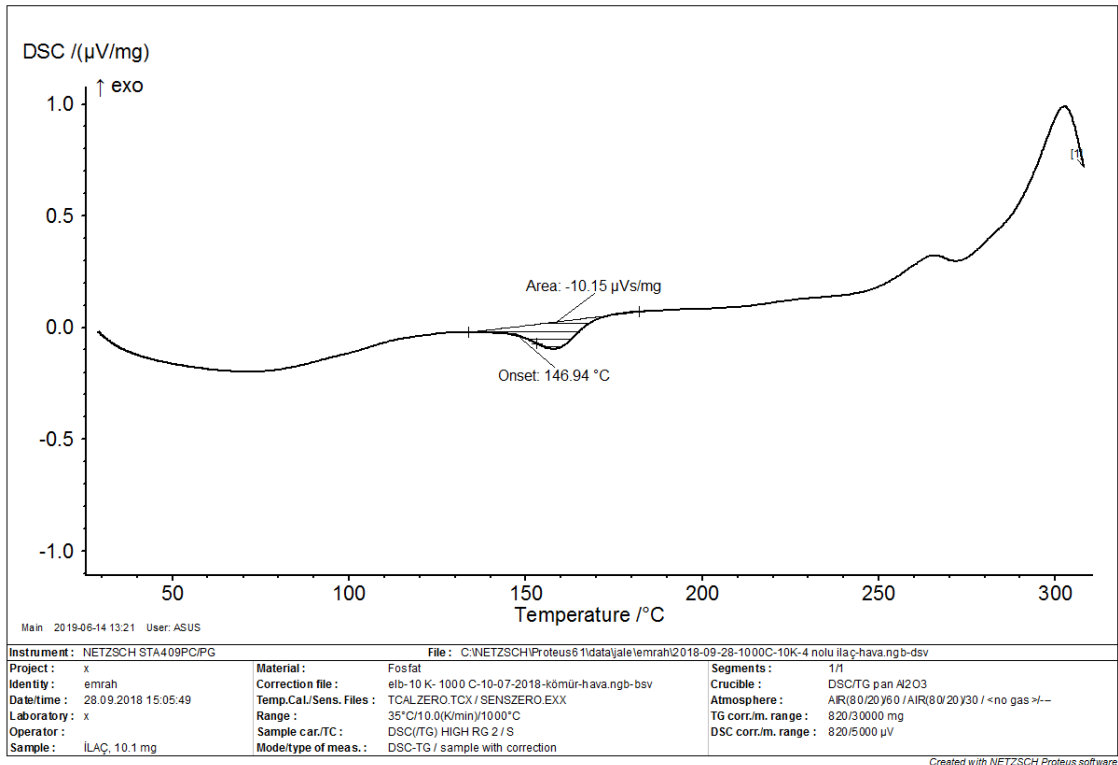
Şekil 4.47. Saf PVA’ya ait termogram



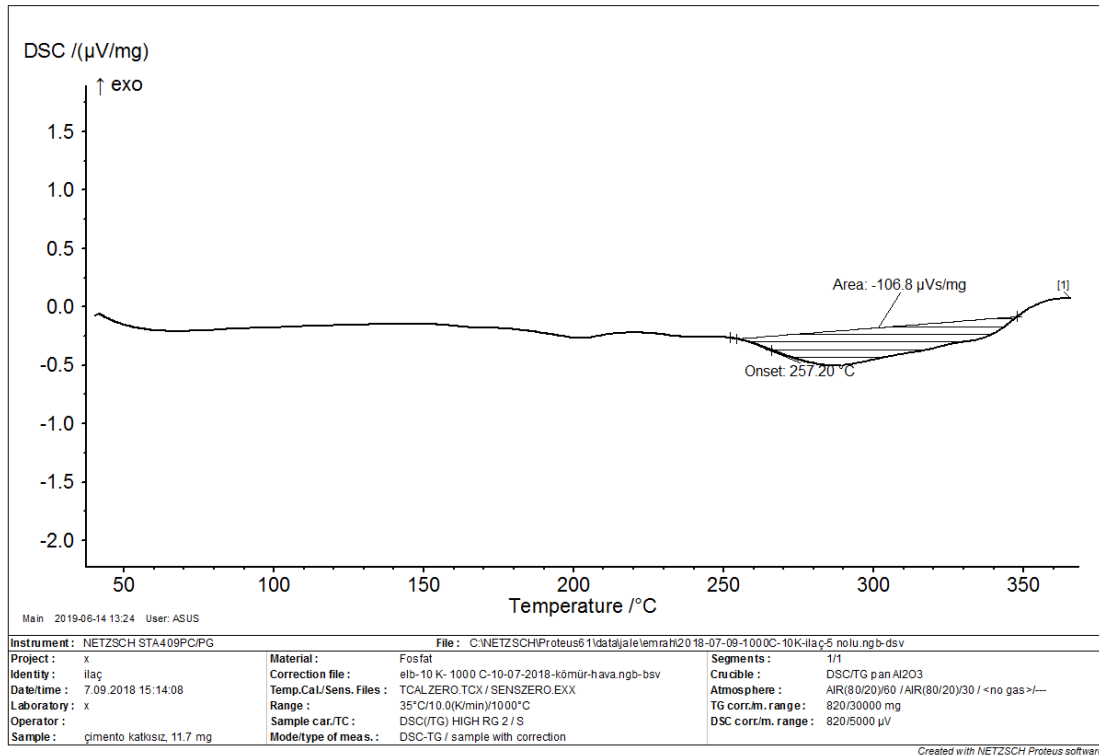
Şekil 4.48. Saf PLGA'ya ait termogram



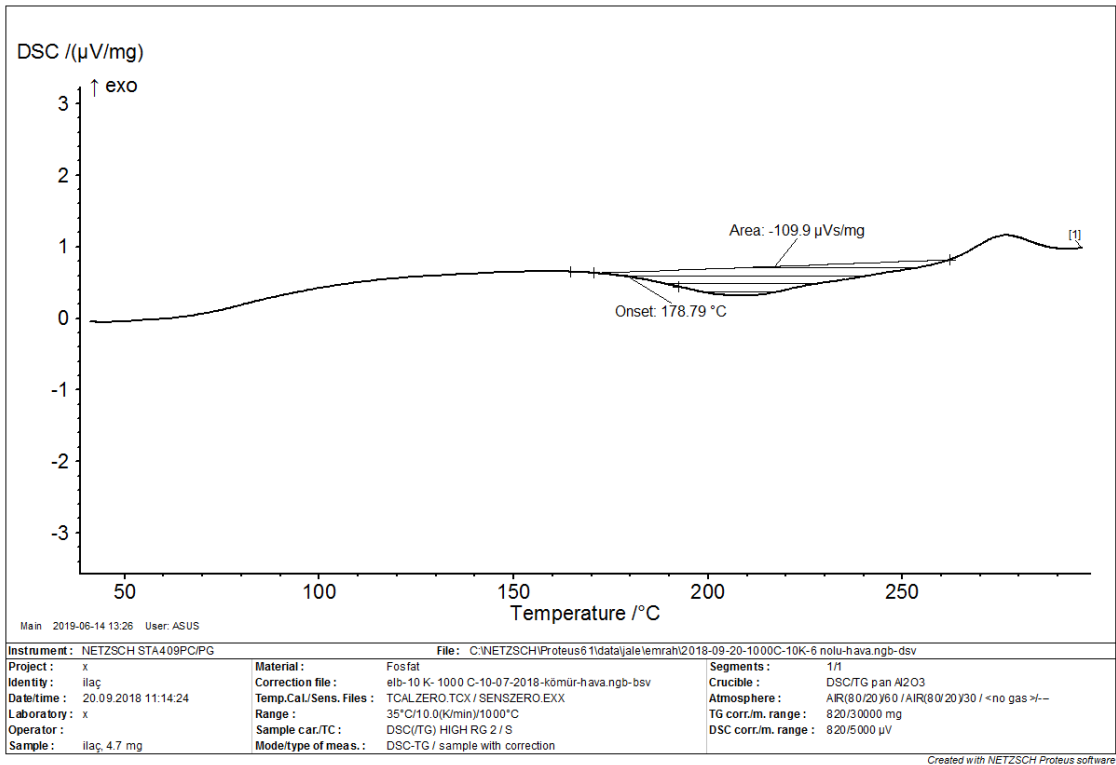
Şekil 4.49. Saf Kollicoat® MAE 100P'ye ait termogram



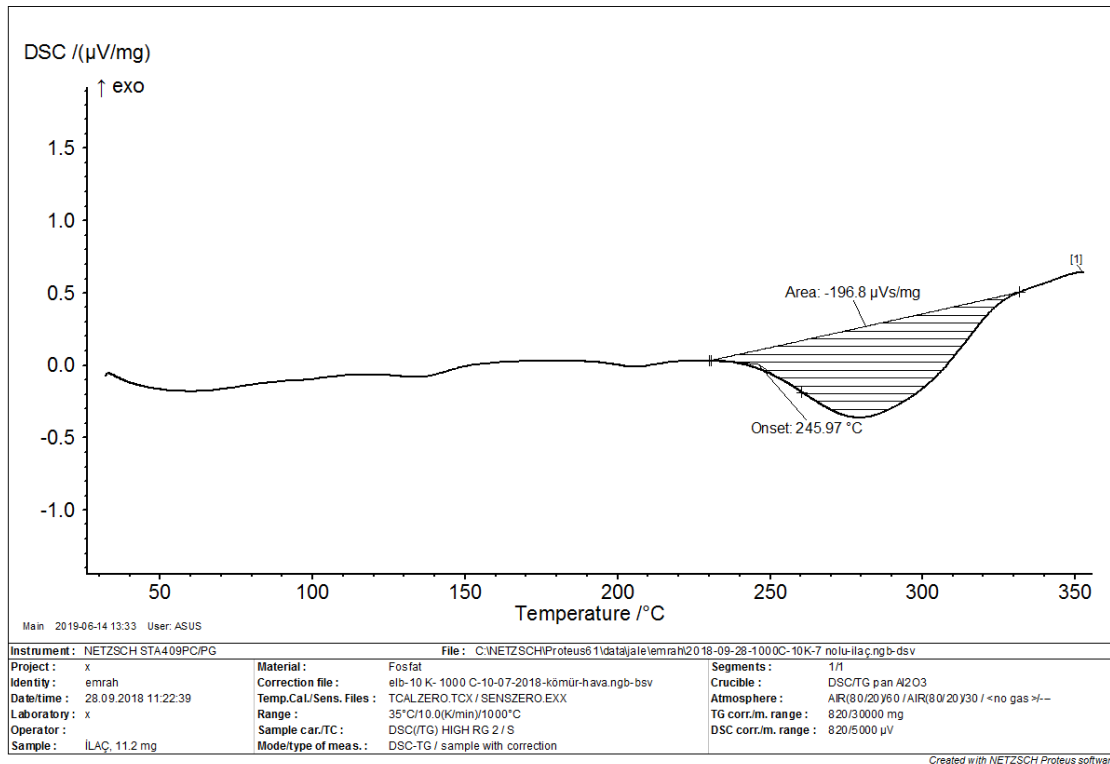
Şekil 4.50. Saf indometazin, saf PLGA ve saf Kollicoat® MAE 100P'nin fiziksel karışımlarına ait termogram



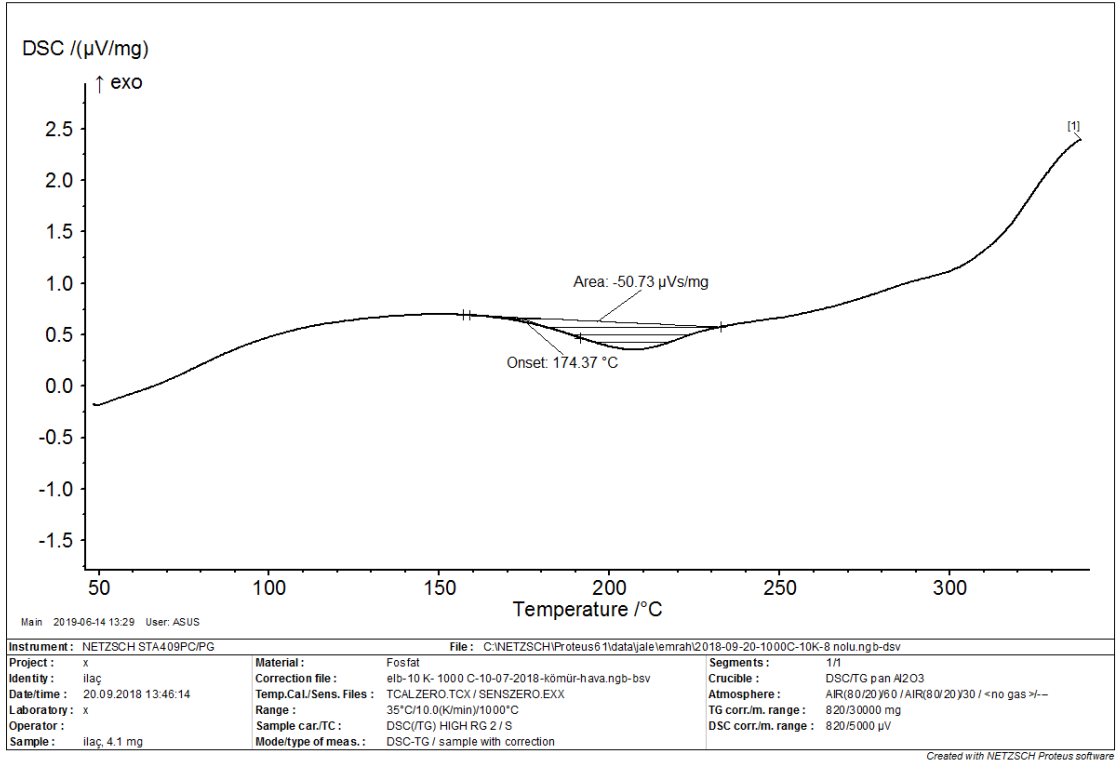
Şekil 4.51. Boş nanopartiküllere ait termogram



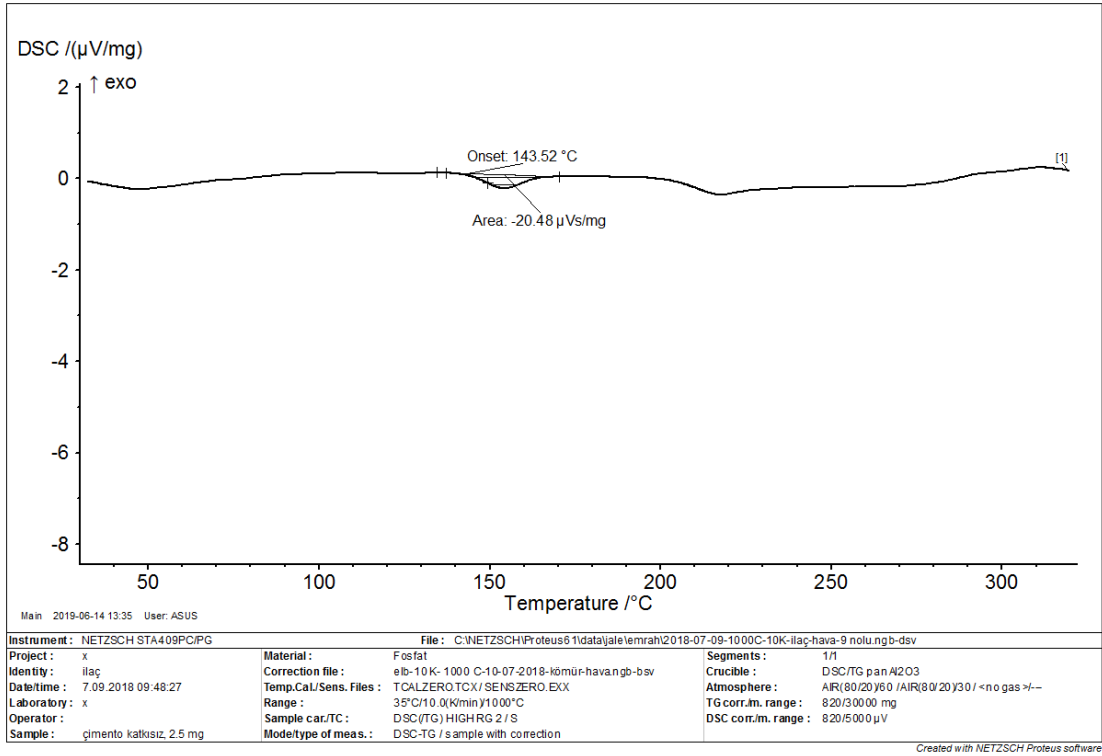
Şekil 4.52. Enterik kaplı boş nanopartiküllere ait termogram



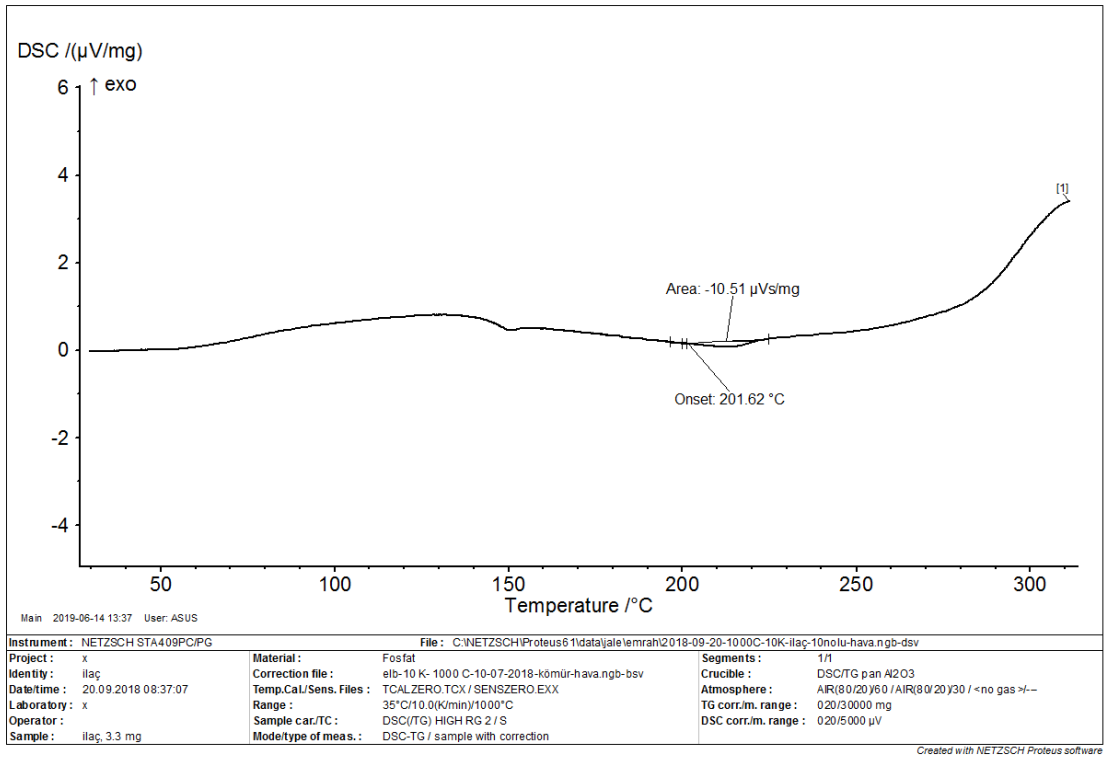
Şekil 4.53. İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait termogram



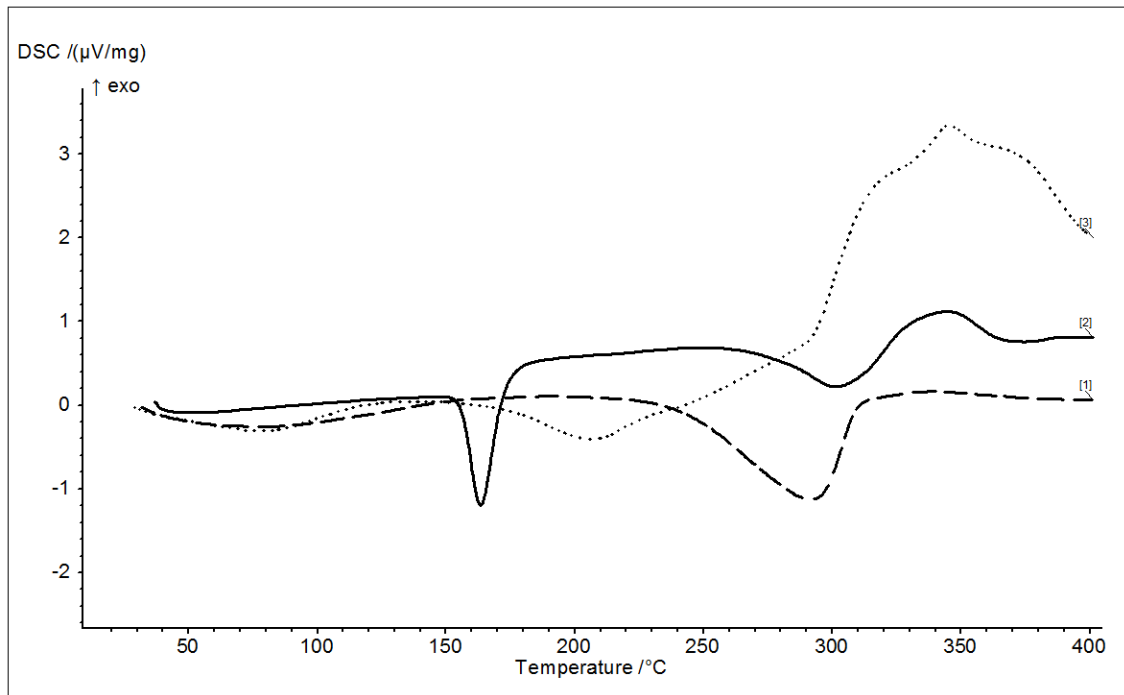
Şekil 4.54. Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait termogram



Şekil 4.55. İndometazin nanosüspansiyonlarına ait termogram



Şekil 4.56. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonlarına ait termogram

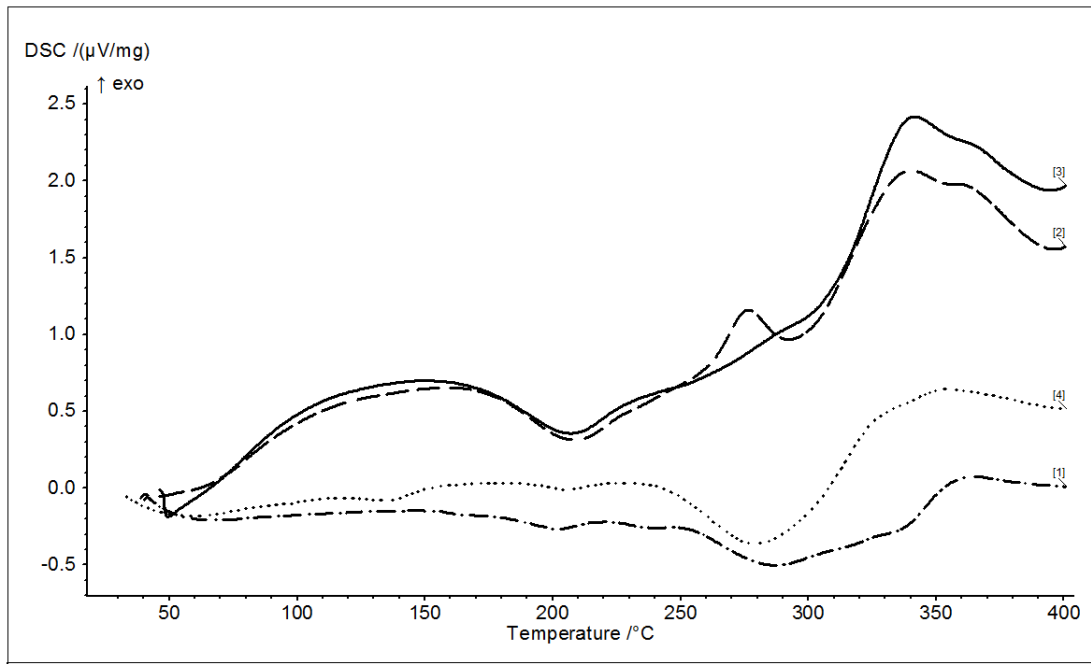


Şekil 4.57. Saf indometazin, saf PLGA ve saf Kollicoat® MAE 100P'ye ait termogramlar

[1] Saf PLGA polimeri

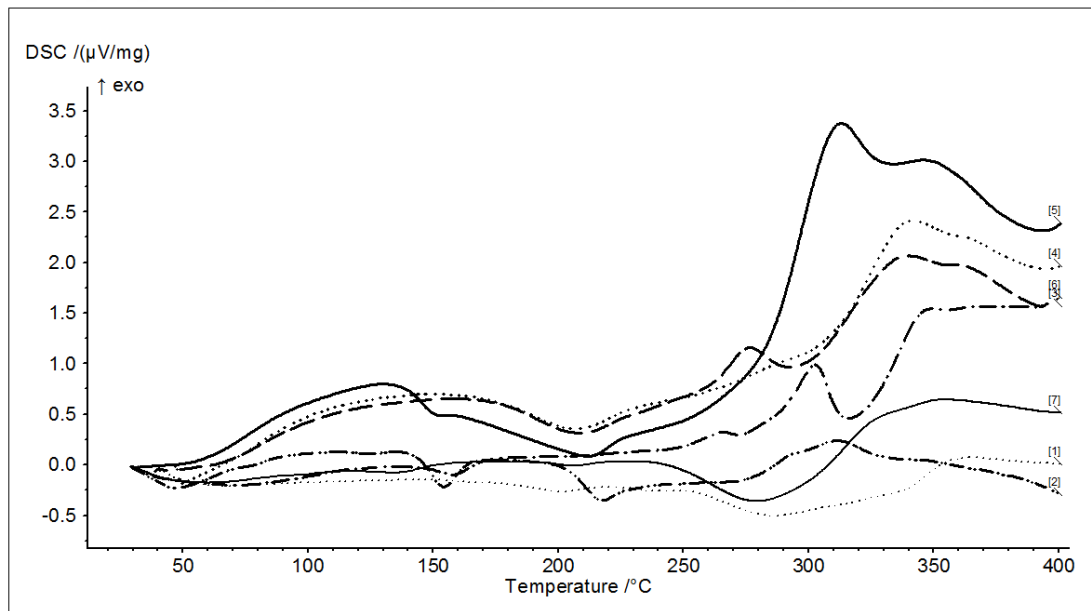
[2] Saf indometazin

[3] Saf Kollicoat® MAE 100P polimeri



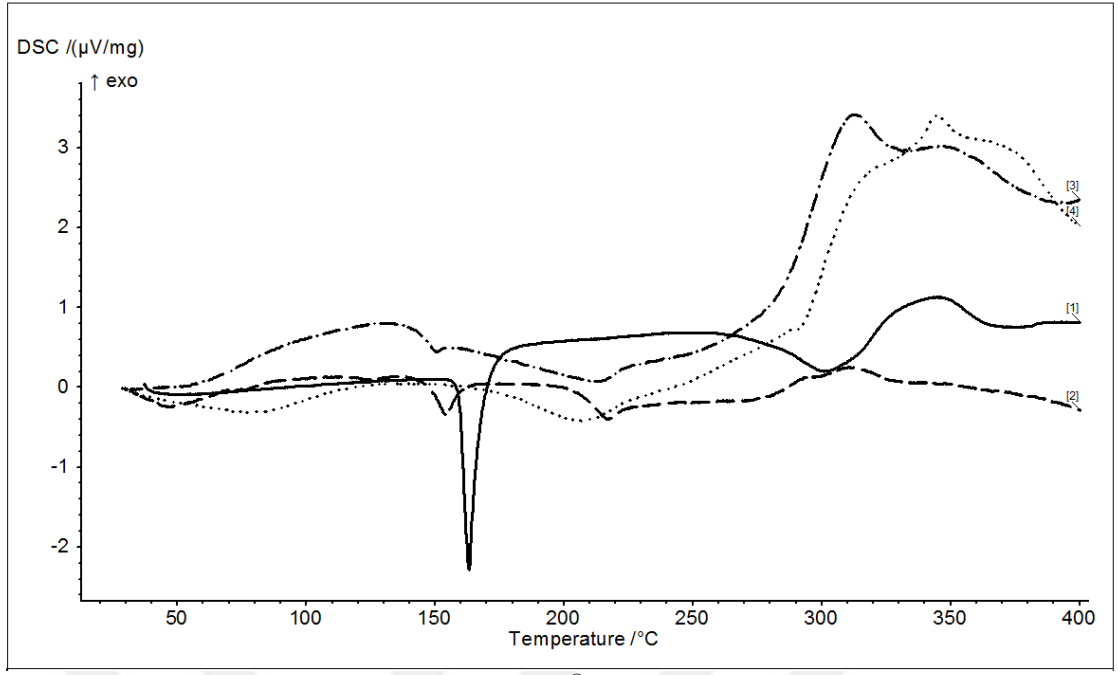
Şekil 4.58. Boş nanopartiküller, enterik kaplı boş nanopartiküller, enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri ve indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait termogram

