



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



LEVODOPA' NIN BİYOYARARLANIMININ ARTIRILMASI İÇİN YENİ DOZAJ ŞEKLİ GELİŞTİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Hatice ÇETİN

Farmasötik Teknoloji

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**LEVODOPA' NIN BİYOYARARLANIMININ
ARTIRILMASI İÇİN YENİ DOZAJ ŞEKLİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Hatice ÇETİN

Danışman(lar)
Prof. Dr. Ercüment KARASULU

Farmasötik Teknoloji
Yüksek Lisans

İzmir
2019

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Ercüment KARASULU

(Danışman)

Üye : Doç.Dr. Emel Öykü ÇETİN UYANIKGİL

Üye : Doç.Dr. Mehmet Zeki HAZNEDAROĞLU

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 29.08.2019

Önsöz

E.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP/13-İLAM-003) tarafından desteklenen “Levodopa’nın biyoyararlanımının artırılması için yeni dozaj şeklinin geliştirilmesi” adlı yüksek lisans tez çalışmasında mevcut olan ve günümüzde yaygın olarak kullanılan formülasyonlara alternatif olabilecek bir mikroemülsiyon geliştirdik. Levodopanin intranazal yol ile uygulanabilen, farklı bir taşıyıcı sistem içinde düşük olan biyoyararlanımını artırmayı amaçladık. Böylesine anlamlı bir amaca beni dahil ettikleri için saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ercüment KARASULU’ ya ve Öğr. Gör. İskender İNCE’ ye teşekkürü borç bilirim.

İzmir, 2019

Hatice ÇETİN

Özet

Levodopa' nın Biyoyararlanımının Artırılması İçin Yeni Dozaj Şekli Geliştirilmesi

Parkinson hastalığı (PH) en sık görülen hareket bozukluğu hastalıklarından birisidir. Bazal ganglionda dopaminin aşırı kaybı ile ortaya çıkan titreme, sertlik, hareketlerin yavaşlaması PH'nın en belirgin belirtileridir. Günümüzde PH'nın tedavisindeki temel yaklaşım, azalan dopaminin dışarıdan ilaç tedavisi ile yerine koyma prensibine dayanmaktadır. Dopaminin kan-beyin bariyerini aşamaması ile ortaya çıkan sorun, dopamine metabolize olan, kan-beyin bariyerini aşabilen, aromatik bir amin olan Levodopa (L-Dopa) nın kullanılması ile çözülmüştür. Fakat oral yoldan uygulanan levodopadan çeşitli kısıtlayıcı faktörler nedeniyle beklenen biyoyararlanım sağlanamamaktadır.

Bu projede düşük biyoyararlanım gösteren levodopanın biyoyararlanımını artırıcı formülasyon geliştirilmiştir. Bu çalışma sırasında levodopa'nın intranazal uygulanabilecek mikroemülsiyon dozaj şekli hazırlanmış, in vitro yöntemlerle kalite kontrol çalışmaları, etkin maddenin sentetik membrandan geçiş çalışmaları, flourosens işaretleme verimi ve deney hayvanlarında intranazal uygulama sonrası görüntüleme çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler; Parkinson hastalığı, Levodopa, Mikroemülsiyon

Abstract

Bioavailability of Levodopa For Boosting New Dosage Form Development

Parkinson's disease (PH) is one of the most common movement disorder disease. PH of the symptoms (tremor, stiffness, slow movements) with excessive loss of dopamine in the basal ganglio emerges. Today, the basic approach in the treatment of PH decreasing dopamine from outside drug therapy is based on the principle of substitution with. The action of dopamine, which occurs with the blood-brain barrier couldn't surpass problem is metabolized to dopamine, which can cross the blood-brain barrier, an aromatic amine, the use of Levodopa (l-dopa) that is solved with. But a variety of restrictive factors of applied oral ingestion is expected due to the lower bioavailability of Levodopa is not provided.