- [1] Boş nanopartiküller
 [2] Enterik kaplı boş nanopartiküller
 [3] Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri
 [4] İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri



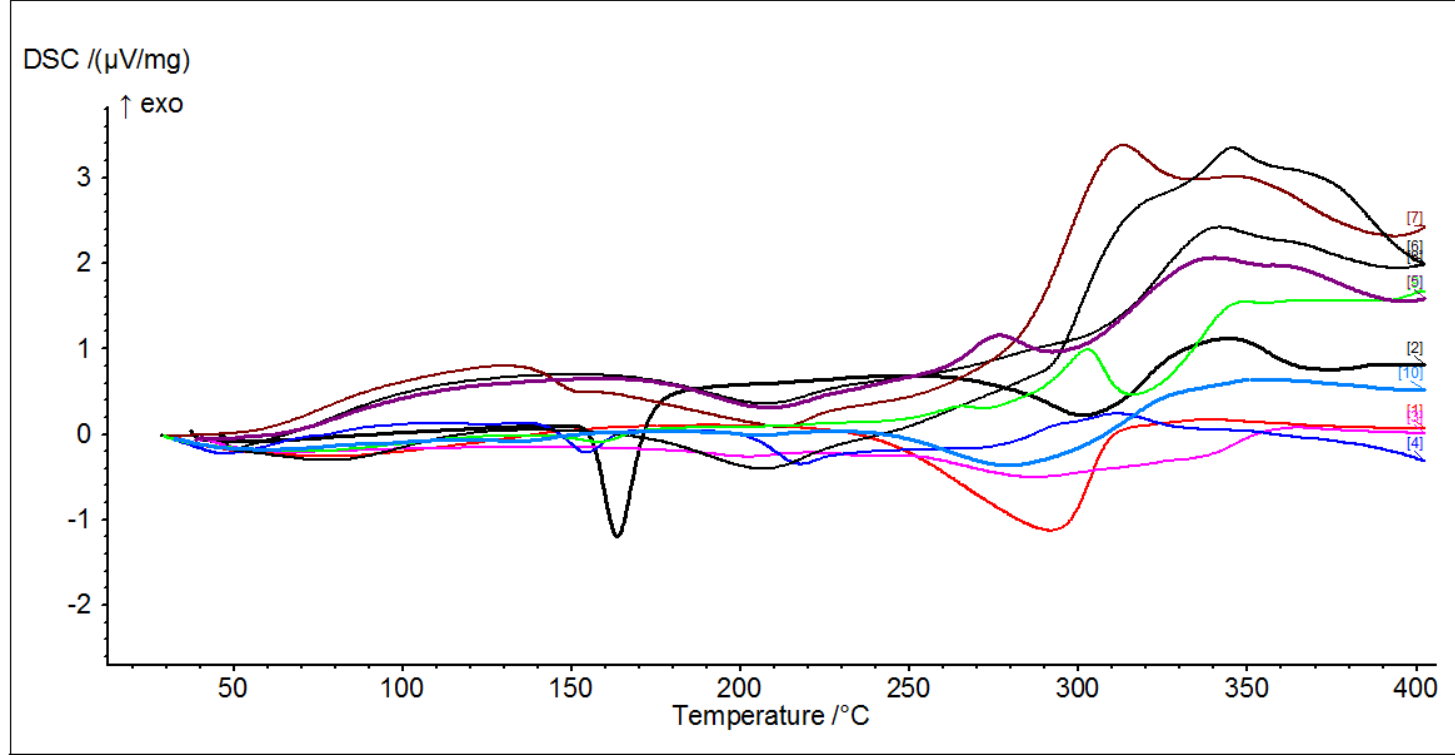
Şekil 4.59. Formülasyonlara ait termogramlar

- [1] Boş nanopartiküller
 [2] İndometazin nanosüspansiyonu
 [3] Enterik kaplı boş nanopartiküller
 [4] Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri
 [5] Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
 [6] Saf indometazin, saf PLGA ve saf Kollicoat® MAE 100P fiziksel karışımları
 [7] İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri



Şekil 4.60. Saf indometazin, saf Kollicoat® MAE 100P ve nanosüspansiyonlara ait termogramlar

- ^[1] Saf indometazin
- ^[2] İndometazin nanosüspansiyonu
- ^[3] Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
- ^[4] Saf Kollicoat® MAE 100P polimeri

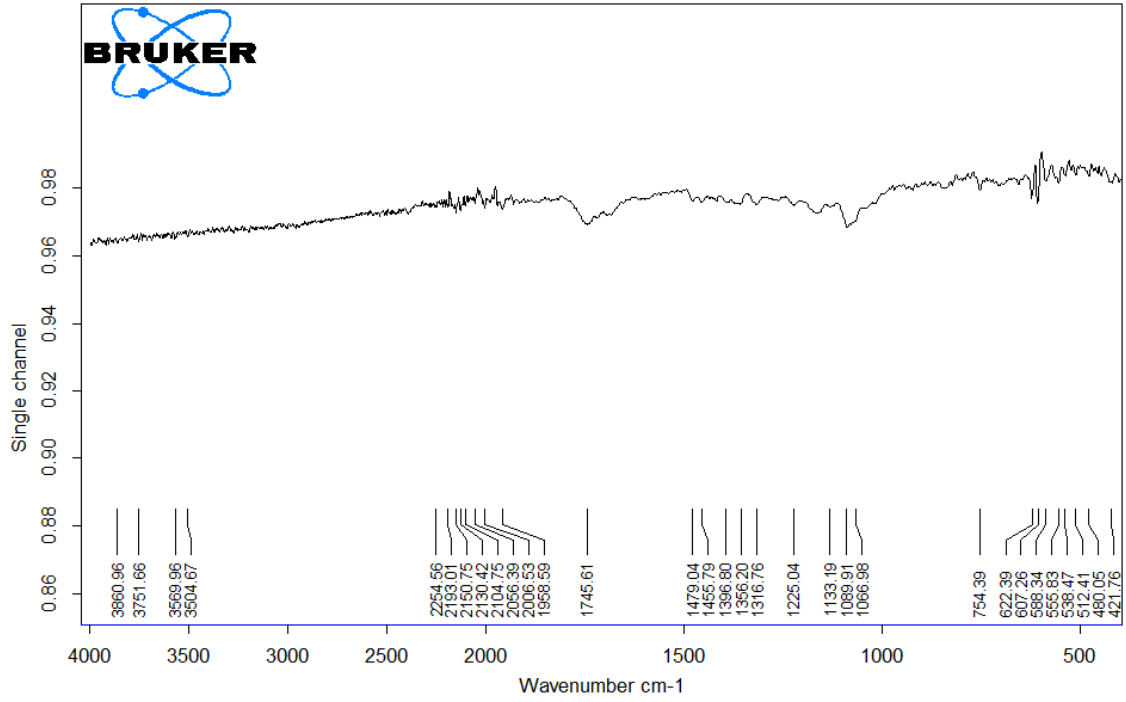


Şekil 4.61. Formülasyonlara ve formülasyon bileşenlerine ait termogramlar

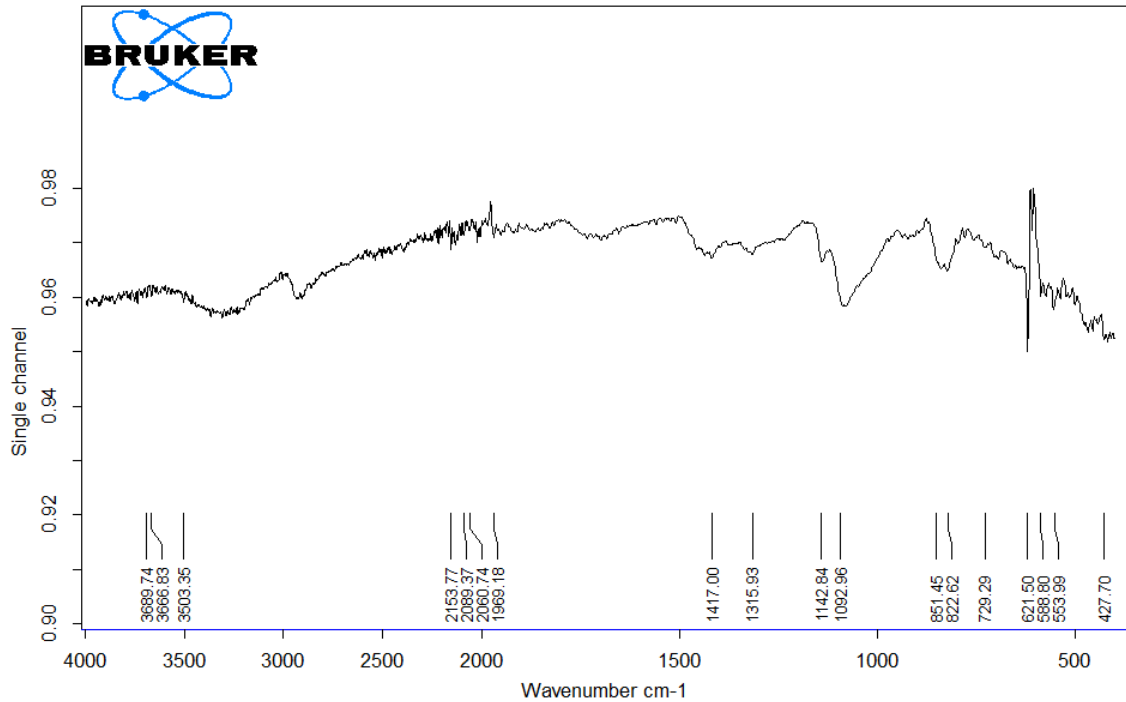
- [1] Saf PLGA polimeri
- [2] Saf indometazin
- [3] Boş nanopartiküller
- [4] İndometazin nanosüspansiyonu
- [5] Enterik kaplı boş nanopartiküller
- [6] Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri
- [7] Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
- [8] Saf Kollicoat® MAE 100P polimeri
- [9] Saf indometazin, saf PLGA ve saf Kollicoat® MAE 100P'nin fiziksel karışımları
- [10] İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri

4.8.7. Bileşenlerin ve Formülasyonların FT-IR Spektrumları

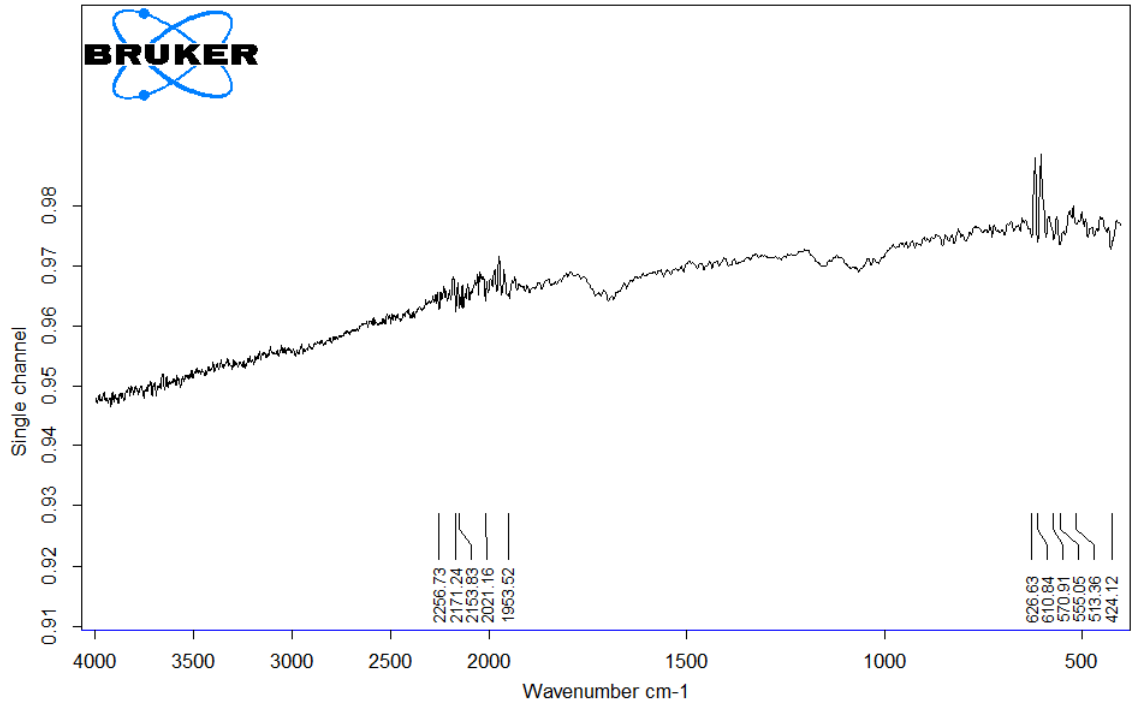
Bölüm 3.11.7’de anlatıldığı gibi bileşenlerin, geliştirilen formülasyonların ve fiziksel karışımların FT-IR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.62 – 4.71).



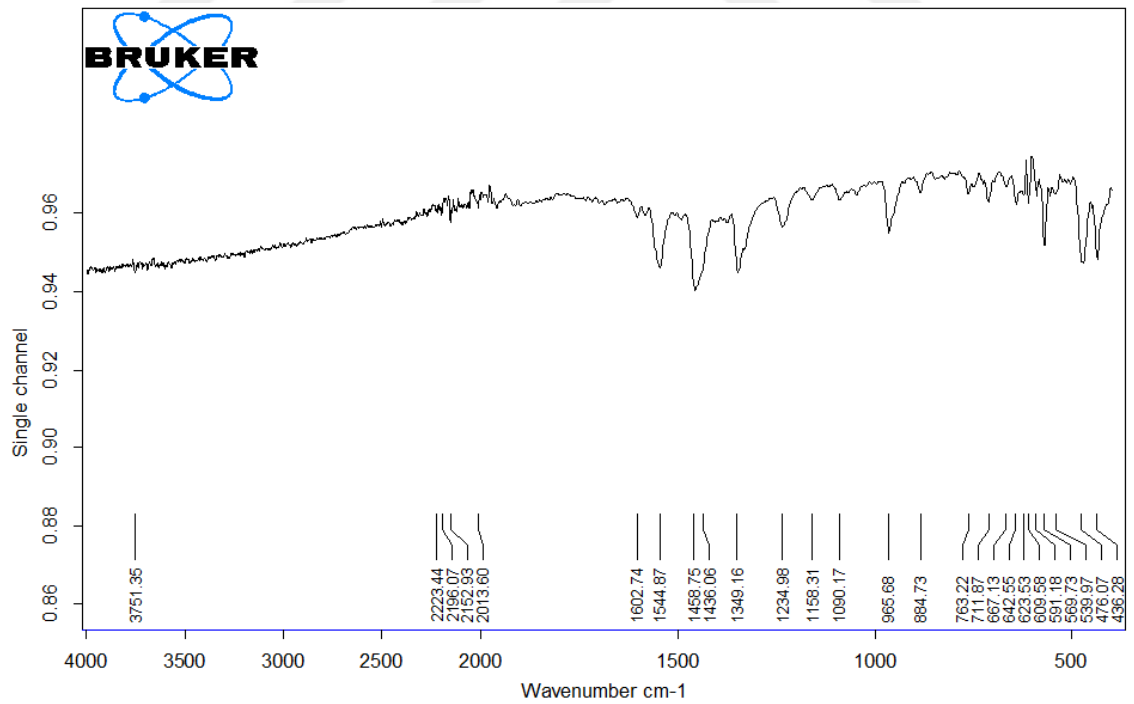
Şekil 4.62. Saf PLGA’ya ait FT-IR spektrumu



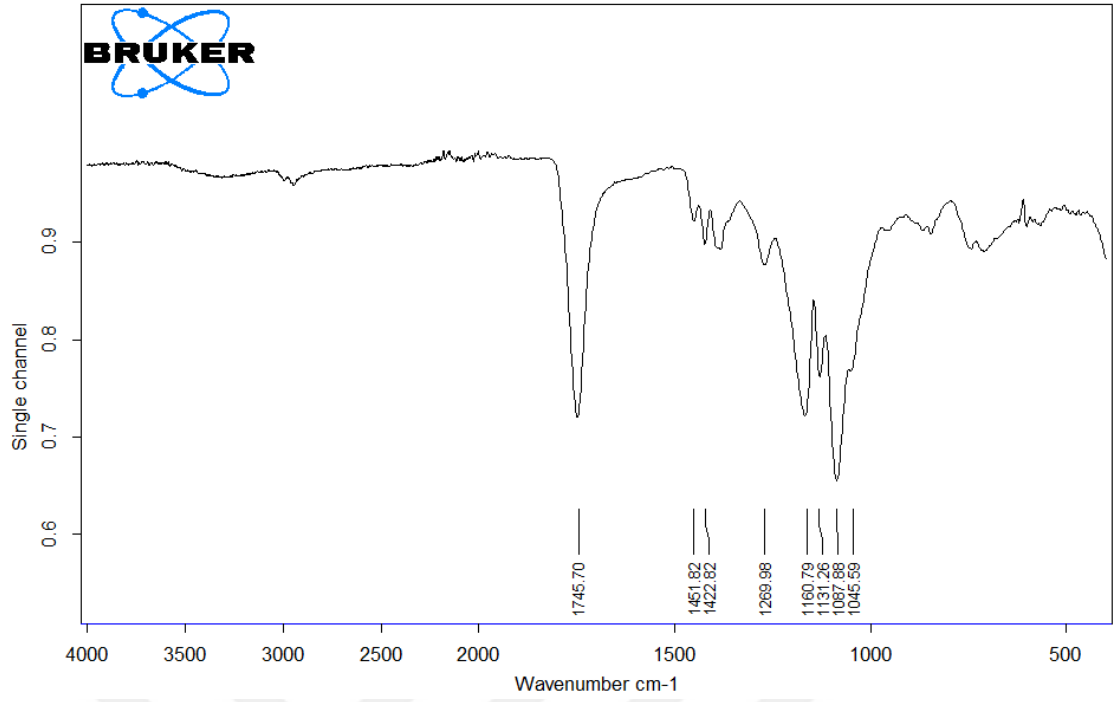
Şekil 4.63. Saf PVA’ya ait FT-IR spektrumu



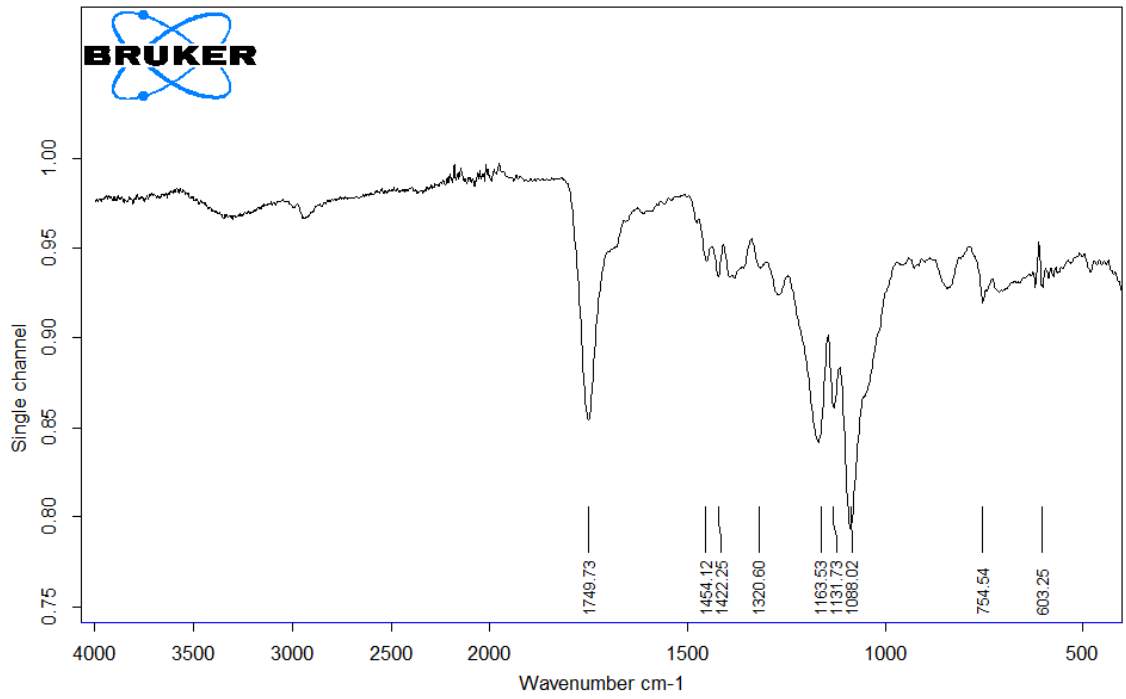
Şekil 4.64. Saf Kollicoat® MAE 100P'ye ait FT-IR spektrumu



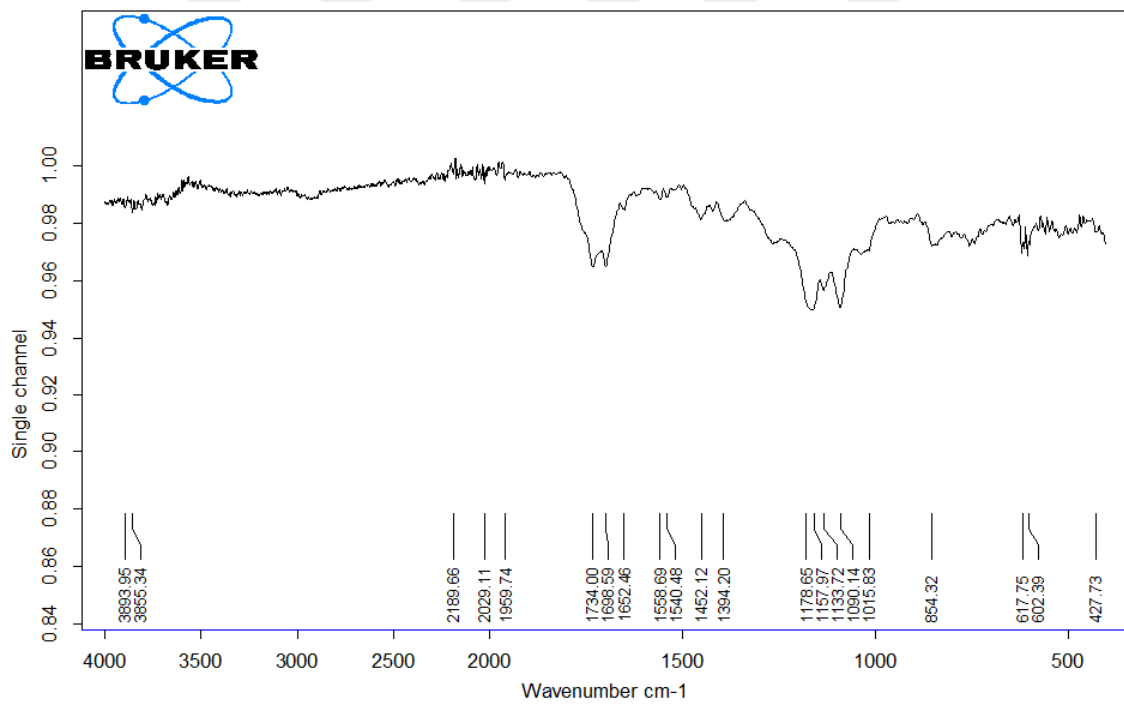
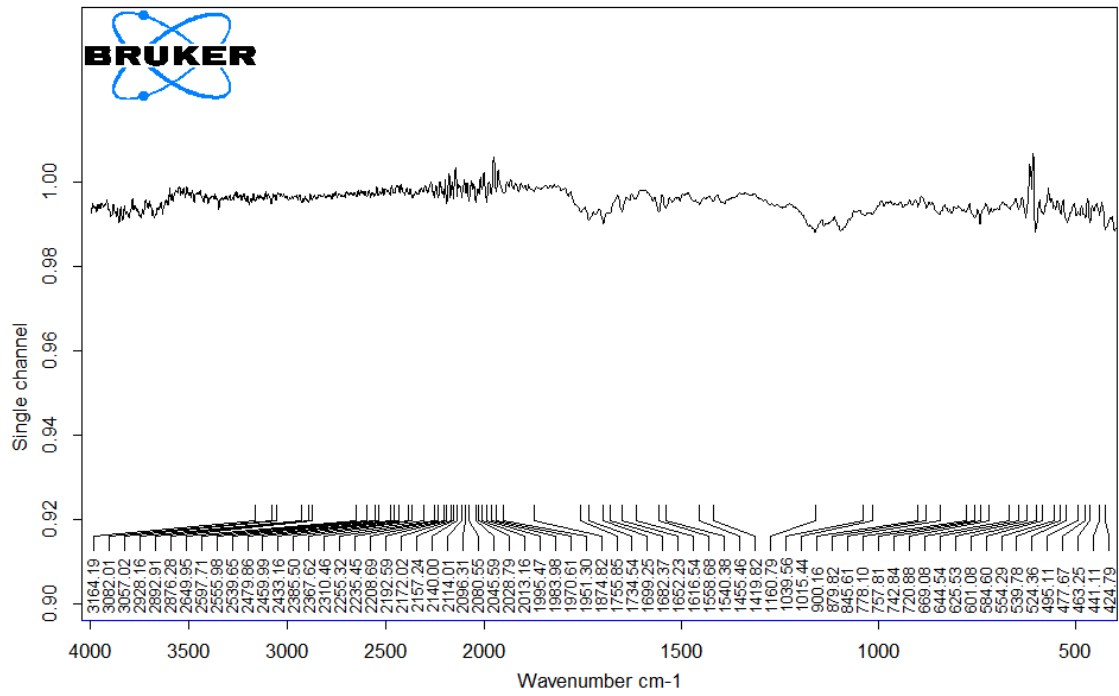
Şekil 4.65. Saf FD&C Red No:3'e ait FT-IR spektrumu

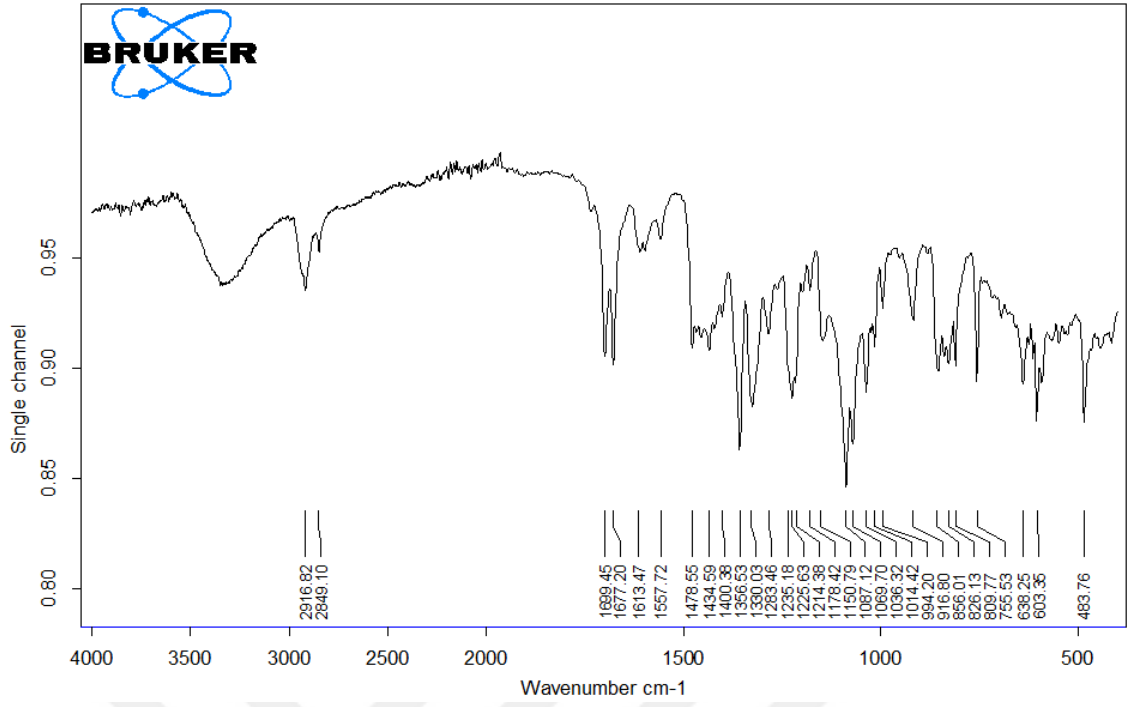


Şekil 4.66. Boş nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu

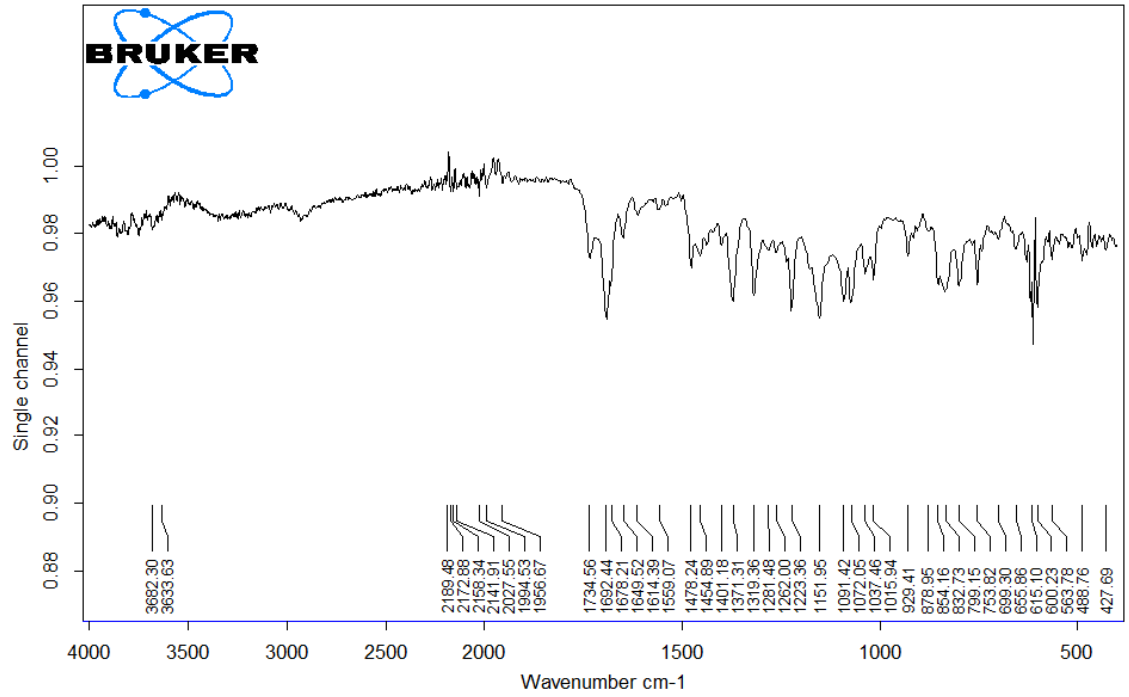


Şekil 4.67. İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait FT-IR spektrumu





Şekil 4.70. İndometazin nanosüspansiyonuna ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.71. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonuna ait FT-IR spektrumu

4.9. İndometazin Formülasyonlardan Salımının Tayini

Bölüm 3.12’de belirtildiği gibi formülasyonlar ile üç farklı ortamda (pH 6.8, pH 7.2 ve pH 1.2) dissolüsyon çalışmaları yapılmıştır. Deneylerin sonuna kadar sink koşul sürdürülmüştür.

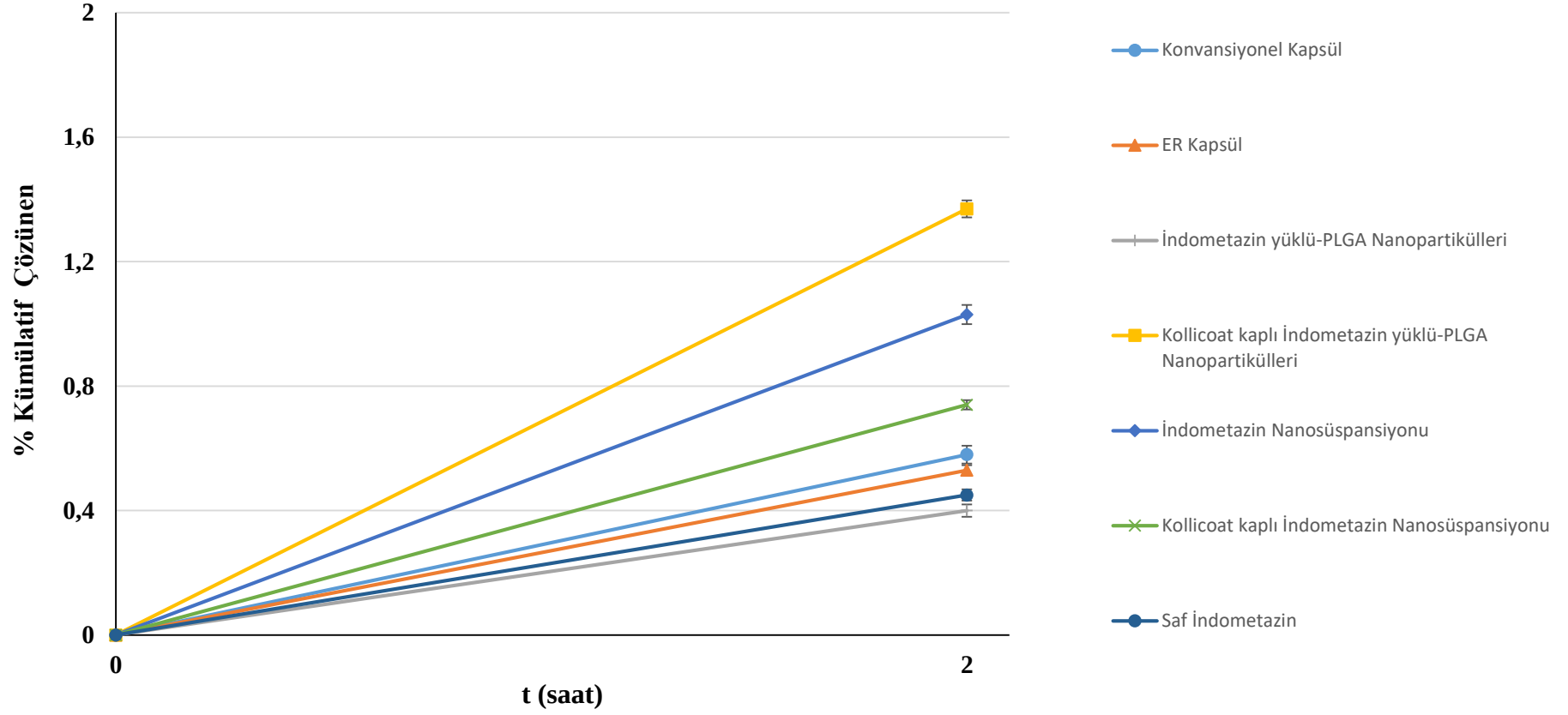
Farmakopelere kayıtlı olmayan pH 1.2 HCl tamponu ortamında yapılan dissolüsyon çalışması sonucu elde edilen veriler Tablo 4.12’de, salım grafiği ise Şekil 4.72’de verilmiştir.

USP30-NF25’e kayıtlı olan “İndometazin Kapsül” formuna ait monograf bilgileri dikkate alınarak pH 7.2 fosfat tamponu ile yapılan dissolüsyon çalışması, tolerans limiti 20 dk (0.33 saat) olmasına rağmen hazırlanan formülasyonların salım profillerini izlemek açısından 24 saat süreyle devam ettirilmiştir. Elde edilen dissolüsyon çalışmasına ait veriler aşağıda Tablo 4.13’te, salım grafiği ise Şekil 4.73’te verilmiştir.

Ayrıca USP30-NF25’e kayıtlı olan “İndometazin ER Kapsül” formuna ait monograf bilgileri dikkate alınarak gerçekleştirilen pH 6.8 fosfat tamponu ile yapılan dissolüsyon çalışmasına ait veriler ise Tablo 4.14’te, salım grafiği ise Şekil 4.74’te verilmiştir.

Tablo 4.12. pH 1.2’de ve 2 saat sonunda % çözünen indometazin (n=3)

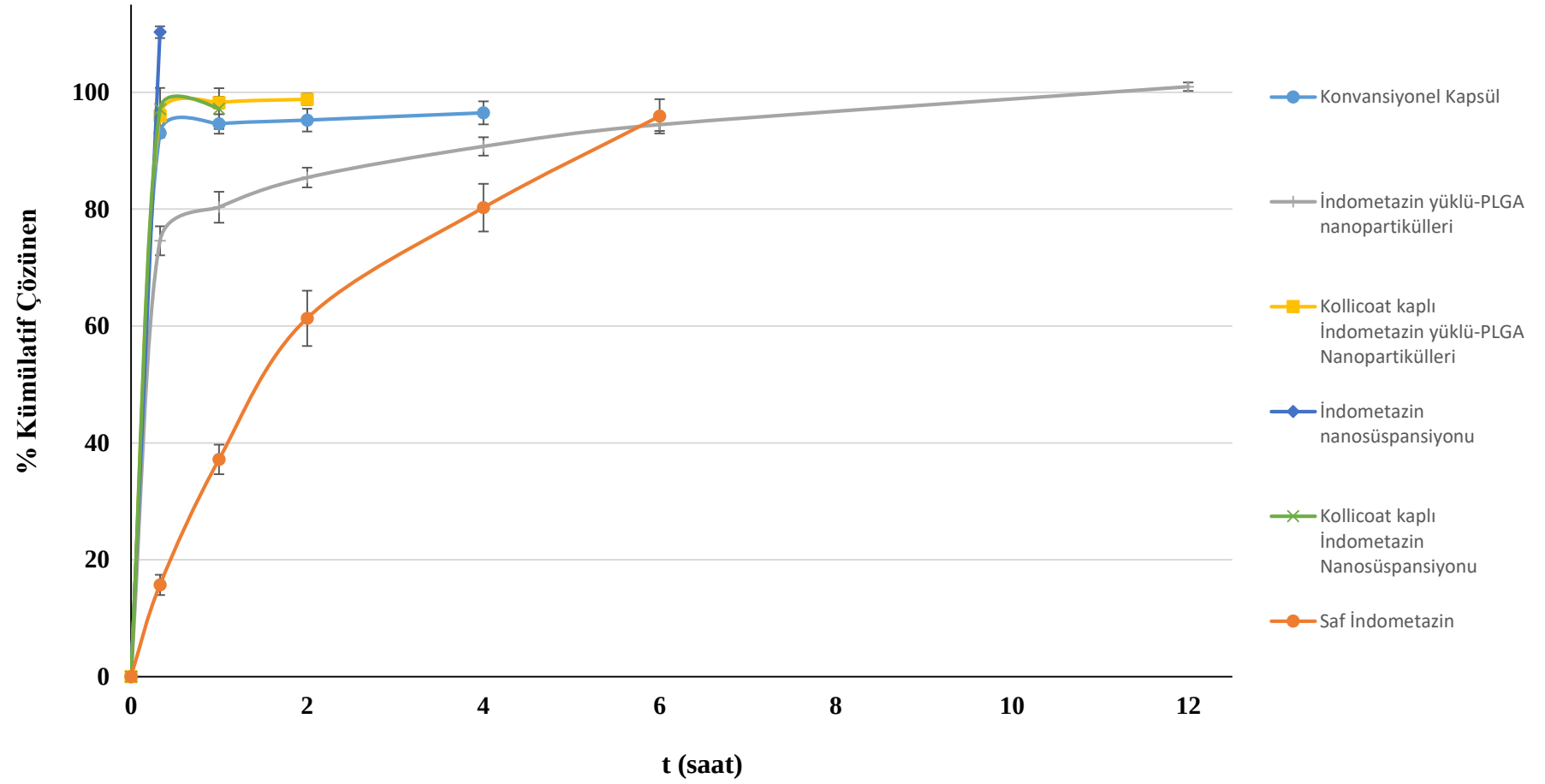
	% Çözünen İlaç
Saf indometazin	0.45 ± 0.02
İndometazin geleneksel kapsül	0.58 ± 0.09
İndometazin ER kapsül	0.53 ± 0.05
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	0.40 ± 0.00
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	1.37 ± 0.22
İndometazin nanosüspansiyonu	1.03 ± 0.10
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	0.74 ± 0.06



Şekil 4.72. pH 1.2'deki tüm örneklere ait % çözünen ilacın salım profilleri

Tablo 4.13. pH 7.2 ortamında % kümülatif çözünen indometazin (n=3)

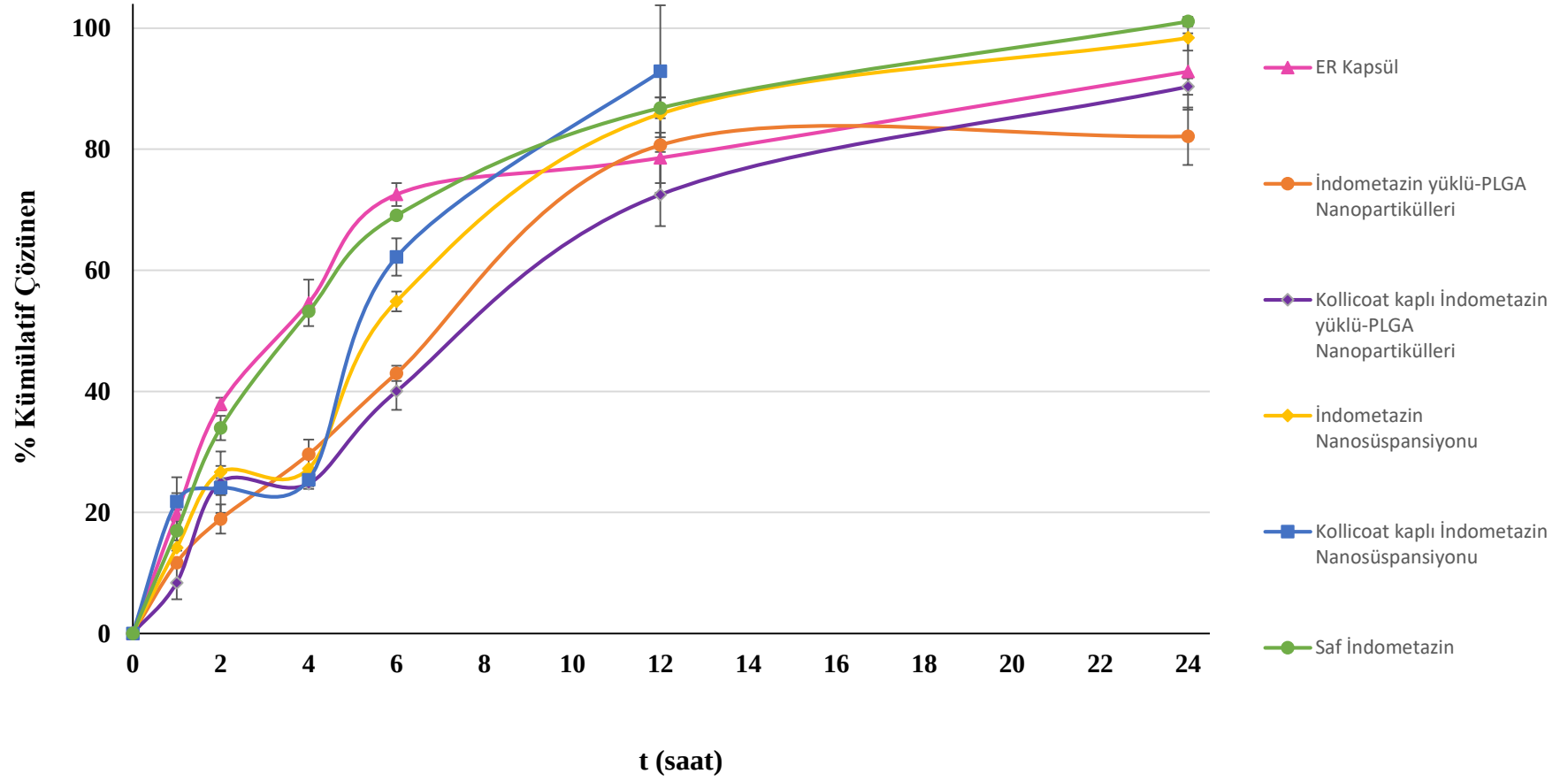
Örnek	% Kümülatif Çözünen İlaç					
	0.33	1	Saat		6	12
			2	4		
Saf indometazin	15.71 ± 1.74	37.17 ± 2.52	61.33 ± 4.74	80.24 ± 4.09	95.89 ± 2.92	-
İndometazin geleneksel kapsül	92.98 ± 0.71	94.58 ± 1.67	95.22 ± 1.95	96.46 ± 1.98	-	-
İndometazin yüklü-PLGA Nanopartikülü	74.58 ± 2.50	80.32 ± 2.63	85.40 ± 1.70	90.73 ± 1.58	94.45 ± 1.07	100,95 ± 0.74
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA Nanopartikülü	95.98 ± 0.87	98.23 ± 0.59	98.79 ± 0.16	-	-	-
İndometazin nanosüspansiyonu	110.29 ± 2.14	-	-	-	-	-
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	97.09 ± 3.68	97.19 ± 3.49	-	-	-	-



Şekil 4.73. pH 7.2'deki tüm örneklere ait % kümülatif çözünen ilacın salım profilleri

Tablo 4.14. pH 6.8 ortamında % kümülatif çözünen indometazin (n=3)

Örnek	% Kümülatif Çözünen İlaç					
	Saat					
	1	2	4	6	12	24
Saf indometazin	16.97 ± 1.58	33.95 ± 2.02	53.20 ± 0.23	69.06 ± 0.35	86.82 ± 1.72	101.11 ± 0.77
İndometazin ER kapsül	19.73 ± 6.05	37.88 ± 1.04	54.62 ± 3.85	72.53 ± 1.89	78.58 ± 4.17	92.82 ± 6.31
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülü	11.70 ± 0.13	18.90 ± 2.43	29.59 ± 2.42	42.99 ± 1.26	80.70 ± 7.88	82.15 ± 4.75
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülü	8.38 ± 2.74	24.99 ± 5.06	24.73 ± 0.87	40.00 ± 3.07	72.51 ± 5.22	90.35 ± 1.36
İndometazin nanosüspansiyonu	14.14 ± 0.10	26.66 ± 1.02	27.23 ± 2.91	54.87 ± 1.65	85.84 ± 6.29	98.40 ± 2.09
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	21.81 ± 1.40	24.05 ± 1.18	25.39 ± 0.65	62.21 ± 3.09	92.89 ± 10.88	-



Şekil 4.74. pH 6.8'deki tüm örneklere ait % kümülatif çözünen ilacın salım profilleri

4.9.1. İndometazinin Salım Kinetiklerinin Tayini

Geliştirdiğimiz formülasyonların ve indometazinin piyasa preparatlarının Bölüm 3.12.1’de anlatıldığı üzere salım kinetiklerini belirleyebilmek amacıyla bilgisayar programı aracılığıyla çözünme hız profillerinin eğimleri ve R^2 değerleri grafik yöntemi ile hesaplanmıştır. pH 6.8 fosfat tamponunda yapılan dissolüsyon çalışması için elde edilen veriler aşağıda Tablo 15’te, pH 7.2 fosfat tamponunda yapılan dissolüsyon çalışması için veriler ise Tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 4.15. pH 6.8 ortamındaki indometazine ait salım kinetiği sonuçları (n=6)

	R^2			
	0. Derece	1. Derece	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
İndometazin ER kapsül	0.8837	0.8041	0.9322	0.9737
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	0.9252	0.8917	0.9598	0.9740
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	0.9428	0.8542	0.9656	0.9344
İndometazin nanosüspansiyonu	0.9475	0.9032	0.9724	0.9606
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	0.9322	0.9064	0.9538	0.8411

Tablo 4.16. pH 7.2 ortamındaki indometazine ait salım kinetiği sonuçları (n=6)

	R^2			
	0. Derece	1. Derece	Higuchi	Korsmeyer-Peppas
İndometazin geleneksel kapsül	0.9015	0.8992	0.9118	-
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	0.8661	0.8344	0.9744	-
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	0.7957	0.7940	0.8817	-
İndometazin nanosüspansiyonu	0.8240	0.8232	0.8899	-
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	0.5170	0.5177	0.4256	-

4.10. Formülasyonların Stabilitesinin Tayini

Bölüm 3.13'te anlatıldığı gibi hazırlanan 6 ayrı formülasyonun bir ay süreyle yapılan stabilite çalışmaları sonucunda zeta potansiyel değerleri, partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve içerdiği indometazin miktarları açısından incelenmiş, her bir formülasyon grubu için hem oda sıcaklığı hem de +4 °C sıcaklıkta 24. saat, 15. gün ve 30. gün olmak üzere her bir parametre ayrı ayrı ele alınmıştır. Miktar tayinlerine ilişkin sonuçlar aşağıda Tablo 4.17'de; zeta potansiyel, partikül boyutu ve polidispersite indeksi sonuçları ise Tablo 4.18 – 4.20'de verilmiştir.



Tablo 4.17. 30 gün boyunca sıvı halde bekletilen formülasyonlarda indometazin miktarındaki değişmeler (n=3)

Formülasyonlar	% Kalan Etkin Madde Miktarı					
	1.Gün		15.Gün		30.Gün	
	+4 ± 2 °C	+25 ± 2 °C	+4 ± 2 °C	+25 ± 2 °C	+4 ± 2 °C	+25 ± 2 °C
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	89.0 ± 0.38	92.6 ± 0.38	94.3 ± 7.69	92.0 ± 2.09	79.34 ± 7.85	80.7 ± 12.01
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	90.5 ± 2.23	89.1 ± 5.25	70.7 ± 22.38	87.1 ± 3.42	81.22 ± 13.23	90.1 ± 16.94
İndometazin nanosüspansiyonu	77.6 ± 4.98	77.4 ± 5.73	87.3 ± 3.25	85.0 ± 12.92	84.23 ± 6.30	76.4 ± 16.58
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	75.1 ± 3.69	78.1 ± 3.83	85.5 ± 11.78	61.7 ± 15.76	91.13 ± 10.86	79.9 ± 18.94

Tablo 4.18. Sıvı halde bekletilen formülasyonların 1.gün sonunda farklı bekletme koşullarındaki zeta potansiyel, partikül boyutu ve Pdl değerleri (n=6)

Formülasyonlar	+4 ± 2 °C			+25 ± 2 °C		
	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	243.13 ± 3.39	0.087 ± 0.035	-37.90 ± 0.99	247.62 ± 2.88	0.102 ± 0.019	-33.83 ± 2.12
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	206.12 ± 2.94	0.128 ± 0.021	-51.97 ± 2.82	208.52 ± 2.23	0.135 ± 0.016	-45.42 ± 3.25
İndometazin nanosüspansiyonu	626.67 ± 10.83	0.274 ± 0.036	-15.78 ± 0.37	705.43 ± 20.29	0.248 ± 0.041	-13.35 ± 0.50
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	386.93 ± 93.08	0.641 ± 0.108	-32.85 ± 2.01	330.62 ± 80.28	0.704 ± 0.190	-31.85 ± 2.03
Boş nanopartiküller	238.53 ± 2.91	0.136 ± 0.009	-35.22 ± 1.22	231.80 ± 2.81	0.065 ± 0.032	-27.62 ± 1.25
Enterik kaplı boş nanopartiküller	138.88 ± 1.42	0.146 ± 0.007	-64.52 ± 2.46	132.45 ± 2.03	0.167 ± 0.009	-74.12 ± 1.78

Tablo 4.19. Sıvı halde bekletilen formülasyonların 15.gün sonunda farklı bekletme koşullarındaki zeta potansiyel, partikül boyutu ve Pdl değerleri (n=6)

Formülasyonlar	+4 ± 2 °C			+25 ± 2 °C		
	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	282.17 ± 7.70	0.224 ± 0.020	-40.43 ± 0.63	252.67 ± 5.57	0.126 ± 0.026	-41.58 ± 1.45
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	207.18 ± 2.77	0.079 ± 0.020	-49.48 ± 0.66	198.02 ± 0.72	0.078 ± 0.011	-56.35 ± 2.10
İndometazin nanosüspansiyonu	737.70 ± 19.32	0.350 ± 0.030	-17.38 ± 0.73	776.10 ± 15.69	0.366 ± 0.027	-16.75 ± 0.37
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	458.48 ± 55.12	0.589 ± 0.205	-56.15 ± 0.98	544.65 ± 110.37	0.562 ± 0.084	-46.10 ± 1.89
Boş nanopartiküller	241.02 ± 11.32	0.241 ± 0.011	-18.40 ± 2.85	238.47 ± 4.71	0.123 ± 0.016	-35.62 ± 0.72
Enterik kaplı boş nanopartiküller	128.53 ± 0.84	0.159 ± 0.028	-56.33 ± 2.86	137.80 ± 2.38	0.181 ± 0.026	-65.78 ± 2.67

Tablo 4.20. Sıvı halde bekletilen formülasyonların 30.gün sonunda farklı bekletme koşullarındaki zeta potansiyel, partikül boyutu ve Pdl değerleri (n=6)

Formülasyonlar	+4 ± 2 °C			+25 ± 2 °C		
	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)	Partikül Boyutu (nm)	PdI	Zeta Potansiyel (mV)
İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	255.12 ± 3.54	0.181 ± 0.020	-47.77 ± 1.96	300.38 ± 6.42	0.169 ± 0.030	-47.20 ± 0.69
Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri	203.00 ± 1.51	0.062 ± 0.013	-52.58 ± 1.21	217.06 ± 3.35	0.095 ± 0.057	-45.58 ± 0.62
İndometazin nanosüspansiyonu	763.00 ± 31.93	0.342 ± 0.034	-13.28 ± 0.86	820.77 ± 35.95	0.386 ± 0.025	-13.32 ± 0.38
Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	539.18 ± 72.56	0.604 ± 0.042	-35.75 ± 1.70	501.07 ± 95.59	0.635 ± 0.120	-30.52 ± 1.43
Boş nanopartiküller	241.62 ± 2.69	0.104 ± 0.014	-37.70 ± 0.78	285.53 ± 1.86	0.138 ± 0.017	-35.17 ± 0.65
Enterik kaplı boş nanopartiküller	131.78 ± 1.10	0.158 ± 0.016	-60.22 ± 1.95	347.65 ± 8.32	0.128 ± 0.034	-48.88 ± 1.06

4.11. *In Vivo* Çalışmalar

Hazırlamış olduğumuz indometazin içeren/içermeyen yeni ilaç taşıyıcı formülasyonların, 25 mg/kg dozdaki saf indometazine, geleneksel ve uzatılmış salımlı (ER) kapsül formlarına karşılaştırmalı olarak midede ülser oluşturup oluşturmadığı ve/veya oluşan ülser indeksinin karşılaştırmalı olarak oranları incelenmiştir. Elde edilen ön çalışma sonuçlarına ait veriler aşağıda açıklanmıştır:

- Önce 5 sıçan 6 saat sonra sakrifiye edilmiş ve mide-bağırsakları incelenmiştir.

Daha sonra 12. saatte diğer 5 sıçan için aynı işlem uygulanmıştır.

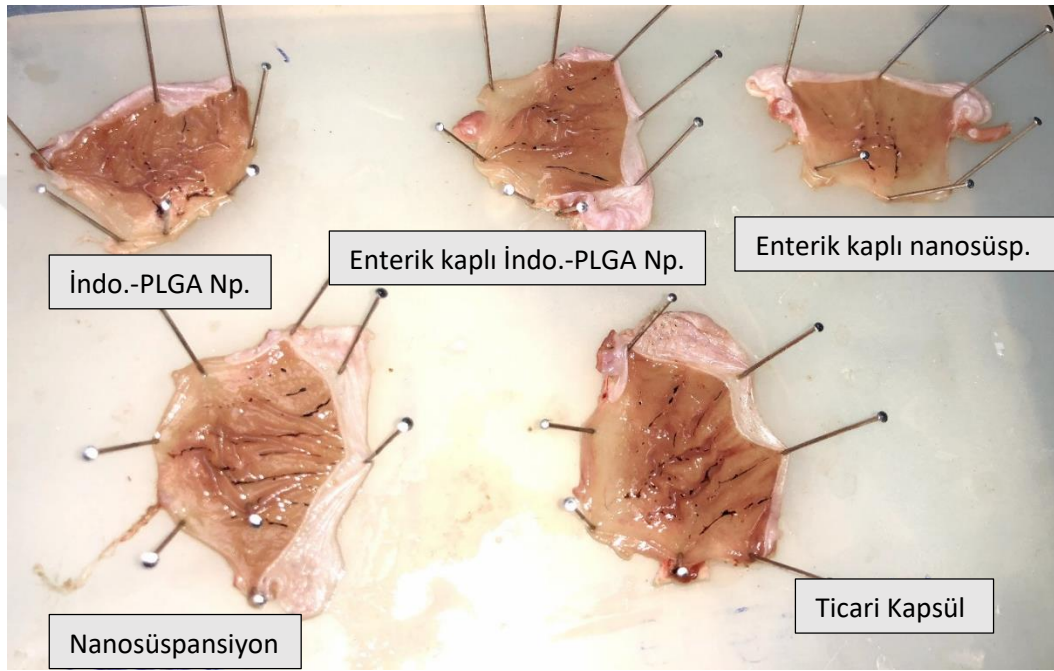
- 6. saat sonunda aynı doz indometazin içeren formülasyonlarımızın indometazin geleneksel kapsül verilen gruba kıyasla ülser oluşturma potansiyelini en az % 45.24 oranda azalttığı tespit edilmiştir. Mide lümeni içinde oluşan ülserli bölgeler milimetrik olarak sayılmıştır. Elde edilen sayılar “mm²” (milimetrekare) cinsinden verilmiştir. Bu veriler kontrol grubuna kıyasla karşılaştırılmıştır.
- Enterik kaplı formülasyonlar ise % 35 ve % 40 ülser oluşturma potansiyelleri ile deneydeki en az ülserli alan oluşturan formülasyonlar olmuşlardır.