This project represents the optimum combination of low bioavailability of Levodopa on enhancing formulation will be developed. This work can be applied during a Microemulsion dosage of Levodopa intranasal form prepared and in vitro methods of quality control work, the active ingredient of transition from the synthetic membrane, flouro autosensing markup yields and after intranasal application imaging studies in experimental animals is intended.

Keywords; Parkinson disease, Levodopa, Microemulsion

İçindekiler

Önsöz	II
Özet	III
Abstract	IV
İçindekiler	V
Tablolar Dizini	VIII
Şekiller Dizini	IX
Kısaltmalar Listesi	X
1. Giriş	1
2. Genel Bigiler	3
2.1. Parkinson Hastalığı	3
2.1.1. Dopaminin Moleküler Metabolizması	3
2.1.2. Levodopa ve Parkinson Tedavisi	4
2.1.3. Benserazid	5
2.2. Emülsiyonlar	5
2.2.1. Emülgatörler	6
2.2.2. Hidrofilik Lipofilik Balans (HLB) Değeri	7
2.2.3. Mikroemülsiyonlar	8
2.3. Nazal Yol ile İlaç Uygulama	9
2.3.1. Nazal Yolun Yapısı ve Özellikleri	9
2.3.1.1. Nazal Anatomi ve Fizyoloji	9
2.3.2. Nazal Absorbsiyon Mekanizması	11
2.3.2.1. Nazal Yoldan İlaç Absorbsiyonunu Etkileyen Faktörler	12
3. Gereç Ve Yöntem	14
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	14
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Yardımcı Maddeler	14
3.3. Yöntem ve Deneyler	15
3.3.1. Levodopa ile Benserazidin LCMS/MS'e İnfüsyonu ve Standart Eğrisinin Çizimi	15
3.3.1.1. LOD-LOQ Hesaplaması	15
3.3.2. Formülasyon Çalışmaları	16
3.3.2.1. Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışması	16

3.3.2.1.1. Formülasyonda Kullanılacak Madde Seçimi	16
3.3.2.1.2. Mikroemülsiyon Formülasyonunu Belirlemek İçin Yapılan Çalışmalar	16
3.3.2.1.3. Üçgen Faz Diyagramının Çizimi	17
3.3.2.1.4. Levodopa-Benserazid ile Formülasyon Çalışmaları	17
3.3.3. Mikroemülsiyonunu Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	18
3.3.3.1. Fiziksel Görünüm.....	18
3.3.3.2. pH Ölçümü	18
3.3.3.3. Refraktif İndeks Ölçümü.....	18
3.3.3.4. Yoğunluk Ölçümü.....	19
3.3.3.5. Viskozite Ölçümü.....	19
3.3.3.6. Elektrik İletkenliği Ölçümü.....	19
3.3.3.7. Partikül Boyutunun Saptanması.....	19
3.3.3.8. Etken Madde Miktarı Tayini	19
3.3.4. İn-vitro Geçiş Çalışması.....	20
3.3.5. İn-vivo Görüntüleme	20
4. Bulgular.....	22
4.1. Formülasyon Çalışması Sonuçları.....	22
4.2. Mikroemülsiyonun Fizikokimyasal Test Sonuçları	24
4.2.1. Mikroemülsiyonun Parikül Boyutu Ölçüm Sonuçları	25
4.2.2. Etken Madde Miktarı Tayin Sonucu	25
4.3. Levodopa ve Benserazid'in LCMS/MS' te Tayini	26
4.3.1. Levodopa ve Benserazid' in Kalibrasyon Eğrisi Çizimi.....	27
4.3.2. LOD ve LOQ Hesaplanması Sonuçları.....	28
4.4. İn-vitro Geçiş Çalışması Sonuçları	28
4.5. İn-vivo Görüntüleme Çalışması Sonuçları.....	31
5. Tartışma.....	33
5.1. Formülasyon Çalışmaları Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	33
5.2. Levodopa ve Benserazid in LCMS/MS te Tayin Çalışmasının Değerlendirilmesi	35
5.3. İn-Vitro Geçiş Çalışması Sonuçlarının Değerlendirilmesi	35
5.4. İn-Vivo Görüntüleme Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	36
6. Sonuç ve Öneriler.....	37
7. Kaynaklar	38
8. Ekler	41