Kontrol Grubu (indometazin geleneksel kapsül verilen hayvanlarda): 42 mm² ülserli alan tespit edilmiştir. Bu değer % 100 kabul edilirse;

- İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinin oluşturduğu ülserli alan: 20 mm² (% 47.62)
- Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri: 17 mm² (% 40.48)
- İndometazin Nanosüspansiyonu: 23 mm² (% 54.76)
- Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu: 15 mm² (% 35.71).

12. saat sonundaki sonuçlarda ise kontrol grubu olan sıçanın midesi harap halde bulunmuştur.

Ayrıca 6. ve 12. saatin sonunda indometazin geleneksel kapsül verilen sıçanların mide mukozasının oldukça kırmızı ve kabarmış olduğu ve hiperemi olduğu gözlenmiştir. Kanama hatlarının etrafında da minör kanamalar olduğu gözlenmiştir. Sıçanlara ait elde edilen mide görüntüleri aşağıda Şekil 4.75'te verilmiştir. Burada alınan olumlu ön deneme sonuçları neticesinde asıl deneylere geçilmiştir.



Şekil 4.75. Ön deneme çalışması, 6. saat sonunda sıçan mide mukozalarının görüntüsü

Çalışmalar sonunda saf indometazin, indometazin geleneksel kapsül ve indometazin ER kapsül uygulanan her iki gruptaki sıçanların mide mukozalarının oldukça kırmızı, lümenlerinin kabarmış ve belirgin hiperemiler görülmüştür. Kanama hatlarının etrafında da minör kanamalar gözlenmiştir. Bu durum, uyguladığımız hiçbir formülasyon grubunda gözlenmemiştir. Saf indometazin, indometazin geleneksel kapsül veya indometazin ER kapsülü ülser oluşturma potansiyeli açısından % 100 kabul edersek, geliştirdiğimiz indometazin içeren yeni ilaç taşıyıcı formülasyonların anlamlı şekilde bu 3 kontrol grubuna oranla daha az

ülser oluşturduğu, sıçan midelerine daha az zarar verdiği görülmüştür. Sonuçlar aşağıda Tablo 4.21 - 4.27’de verilmiştir. Ülser Skorlarına ait 6.saat verileri Şekil 4.76’da, 12.saat verileri ise Şekil 4.77’de grafiksel olarak istatistiksel sonuçları da içerecek şekilde verilmiştir. Sıçan midelerine ait görüntüler ise her bir zaman grubu ve formülasyon için ayrı ayrı aşağıda Şekil 4.78 - 4.95’te verilmiştir.



Tablo 4.21. 6. saat sonunda sıçan midelerindeki ülserli alanlar (mm²)

Sıçan Sayısı (n)	Saf indometazin	Konvansiyonel kapsül	İndometazin yüklü-PLGA Np.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA Np.	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	Boş PLGA Np.	Enterik kaplı boş PLGA Np.	Sağlıklı kontrol
1	56	38	12	15	10	1	0	0	0
2	36	16	28	7	20	6	0	0	0
3	25	26	7	3	12	12	-	-	0
4	43	45	10	20	12	11	-	-	-
5	30	9	10	2	21	12	-	-	-
6	34	25	2	7	10	12	-	-	-
$\bar{X}$	37.33 ±	26.50 ±	11.50 ±	9.00 ±	14.17 ±	9.00 ±	-	-	-
	10.95	13.37	8.80	7.07	5.00	4.56	-	-	-

Tablo 4.22. 12. saat sonunda sıçan midelerindeki ülserli alanlar (mm²)

Sıçan Sayısı (n)	Saf indometazin	Konvansiyonel Kapsül	ER Kapsül	İndometazin yüklü-PLGA Np.	Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA Np.	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu	Boş PLGA Np.	Enterik kaplı boş PLGA Np.
1	42	58	24	16	24	24	8	0	0
2	40	58	40	29	11	17	29	0	0
3	54	54	16	22	10	34	19	-	0
4	60	48	18	10	11	7	22	-	-
5	38	21	36	22	9	18	20	-	-
6	27	40	28	25	12	28	16	-	-
$\bar{X}$	43.50 ± 11.83	46.50 ± 14.25	27.00 ± 9.61	20.67 ± 6.74	12.83 ± 5.56	21.33 ± 9.46	19.00 ± 6.93	-	-

Tablo 4.23. Saf indometazine kıyasla formülasyonların 6. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%)

	İndometazin yükü-PLGA nanopartikülleri	Enterik kaplı indometazin yükü- PLGA nanopartikülleri	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
%	30.81	24.11	37.96	24.11

Tablo 4.24. İndometazin geleneksel kapsüle kıyasla formülasyonların 6. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%)

	İndometazin yükü-PLGA nanopartikülleri	Enterik kaplı indometazin yükü- PLGA nanopartikülleri	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
%	43.40	33.96	53.47	33.96

Tablo 4.25. Saf indometazine kıyasla formülasyonların 12. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%)

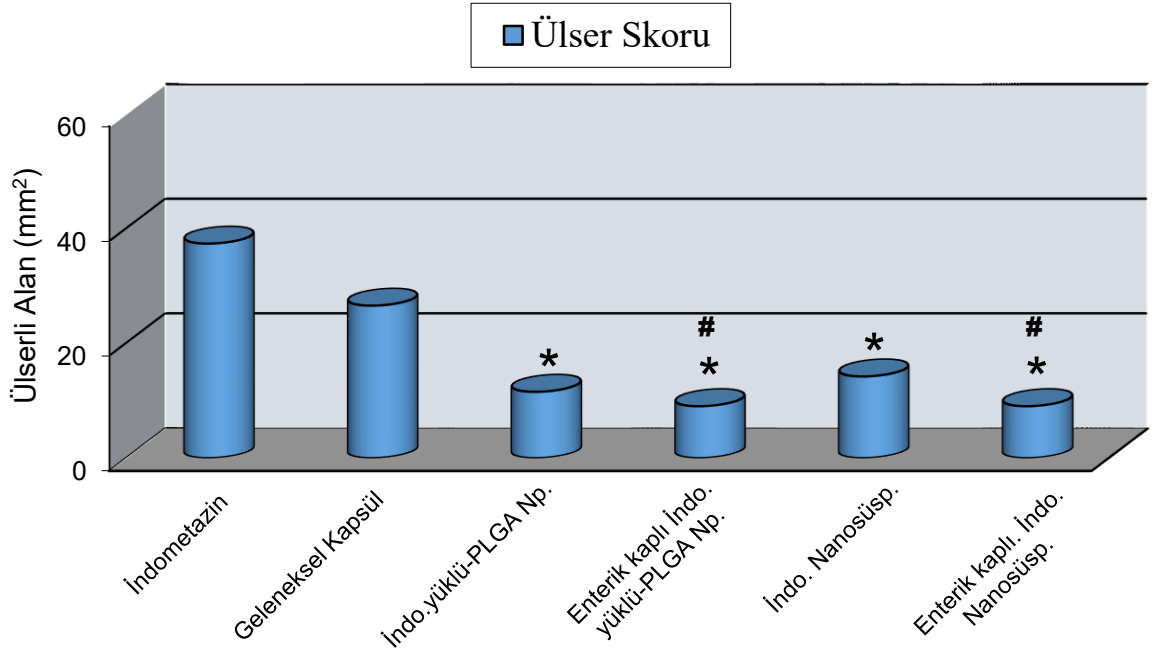
	İndometazin yükü-PLGA nanopartikülleri	Enterik kaplı indometazin yükü- PLGA nanopartikülleri	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
%	47.52	29.49	49.03	43.68

Tablo 4.26. İndometazin geleneksel kapsüle kıyasla formülasyonların 12. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%)

	İndometazin yükü-PLGA nanopartikülleri	Enterik kaplı indometazin yükü- PLGA nanopartikülleri	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
%	44.45	27.59	45.87	40.86

Tablo 4.27. ER kapsüle kıyasla formülasyonların 12. saat sonunda sıçan midelerinde ülser oluşturma potansiyeli (%)

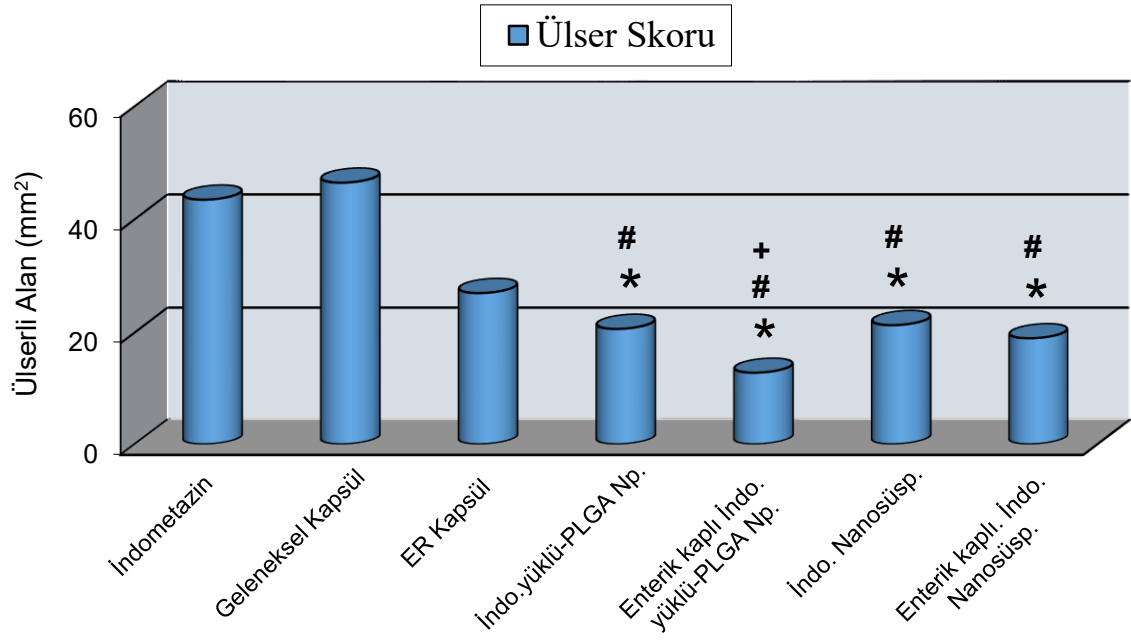
	İndometazin yükü-PLGA nanopartikülleri	Enterik kaplı indometazin yükü- PLGA nanopartikülleri	İndometazin nanosüspansiyonu	Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu
%	76.56	47.52	79.00	70.37



Şekil 4.76. 6. saat sonucunda elde edilen ülser skorlarının grafiksel olarak gösterimi

* p<0.05 Saf indometazin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

p<0.05 Konvansiyonel kapsül grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

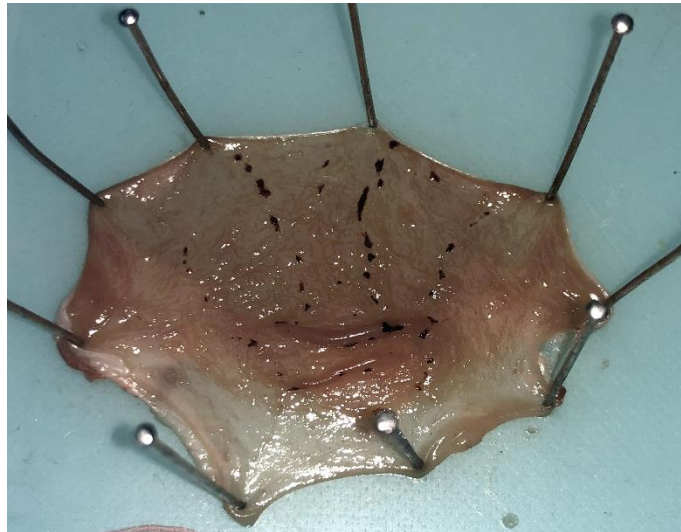


Şekil 4.77. 12. saat sonucunda elde edilen ülser skorlarının grafiksel olarak gösterimi

* $p < 0.05$ Saf indometazin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

$p < 0.05$ Konvansiyonel kapsül grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

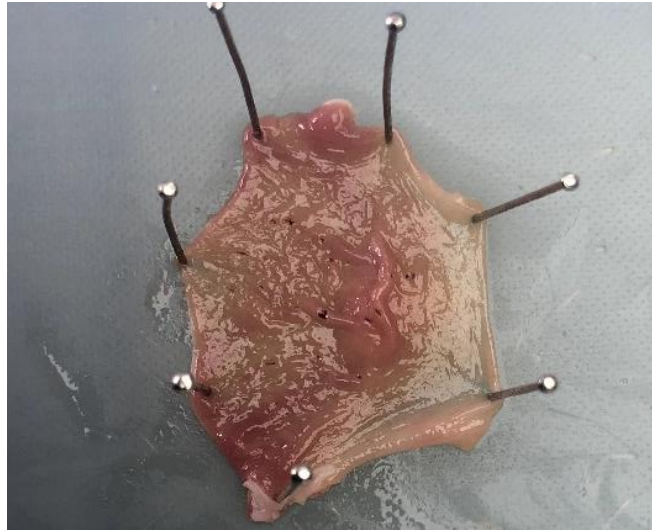
+ $p < 0.05$ ER kapsül grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.



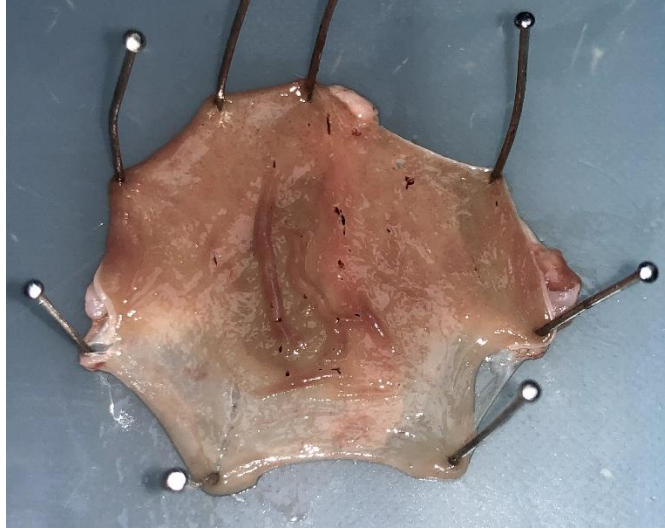
Şekil 4.78. İndometazin verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



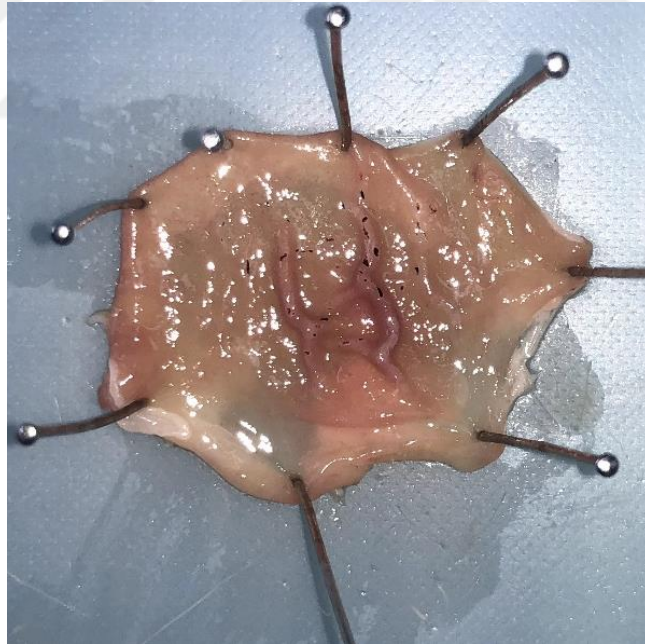
Şekil 4.79. İndometazin geleneksel kapsül verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



Şekil 4.80. İndometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



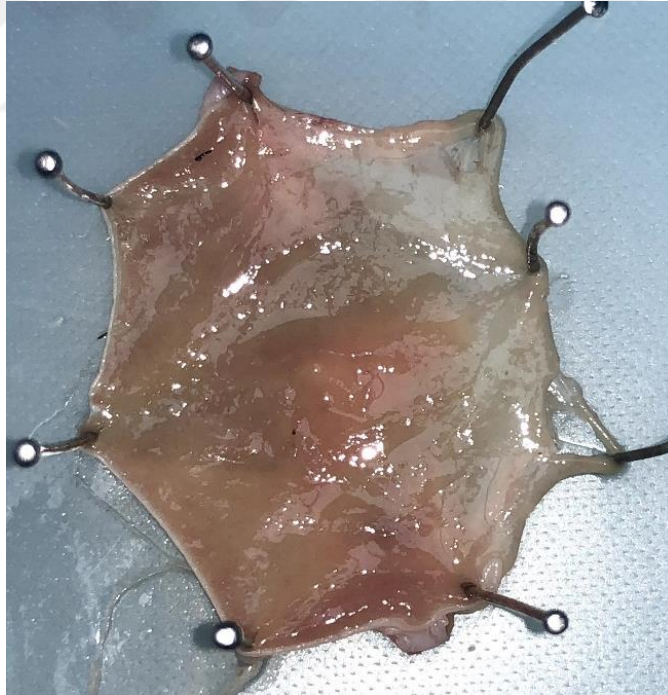
Şekil 4.81. Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



Şekil 4.82. İndometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



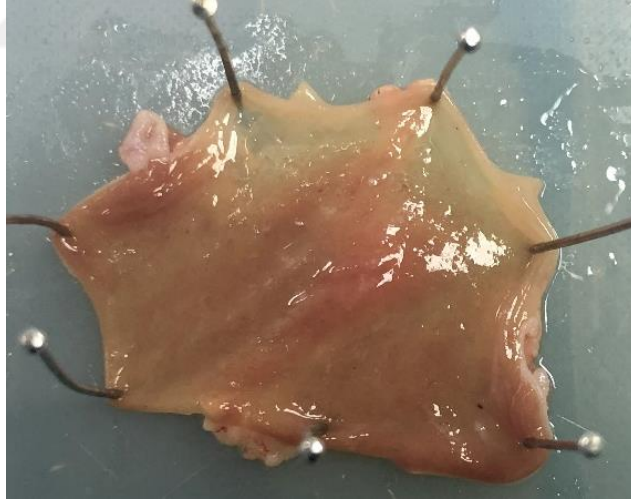
Şekil 4.83. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



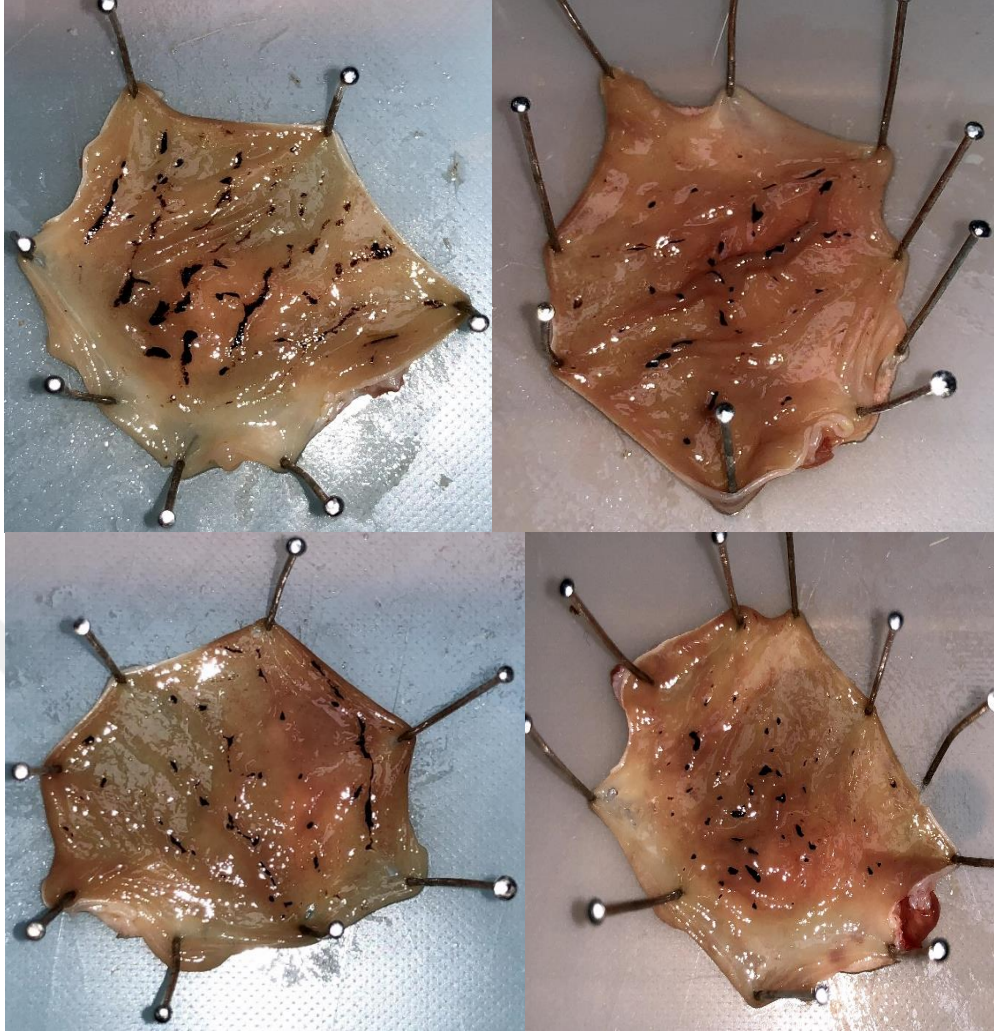
Şekil 4.84. Boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



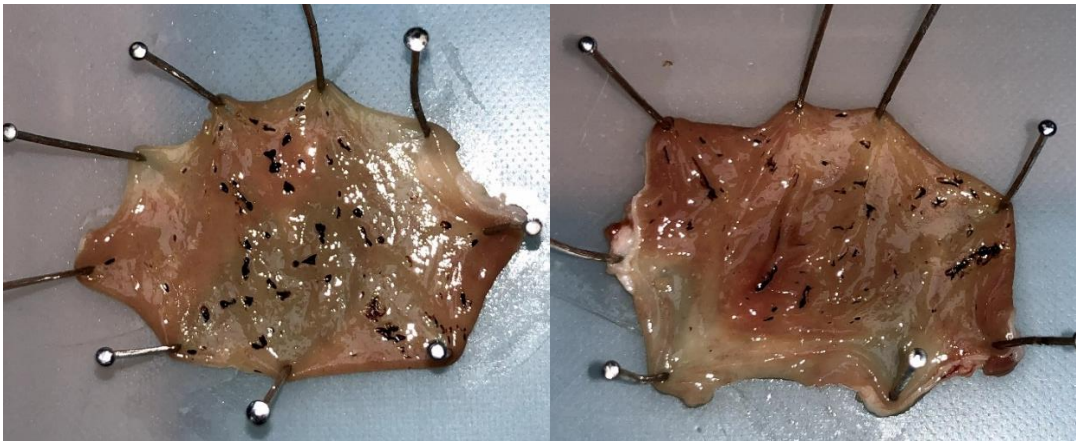
Şekil 4.85. Enterik kaplı boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



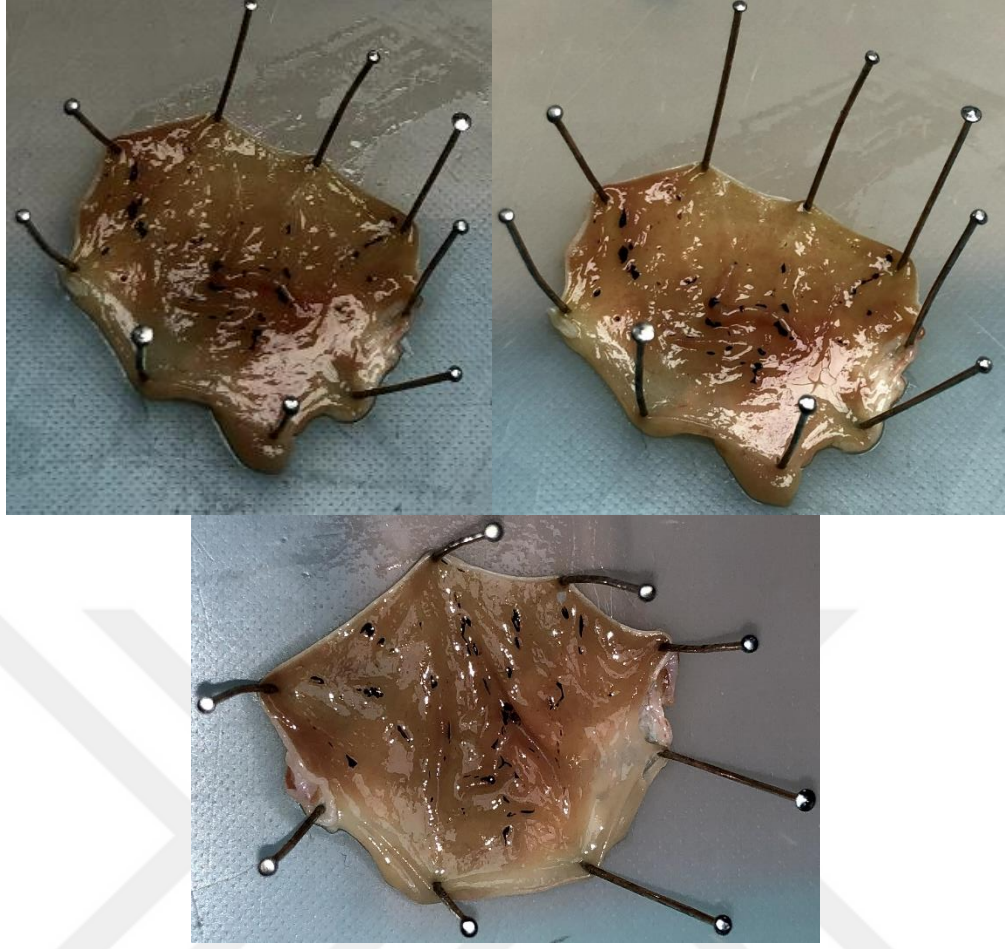
Şekil 4.86. Sağlıklı kontrol grubundaki sıçanların mide mukozasının 6. saat sonundaki görüntüsü



Şekil 4.87. İndometazin verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



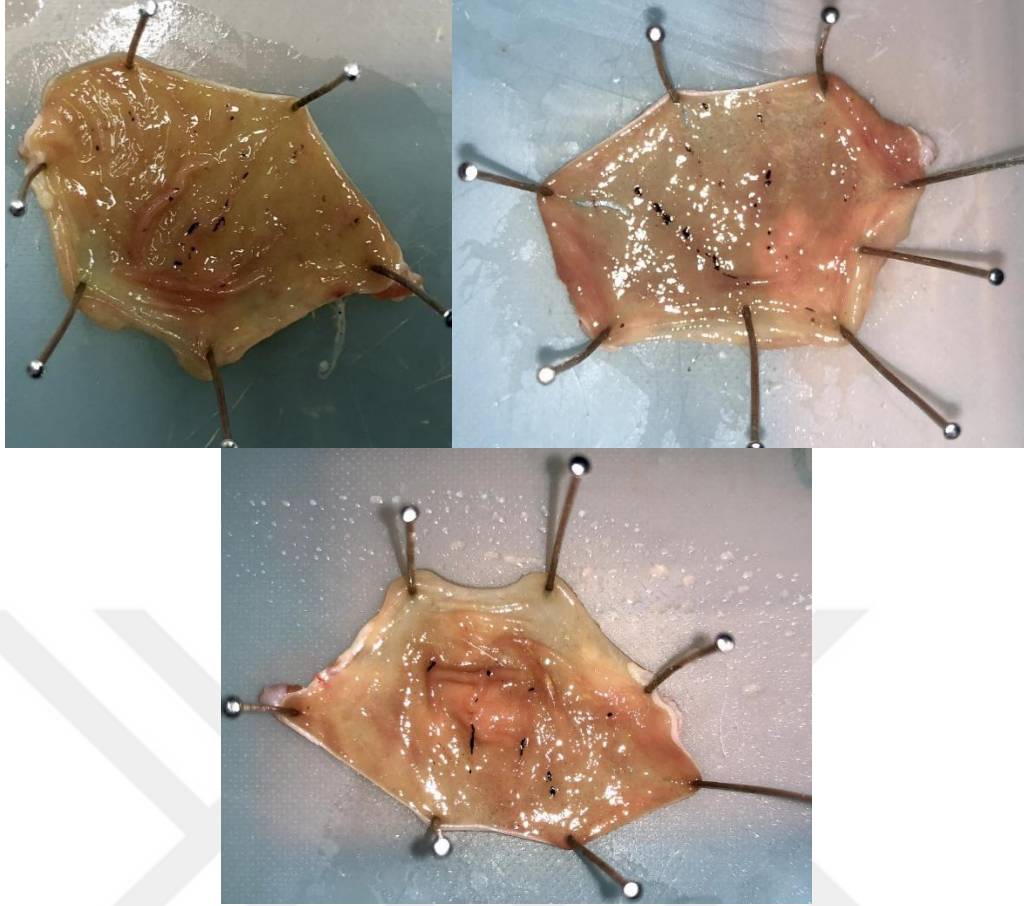
Şekil 4.88. İndometazin geleneksel kapsül verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



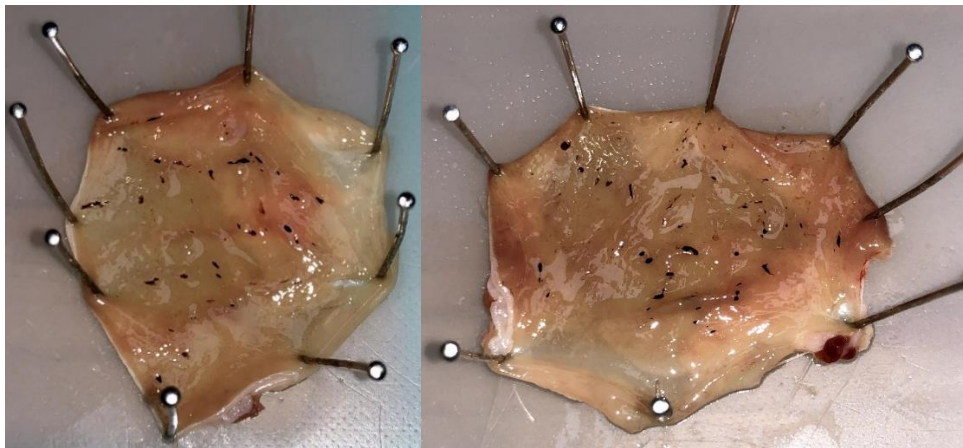
Şekil 4.89. İndometazin ER kapsül verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



Şekil 4.90. İndometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



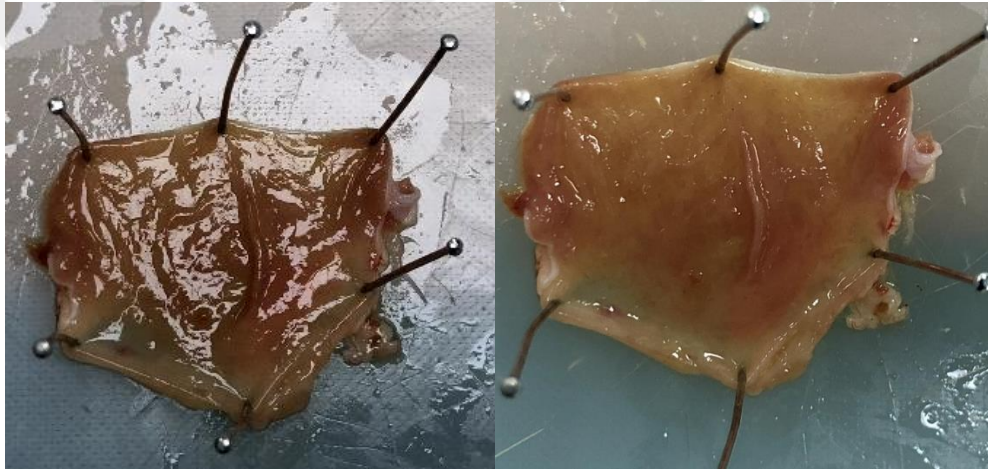
Şekil 4.91. Enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



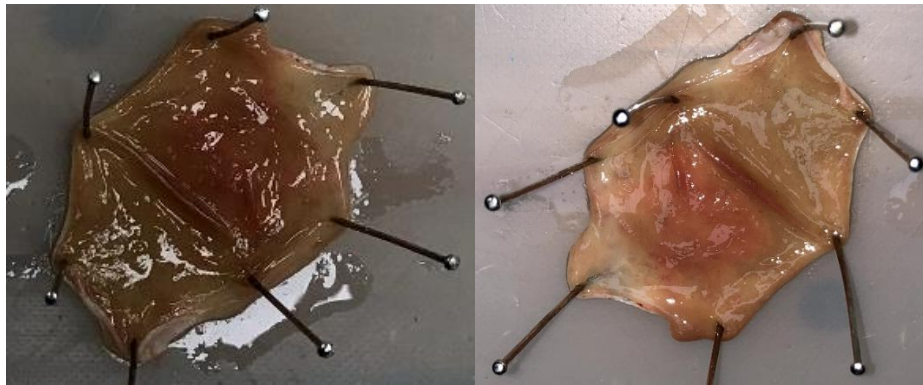
Şekil 4.92. İndometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



Şekil 4.93. Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyon formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



Şekil 4.94. Boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri



Şekil 4.95. Enterik kaplı boş nanopartikül formülasyonu verilen sıçanların mide mukozalarının 12. saat sonundaki görüntüleri

5. TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında indometazin içeren ve dünya ilaç piyasasında bulunmayan yeni ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları başarıyla geliştirilmiştir. Ayrıca bu formülasyonların enterik kaplama çalışmaları da yapılmıştır. Elde edilen tüm formülasyonlar karakterize edilerek, dissolüsyon profilleri piyasa preparatları ile karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Bu formülasyonlar ve piyasada var olan indometazin preparatları, saf indometazinin yan etkisi olan ülser oluşturma potansiyelleri açısından irdelenmiştir.

Günümüzde NSAİİ'ler, analjezik, antienflamatuar ve antipiretik özellikleri ile dünya çapında en yaygın kullanılan ilaçlar arasındadır. Her gün 30 milyondan fazla insan NSAİİ kullanmakta ve ABD'de reçetesiz satılan analjezikler ilaç pazarının % 60'ını oluşturmaktadır.¹¹⁴ İndometazin, kuvvetli bir NSAİİ ajan olup bu grup ilaçlar arasında GI toksite açısından yüksek risk faktörlü olarak anılır.^{114, 115} Gastrik ülserasyon, midenin aşırı aside ve agresif pepsin aktivitesine maruz kalması üzerine mukozal epitelde meydana gelen iyi huylu bir lezyondur. Ancak dünyada her 15.000 ülser komplikasyonun tahminen 15'inin ölümle neticelendiği de bilinmektedir.¹¹⁶

Ülser, üst mide ve bağırsak mukozasında, musküleris mukozasından bağırsak duvarının daha derin katmanlarına kadar uzanan bir hastalıktır. Peptik ülser için iki ana risk faktörü vardır. Bunlardan ilki *Helicobacter pylori* diğeri ise NSAİİ'dir. Bunlar, güçlü etkinlikleri ve uzun klinik kullanım geçmişlerinin yanısıra ölümcül komplikasyonlar ile peptik ülserlere sebep olabilmektedirler. Peptik ülser, NSAİİ kullanımının bilinen bir komplikasyonudur. GI sistemde COX-1'in inhibisyonu, prostaglandin sekresyonunun ve gastrik mukozadaki sitoprotektif etkilerinin azalmasına yol açar. Bu nedenle mukozal zarara yatkınlığı arttırır. COX-2'nin inhibisyonu da mukozal yaralanmalarda rol oynayabilir.¹¹⁵ Düşük dozda aspirin dahil NSAİİ'lerle oluşan GI toksite, risk faktörü

olan hastalarda en yüksektir. Ülser oluşumunu hızlandıran risk faktörleri ise; ileri yaş (> 65 yıl), geçmişteki peptik ülser öyküsü, kalp hastalığı ve antiplatelet, kortikosteroid ve antikoagülanların kullanımıdır. Ek olarak, daha yüksek NSAİİ dozlarının kullanılması, üst GI komplikasyon riskinin artmasına neden olur. Uzun süreli NSAİİ kullanımı ve H. pylori enfeksiyonu, GI toksisite riskinin artmasıyla da ilişkilidir.^{114, 115}

Oral yoldan ilaçların kullanımı günümüzde hastalıkların tedavisinde en çok tercih edilen uygulama yoludur. Ancak günümüz geleneksel ilaçları ile yapılan tedavilerde doz sıklığı, yan ve toksik etkilerin bu nedenle artması, biyoyararlanımın düşük olması hasta memnuniyeti açısından kabul edilebilir bir durum değildir. Geleneksel ilaçlar ile oral uygulamayı takiben görülen bir takım sorunlardan (zayıf biyoyararlanım, GI sistemde meydana gelen istenmeyen yan etkiler veya bu maddelerin düşük çözünürlüğe sahip olmaları) ötürü alternatif ilaç taşıyıcı sistemlerin araştırılmasını zorunlu hale getirmiştir.

21.yüzyıl başları itibariyle popüler hale gelen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, bugün hemen hemen her tedavi grubunda çalışılan önemli bir dozaj şekli haline gelmiştir. Nanopartiküler ilaç taşıyan sistemler, biyofarmasötik endüstrisi için uygulanabilir ve gelecek vaad eden bir strateji gibi görünmektedir. Geleneksel ilaç taşıyan sistemlere göre avantajları vardır. Oral yolla verilmesi zor olan birçok aktif ilacın biyoyararlanımını, çözünürlüğünü ve geçirgenliğini artırabilirler. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, ilaç dozaj sıklığını azaltarak hastanın uyuncunu da artırmaktadır. Yakın gelecekte nanopartiküler ilaç taşıyan sistemler, suda düşük çözünürlüğe, zayıf geçirgenlik ve biyoyararlanıma sahip birçok biyolojik ilacın kullanılmasını sağlayabilecektir. Nanopartiküller, stabilite ve yapılarını koruyarak bu ilaçlara özgü problemleri en aza indirebilirler. Bunların yanında nanopartiküller ile hedeflenen sistemler veya kontrollü salımlar gerçekleştirilebilmektedir.¹⁷

Oral yol, daha iyi hasta uyuncu ve uygulama kolaylığı nedeniyle ilaç kullanımı için en çok tercih edilen yolu oluşturur. GI kanaldaki biyoyararlanımı çok düşük olan ve bağırsak epiteli yoluyla düşük geçirgenliği yüzünden zayıf çözünürlüğe ve emilime sahip ilaçların oral emilimini artıran dozaj formunun geliştirilmesi farmasötik alandaki en büyük zorluklardan biridir. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak veya sorunları en aza indirmek için, çok sayıda çalışma polimerik nanopartiküllerin zayıf emilen ilaçların oral yoldan verilmesi için taşıyıcı sistemler olarak uygulanabilme olasılığını göstermiştir.¹⁰⁴

Oral ve rektal geleneksel dozaj şekilleri ile dünya ilaç piyasasında mevcut olan ve varlığını sürdüren indometazin için literatürde çok olmamakla birlikte farklı alanlarda yapılmış yeni ilaç taşıyıcı sistemleri kapsayan çalışmalar bulunmaktadır.

Kamel ve ark.¹¹⁷ osteoartrit tedavisinde kullanılmak üzere ortalama 173.9 nm partikül boyutuna sahip indometazin ve glukozamin içeren PLGA nanopartiküllerini ince film hidrasyon metodu kullanarak geliştirmişlerdir. Bu nanopartiküller deney hayvanlarının hastalıklı diz eklemlerinde denemiş ve olumlu sonuçlar almışlardır. Castelli ve ark.¹¹⁸ PLGA ile dipalmitofosfatidilkolin etkileşimini belirlemek, ilaç salımını kalorimetrik olarak değerlendirmek için indometazin içeren PLGA mikroküreleri hazırlamışlardır. Barichello ve ark.⁵⁵ birçok model ilacın PLGA ile nanopresipitasyon yöntemi kullanarak enkapsülasyon etkinliklerini kıyaslamışlardır. indometazin ve diğer suda çözünmeyen etkin maddeler için PLGA nanopartiküllerinin ilacı dış ortamdan etkilenmeden çevreleyip hapsettiğini vurgulamışlardır. Puebla ve ark.¹¹⁹ romatoid artrit tedavisinde kullanılmak üzere çözücü buharlaştırma yöntemi ile indometazin içeren biyoparçalanır PEG ile konjuge edilmiş PLGA mikroküreleri geliştirmişlerdir. 21 gün *in vivo* uygulama sonucu antianjiogenik ve antiinflamatuvar etkilerde kontrol gruplarına göre tedavide olumlu neticeler elde etmişlerdir. Fernandez ve ark.¹²⁰ radyosterilizasyon yönteminde gama ışınlarının etkisini değerlendirmek üzere PEG ile türevlendirilmiş

indometazin içeren PLGA mikrokürelerini emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi kullanarak hazırlamışlardır. Gama ışınları ile sterilizasyon sonucunda düşük sıcaklıklarda tatmin edici sonuçlar almışlardır. Madani ve ark.¹²¹ koaservasyon ve çözücü buharlaştırma/ekstraksiyon yöntemlerini kullanarak embolizasyon tedavisinde indometazinin antiinflamatuvar özelliklerini araştırmak üzere indometazin-yüklü dietilaminoetil trisakril PLGA mikrokürelerini geliştirmişlerdir. Hazırlanan mikrokürelerin embolizasyon bölgesinde uzun süre kaldığı, inflamasyonu azalttığı ve tedaviye yardımcı olduğunu kanıtlamışlardır. Kang ve ark.¹²² süperkritik akışkan (CO₂) tekniği kullanarak indometazin-yüklü poly(L-laktik asit)/poly(laktide-ko-glikolid) mikropartikülleri hazırlamışlar ve *in vitro* karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak *in vitro* sitotoksite çalışmaları ile geliştirdikleri formülasyonun anti-tümör özelliğinden faydalanılabileceğinden bahsetmişlerdir.

Tez çalışmamız kapsamında öncelikle indometazine ait fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesine yönelik çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak erime derecesinin ölçümü Bölüm 3.4.1’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen erime eğrilerine bakıldığında erime pikinin 155-165 °C arasında olduğu görülmektedir. Sonuçlar literatür ile uyumludur.^{123, 124} Maddenin 300 °C’nin üzerinde ise bozunduğu gözükmemektedir. İndometazinin UV spektrumuna bakıldığında, Bölüm 3.4.2’de anlatıldığı gibi hazırlanan çözeltisinin maksimum absorbansın 300-350 nm dalga boyu arasında olduğu, spesifik absorbansının ise 200 nm civarında olduğu görülmüştür. Literatür bilgileri incelendiğinde sonuçların benzerliği görülmektedir.^{125, 126} Saf indometazine ait FT-IR spektrumunda 3200 cm⁻¹ - 3000 cm⁻¹ bant aralığında karakteristik aromatik C-H geriliminin, 3000 cm⁻¹ - 2800 cm⁻¹ bant aralığında C-H gerilim titreşimlerinin, 1800 cm⁻¹ - 1600 cm⁻¹ bant aralığında C=O gerilim titreşimlerini, 1400 cm⁻¹ - 1200 cm⁻¹ bant aralığında asimetrik aromatik O-C gerilim titreşimlerini ve 1200 cm⁻¹ – 1000 cm⁻¹

bant aralığında ise simetrik aromatik O-H gerilim titreşimleri tespit edilmiştir. Sonuçlar literatürler ile kıyaslandığında uyumlu olduğu görülmektedir.^{50, 125, 127, 128} Yine Bölüm 3.4.4'te anlatıldığı gibi indometazin için kütle analizi yapılmış ve sonucunda molekül ağırlığının 357.0766 g/mol olduğu bulunmuştur. Bulunan molekül ağırlığı literatür ile uyumlu çıkmıştır.^{68, 129}

İndometazin miktar tayini için Bölüm 3.5'te anlatıldığı üzere, indometazin için USP 30-NF25 yer alan safsızlık analizi tayini⁸⁵ ve Keishiro Tomoda ve ark.⁸⁶'nın geliştirdiği bir yöntem üzerinde ufak modifikasyonlar yapılarak HPLC yöntemi seçilmiştir. Sonuçta maksimum absorbansın alındığı 254 nm kaydedilmiş ve kalibrasyon eğrisi için yapılan ölçümler neticesinde determinasyon katsayısı 1'e yakın doğrulukla elde edilmiştir ($R^2 = 0.9997$).

İndometazinin miktar tayini, stabilite ve dissolüsyon ölçümlerinde kullanılacak olan analitik yöntemin amaçlanan uygulamalar bakımından güvenilirliğini belirlemek amacıyla yöntem validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar, ICH (International Conference on Harmonisation) kılavuzuna (Q2 (R1) (CPMP/ICH/381/95) uygun olarak gerçekleştirilmiştir.¹³⁰ Yöntemin belirli bir doğruluk ve kesinlikle saptayabildiği minimum değer için seyreltik numuneler ölçülmüş ve neticesinde deneysel olarak sinyal/gürültü oranının 10/1, konsantrasyonun 0.3 µg/mL olduğu tespit edilmiştir (LOQ). Yöntem belirli bir doğruluk ve kesinlik ile bu en küçük konsantrasyon değerini saptayabildiği için kalibrasyon eğrisi çizilirken en alt nokta olarak seçilmiştir. Yöntemin kromatogram üzerinde pik verdiği en düşük konsantrasyon (LOD) ise 0.1 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Bir analitik yöntemin kesinliği, hem tekrarlanabilirlik hem de tekrar elde edilebilirlik parametreleri bakımından önemlidir. Validasyon parametrelerinden olan yöntemin doğruluğu ve kesinliğini belirleyebilmek için Bölüm 3.7'de anlatıldığı üzere

alışmalar yapılmıştır. Gün içi ve günler arası kesinlik değerlerinin standart sapmasının % 2'nin altında olması beklenir.⁸⁷ Hem % BH değerleri hem de % BSS ve % VK değerleri % 2'nin altında bulunmuştur. Bu sayede yöntemin kesinliği ve doğruluğu kanıtlanmıştır.

Analitik yöntemin doğrusallığının sağlanabilmesi için determinasyon (R^2) katsayısının 1'e yakın olması beklenir.⁸⁷ Kalibrasyon eğrisi oluşturukten doğrusallıktan ayrılan yüksek konsantrasyonlu noktalar çıkarılmış ve kalibrasyon eğrisi doğrusal sonuç verecek şekilde 6 noktadan çizilmiştir.

İndometazinin maksimum absorbens verdiği dalga boyunda (254 nm), indometazin içermeyen nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında kullanılan tüm yardımcı maddeler (PLGA, PVA, Kollicoat[®] MAE 100P gibi) aynı formülasyon ve analiz ortamında HPLC sistemine enjekte edilmiş ve indometazinin absorbens verdiği sürede herhangi bir pik olmadığı ve miktar tayinini etkilemediği tespit edilmiştir. Yöntemimizin bu yönüyle indometazin için seçici olduğu kanıtlanmıştır. İndometazin ve formülasyonda kullanılan tüm materyallerin varlığında yapılan analizlerde de yalnız indometazin piklerinin varlığı tespit edilmiş ve yöntemin indometazin için özgün olduğu belirlenmiştir.

İndometazinin analizler süresince stabil kaldığını ispatlamak amacıyla yapılan çalışmalarda indometazinin stok çözelti içindeki stabilitesi, oda sıcaklığı (25 °C) ve daha sonra gerçekleştirilecek olan dissolüsyon koşullarındaki sıcaklıkta (37 °C) incelenmiş ve istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Sonuçların 30 gün boyunca tutarlı sonuçlar verdiği ve stabil kaldığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Analitik yöntem validasyon parametrelerinin hesaplanması sonucunda elde edilen veriler ışığında yöntemin güvenilir, tekrarlanabilir ve tekrar edilebilir olduğu kanıtlanmıştır.

Nanopresipitasyon yöntemi, ilk keşfinden bu yana çeşitli biyomedikal uygulamalara yönelik polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan basit ve tekrarlanabilir bir tekniktir.^{54, 131, 132} Temel fikir, organik çözücünün sulu faza difüzyonu sebebiyle polimer moleküllerinin bu fazda hapsolmesidir.⁹³

Etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinden ve analitik yöntem validasyonunun gerçekleştirilmesinden sonra uygun ve stabil formülasyonların geliştirilmesi için ilk olarak ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında oldukça fazla parametre ve durum değerlendirilmesi yapılmıştır. Farmasötik teknoloji açısından optimize edilen ve stabil bir formülasyon elde etmek için aynı anda pek çok kritik işlem parametresi incelenmiştir. Bu amaçla polimerik nanopartiküler sistemleri geliştirmek için polimer miktarı, kullanılan çözücü seçimi ve hacmi, kullanılan stabilizan konsantrasyonu, yöntem parametrelerinin tasarımı ve sonuç ürünün değerlendirilmesi süreçleri yürütülmüştür. Bu süreçte yapılan denemeler neticesinde en stabil partikül boyutu dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğine sahip formülasyonlar belirlenmiştir.

Ön formülasyon çalışmaları, biyofarmasötik prensiplerin ilaç maddesinin fizikokimyasal parametrelerine uygulanmasını içerir, optimum bir ilaç taşıyıcı sistemi tasarlama amacı ile karakterize edilir. Ön formülasyon çalışmaları, formülasyon problemlerini öngörmede ve hem sıvı hem de katı dozaj formu teknolojisinde mantıksal yolu belirlemede önemli bir rol oynar.¹³³

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında kullanılacak çözücülerin seçimi, yöntemin gerekliliklerine ve polimerin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Kullanılacak organik çözücüler şu üç niteliğe sahip olmalıdır: (1) polimeri çözündürme, (2) su ile karışabilme (3) kolay buharlaşma (düşük kaynama noktası).^{54, 89} Bu yöntem için "en iyi çözücünün" açık bir tanımı yoktur. Bazen tek başına bazen de karışım halinde

kullanılabilmektedirler.⁵⁸ Kullanılacak yönteme uygun        seçimi için su ile karı abilirli i olan etil asetat, etanol, aseton ve asetonitril denenmiştir. Daha küçük boyut ve en az kalıntı, asetonitril ile hazırlanan nanopartiküllerde gözlemlenmiştir. Dolayısıyla PLGA polimeri ile hazırlanan sistemler için asetonitril kullanılmasına karar verilmiştir. indometazin içeren nanosüspansiyonlar için de yine farklı      ler ve       karışımları kullanılmış ancak en iyi partikül şekli ve oluşumu aseton ile hazırlanan nanos spansiyonlarda gözlenmiştir. Bu nedenle organik       seçimi asetondan yana olmuştur.

Nanopartikülleri stabilize etmek için PVA veya diğer hidrofilik yüzey aktif maddeler Tween[®], Poloksamer[®] ve Pluronik[®] gibi stabilize edici maddeler su fazına ilave edilir. Stabilizan konsantrasyonunun, oluşan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerini ve stabilitesi ile birlikte partikül boyutlarını da etkilediği bilinmektedir. Genel olarak, nanopartikülleri stabilize etmek için % 0.1'den % 7'ye varan (a/h) oranlarda stabilizan konsantrasyonu yeterli bulunmuştur. Ancak stabilizan ve dispersiyon ortamının türüne bağlı olarak bazen % 7'ye (a/h) varan yüksek konsantrasyonlar gerektirmektedir.⁸⁹   n formülasyon çalışmaları sırasında, stabilizan olarak literatürde PLGA ile çoğunlukla PVA kullanıldığı saptanmış ve bu nedenle PVA'ya karar verilmiştir.^{6, 43, 105, 134-136} Literatürlerde PVA'nın stabilizan olarak kullanıldığı PLGA formülasyonlarında, stabilizan konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak partikül boyutunun azaldığını bildiren makaleler ile birlikte bu savın tam tersini   ne süren çalışmalar da bulunmaktadır.⁵⁴ Aslında stabilizan miktarı, hazırlanan sistemin en etkin parametresidir. D    k PVA konsantrasyonunda PLGA nanopartiküllerinin boyutlarının k   ld   , artan PVA konsantrasyonu ile sulu fazın viskozitesinin artışına bağlı olarak da nanopartiküllerin boyutların büyüdüğü bildirilmiştir.⁵⁴ Yine PLGA ile yapılan bir çalışmada % 0.5 – 2 oranında stabilizan olarak PVA ile denemeler yapılmış, ortalama

300 nm boyutuna sahip nanopartiküllerin elde edildiği bildirilmiştir.⁵⁸ İlaç taşıyıcı sistemlerinin zeta potansiyeli, taşıyıcıların fiziksel stabilitesini ve *in vivo* sonuçları etkileyen çok önemli bir parametredir. PVA ile hazırlanan nanopartiküllerin yüklerindeki azalma, daha uzun hidrofilik zincire sahip pluronikler ile hazırlanan nanopartiküllere nazaran daha düşük olduğu bulunmuştur.¹⁴ Çalışmamızda % 0.1 – 3 (a/h) oranlarında PVA ile denemeler yapılmış, neticede en stabil nanopartikül oluşumunun % 0.1 (a/h) ile olduğu tespit edilmiştir (2.5 mg PVA kullanarak nanopartiküler sistemler stabilize edilmiştir). Bu oran ile minimum düzeyde stabilizan kullanarak nanopartiküler sistemler elde edilmiştir.