9. Teşekkür.....	42
10. Özgeçmiş.....	43



Tablolar Dizini

Tablo 1. Surfaktan/ko-surfaktan oranı (a/a) (2:1) olan formülasyon geliştirme verileri	16
Tablo 2. Surfaktan/ko-surfaktan oranı (a/a) (1:1) olan formülasyon geliştirme verileri	17
Tablo 3. (1:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı sonuçları	22
Tablo 4. (2:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı sonuçları	23
Tablo 5. Mikroemülsiyonun fizikokimyasal çalışma sonuçları	24
Tablo 6. Mikroemülsiyonun polidispersite indeksi, Z-average ve partikül boyutu değerleri.....	25
Tablo 7. Levodopa ve Benserazid için LCMS/MS ten elde edilen değerler.....	26
Tablo 8. Levodopa geçiş çalışması sonucu hesaplanan derişim, ortalama derişim ve standart sapma değerleri.....	29
Tablo 9. Benserazid geçiş çalışması sonucu hesaplanan derişim, ortalama derişim ve standart sapma değerleri.....	30

Şekiller Dizini

Şekil 1. Dopamin sentezi ve yıkımı	4
Şekil 2. Fazlarına Göre Emülsiyon Tipleri	6
Şekil 3. Farklı HLB Değerlerinde Emülgatör Davranışları	8
Şekil 4. Nazal Boşluk.....	10
Şekil 5. Nazal mukoza hücre yapısı	11
Şekil 6. (1:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı.....	22
Şekil 7. (2:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı.....	23
Şekil 8. (1:1) ve (2:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyonlara ait üçgen faz diyagramının birlikte gösterimi	24
Şekil 9. Levodopa ve benserazid içeren formülasyona ait partikül boyutu grafiği.....	25
Şekil 10. Levodopa'nın LCMS/MS teki tayini	26
Şekil 11. Benserazid'in LCMS/MS teki tayini	27
Şekil 12. Levodopaya ait Kalibrasyon Eğrisi Grafiği	27
Şekil 13. Benserazide ait Kalibrasyon Eğrisi Grafiği	28
Şekil 14. Levodopa ve Benserazid İn-vitro geçiş çalışması sonuçlarının grafiksel birlikte gösterimi	30
Şekil 15. FITC ile İşaretlenmiş Levodopa ve Benserazid ME IVIS Görüntü(40.Dk) ...	31
Şekil 16. FITC ile İşaretlenmiş Levodopa ve Benserazid ME IVIS Görüntü(90.Dk) ...	32

Kısaltma Listesi

PH	: Parkinson Hastalığı
L-Dopa	: Levodopa
YEM	: Yüzey Etkin Madde
HLB	: Hidrofilik Lipofilik Balans
LOD	: Limit of Detection (miktar tayini sınırı)
LOQ	: Limit of Quantitaion (saptama sınırı)

1. Giriş

Klinik özellikleri 1817 yılında James Parkinson tarafından tanımlanmış olan PH; genellikle orta yaşlı insanlarda ortaya çıkan ve kronik ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalığın erken aşamasında mekanik bozuklukları düzeltmek için dopamin agonistleri veya dopaminin ön ilacı Levodopa kullanılır. Vücuda verilmesinden sonra levodopa dopaminerjik nöronların içinde saklanmak üzere dopamine dönüştürülür. Bu depolama kapasitesi levodopanin değişken oral biyoyararlanımı sonucu plazma düzeylerindeki dalgalanmalara bağlıdır. Levodopa'nın periferal degradasyonunu ve plazma dalgalanmalarını azaltmak için carbidopa veya benserazide ile kullanımı yaygındır.