Polimer miktarının seçimi nanopartikül oluşumu üzerine oldukça etkilidir. Artan polimer miktarıyla beraber partikül boyutunun ve enkapsülasyon etkinliğinin de arttığı bildirilmiştir. Bu durumun sebebi olarak da organik fazdaki viskozitenin artışı şeklinde yorumlanmıştır.^{54, 58, 137} Polimer miktarı seçiminde, organik fazın viskozitesinin artmasının da agregat oluşumuna sebep olacağı bildirilmiştir.⁵⁴ Düşük miktarlardaki polimerin genellikle daha küçük nanopartiküller oluşturduğu rapor edilirken, yüksek polimer konsantrasyonlarının artan viskoziteye bağlı olarak daha büyük nanopartiküller oluşturduğu bildirilmiştir.⁸⁹ Nanopartiküler bir formülasyon geliştirirken en önemli parametrelerden biri de kuşkusuz etkin madde:polimer oranının belirlenmesidir. Bu doğrultuda çalışmamızda minimum miktarda polimer kullanılarak ön formülasyon çalışmalarına başlanmış ve bu miktar 25 mg (PLGA 50:50) olarak belirlenmiştir. Bu miktarı belirlerken PLGA ile nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan formülasyonlardaki organik faz/polimer oranı da göz ardı edilmemiştir.¹³⁸

Pekçok araştırmacı, ilaç konsantrasyonunun nanopartiküllerin boyutuna etkisini bildirmiştir. Genel olarak, düşük ilaç konsantrasyonunda küçük nanopartiküller elde edilmektedir. Örneğin bir çalışmada organik fazdaki sefuroksim aksetil konsantrasyonu

120 mg/mL'den 60 mg/mL'ye düşürüldüğünde, partikül boyutunun 800 nm'den ~300 nm'ye kadar küçüldüğü tespit edilerek ilaç konsantrasyonunun nanopartiküllerin boyutu üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yüksek ilaç konsantrasyonlarının, daha büyük nanopartikül oluşumuna ve agregat oluşumuna sebep olduğu da belirtilmiştir. Ayrıca, yüksek ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak viskozitedeki artış, difüzyonu indirgeyerek nanopartiküllerin verimini düşürmektedir.⁸⁹ Bu bağlamda polimer miktarı belirlendikten sonra literatürdeki çeşitli çalışmalar incelenmiş ve değişen miktarlarda indometazin kullanılarak denemeler yapılmıştır. En iyi ekin madde:polimer oranın 1:5, indometazin miktarının 5 mg ve optimum karıştırma süresinin de 30 dk olduğu tespit edilmiştir. Bu oranlar dışındaki etkin madde:polimer oranlarına bakıldığında yüksek konsantrasyonlarda boyutun büyüdüğü ve polimere hapsolmayan etkin maddeden kaynaklı kalıntıların varlığı saptanmıştır. Benzer sonuçlar literatür ile de uyum göstermektedir.¹³⁹

Su, nanopresipitasyon tekniğinde kullanılan en yaygın çözücüdür. Nanopartikül hazırlanma sürecinde, ilacın organik faza difüzyonunu önlemek için, ilaç ve polimerin suda çözünmemesi gerekmektedir. Organik faz:sulu faz oranlarına ilişkin çalışmalar, bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Organik faz:sulu faz oranındaki sulu faz miktarının organik faza oranla artırılmasıyla genellikle daha küçük nanopartiküllerin oluştuğu bildirilmiştir.⁸⁹ Başka bir çalışmada sulu faz hacminin iki katına çıkarılmasının PLGA nanopartiküllerinin boyutlarında önemli bir küçülmeye neden olduğu bildirilmiştir. Nanopresipitasyon yönteminde nanopartiküller, sulu faza organik fazın hızlı bir şekilde difüzyonu sonucu oluşur. Sulu fazın hacmi arttıkça organik çözücünün sulu fazda difüzyonu artar bu da partikül boyutunu küçültür.⁵⁴ Farklı bir çalışmada organik faz:sulu faz oranları azaltıldığında partikül boyutunun da küçüldüğü tespit edilmiştir (600, 369 ve 304 nm).¹⁴⁰ Organik faz:sulu faz oranı nanopresipitasyon da dahil

olmak üzere tüm nanopartikül hazırlama yöntemleri için önemlidir. Bu nedenle faz oranlarını belirlemek açısından seçilen indometazin ve polimer miktarını minimum seviyede çözündürecek ve kolay uzaklaştırılabilecek organik faz (aseton, asetonitril) miktarı 2.5 mL olarak belirlenmiştir.⁹⁵ Böylece organik faz miktarı sabit tutularak çalışmalar yapılmıştır. Optimum sürede, yüksek verimle elde edilen nanopartiküller için organik faz:sulu faz oranı 1:1 olarak seçilmiştir.

Nanopresipitasyon yönteminin esasında araştırmacılar genellikle, emülsiyon oluşturma-buharlaştırma yöntemleri için çok yüksek olan dış enerji gereksiniminin aksini vurgulamak için düşük enerji gerektiren karıştırıcılar kullanmışlardır.⁹⁰ Bununla birlikte nanopresipitasyon yönteminde, elde edilen nanopartiküllerin boyutunun, karıştırma hızından önemli ölçüde etkilendiği de bildirilmiştir. Genel olarak daha yüksek karıştırma hızları daha küçük nanopartiküllerle sonuçlanır. Örneğin, 300 rpm'den 1200 rpm'e çıkılarak nanopartikül hazırlandığında hız artışına bağlı olarak 800 nm boyuttan 300 nm boyuta inildiği gözlenmiştir. Partikül boyutundaki azalma, hızlı çekirdek oluşumuna ve çökmeye yol açan kütle aktarımına ve difüzyon hızına bağlı olabilmektedir.⁸⁹ Nanopresipitasyonda en yaygın kullanılan karıştırma yöntemi manyetik mekanik karıştırma yöntemidir. Karıştırma hızındaki artış, genellikle partiküllerin boyutunda küçülmeye neden olur. Bu, tabakaların daha verimli karışması ve dolayısıyla organik çözücünün sulu faza daha hızlı yayılmasıyla açıklanmaktadır.⁵⁴ Çalışmamızda hem homojenizatör ile hem de manyetik mekanik karıştırıcı ile denemeler yapılmış ve en iyi partikül boyutuna manyetik mekanik karıştırıcı ile 1000 rpm hızda ulaşılmıştır.

Nanopresipitasyon işleminin genel olarak ortam veya oda sıcaklığında yapıldığı rapor edilmiştir. Bu sebeple sıcaklığın nanopresipitasyon üzerindeki etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin Zhang ve ark., sıcaklığın (10, 20, 30 ve 40 °C) nanopresipitasyon ile hazırlanan partiküllerin boyutu üzerindeki etkisini araştırmış ve

40 °C ila 10 °C arasında bir azalmanın partikül boyutunda yaklaşık 800 nm'den 300 nm'ye varan düşüşe sebep olduğunu gözlemlemiştir. Düşük sıcaklıkta daha hızlı çekirdeklenme oranıyla birlikte daha küçük partiküllerin oluşabileceğini öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, başka bir araştırmada ise tam tersi bir eğilim gözlenmiştir. Sıcaklık, 0 °C'den 80 °C'ye yükseltildiğinde, her 10 derecelik artışla birlikte yaklaşık 10 nm'lik bir düşüş, toplamda ise 100 nm'lik bir düşüş rapor edilmiştir. Araştırmacılar, yüksek sıcaklıklarda polimerin çözünürlüğünün artmasının bir sonucu olarak çökmenin önlendiğini öne sürmüşlerdir.⁸⁹ Tüm çalışmalarımız literatürler ışığında oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Organik çözücünün buharlaştırılması sürecinde ise farklı sıcaklıklar denenmiş, PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığına yaklaşımadan (45-50 °C) organik çözücüyü vakum altında kısa sürede buharlaştırmak için uygulanacak sıcaklık 40 °C olarak belirlenmiştir.

pH'ya duyarlı bir kaplama, ilaç yüklü-PLGA nanopartiküllerinden ilaç salımını kısıtlayabileceği düşünülmektedir. Birçok ilaç taşıyıcı sistem oral yol ile verildiği için, ilaç taşıyıcıların, GI kanalındaki pH değerlerine duyarlı olması daha umut verici olacaktır. Eudragit®, karboksilik asit grubu nedeniyle PLGA nanopartiküllerinin kaplanmasında yaygın olarak kullanılır.¹³¹ Eudragit® gibi Kollicoat® MAE 100P'de karboksilik asit grubu içerir.⁴⁵ Bu bağlamda Kollicoat® MAE 100P pH'ya duyarlı bir polimerdir ve pH 5.5'in altında çözünmez.⁴⁶ Aynı zamanda bir çalışmada indometazin, Eudragit® L100 çözeltisine ilave edilmiş ve bir geçimsizlik söz konusu olmamıştır.⁵⁰ Aynı içeriğe sahip olan Kollicoat® MAE 100P'nin indometazin ile de uyumsuzluğu görülmediğinden çalışmamız kapsamında PLGA ve indometazin için uyumlu bir kaplama maddesi olarak kullanılacağını düşündüğümüz Kollicoat® MAE 100P ile enterik kaplama yapılmıştır.

Literatürde kayıtlı benzer çalışmalar incelenerek nanopartiküler sistemler hazırlanmıştır.^{100, 101, 103, 104, 141}

Nanosüspansiyonlar, zayıf çözünürlük ve biyoyararlanıma sahip hidrofobik ilaçların bu konudaki problemlerini çözmek için özgün ve ticari olarak uygulanabilir yaklaşımlardır. Çözünme hızının iyileştirilmesi, çözünürlüğün artırılması, gelişmiş biyoadhezif özellik, yüzey modifikasyonundaki çok yönlülük ve üretim sonrası işlem kolaylığı gibi çarpıcı özellikleri ile çeşitli ilaç uygulama yolları için nanosüspansiyonların kullanım alanlarını genişletmiştir.³⁸ Nanosüspansiyonlar elektrostatik veya sterik stabilizasyon veya her ikisinin kombinasyonu ile stabilize edilebilmektedirler. Bununla birlikte sterik stabilizasyon, elektrostatik stabilizasyondan daha avantajlıdır Çünkü GI sistem, değişken pH koşullarından ve elektrolitlerden etkilenebilmektedir. Sterik olarak stabilize edilmiş nanosüspansiyonların stabilitesi, stabilizanın hidrofobik özelliği yanında ilacın entalpi ve logP değerlerine de bağlıdır.¹⁴⁰ Çalışmamız kapsamında geliştirdiğimiz nanosüspansiyonlar, PVA ile stabilize edilerek sterik bir bariyer oluşturulmuş ve stabiliteleri uzun süre muhafaza edilmiştir. Literatürde indometazin ile yapılmış ve tedavi amacıyla kullanılmış nanosüspansiyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızdaki nanosüspansiyon formülasyonları da bu yönüyle ilk olmaktadır. Aynı zamanda indometazini taşıyıcı bir polimer içinde hapsederek geliştirdiğimiz formülasyonlar ile de karşılaştırılması açısından önem taşımaktadır. Ayrıca literatürde indometazine benzer özellikler taşıyan başka bir NSAİİ için yapılmış bir nanosüspansiyon çalışmasında, etkin maddenin enterik kaplama materyali ile aynı anda organik fazda çözündürülerek hazırlandığı ve adına enterik nanopartikül denildiği görülmektedir.¹⁴² Oysa çalışmamızda öncelikli olarak elde edilen nanosüspansiyonlar enterik kaplama çözeltisine ilave edilmiş böylece enterik kaplanmaları sağlanmıştır. Bu yönüyle de literatürde benzer bir nanosüspansiyon çalışmasına rastlanılmamıştır.

Aktif bileşenlerin hapsedilmesi, nanopartiküllerin son boyutu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Genel bir kural olarak hidrofobik aktif bileşenler ile hidrofilik bileşenlerin

enkapsülasyonu karşılaştırıldığında hidrofobik ilaçların daha küçük nanopartiküller oluşturduğu bildirilmiştir. İlaç yükleme ve ilaç enkapsülasyon etkinliğini geliştirmek için çözücü, polimer ve aktif bileşen arasındaki etkileşim dikkate alınmalıdır. PLGA ile yapılan bazı çalışmalarda boş nanopartiküllere kıyasla ilaç yüklenmiş nanopartiküllerin hem boyutlarında hem de zeta potansiyellerinde bir artış olduğu bildirilmiştir.⁵⁸

Hazırlanan nanopartiküler yeni ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenen etkin madde miktarının belirlenmesinde geliştirilen HPLC yöntemi kullanılmış ve valide edilmiştir. PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının % EE değeri ortalama 72.45 ± 6.26 , Kollicoat® MAE 100P kullanılarak gerçekleştirilen enterik kaplanmış indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinin % EE değeri ise 86.33 ± 2.92 olarak tespit edilmiştir. Aradaki farkın Mann-Whitney U testi kullanılarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Bu durumda % EE değerindeki değişimin proses aşamasındaki bir basamakta aktarma yapılmadan kaplamanın gerçekleştirilmesi sebebiyle arttığını düşünmekteyiz. Çünkü PLGA ile nanopartiküler sistemlerin prosesine ait her bir basamak için gerçekleştirdiğimiz miktar tayinleri esnasında işlem den kaynaklı verimin azaldığı, ancak indometazinin herhangi bir işlem aşamasında değışikliğe ya da bozunmaya uğramadığı da tespit edilmiştir. Taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın hazırlanan nanosüspansiyonlar için elde edilen ortalama % EE değeri ise 72.99 ± 6.38 , Kollicoat® MAE 100P kullanılarak gerçekleştirilen enterik kaplanmış indometazin nanosüspansiyonlarının % EE değeri ise 89.21 ± 2.48 olarak tespit edilmiştir. Aradaki farkın Mann-Whitney U testi kullanılarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu durumda % EE değerindeki değışimin yine aynı sebepten yani proses aşamasındaki bir basamakta aktarma yapılmadan kaplamanın gerçekleştirilmesi sebebiyle arttığını düşünmekteyiz. Nanosüspansiyonları hazırlarken kullandığımız prosesin her aşaması için yapılan miktar tayinleri esnasında deney aşamalarındaki aktarmalardan kaynaklı olarak verimin azaldığı,

ancak indometazinin herhangi bir proses aşamasında değişikliğe ya da bozunmaya uğramadığı tespit edilmiştir.

İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri ve bunların Kollicoat® MAE 100P kullanılarak hazırlanan enterik kaplı nanopartiküllerin etkin madde yükleme kapasiteleri sırasıyla % 17.49±0.91 ve % 6.16±0.33 olarak bulunmuştur. Aradaki farkın anlamlı oluşu ($p<0.05$) enterik kaplama polimerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. İndometazin nanosüspansiyonları ve bunların Kollicoat® MAE 100P kullanılarak elde edilen enterik kaplı nanosüspansiyonlarının etkin madde yükleme kapasiteleri ise sırasıyla % 72.77±17.09 ve % 39.16±1.43 olarak bulunmuştur. Aradaki farkın anlamlı oluşu ($p<0.05$) enterik kaplama polimerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. PLGA kullanılarak elde edilen nanopartiküller ile sadece indometazin kullanılarak elde edilen nanosüspansiyonlar karşılaştırıldığında yine anlamlı derecede ($p<0.05$) fark görülmektedir. PLGA kullanılarak elde edilen nanopartiküllerin Kollicoat® MAE 100P ile kaplanmasıyla yükleme kapasiteleri ile Kollicoat® MAE 100P kullanılarak enterik kaplanan nanosüspansiyonların yükleme kapasiteleri karşılaştırıldığında da anlamlı derecede ($p<0.05$) bir fark görülmüştür. Özetle taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın hazırlanan nanosüspansiyonların bu yönüyle üstün olduğu saptanmıştır.

Literatürde PLGA ile ilgili çalışmalar arasında Kamel ve ark.¹¹⁷ intrartiküler uygulama için hazırladıkları nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliklerini % 55.3 - % 97.7 arasında buldukları, PLGA ile hazırlanan indometazin nanopartikülleri için Ghitman ve ark.¹⁴³,nın ise ilaç yükleme kapasitesini % 4.6, enkapsülasyon etkinliğini de % 28.7 olarak saptadıkları görülmektedir.

Çalışmamızda indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri ve bunların Kollicoat® MAE 100P kullanılarak enterik kaplı nanopartikülleri için verim sırasıyla % 65.7±3.23 ve % 85.15±4.53 olarak bulunmuştur. Hazırlanan nanosüspansiyonlar ve bunların

Kollicoat® MAE 100P kullanılarak enterik kaplı formülasyonlarının verimleri ise sırasıyla % 84.2±4.42 ve % 91.2±3.58'dir. Boş-PLGA nanopartiküllerine ait verim % 69.3±5.46 iken enterik kaplı Boş-PLGA nanopartiküllerinde bu değer % 71.5±4.38 olarak hesaplanmıştır. Boş nanopartiküler sistemler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ancak PLGA kullanılarak hazırlanan sistemler (enterik kaplı ve kaplanmamış) verimleri açısından kendi aralarında istatistiksel bir fark oluşturmuştur ($p<0,05$). Nanosüspansiyonlar ise hem kendi aralarında (kaplanmış ve kaplanmamış) hem de PLGA ile yapılan formülasyonlar (kaplanmış ve kaplanmamış) ile kıyaslandıklarında, istatistiksel açıdan anlamlı şekilde farklı olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

Polimerik yapıların ve terapötik maddelerin birleştirilmesiyle elde edilen nanopartiküllerin partikül boyutunun ve dağılımının kontrol edilmesi, nanopartikül oluşumunu yöneten moleküler kuvvetlerin anlaşılmasını gerektirir. Bileşenlerin fizikokimyasal özellikleri, faz geçiş kinetiği, akışkanların dinamiği ve üretim süreçlerinin tümü nanopartikül boyutunun kontrolüne katkıda bulunan faktörlerdir. Partikül boyutu dağılımı dar olan nanopartiküller elde etmek, onların biyolojik aktivite ve terapötik etkinlikleri üzerinde kritik öneme sahiptir. Nanopartikül boyutu ve dağılımı genel olarak TEM, AFM, PCS ve DLS gibi benzeri yöntemlerin kombinasyonları ile ölçülmektedir.¹⁴⁴ Nanopresipitasyon yönteminde partikül boyutunu kontrol eden pekçok faktör bulunmaktadır. Bunlar; uygulanan homojenizasyon şekli (mekanik manyetik karıştırıcı, homojenizatör veya sonikatör), karıştırma hızı ve süresi, dispersiyon ajanının özellikleri (tip ve içeriği), her iki fazın viskozitesi, fazların oranı, polimer ve ilaç oranları, damlatma için kullanılan iğnenin boyutu, damlatma yönü ve ortam sıcaklığıdır.¹⁴⁵

Nanopartiküllerin partikül boyutu ve yüzey yükü, absorpsiyonunda önemli rol oynar. Literatürde negatif yüklü nanopartiküllerin, hücre zarı ile kuvvetli ve spesifik

olmayan etkileşimlerden dolayı hücre içine giriş oranının yüksek olduğu bildirilmiştir. Wilhelm ve arkadaşları negatif yüklü partiküllerin hücre zarının negatif yüklü alanları tarafından itildiğini, hücre yüzeyinin pozitif bölgelerine adsorbe olduğunu ve bu sayede membranın lokal nötralizasyonuna yol açarak ve membran lehine bir endositoz oluşumuna neden olduğu bildirmiştir. Bir başka çalışmada Huang ve Donovan 1996'da tavşan nazal solunum epiteli boyunca polistiren nanopartiküllerinin (10-500 nm) taşınmasını incelemiş ve 200 nm'ye kadar olan boyutta ilacın modifiye edilmiş nanopartiküllerin hem paraselüler hem de transselüler yolla taşındığı sonucuna varmıştır.¹⁴⁶

Çalışmamızda hazırlanan sistemlerin partikül büyüklükleri, SEM ve DLS temeline dayanan Zetasizer cihazı ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine ait partikül boyutu ölçüm sonucu ortalama $245.73\text{nm} \pm 3.92$ ve boş PLGA nanopartikülleri ise ortalama $234.17\text{nm} \pm 3.76$ olarak tespit edilmiştir. Bu iki formülasyon grubu arasında indometazin yüklenmesine bağlı olarak boyut üzerinde anlamlı bir farkın olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Boş ve indometazin yüklü sistemlerin Kollicoat® MAE 100P kullanılarak gerçekleştirilen enterik kaplamaları sonucundaki boyutları ise sırasıyla $139.27\text{nm} \pm 0.88$ ve $192.55\text{nm} \pm 1.95$ olarak bulunmuştur. Bu iki formülasyon grubu arasında indometazin yüklenmesine ve Kollicoat® MAE 100P ile kaplanmaya bağlı olarak partikül boyutu üzerinde anlamlı bir farkın olduğu da istatistiksel olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$). Boş nanopartiküller ile Kollicoat® MAE 100P kaplı olan şekillerinin, partikül büyüklüklerinin istatistiksel yönden anlamlı çıktığı ($p < 0.05$), indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri ile Kollicoat® MAE 100P ile kaplı olan indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklükleri arasında ise yine kaplamanın bir sonucu olarak istatistiksel açıdan farkın anlamlı çıktığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). indometazin nanosüspansiyonlarına

baktığımızda kaplanmamış nanosüspansiyonların partikül boyutu ortalamasının $504.12\text{nm} \pm 23.84$ ve Kollicoat® MAE 100P ile kaplanmış olan nanosüspansiyonların partikül boyutu ortalamasının $429\text{nm} \pm 28.17$ olduğu ve kaplama etkisinin partikül boyutu üzerinde anlamlı bir fark oluşturduğu, bunda da proses aşamasındaki sonikasyon işlemlerinin varlığı ve süresinin rolü olduğunu düşünmekteyiz ($p < 0.05$). Tüm formülasyonlar için partikül boyutu dağılımlarının dar ve homojen olarak elde edildiği görülmektedir.

Zeta potansiyel, partikül yükünün bir ölçüsüdür. Partikül stabilitesi için bir ölçüttür. Partiküller yüklendiğinde, zeta potansiyel arttığında, itme kuvvetleri sayesinde daha tekdüze partikül boyutu dağılımına sahip, daha stabil partiküler formülasyonlar oluşmaktadır. Hans ve Lowman, yüksek zeta potansiyel değerinin partiküller arasında elektrostatik itmeye sebep olduğunu, ± 30 mV arasındaki zeta potansiyel değerinin iyi bir fiziksel stabilite gösterdiğini vurgulamıştır.¹⁴⁷ Partikül yüzeyinin negatif yüklü olması inflamasyonlu ve hastalıklı bölgede daha fazla birikime yol açar. Ayrıca boyutun 200 nm den az olması Retikulo Endotelial Sistemden (RES) kaçışlarını da kolaylaştırmaktadır.¹⁴⁸

Nanopartiküllerin partikül büyüklerinin hesaplanmasında basit bir teknikten, Brownian hareketlerinden yararlanılır. Ancak, burada nanopartiküllerin yüksek yüzey enerjisi göz ardı edilmektedir. Yüklü iki partikül arasındaki bir çarpışma olayı, agregasyonla ve nanopartiküllerin çökmesi ile sonuçlanacaktır. Bu sebeptendir ki, iki partikülün yaklaşmasını engelleyen bir bariyer sağlayarak nanopartikül dispersiyonunu stabilize etmek gerekir. Bu bariyerler ya yüke ya da kolloidin sterik stabilizasyonuna dayandırılır. Yüklü bir yüzey, ters yüklü iyonlar ile partikül yüzeyine sıkıca bağlanmış bazı çözücü moleküllerinden ibarettir. İşte bu katmana Stern tabakası denilmektedir. Coulombs kanununa göre benzer yük benzerinin itilmesine neden olur böylece agregasyona engel teşkil eder. Sterik stabilizasyonda ise nispeten uzun zincirli

bir molekül partikül yüzeyine bağlanır. Molekülün uzun zinciri, çözücü için yüksek bir afiniteye sahiptir. Bu nedenle agregasyonun önündeki engel, polimer zincirinin partikül ve çözücü ile göreceli etkileşimleri ile ilgilidir. Partiküllerin agregasyonu için çözücünün iki parçacık arasından ve zincirlerin etrafından elimine edilmesi ile ancak gerçekleşir. Bu, enerji açısından elverişsiz bir durumdur ve bu nedenle agregasyona karşı bir engel oluşturur.¹⁴⁹

Çalışmamızda boş PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel değerlerinin ortalama $-39.45\text{mV} \pm 3.97$ olduğu tespit edilmiştir. Bu durum PLGA nanopartiküllerinin yüzeyindeki karboksilik uç gruplarından kaynaklanmaktadır.¹³⁸ İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine baktığımızda ise zeta potansiyel değeri olarak negatif yükün ortalama $-45.47\text{mV} \pm 1.46$ olduğu görülmektedir. Negatif yükün artmış olması indometazin varlığını da ayrıca kanıtlamaktadır. İstatistiksel olarak da bu fark anlamlıdır ($p < 0.05$). İndometazinin zayıf asit karakterdeki yapısı, nanopartikül üzerindeki net yükün negatif yönde artmasına sebep olabilir. Benzer nanopartiküler çalışmalarda da bu durum gözlenmiştir.¹³ Ayrıca PVA konsantrasyonu arttıkça zeta potansiyel değerlerinin negatif yönde azaldığı ve nötr skalaya yakınlığı bildirilmektedir. Bu da PVA'nın nanopartikülün üzerine bir defada adsorplandığını ve partiküllerin birleşerek büyümesini engellediğini göstermektedir.⁵² Çalışmamızda hazırlanan nanopartiküler sistemler için kullanılan minimum miktar PVA (% 0.1 a/h) ile oldukça yüksek negatif zeta potansiyel değerleri elde edilmiştir. Enterik kaplı boş PLGA ve enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerinin sırasıyla $-60.68\text{mV} \pm 2.50$ ve $-54.37\text{mV} \pm 1.14$ olarak saptanmıştır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$) ve Kollicoat® MAE 100P'nin yapısındaki karboksilik uç grupları nedeniyle negatif yükün her iki formülasyon grubunda da arttığı görülmektedir.⁴⁵ Yine indometazin nanosüspansiyonları incelediğimizde kullandığımız stabilizanın doğası gereği negatif

yüke sahip kaplanmamış ve enterik kaplanmış nanosüspansiyonların oluştuğunu görmekteyiz ($-20.15\text{mV}\pm 0.80$ ve $-26.80\text{mV}\pm 1.50$). Sonuçta kullandığımız kaplama materyali sayesinde zeta potansiyel üzerinde anlamlı bir fark oluştuğu tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin zeta potansiyel dağılım grafikleri incelendiğinde her formülasyon grubunun kendi içinde tutarlı bir dağılım verdiği görülmüştür. *In vivo* uygulamadan sonra katyonik özellikteki polimerik nanopartiküller, kan kompartmanındaki proteinler ile elektrostatik bağlanmalar nedeniyle non-spesifik sitotoksik etkileşimler oluşturabilirler. Bu spesifik olmayan yüzey reaktivitesini veya etkileşimini azaltmak için istenen durum, küçük boyutlu negatif yüklü anyonik polimerik nanopartiküllerdir. Bu sayede katyonik yüklü nanopartiküllerden daha geniş bir spektrum ile biyolojik uygulamalarda kullanılabilirler.¹⁴⁸ Bizim çalışmamızda da negatif yüklü polimerik sistemler geliştirildiğinden biyolojik olarak daha uyumlu olacağı kanaatindeyiz.

PdI'nin 0.5'ten küçük olması her formülasyon için istenilen bir durumdur. PdI, polimer konsantrasyonunun artması ve boyut dağılımının genişlemesi üzerine yükselmeye başlar. Bu durum artan viskozitenin bir sonucu olarak enerjinin düzensiz dağılımından kaynaklanıyor olabilir.¹⁴⁷ Bizim geliştirdiğimiz tüm formülasyonlarda da PdI değerleri 0.53'ten küçük bulunmuştur.

Hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin ve nanosüspansiyonların morfolojik olarak görüntüleri SEM ile incelenmiştir. Boş PLGA, indometazin yüklü-PLGA ve bunların Kollicoat® MAE 100P ile kaplanmış nanopartiküllerinin görüntülerinin küresel olduğu, boyutların Zetasizer ölçümelerini doğruladığı görülmektedir. Nanosüspansiyonların ve bunların Kollicoat® MAE 100P ile kaplanmış

formülasyonlarına ait görüntüler incelendiğinde çubuk şeklinde nanopartiküllerin olduğu ve boyutlarının da yine Zetasizer sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

DSC, erime endotermi ve Tg sıcaklıkları hakkında bilgi veren, sıkça kullanılan bir termo-analitik tekniktir.¹²⁷ Tg sıcaklığı, ilaç ve polimer moleküllerinin fiziksel özelliklerini belirlemek için kullanılan önemli bir araçtır. PLGA kopolimerinin bileşimi, bozunma hızı üzerinde dolaylı etkisi olan camsı geçiş sıcaklığını ve kristallenmeyi etkiler. PLGA'nın Tg sıcaklığı, molekül ağırlığının ve poli laktik asit içeriğinin azalmasıyla düşüş kaydeder.¹⁵⁰ Hapsolan ilacın enkapsülasyon şekline göre DSC termogramlarının yorumlanması değişir. Şöyle ki: enkapsüle olan ilaç, ya katı halde disperse olmuştur ya da polimer matriks içinde çözünmüştür. Disperse olmuş ise polimer matriks içinde süspansiyon halindedir. Eğer çözünmüş ise üç farklı durumda olabilir. Birinci durumda, ilaç polimer içinde tamamen çözünmüş halindedir. İlaç molekülleri ve polimer arasında güçlü etkileşim mevcuttur. Bu durumda DSC termogramında polimere ait Tg'de düşüş gözlenirken etkin maddenin erime piki ise gözlenemez. İkinci durumda ilaç polimer matriks içinde moleküler olarak dağılmıştır, ancak ilaç molekülleri ile polimer zincirleri arasındaki etkileşimler stabil bir duruma gelemeyecek kadar zayıf kalır. İlaç molekülleri arasındaki etkileşimler kuvvetlidir ve moleküller polimer ağı boyunca dağılır. Moleküllerin difüzyon hızı matriks viskozitesine bağlıdır. İlaç sadece moleküler düzeyde kalır çünkü ortamın viskozitesi ilacın difüzyonunu ve dolayısıyla kristalleşmesini engeller. İlaç molekülleri ve polimer zincirleri birbirleriyle etkileşime girmez, polimerin ve ilacın erime sıcaklıkları korunmuş ve termogramda gözlenmiş olur. Üçüncü durumda ise ilaç, mikropartikül hazırlama süreci boyunca kristalleşebilmekte, daha sonra fiziksel olarak kristal bir dispersiyon şeklinde polimer matrikste dağılabilmektedir.¹⁵¹ Buradan hareketle çalışmamızdaki indometazin içermeyen PLGA ve bunların enterik kaplanmış formülasyonların DSC termogramları ile indometazin yüklü-PLGA ve bunların enterik

kaplanmış formülasyonların DSC termogramları karşılaştırıldığında PLGA'ya ait Tg sıcaklığının azaldığı, indometazin erime piklerinin ise gözlemlenemediği tespit edilmiştir. İlacın kristal halinin olmadığı, ilacın nanopartiküllere hapsedilirken kristal yapısının azaldığı söylenebilir. Bu sayede indometazinin polimer içinde amorf halde homojen olarak çözündüğü sonucuna varılabilir. Benzer durum PLGA ile çalışılmış literatür örneklerinde de mevcuttur.^{138, 139} Taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın hazırlanan indometazin nanosüspansiyonlarının ve bunların enterik kaplanmış formülasyonlarının DSC termogramları incelendiğinde saf indometazin erime pikine yakın sıcaklıklarda oldukları saptanmıştır. Buradan hareketle Bölüm 4.11.6'da verilen saf maddelere ve formülasyonlara ait DSC termogramları incelendiğinde, formülasyonların hiç birinde etkin madde-yardımcı madde etkileşimine rastlanılmamıştır. Bu sonuçların ışığında, hazırlanan formülasyonların uygun, etkin ve güvenilir olduğu kanıtlanmıştır.

İndometazine ait erime derecesi pikinin $\sim 156^{\circ}\text{C}$ civarında olduğu görülmektedir. Literatürde de benzer sonuçlar görülmüştür.^{62, 127} Saf PLGA'ya ait erime diyagramına bakıldığında $\sim 50^{\circ}\text{C}$ 'de Tg sıcaklığına bağlı olarak endotermik bir pik ve $\sim 300^{\circ}\text{C}$ 'de degradasyon piki verdiği görülmektedir. Bu bulgu literatür bilgileri ile paraleldir.^{152, 153}

İlaç-polimer uyumu farmasötik formülasyonların tasarımında büyük bir önem taşır. Çünkü formülasyon etkinliği (terapötik aktivite ve/veya biyoyararlanım), ilaç-polimer bileşiminin temelinde geliştirilebilir. Bu açıdan bakıldığında, FT-IR spektroskopisi ilaç-polimer etkileşimlerini incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çünkü her molekül kendi yapısının özelliği olan spesifik frekansları absorplar. Bu bağlamda, bir spektrum için iki önemli bölge tanımlanır. Bunlar $4.000-1.300\text{ cm}^{-1}$ ila $900-650\text{ cm}^{-1}$ arasındır. Spektrumun yüksek frekanslı bölümü "fonksiyonel grup bölgesi" olarak adlandırılır. Spektrumun orta bölgesi olan $1300-900\text{ cm}^{-1}$ ise genellikle "parmak izi bölgesi" olarak adlandırılır.⁵⁰ FT-IR

spektrumları, temel fonksiyonel grupların titreşimsel veya gerilim bantlarındaki değişimi takip ederek ilaç yardımcı madde etkileşimlerini tespit edebilmektedir.¹²⁷

Bölüm 3.11.7’de anlatıldığı şekilde, etkin madde, yardımcı madde ve polimerlere ait FT-IR spektrumları alınmıştır. Saf indometazine ait FT-IR spektrumları literatür kayıtları ile uyumlu bulunmuştur. Saf PLGA’ya ait spektrum incelendiğinde 1745 cm^{-1} gerilme bandında karbonil gruplarını, $1400\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ gerilme bantları arasında simetrik ve asimetrik C-C(=O)-O ester gruplarını göstermektedir. Bu bölgelerdeki bantlar, esterlerin karakterizasyonunda önemlidir. Laktid ve glikolid için FT-IR spektrumunda 3500 cm^{-1} civarındaki bantlar -OH grubunun gerilim titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar literatür ile de uyumludur.¹⁵⁰ İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri ve bunların enterik kaplanmış formülasyonlarının FT-IR spektrumları incelendiğinde, boş nanopartiküler formülasyonlar ile benzer gerilim bantları sergilediği görülmüştür. Dolayısıyla indometazin ile polimerler arasında anlamlı bir iyonik etkileşim görülmemiştir. İndometazin nanopartiküller içinde hapsediği anlaşılmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir.^{50, 154}

Nanosüspansiyonların ve bunların enterik kaplanmış formülasyonlarının FT-IR spektrumları incelendiğinde, herhangi bir taşıyıcı polimer içerisine hapsedilme durumu olmadığından saf indometazin ile hazırlanmış nanosüspansiyonların spektrumu saf indometazin spektrum pikine benzemektedir. Enterik kaplanmış indometazin nanosüspansiyonlarının spektrumlarında ise bant gerilim frekanslarının daha düşük çıktığı görülmüştür. Buna Kollicoat® MAE 100P’nin indometazin nanosüspansiyonlarının yüzeyini kaplaması sebep gösterilebilir. Bununla birlikte yine saf indometazin spektrumuyla tamamen uyumlu olduğu görülmektedir.

Oral yoldan verilmesi amaçlanan bir formülasyonun terapötik etkinliği, biyoyaralanımına bağlıdır. Dissolüsyonun, katı dozaj formundan düşük çözünürlüğe

sahip bir ilacın GI sistemde emiliminde hız sınırlayıcı adım olduğu iyi bilinmektedir. İndometazin gibi suda çözünmeyen ilaçların salımının önceden tahmin edilemez olduğu gösterilmiştir. Bu durum ilaç endüstrisi için bir sorun olmuş ve olmaya da devam etmektedir. Bununla birlikte yakın tarihli çalışmalar, yüzey aktif maddeler gibi az miktarda hidrofilik eksipiyenlerin hidrofobik ilaçlar ile birlikte kullanılmasının dissolüsyonu önemli ölçüde artırabildiğini kanıtlamıştır.⁵⁰ İlacın nanopartiküler sistem formülasyonlarından salınması; pH'ya, sıcaklığa, ilacın çözünürlüğüne, yüzeye bağlanmış veya adsorplanmış ilacın desorpsiyonuna, nanopartikül matriksi boyunca ilacın difüzyonuna, nanopartikül matriksinin şişmesine ve aşınmasına ve ayrıca tüm aşınma ve difüzyon proseslerinin kombinasyonunu içeren faktörlere bağlıdır.¹⁵⁵

İndometazin içeren nanopartiküler sistem formülasyonlarımızın *in vitro* dissolüsyon çalışmaları üç farklı tampon ortamında (pH 1.2, 6.8 ve 7.2) piyasa preparatlarından indometazin geleneksel kapsül (25 mg) ve uzatılmış salım örneği için indometazin ER kapsüle (75 mg) karşı kıyaslamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

Saf halde indometazinin sudaki çözünürlüğü çok düşüktür.¹⁵⁶ pKa'sı 4.5 olan zayıf bir organik asittir ve çözünürlüğü pH ile artar.⁶² İndometazin için asit ortamda (pH 1.2 HCL tamponu) farmakopelerde herhangi bir dissolüsyon testi bulunmamaktadır. Bu durum aslında indometazinin doğası gereği asitli ortamda (pH 1.2) non-iyonize halde kalmasındandır. Enterik kaplamanın etkisini anlamak için literatürlerde pH 1.2 salım çalışmaları yapılmaktadır. İndometazinin pH 1.2'de çözünürlüğü olmadığından kaplama etkinliği bu yöntemle tespit edilememiştir. Ancak yine de 2 saat süreyle yapılan dissolüsyon çalışması neticesinde 25 mg indometazin içerecek şekilde deneye alınan tüm formülasyonlar ve ticari preparatlar değerlendirilmiştir. Çıkan sonuçlar ise sırasıyla şöyledir: İndometazin geleneksel kapsül 0.195 µg/mL, indometazin ER kapsül 0.178 µg/mL, indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri 0.132 µg/mL, enterik kaplı

indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri 0.456 µg/mL, indometazin nanosüspansiyonu 0.344 µg/mL, enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonu 0.245 µg/mL olarak bulunmuştur. Literatür bilgileri incelendiğinde pH 1.2’de indometazin salımının gerçekleşmediği görülmektedir.^{123, 157, 158} Sonuçlar bize hem ticari preparatlardaki hem de bu çalışma için hazırlanan nanopartiküler formülasyonlardaki indometazinin ortamda çözünmediğini göstermiştir. Ancak burada indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinden daha yavaş bir salım görülmektedir. İndometazinin nanopartikül içinde hapsediği ve PLGA’nın yapısının mide ortamında hızlı bozulmadığı anlaşılmaktadır. Diğer tüm formülasyon ve ticari preparatlara kıyasla enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonundan ise daha hızlı bir salım göstermesi, partikül boyutunun indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerine oranla iki kat küçülmesi ve bu sayede artan yüzey alanı ile birlikte Kollicoat® MAE 100P’nin formülünde yer alan stabilizanların⁴⁶ (% 0.7 sodyum lauril sülfat ve % 2.3 polisorbat 80) çözünürlüğü artırmış olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Boyutun küçülmesine bağlı olarak indometazinin çözünürlüğünün arttığı yapılan literatür incelemelerinde de görülmüştür.¹⁵⁹

USP 30-NF 25’e kayıtlı olan “İndometazin Kapsül” formuna ait monograf bilgileri dikkate alınarak geliştirdiğimiz indometazin içeren nanopartiküler sistem formülasyonları ve ticari indometazin geleneksel kapsül formuna ait dissolüsyon çalışması pH 7.2’de gerçekleştirilmiştir. Farmakope monografında 20 dakika içinde indometazin miktarının % 80’den daha az çözünmemesi gerektiği belirtilmiştir.¹⁶⁰ Hazırladığımız formülasyonlar (indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri haricinde) ve ticari preparat 20 dakikanın sonunda % 80’in üzerinde bir çözünme oranı göstermiştir. İndometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri ise bu sonuca 2 saat sonunda ulaşmıştır (% 85.40± 1.70). Bu durum kullanılan PLGA’nın kendi doğasından kaynaklanmaktadır.

PLGA'nın degradasyon hızı üzerinde ortamın pH'sı etkilidir. Hafif asit veya nötral ortamda daha yavaş bir degradasyon hızı görülürken alkali ve kuvvetli asit ortamlarda degradasyon hızı artmaktadır.¹⁹

USP 30-NF 25'e kayıtlı olan "İndometazin Uzatılmış Salım Kapsül" formuna ait monograf bilgileri dikkate alınarak geliştirdiğimiz indometazin içeren nanopartiküler formülasyonları ve ticari indometazin ER 75 mg kapsül formuna ait dissolüsyon çalışması pH 6.8'de gerçekleştirilmiştir. Monografta bu test için 24 saat süreyle çalışma yapılmıştır.¹⁶¹ Tolerans limitleri göz önüne alındığında ilk olarak referans ilacın belirlenen sürelerde indometazini serbestleştirdiği görülmektedir. Referans ilaca kıyasla indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinin daha yavaş bir salım profili çizdiği, indometazin nanosüspansiyonlarının ise 12 ve 24. saatin sonunda hızlı bir dissolüsyon sergilediği görülmektedir. Hazırlanan indometazin yüklü-PLGA formülasyonlarının kullanılan PLGA polimerinin katkısıyla indometazinin uzatılmış etkisini göstermesi bakımından referans ilaçtan daha etkili olduğunu görülmüştür.

pH 6.8 ve 7.2 dissolüsyon ortamlarında yapılan indometazin çözünme hızı çalışmaları kapsamında enterik kaplama materyali olarak kullandığımız Kollicoat® MAE 100P'nin, alkali ortamda hızla çözündüğünü ve indometazin içeren formülasyonların salımlarının daha hızlı gerçekleştirdiğini görmekteyiz. Bununla birlikte kaplama kalınlığı ve boyutunu nanopartiküler sistemlerde kanıtlamak geleneksel (tablet, kapsül) dozaj şekillerine kıyasla çok mümkün olmamaktadır. Olması gereken pH 1.2 deki salım çalışmalarıdır. Ancak yukarıda da bahsedildiği gibi indometazin mide ortamında çözünmeden kalmaktadır. Bu nendenledir ki kaplama etkinliğinin yeterli olup olmadığı dissolüsyon çalışmaları yanında başka çalışmalar ile desteklenerek kanıtlanmıştır (*in vivo* çalışmalar). Aslında enterik kaplama materyali (Kollicoat® MAE 100P) alkali ortamda hemen çözündüğünden⁴⁶ kaplamanın ince veya kalın olması pH 6.8 ve 7.2 için sınırlayıcı

bir faktör olmamıştır.¹⁵⁹ Aksine Kollicoat® MAE 100P ile kaplanan formülasyonlardan alkali ortamlardaki indometazin çözünme hızı sonuçlarına bakıldığında daha hızlı bir salım gerçekleştiği görülmektedir. Bu sonuçlar kullanılan anyonik kopolimerin pH'ya bağlı bir çözünürlüğe sahip olduğunu ve nötr ile zayıf alkali çözeltilerde kolayca çözünür olduğunu göstermektedir.⁵⁰ Bu durum da bize indometazinin terapötik etkinliğinin görülmesi açısından bir an önce biyoyararlanıma katılması için önemlidir.

Nanopartiküllerin boyutu ve yüzey özellikleri, biyoyararlanımı optimize etmek, klirensi azaltmak ve stabiliteyi artırmak amacıyla araştırılmaktadır.¹⁵⁵ Yüklü kolloidlerin yüzeyini karakterize etmenin en basit ve en kolay yolu zeta potansiyelinin ölçülmesidir. Bu sayede konsantrasyon, dağılım, adsorpsiyon, vb konularda verilerden sonuçlar çıkarılabilir. Zeta potansiyel, nanopartiküller ile tedavinin etkinliğinde önemli bir rol oynayabilecek özelliklerden biridir. Dozaj formlarının stabiliteyi nanomateryallerin zeta potansiyelinden etkilenebilir.¹⁶²

Nanopartikül yüzeyi, ilaçların taşınmasında çok önemli bir husustur. Uygun zeta potansiyel değeri, ilaç salım profillerini ve ayrıca dozaj formlarındaki stabiliteyi iyileştirebilir. Biyolojik ortamlardaki kolloidal stabilite, nano ölçekli maddelerin geniş yüzey alanı / hacim oranları nedeniyle herhangi bir nanopartikül bazlı yapının klinik uygulamasını zorlaştırabilir. Özellikle pozitif yüklü nanopartiküller, proteinleri elektrostatik etkileşim yoluyla biyolojik ortamdan adsorbe etme, kirlenme ya da çökmeye eğilimli olduklarından genellikle hücre kültürü koşullarında zayıf stabilite sergilerler.¹⁶³ Zeta potansiyel, nanosüspansiyonların stabilitesini etkileyen önemli bir fizikokimyasal parametredir. Aşırı derecede pozitif veya negatif zeta potansiyel değerleri daha büyük itici kuvvetlere neden olurken, benzer elektrik yüküne sahip partiküller arasındaki itme, partiküllerin agregasyonunu önler ve böylece yeniden süspande edilebilirliği kolay hale gelir. Elektrostatik ve sterik stabilite birlikte düşünüldüğünde, ± 20 mV'lik minimum zeta

potansiyeli arzu edilir.¹⁶³ Bu bağlamda çalışmamız kapsamında hazırlanan indometazin içeren nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin stabilitelerini değerlendirmek üzere, oda sıcaklığı (18-25 °C) ve +4 °C’de 24. saat, 15. ve 30. gün sonunda zeta potansiyel, partikül boyutu ve indometazin miktar tayin sonuçları açısından incelenmiştir. Literatür çalışmalarında benzer parametrelerin benzer sürelerde değerlendirildiği görülmüştür.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Miktar tayinleri açısından bakıldığında, tüm indometazin içeren formülasyonların hem oda sıcaklığı hem de +4 °C’de 30 gün boyunca nanopartiküler sistemler içindeki indometazin miktarlarında anlamlı derecede bir farkın (azalma veya artma) oluşmadığı tespit edilmiştir ($p \geq 0.05$). Partikül boyutları açısından bakıldığında PLGA ile hazırlanan boş ve indometazin yüklü nanopartiküler sistem formülasyonları ile bunların enterik kaplanmış şekillerinin partikül boyutlarında 30 gün boyunca (hem oda sıcaklığı hem de +4 °C) önemli bir değişiklik olmamış ve nanopartiküler sistemler yüksek zeta potansiyelleri sayesinde agregat oluşturmada stabil kalabilmişlerdir. İndometazin nanosüspansiyonlarında boyutun 30 gün boyunca (1., 15. ve 30.gün) her iki sıcaklık grubunda da giderek arttığı (~ 300 nm) ve buna karşın PDI’lerinde de artış görülmüştür. indometazin nanosüspansiyonlarında ise boyut ilk günün sonunda azalmışken, 30 günün sonundaki ölçümlerde başlangıçtaki boyutuna göre yaklaşık 100-200 nm (oda sıcaklığı, +4 °C) arttığı tespit edilmiştir.

Formülasyonların stabiliteleri açısından zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde PLGA ile hazırlanan tüm formülasyonların (30 gün boyunca), kolloidlerin stabiliteleri için kritik sınır olarak bildirilen ± 30 mV değerinden aşağı düşmediği görülmüştür.¹⁴⁷ Yeni hazırlanan formülasyonlarla kıyaslandıklarında ise oda sıcaklığında bekletilen formülasyonların +4 °C’ye kıyasla zeta potansiyelleri açısından anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Nanosüspansiyonlara baktığımızda 30 gün boyunca her iki sıcaklık ortamında da zeta potansiyel değerleri açısından yeni hazırlanan örneklere göre daha

düşük kalmıştır. Kolloidlerin stabilitesi için minimum sınır olan ± 20 mV'lik zeta potansiyel eşiğinden düşük olduğu için yeterli bir stabilizasyon sağlanamamış ve partiküller agregat oluşturmaya başlayarak partikül boyutunu yükseltmişlerdir.¹⁶³ Enterik kaplı nanosüspansiyonların ise 30 gün boyunca, yeni hazırlanıp ölçülen örnekler ile kıyaslandıklarında oda sıcaklığı şartlarında hemen hemen benzer zeta potansiyel sergiledikleri görülmüştür. Enterik kaplanan tüm formülasyonların, bileşimlerindeki stabilizanlar sayesinde güçlü bir elektrostatik etkiyle sterik bir bariyer oluşturduğu ve kaplanmamış formülasyonlara kıyasla (partikül boyutu ve zeta potansiyel açısından) sistemlerin stabiliteilerini korumalarında önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. Rodriguez ve ark.⁴⁹ yaptıkları çalışmada sıcaklığın zeta potansiyel, PDI ve partikül boyutu üzerindeki stabilitesini incelemiş ve benzer değişkenlikler tespit etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında yaptığımız *in vivo* deneylerde oluşan ülserli bölgeler/alanlar milimetrik olarak ölçülmüş ve milimetrekare (mm²) cinsinden ifade edilmiştir. Yapılan ön çalışma ile deney tasarımı ve formülasyonların etkinliği incelenmiş ve asıl deney dizaynı için bir basamak oluşturulmuştur. Ön çalışma ile 6. saat sonunda aynı doz indometazin içeren formülasyonlardan en az etkili olanının dahi (indometazin nanosüspansiyonu), indometazin geleneksel kapsül verilen gruba kıyasla % 45.24 daha az ülser oluşturma potansiyeline sahip olduğu görülmüştür. En iyi sonuç ise (indometazin geleneksel kapsül verilen grubuna kıyasla) daha az ülser yapma potansiyeli gösteren (% 64.29) Enterik kaplı indometazin nanosüspansiyonunda elde edilmiştir. Benzer bir sonuçla da hemen ardından % 59.52 ile enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikülleri olmuştur. 6. ve 12. saatin sonunda indometazin geleneksel kapsül verilen sıçanların mide mukozasının oldukça kırmızı olduğu ve hiperemi olduğu gözlenmiştir. Kanama hatlarının etrafında da minör kanamalar olduğu gözlenmiştir. 12. saat sonundaki

kontrol grubu olan sıçanın midesi daha harap halde bulunmuştur. Burada alınan başarılı ön deneme sonuçları neticesinde asıl deneye geçilmiştir.

Çalışmamızda temel olarak alınan *in vivo* deney sonuçları incelendiğinde, 6. saatin sonunda tüm formülasyonların saf indometazine kıyasla en az ~ % 38 oranında daha az ülser oluşturduğu, enterik kaplı formülasyonların ise şaşırtıcı bir şekilde ~ % 24 gibi saf indometazin ile oluşan ülsere kıyasla dörtte birinden daha az bir oranla ülser oluşturduğu ve istatistiksel olarak bunun anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Yine 6. saatin sonunda tüm formülasyonların en az ~ % 53 oranda indometazin geleneksel kapsüle kıyasla daha az ülser oluşturduğu, enterik kaplı formülasyonların ise indometazin geleneksel kapsül ile oluşan ülsere kıyasla ~ % 66 oranında daha az ülser oluşturduğu ve istatistiksel olarak bunun anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu çalışmada geliştirdiğimiz tüm formülasyonların sıçanların mide lümenlerini daha az kabarttığı ve kırmızı yaptığı gözlenmiştir. Ayrıca boş nanopartiküller ve bunların enterik kaplı formülasyonlarının ise sıçan midelerinde herhangi bir ülser oluşumuna sebep olmadıkları tespit edilmiştir.

12. saat sonundaki sonuçlar, indometazinin uzatılmış salım preparatı olan ER kapsül formu ile karşılaştırılması amacıyla yapılmıştır. Çünkü bu preparatın kullanma talimatında 12 saatte bir alındığından bahsedilmektedir.¹⁶⁷ 12. saat sonundaki sonuçları almak amacıyla çalışma 2 ayrı zaman dilimi olarak tasarlanmıştır. 12. saatin sonunda tüm formülasyonların saf indometazine karşılık ülser oluşturma potansiyelinin en çok ~ % 49 olduğu, enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonlarının ise şaşırtıcı bir şekilde saf indometazine karşılık ülser oluşturma potansiyelinin ~ % 29 olduğu ve istatistiksel olarak bunun anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Yine 12. saatin sonunda tüm formülasyonların saf indometazine karşılık ülser oluşturma potansiyelinin en çok ~ % 46 olduğu, enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonlarının ise saf indometazine karşılık ülser oluşturma potansiyelinin ~ % 28

olduğu ve istatistiksel olarak bunun anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Uzatılmış salım kapsülü (ER 75 mg) ile karşılaştırıldıklarında geliştirdiğimiz tüm formülasyonların bu ticari preparattan daha az ülser oluşturduğu ancak enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinin istatistiksel olarak hem saf indometazin hem ticari indometazin 25 mg geleneksel kapsüle hem de ticari ER 75 mg kapsüle karşılık anlamlı derecede bir fark oluşturduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Hazırlanan tüm formülasyonların sıçanların mide lümenlerini daha az kabarttığı ve kırmızılıklar oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca boş nanopartiküler formülasyonların ve bunların enterik kaplı formülasyonlarının ise midelerde herhangi bir ülser oluşumuna sebep olmadıkları 12. saat sonunda da tespit edilmiştir.

Geliştirdiğimiz formülasyonların ve piyasa preparatlarının salım kinetiklerini incelediğimizde pH 7.2 tampon ortamındaki salım yüzdelerinin ilk örnek alım süresi ile birlikte % 60'ın üzerinde gerçekleştiği görülmüş ve Korsmeyer-Peppas modeli uygulanamamıştır.¹¹⁰ Bu ortamda tüm preparatlar için Higuchi salım kinetiğine uyum tespit edilmiştir. pH 6.8 tampon ortamına baktığımızda, polimerik bir sistemle hazırlanmış olan ER kapsül ile geliştirdiğimiz İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinin Korsmeyer-Peppas salım kinetiğine, diğer geliştirdiğimiz formülasyonların ise Higuchi salım kinetiğine uyum gösterdiği tespit edilmiştir. Model seçiminde R^2 (determinasyon katsayısı) dikkate alınmış ve 1'e yaklaşan sonuçlar değerlendirilmiştir.¹⁶⁸ İndometazin yüklü-PLGA nanopartiküllerinden etkin madde salımının önce difüzyon ardından aşınma ve difüzyonla birlikte seyretmesinin literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.¹⁹

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışmada PLGA ve taşıyıcı bir polimer kullanılmaksızın hazırlanan indometazin içeren yeni ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonlara yüksek oranda indometazin yüklendiği saptanmıştır. Böylece oral uygulama yoluyla kullanılmak üzere ilaç taşıyan yeni nanopartiküler sistemler elde edilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen HPLC yöntemi ile miktar tayinleri gerçekleştirilmiş, *in vitro* dissolüsyon çalışmaları ile piyasada mevcut indometazin preparatları ile aralarındaki üstünlükler ve farklılıklar tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan *in vivo* çalışmalar ile geliştirdiğimiz sistemler, piyasa preparatları ile karşılaştırılarak incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Sonuçta tüm formülasyonların özellikle de enterik kaplı indometazin yüklü-PLGA nanopartikül formülasyonlarının GI sistemdeki ülser oluşturma potansiyelini en aza indirgeyerek güvenli bir şekilde kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Bu bilgilerden hareketle ileride yapılması planlanan çalışmalar ile patent alımı aşamasına geçilmesi düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Nathan C, Jose U-A, Lijie GZ, Michael K. Nanobiotechnology and Nanostructured Therapeutic Delivery Systems. *Recent Patents on Biomedical Engineering*, 2012, 5: 1-12.
2. Felice B, Prabhakaran MP, Rodriguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2014, 41: 178-195.
3. Moritz M, Geszke-Moritz M. Recent Developments in the Application of Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 24: 749-758.
4. Bhatt Neha, Bhatt Ganesh, Preeti K. Drug Delivery to The Brain Using Polymeric Nanoparticles: A Review. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 2013, 2(3): 107-132.
5. Mirakabad FST, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, Zeighamian V, Rahimzadeh A, Alimohammadi S, Hanifehpour Y, Joo SW. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15: 517-535.
6. Cooper DL, Harirforoosh S. Design and optimization of PLGA-based diclofenac loaded nanoparticles. *PLoS One*, 2014, 9: e87326.
7. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 2011, 36: 887-913.
8. Singh A, Garg G, Sharma P. Nanospheres: A novel approach for targeted drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2010, 5: 84-88.
9. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 2009, 26: 1025-1058.
10. Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2006, 2: 8-21.
11. Teixeira M, Alonso MJ, Pinto MM, Barbosa CM. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59: 491-500.
12. Lacey C, Sabliov S, Sabliov CM. Time Analysis of Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid Nanoparticle Uptake by Major Organs Following Acute Intravenous and Oral Administration in Mice and Rats. *Industrial Biotechnology*, 2013, 9: 19-23.
13. Govender T, Stolnik S, Garnett MC, Illum L, Davis SS. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*, 1999, 57: 171-185.
14. Sengel Türk CT, Sezgin Bayindir Z, Badilli U. Preparation of polymeric nanoparticles using different stabilizing agents. *J. Fac. Pharm, Ankara*, 2009, 38: 257-268.

15. Pal SL, Jana U, Manna PK, Mohanta GP, Manavalan R. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2011, 1: 228-234.
16. Ahmed M. Nasef, Ahmed R. Gardouh, Ghorab MM. Polymeric nanoparticles: influence of polymer, surfactant and composition of manufacturing vehicle on particle size. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015, 3: 2308-2322.
17. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 75: 1-18.
18. Liechty WB, Kryscio DR, Slaughter BV, Peppas NA. Polymers for drug delivery systems. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2010, 1: 149-173.
19. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 2011, 3: 1377-1397.
20. Ji YH, Lesniak AK, Prudic A, Paus R, Sadowski G. Drug Release Kinetics and Mechanism from PLGA Formulations. *Aiche Journal*, 2016, 62: 4055-4065.
21. Sharma S, Parmar A, Kori S, Sandhir R. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 80: 30-40.
22. Corrigan OI, Li X. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 37: 477-485.
23. Kerimoğlu O, Alarçin E. Poly(lactic-co-glycolic acid) based drug delivery devices for tissue engineering and regenerative medicine. *ANKEM*, 2012, 26: 86-98.
24. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15: 3640-3659.
25. Ishihara T, Mizushima T. Techniques for efficient entrapment of pharmaceuticals in biodegradable solid micro/nanoparticles. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, 7: 565-575.
26. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161: 505-522.
27. Stevanovic M, Uskokovic D. Poly(lactide-co-glycolide)-based Micro and Nanoparticles for the Controlled Drug Delivery of Vitamins. *Current Nanoscience*, 2009, 5: 1-14.
28. Khanal S, Adhikari U, Rijal NP, Bhattarai SR, Sankar J, Bhattarai N. pH-Responsive PLGA Nanoparticle for Controlled Payload Delivery of Diclofenac Sodium. *Journal of Functional Biomaterials*, 2016, 7.
29. Afifi SA, Hassan MA, Abdelhameed AS, Elkhodairy KA. Nanosuspension: An Emerging Trend for Bioavailability Enhancement of Etodolac. *International Journal of Polymer Science*, 2015.
30. Pawar VK, Singh Y, Meher JG, Gupta S, Chourasia MK. Engineered nanocrystal technology: in-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2014, 183: 51-66.
31. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm*, 2012, 2012: 195727.

32. Jain V, Kare P, Jain D, Singh R. Development and Characterization of Mucoadhesive Nanosuspension of Ciprofloxacin. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2011, 68: 273-278.
33. Malkani A, Date AA, Hegde D. Celecoxib nanosuspension: single-step fabrication using a modified nanoprecipitation method and in vivo evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*, 2014, 4: 365-376.
34. Verma S, Kumar S, Gokhale R, Burgess DJ. Physical stability of nanosuspensions: investigation of the role of stabilizers on Ostwald ripening. *Int J Pharm*, 2011, 406: 145-152.
35. Du J, Li XG, Zhao HX, Zhou YQ, Wang LL, Tian SS, Wang YC. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 495: 738-749.
36. Yuan HL, Li X, Zhang CY, Pan WL, Liang YM, Chen Y, Chen WD, Liu LL, Wang XM. Nanosuspensions as delivery system for gambogic acid: characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Drug Delivery*, 2016, 23: 2772-2779.
37. Arunkumar N, Deecaraman M, Rani C. Nanosuspension technology and its applications in drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 2009, 1: 168-173.
38. Patel VR, Agrawal YK. Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *J Adv Pharm Technol Res*, 2011, 2: 81-87.
39. Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release*, 2013, 172: 1126-1141.
40. Gaaz TS, Sulong AB, Akhtar MN, Kadhum AAH, Mohamad AB, Al-Amiery AA. Properties and Applications of Polyvinyl Alcohol, Halloysite Nanotubes and Their Nanocomposites. *Molecules*, 2015, 20: 22833-22847.
41. Salman SA, Bakr NA, Homad HT. Section C: Physical Sciences DSC and TGA Properties of PVA Films Filled with Na₂S₂O₃·5H₂O Salt. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 2018, 8: 1-11.
42. Sahoo SK, Panyam J, Prabha S, Labhasetwar V. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release*, 2002, 82: 105-114.
43. Menon JU, Kona S, Wadajkar AS, Desai F, Vadla A, Nguyen KT. Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012, 100a: 1998-2005.
44. Kranz H, Gutsche S. Evaluation of the drug release patterns and long term stability of aqueous and organic coated pellets by using blends of enteric and gastrointestinal insoluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 380: 112-119.
45. TC AURORA LLC. http://www.aurora-pharma.com/en/products_catalogue/excipients/film_coatings/enteric_coatings/kollicoat_mae.htm. 13 Aralık 2018.
46. BASF. <https://pharmaceutical.basf.com/en/Drug-Formulation/Kollicoat-MAE-100-P.html>. 13 Aralık 2018.
47. Martell DRD, Briones JR, Hurtado MG, Lopez AD, Meneses VMC. Effect of Solvents on the Morphological Characterization of Enteric Nanoparticles. *Materials Research-Ibero-American Journal of Materials*, 2009, 12: 405-410.

48. Dupeyron D, Rieumont J, Gonzalez M, Castano VM. Protein Delivery by Enteric Copolymer Nanoparticles. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 2009, 30: 1188-1194.
49. Amado JRR, Prada AL, Duarte JL, Keita H, da Silva HR, Ferreira AM, Sosa EH, Carvalho JCT. Development, stability and in vitro delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25: 1158-1168.
50. Dupeyron D, Kawakami M, Ferreira AM, Caceres-Velez PR, Rieumont J, Azevedo RB, Carvalho JCT. Design of indomethacin-loaded nanoparticles: effect of polymer matrix and surfactant. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8: 3467-3477.
51. Hao SL, Wang BC, Wang YZ, Zhu LC, Wang B, Guo TW. Preparation of Eudragit L 100-55 enteric nanoparticles by a novel emulsion diffusion method. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2013, 108: 127-133.
52. Kumar R, Siril PF. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol stabilized griseofulvin nanoparticles. *Materials Today-Proceedings*, 2016, 3: 2261-2267.
53. Tyagi S, Pandey VK. Nanoparticles: An Overview of Preparation. *Reviews on Pharmaceutics and Nanotechnology*, 2016, 4: 1-12.
54. Miladi K, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. In: Vauthier C, Ponchel G (eds). *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*, 1st ed. Switzerland, Springer, 2016: 80-115.
55. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1999, 25: 471-476.
56. Schubert S, Delaney JT, Schubert US. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*, 2011, 7: 1581-1588.
57. Quintanar-Guerrero D, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm*, 1998, 24: 1113-1128.
58. Astete CE, Sabliov CM. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2006, 17: 247-289.
59. Bhatia S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In: *Natural Polymer Drug Delivery Systems*, 1st ed. Switzerland, Springer, 2016: 33-93.
60. Lucas S. The Pharmacology of Indomethacin. *Headache*, 2016, 56: 436-446.
61. Nagai N, Ito Y. Effect of Solid Nanoparticle of Indomethacin on Therapy for Rheumatoid Arthritis in Adjuvant-Induced Arthritis Rat. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2014, 37: 1109-1118.
62. Mokarram AR, Zadeh AK, Keshavarz M, Ahmadi A, Mohtat B. Preparation and in-vitro evaluation of indomethacin nanoparticles. *Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, 18: 185-192.
63. Rodriguez-Laguna N, Reyes-Garcia LI, Moya-Hernandez R, Rojas-Hernandez A, Gomez-Balderas R. Chemical Speciation of the System Cu(II)-Indomethacin in Ethanol and Water by UV-Vis Spectrophotometry. *Journal of Chemistry*, 2016.

64. Remington. Remington, J. Allen, L. 2013. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy (22.Basım)*. London ; Philadelphia: Pharmaceutical Press. Baskı.
65. Helleberg L. Clinical Pharmacokinetics of Indomethacin. *Clinical Pharmacokinetics*, 1981, 6: 245-258.
66. Martindale. Brayfield, A. 2014. *Martindale: The Complete Drug Reference (38. Basım)*. London, UK: Pharmaceutical Press. Baskı.
67. Akılcıl Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji. Melli, M. 2012. "Non-Steroidal Antiinflamatuvar İlaçlar". Akılcıl Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji. Editör: Kayaalp, S.O. Ankara: Hacettepe Taş Kitapevi.
68. Pubchem. "indomethacin"
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/indomethacin>, 19 Aralık 2018.
69. USPNF.
https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m40421-indomethacin_extended-release_capsules.pdf , 18 Mart 2019.
70. Goodman & Gilman's. Grosser, T., Smyth, E., FitzGerald, G. A. 2011. "Anti-Inflammatory, Antipyretic, and Analgesic Agent; Pharmacotherapy of Gout". Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Editörler: Brunton, L., Chabner, B., Knollmann, B. New York: McGraw-Hill.
71. Froder JG, Dupeyron D, Carvalho JCT, Maistro EL. In vitro study of the cytotoxic and genotoxic effects of indomethacin-loaded Eudragit (R) L 100 nanocapsules. *Genetics and Molecular Research*, 2016, 15.
72. Ramadan S, Bonin AM, Kennedy BJ, Hambley TW, Lay PA. Nuclear magnetic resonance analysis of indomethacin-induced gastric ulcers. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18: 123-128.
73. Bose PS, Nagaraju R, Saritha D, Padmasri B, Reddy PS. Preparation and evaluation of indomethacin loaded alginate microspheres. *Ceska Slov Farm*, 2016, 65: 104-110.
74. Gupta NV, Gowda DV, Balamuralidhara V, Khan MS. Preparation and Comparative Bioavailability Studies of Indomethacin-Loaded Cetyl Alcohol Microspheres. *J Pharm (Cairo)*, 2013, 2013: 109837.
75. Amara HMA. Preparation, Characterization and In Vitro Evaluation of Indomethacin Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014, 7: 15-35.
76. Kaur Amandeep, Singh Robin, Sharma Ramica, Sunil K. Peptic Ulcer: A Review on Etiology and Pathogenesis. *International Research Journal of Pharmacy*, 2012, 3(6): 34-38.
77. Yuvraj Gulia, Choudhary M. Peptic Ulcer Disease: A Review. *Pharmacologyonline*, 2011, 3: 48-70.
78. Lanza FL, Gastroe AHCPPAC. A guideline for the treatment and prevention of NSAID-induced ulcers. *American Journal of Gastroenterology*, 1998, 93: 2037-2046.
79. Türkiye İstatistik Kurumu. "İstatistiklerle Türkiye, 2014". http://www.tuik.gov.tr/IcerikGetir.do?istab_id=5. 13 Aralık 2018.
80. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. "Türkiye Kalp ve Damar Hastalıklarını Önleme ve Kontrol Programı".

http://file.tkd.org.tr/pdfscop/turkiye_kalp_ve_damar_hastaliklarini_onleme_ve_kontrol_programi.pdf. 13 Aralık 2018.

81. Thorsen K, Soreide JA, Kvaloy JT, Glomsaker T, Soreide K. Epidemiology of perforated peptic ulcer: age- and gender-adjusted analysis of incidence and mortality. *World J Gastroenterol*, 2013, 19: 347-354.

82. Vakil, N.B. "Epidemiology and Etiology of Peptic Ulcer Disease". UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-etiology-of-peptic-ulcer-disease>. 13 Aralık 2018.

83. Narsinghani T, Sharma R. Lead optimization on conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: an approach to reduce gastrointestinal toxicity. *Chem Biol Drug Des*, 2014, 84: 1-23.

84. Indomethacin Certificate of Analysis. L. Van den Broek, Acros Organics, 10 January 2017, Geel, Belgium.

85. U. S. Pharmacopeia, The standart of Quality, Indomethacin, USP30/NF 25, 2007.

86. Tomoda K, Yabuki N, Terada H, Makino K. Surfactant free preparation of PLGA nanoparticles: The combination of antisolvent diffusion with preferential solvation. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, 457: 88-93.

87. Shabir GA. 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*, 2003, 987: 57-66.

88. Srivastava RK, Kumar SS. An updated review: Analytical method validation. *ejpgmr*, 2017, 4: 774-784.

89. Ansari MJ. Factors Affecting Preparation and Properties of Nanoparticles by Nanoprecipitation Method. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 4: 4854-4858.

90. Mehrotra A, Pandit JK. Critical process parameters evaluation of modified nanoprecipitation method on lomustine nanoparticles and cytostatic activity study on L132 human cancer cell line. *J Nanomed Nanotechol*, 2012, 3: 1-8.

91. Arasoglu T, Derman S, Mansuroglu B, Uzunoglu D, Kocyigit B, Gumus B, Acar T, Tuncer B. Preparation, characterization, and enhanced antimicrobial activity: quercetin-loaded PLGA nanoparticles against foodborne pathogens. *Turkish Journal of Biology*, 2017, 41: 127-140.

92. Fayyad MS, Ghareeb MM, Kassab HJ. Study of Some Variables Affecting Product Properties of Felodipine Nano Precipitation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2017, 42: 265-268.

93. Salatin S, Barar J, Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Kiafar F, Jelvehgari M. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2017, 12: 1-14.

94. Javadzadeh Y, Ahadi F, Davaran S, Mohammadi G, Sabzevari A, Adibkia K. Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2010, 81: 498-502.

95. Maaz A, Abdelwahed W, Tekko IA, Trefi S. Influence of nanoprecipitation method parameters on nanoparticles loaded with gatifloxacin for ocular drug delivery. *IJASR*, 2015, 3: 1-12.
96. Shakeni S, Roghanian R, Emtiazi G, Errico C, Chiellini F, Chiellini E. Preparation of protein-loaded PLGA-PVP blend nanoparticles by nanoprecipitation method: entrapment, Initial burst and drug release kinetic studies. *Nanomedicine Journal*, 2015, 2: 175-186.
97. Bukhari A, Idris A, Atta M. Effect of organic and aqueous dispersion medium on the development of polystyrene nanoparticles in nanoprecipitation method. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 2014, 10: 28-32.
98. Salem HF, Kharshoum RM. Nanoprecipitation technique for preparation of sterically stabilized risperidone nanosuspension: In vitro and in vivo study. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2016, 8: 136-142.
99. Singh VK, Singh P, Chandra D, Kumar S, Rai U, Singh P. Formulation and evaluation of effect of different stabilizer at nanosuspension of satranidazole. *JPBMAL*, 2014, 2: 71-77.
100. Ali H, Weigmann B, Neurath MF, Collnot EM, Windbergs M, Lehr CM. Budesonide loaded nanoparticles with pH-sensitive coating for improved mucosal targeting in mouse models of inflammatory bowel diseases. *Journal of Controlled Release*, 2014, 183: 167-177.
101. Sun H, Liu D, Li Y, Tang X, Cong Y. Preparation and in vitro/in vivo characterization of enteric-coated nanoparticles loaded with the antihypertensive peptide VLPVPR. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 1709-1716.
102. Naha PC, Kanchan V, Manna PK, Panda AK. Improved bioavailability of orally delivered insulin using Eudragit-L30D coated PLGA microparticles. *Journal of Microencapsulation*, 2008, 25: 248-256.
103. Anwer MK, Al-Shdefat R, Ezzeldin E, Alshahrani SM, Alshetaili AS, Iqbal M. Preparation, Evaluation and Bioavailability Studies of Eudragit Coated PLGA Nanoparticles for Sustained Release of Eluxadolone for the Treatment of Irritable Bowel Syndrome. *Frontiers in Pharmacology*, 2017, 8.
104. Ahmed A, Yadav HKS, Manne N, Sureddy VL, Namburi NBV, Shivakumar HG. Formulation and evaluation of enteric coated nanoparticulate system for poorly absorbable drug. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2014, 24: 50-56.
105. Sahin A, Esendagli G, Yerlikaya F, Caban-Toktas S, Yoyen-Ermis D, Horzum U, Aktas Y, Khan M, Couvreur P, Capan Y. A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2017: 1-11.
106. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 2010, 6: 324-333.
107. Pandya VM, Patel JK, Patel DJ. Formulation, Optimization and characterization of Simvastatin Nanosuspension prepared by nanoprecipitation technique. *Der Pharmacia Lettre*, 2011, 3: 129-140.

108. Sahu BP, Das MK. Nanosuspension for enhancement of oral bioavailability of felodipine. *Applied Nanoscience*, 2014, 4: 189-197.
109. Su Z, Sun F, Shi Y, Jiang C, Meng Q, Teng L, Li Y. Effects of formulation parameters on encapsulation efficiency and release behavior of risperidone poly(D,L-lactide-co-glycolide) microsphere. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2009, 57: 1251-1256.
110. Chime Salome, Onunkwo Godswill, Ikechukwu O. Kinetics and Mechanisms of Drug Release from Swellable and Non Swellable Matrices: A Review. *RJPBCS*, 2013, 4: 97-103.
111. Govind Soni, Yadav KS. High encapsulation efficiency of poloxamer-based injectable thermoresponsive hydrogels of etoposide. *Pharm Dev Technol*, 2014, 19: 651-661.
112. Kunes M, Kvetina J, Bures J. Type and distribution of indomethacin-induced lesions in the gastrointestinal tract of rat. *Neuroendocrinology Letters*, 2009, 30: 96-100.
113. Polat B, Suleyman H, Alp HH. Adaptation of rat gastric tissue against indomethacin toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 186: 82-89.
114. Sostres C, Gargallo CJ, Lanás A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and upper and lower gastrointestinal mucosal damage. *Arthritis Research & Therapy*, 2013, 15.
115. Drini M. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Aust Prescr*, 2017, 40: 91-93.
116. Sabiu S, Garuba T, Sunmonu T, Ajani E, Sulyman A, Nurain I, Balogun A. Indomethacin-induced gastric ulceration in rats: Protective roles of Spondias mombin and Ficus exasperata. *Toxicol Rep*, 2015, 2: 261-267.
117. Kamel R, Salama AH, Mahmoud AA. Development and optimization of self-assembling nanosystem for intra-articular delivery of indomethacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 515: 657-668.
118. Castelli F, Conti B, Maccarrone D, La Camera O, Conte U. Indomethacin-dipalmitoylphosphatidylcholine interaction. A calorimetric study of drug release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres into multilamellar vesicles. *Drug Delivery*, 1997, 4: 273-279.
119. Puebla P, Pastoriza P, Barcia E, Fernandez-Carballido A. PEG-derivative effectively modifies the characteristics of indomethacin-PLGA microspheres destined to intra-articular administration. *Journal of Microencapsulation*, 2005, 22: 793-808.
120. Fernandez-Carballido A, Puebla P, Herrero-Vanrell R, Pastoriza P. Radiosterilisation of indomethacin PLGA/PEG-derivative microspheres: Protective effects of low temperature during gamma-irradiation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 313: 129-135.
121. Madani F, Chaumeil JC. Coating of indomethacin-loaded embolic microspheres for a successful embolization therapy. *Journal of Microencapsulation*, 2008, 25: 121-133.
122. Kang YQ, Wu J, Yin GF, Huang ZB, Yao YD, Liao XM, Chen AZ, Pu XM, Liao L. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of indomethacin-loaded PLLA/PLGA microparticles using supercritical CO₂ technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, 70: 85-97.

123. El-Badry M, Fetih G, Fathy M. Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersions in Gelucire 50/13 and PEG4000. *Saudi Pharm J*, 2009, 17: 217-225.
124. Kulkarni S, Gupta SP, Upmanyu N, Tonpay SD. Solubility Enhancement of Water Insoluble Drug for Ophthalmic Formulation. *International Journal of Drug Delivery*, 2011, 3: 141-148.
125. British Pharmacopeia 2013, Volume V, Page 206, The Stationery Office Ltd., London
126. European Pharmacopeia, 5th Edition, 2005, Aubin Ltd. Ligugé, Fransa. .
127. Sunil SA, Srikanth MV, Rao NS, Raju V, Murthy KVR. Investigation on in vitro dissolution rate enhancement of indomethacin by using a novel carrier sucrose fatty acid ester. *Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 20.
128. Elkhodairy KA, Elsaghir HA, Al-Subayiel AM. Formulation of Indomethacin Colon Targeted Delivery Systems Using Polysaccharides as Carriers by Applying Liquisolid Technique. *Biomed Research International*, 2014.
129. Knopp MM, Olesen NE, Holm P, Langguth P, Holm R, Rades T. Influence of Polymer Molecular Weight on Drug-Polymer Solubility: A Comparison between Experimentally Determined Solubility in PVP and Prediction Derived from Solubility in Monomer. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 2905-2912.
130. ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.
131. Wang YC, Li PW, Tran TTD, Zhang J, Kong LX. Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*, 2016, 6.
132. Sah E, Sah H. Recent Trends in Preparation of Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles by Mixing Polymeric Organic Solution with Antisolvent. *Journal of Nanomaterials*, 2015.
133. G.Sahitya, B.Krishnamoorthy, M.Muthukumaran. Importance of preformulation studies in designing formulations for sustained release dosage forms. *International Journal of Pharmacy & Technology*, 2012, 4: 2311-2331.
134. Murakami H, Kobayashi M, Takeuchi H, Kawashima Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 187: 143-152.
135. Jonderian A, Maalouf R. Formulation and In vitro Interaction of Rhodamine-B Loaded PLGA Nanoparticles with Cardiac Myocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 7.
136. Xie H, Smith JW. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *J Nanobiotechnology*, 2010, 8: 18.
137. Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Sung J, Luther G, Gu FX, Levy-Nissenbaum E, Radovic-Moreno AF, Langer R, Farokhzad OC. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 2007, 28: 869-876.
138. Sun SB, Liu P, Shao FM, Miao QL. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015, 8: 19670-19681.

139. Yadav KS, Sawant KK. Modified Nanoprecipitation Method for Preparation of Cytarabine-Loaded PLGA Nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, 2010, 11: 1456-1465.
140. Sahu BP, Das MK. Nanoprecipitation with Sonication for Enhancement of Oral Bioavailability of Furosemide. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2014, 71: 129-137.
141. Boddeda B, Boddu P, Avasarala H, Jayanti VR. Design and Ocular Tolerance of Flurbiprofen Loaded Nanosuspension. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 2015, 3: 56-67.
142. Masilamani K, Ravichandiran V. Effect of Formulation and Process Variables on Particle Size of Aceclofenac Nanosuspension. *Journal of Pharmacy Research*, 2012, 5: 715-718.
143. Ghitman J, Stan R, Ghebaur A, Cecoltan S, Vasile E, Iovu H. Novel PEG-Modified Hybrid PLGA-Vegetable Oils Nanostructured Carriers for Improving Performances of Indomethacin Delivery. *Polymers*, 2018, 10.
144. Hickey JW, Santos JL, Williford JM, Mao HQ. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *J Control Release*, 2015, 219: 536-547.
145. Adibkia K, Alaei-Beirami M, Barzegar-Jalali M, Mohammadi G, Ardestani MS. Evaluation and optimization of factors affecting novel diclofenac sodium-eudragit RS100 nanoparticles. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012, 6: 941-947.
146. Sharma D, Maheshwari D, Philip G, Rana R, Bhatia S, Singh M, Gabrani R, Sharma SK, Ali J, Sharma RK, Dang S. Formulation and Optimization of Polymeric Nanoparticles for Intranasal Delivery of Lorazepam Using Box-Behnken Design: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Biomed Research International*, 2014.
147. Bhadra S, Prajapati AB, Bhadra D. Development of pH sensitive polymeric nanoparticles of erythromycin stearate. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2016, 8: 135-140.
148. Sadat SMA, Jahan ST, Haddadi A. Effects of Size and Surface Charge of Polymeric Nanoparticles on in Vitro and in Vivo Applications. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2016, 7: 91-108.
149. Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 2008, 17: 326-343.
150. Singh G, Kaur T, Kaur R, Kaur A. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA. *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.*, 2014, 1: 30-42.
151. Dubernet C. Thermoanalysis of Microspheres. *Thermochimica Acta*, 1995, 248: 259-269.
152. Erbetta CDAC, Alves RJ, Resende JM, Freitas RFdS, Sousa RGd. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *JBNB*, 2012, 3: 208-225.
153. Ayyoob M, Kim YJ. Effect of Chemical Composition Variant and Oxygen Plasma Treatments on the Wettability of PLGA Thin Films, Synthesized by Direct Copolycondensation. *Polymers*, 2018, 10.
154. Akhgari A, Heshmati Z, Sharif Makhmalzadeh B. Indomethacin electrospun nanofibers for colonic drug delivery: preparation and characterization. *Adv Pharm Bull*, 2013, 3: 85-90.

155. Rizvi SAA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2018, 26: 64-70.
156. Comer J, Judge S, Matthews D, Towes L, Falcone B, Goodman J, Dearden J. The intrinsic aqueous solubility of indomethacin. *ADMET & DMPK*, 2014, 2: 18-32.
157. Nokhodchi A, Javadzadeh Y, Siahi-Shadbad MR, Barzegar-Jalali M. The effect of type and concentration of vehicles on the dissolution rate of a poorly soluble drug (indomethacin) from liquisolid compacts. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2005, 8: 18-25.
158. Hajare AA, Jadhav PR. Improvement of solubility and dissolution rate of indomethacin by solid dispersion in polyvinyl pyrrolidone k30 and poloxomer 188. *Asian J. Pharm. Tech*, 2012, 2: 116-122.
159. Akhgari A, Afrasiabi Garekani H, Sadeghi F, Azimaie M. Statistical optimization of indomethacin pellets coated with pH-dependent methacrylic polymers for possible colonic drug delivery. *Int J Pharm*, 2005, 305: 22-30.
160. U.S. Pharmacopeia, The standart of Quality, Indomethacin Capsules, USP30/NF 25, 2007.
161. U.S. Pharmacopeia, The standart of Quality, Indomethacin Extended-Release Capsules, USP30/NF 25, 2007.
162. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 12: 255-264.
163. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013, 12: 265-273.
164. Çevik Ö. Kanser tedavisinde solid tümörlere lenfatik hedeflendirme amacıyla lyp-1 peptidini içeren ilaç taşıyıcı nanosistemlerin tasarımı ve in vitro değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2012.
165. Gürbüz A. Topikal izotretinoin uygulamasına yönelik koloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: İstanbul Üniversitesi, 2014.
166. Erdoğan N. Tumor specific delivery and in vitro-in vivo evaluation of paclitaxel loaded folate-conjugated amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2015.
167. Ratiopharm. https://www.ratiopharm.de/assets/products/de/pkg_insert/Indomet-ratiopharm%C2%AE%2075%20mg%20Retardkapseln.pdf?pzn=4577860. 27 Aralık 2018.
168. Cojocaru V, Ranetti AE, Hinescu LG, Ionescu M, Cosmescu C, Postoarca AG, Cinteza LO. Formulation and Evaluation of in Vitro Release Kinetics of Na(3)Cdtpa Decorporation Agent Embedded in Microemulsion-Based Gel Formulation for Topical Delivery. *Farmacia*, 2015, 63: 656-664.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Emrah ÖZAKAR Doğum Tarihi: 01.01.1984 Doğum Yeri: Erzurum Medeni Hali: Evli, 1 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, 25240, ERZURUM Tel: 0442 231 52 17 / 0542 472 45 50 Faks: - E-Posta: emrahozakar@atauni.edu.tr
Eğitim
Lise: Özel Dadaşkent Erkek Lisesi (2001) Lisans: Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi (2001-2005) Yüksek Lisans: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2013-2014) Doktora: Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı (2015-2019)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
Erzurum Eczacı Odası, 2005 Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği, 2013
İlgi Alanları Ve Hobiler
Farmasötik Teknoloji Majistral İlaçlar Bitkiler Deniz Canlıları

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ* danışmanlığında sunulan “İNDOMETAZİN YÜKLÜ-NANOPARTİKÜLER SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE İN VİTRO, İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	2	15
Genel Bilgiler	3	30
Materyal ve Metod	7	35
Bulgular	5	10
Tartışma	2	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 14. / 05. / 2019

Arş. Gör. Emrah ÖZAKAR

Öğrenci Adı-Soyadı
İmza

Prof. Dr. Nazan Bergişadi

Danışman Adı-Soyadı
İmza

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1700100755
Konu : HADYEK Kararı.

31.03.2017

HUKUK MÜŞAVİRLİĞİNE

İlgi : 24.03.2017 tarihli ve 77040475-000-E.1700094317 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.03.2017 tarih ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 43 no'lu kararı ile sözkonusu Doktora Tezi çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz ederim.

Toplantı Tarihi: 30.03.2017

Toplantı Sayısı : 3

KARAR NO 43: İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dekanlığı, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Nazan BERGİŞADİ'nin yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan “İndometazin Yüklü-Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması ve *İn-vitro*, *İn-vivo* Değerlendirilmesi” başlıklı Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik teknoloji Anabilim Dalı Arş.Gör.Emrah ÖZAKAR'ın Doktora Tezi çalışması ile ilgili 24.03.2017 tarih ve 77040475-000-E.1700094317 sayılı Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hukuk Müşavirliği yazısı ekindeki İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Rektörlüğünün 20.03.2017 tarih ve 70350156-100-E.649 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen Doktora Tezi çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#!birim=veteriner-fakultesi>

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr



EK-4. ETİK ALT KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu

Sayı : 93722986.12/33
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

07/06/2017

Sayın Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ

İlgi: 24.05.2017 tarih ve 151 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Alt Etik Kurulunun 07.06.2017 tarihinde almış olduğu 7 numaralı karar ile danışmanı olduğunuz doktora öğrencisi Emrah ÖZAKAR'ın "İndometazin Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması ve İn-vitro, İn-vivo Değerlendirilmesi" başlıklı çalışması etik kurulumuz tarafından kabul edilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Yücel KADIOĞLU
Başkan

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Üye

Prof. Dr. Halise İnci GÜL
Üye

Doç. Dr. Yasin BAYIR
Üye

(Oylamaya Katılmadı)

Doç. Dr. Beyzagül POLAT
Üye

Karar-07- İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ'nin danışmanı olduğu doktora öğrencisi Emrah ÖZAKAR'ın Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yürüteceği "İndometazin Yüklü Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması ve İn-vitro, İn-vivo Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma ile ilgili 24.05.2017 tarih ve 151 sayılı yazı ile ekleri görüşülmüştür.

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yürütülmesinin etik kurallara uygun olduğu (Doç. Dr. Beyzagül POLAT çalışma ekibinde olduğundan oylamaya katılmadı) mevcut oybirliği ile kabul edilmiştir.