Levodopaya klinik cevap, kısa süreli ve uzun süreli yanıtın kombinasyonu olarak tanımlanabilir. Levodopaya cevap verme süresindeki düşüş, aşamalı nigral dopaminerjik nöronların dejenerasyonuna ve diskinezi sonucu oluşan dopamin tamponlamasındaki kayıba bağlıdır. Hastalığın gelişimine bağlı olarak iyileşme süreci birkaç yıl sürebilir. Genellikle tedavinin ilk yılında dopaminerjik fonksiyondaki hafif düşüşü önlemek için yavaş yavaş doz artırımı gereklidir. Açma-kapama etkisinin görülmesi büyük oranda levodopanin veriliş sıklığına ve dozuna bağlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle modern alanda PH için ilaç geliştirme ve deneysel tedaviler, levodopanin uzun terapötik etki ve yavaş salınımını hedef almaktadır. PH da artan dopaminerjik fonksiyona yönelik ilaçların üretilmesi için oral salınım sistemlerinden tutunda nazal inhalasyona, deri altına enjekte edilebilen ajanlara, intraduodenal ve hatta intravenöz infüzyona kadar farklı dozaj formları geliştirilmiştir. Bunlarla beraber, merkezi sinir sistemine ilaç uygulama, PH için etkili tedaviler geliştirmede bir sorun olmayı sürdürmektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için, ilaçların beyine dağıtımını güçlendirebilecek mikro ve nanosistemlere olan ilgi artmaktadır. Bu sistemler; geleneksel ve yeni ilaçların farmakolojik ve terapötik özelliklerini arttırabilir, onların yan etkilerini azaltabilir. PH bağlamında İlaç Salınım Sistemleri, ya beyne doğrudan uygulanan lokal tedavi olarak yada merkezi sinir sisteminde hedeflenen eylem için sistemik dağıtımda kullanılabilir.

Son yıllarda özellikle Levodopa gibi enzimatik bozunmaya uğrayan ve karaciğer ilk geçiş etkisine maruz kalan ilaçlar için intranazal uygulamalar önem kazanmıştır. Bu

bölgedeki zengin damar ağı ve geçirgen zar yapısı nedeniyle emilimin fazla olmasının yanında sistemik dolaşıma ve santral sinir sistemine ilaç geçişinin mümkün olmasından dolayı intranazal uygulamalara yönelik çalışmalar artmaktadır. Bu uygulamalar ile amaç ilaç etkinliğini en üst düzeye çıkarırken yan etkileri en alt seviyede tutmaktır.



2. Genel Bigiler

2.1. Parkinson Hastalığı

James Parkinson tarafından, Parkinson hastalığının (PH) ilk klinik özellikleri 1817 yılında tanımlanmış ve yayımlanmıştır (Parkinson, 1817). Parkinson çalışmalarında, semptomların ayrıntılı açıklamasını ve aynı zamanda bozukluğun aşamalı olarak ağırlaşmasını ele almıştır. Günümüzde en sık görülen ikinci ilerleyici nörodejeneratif bir hastalık olan PH, nörolojik sakatlığın önde gelen nedenidir. 50 yaş üstü insanların % 1-2 sinde PH görülmektedir. Dünya genelinde cinsiyet ayrımı gözetmeksizin bir dağılım göstermektedir (Shastry, 2001).

PH nın belirtileri bazal ganglionda dopaminin aşırı kaybı ile ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı mekanik bozuklukları düzeltmek için hastalığın erken aşamasında dopamin agonistleri veya dopaminin ön ilacı levodopa kullanılır. Verilmesinden sonra levodopa dopamine dönüştürülür ve dopaminerjik nöronların içinde saklanır. Bu depolama kapasitesi, levodopanin değişken oral biyoyararlanımı sonucu plazma düzeylerindeki dalgalanmalara bağlıdır. Bununla birlikte levodopa hala PH tedavisinde altın standart olarak kabul edilir (Fahn, 2006).

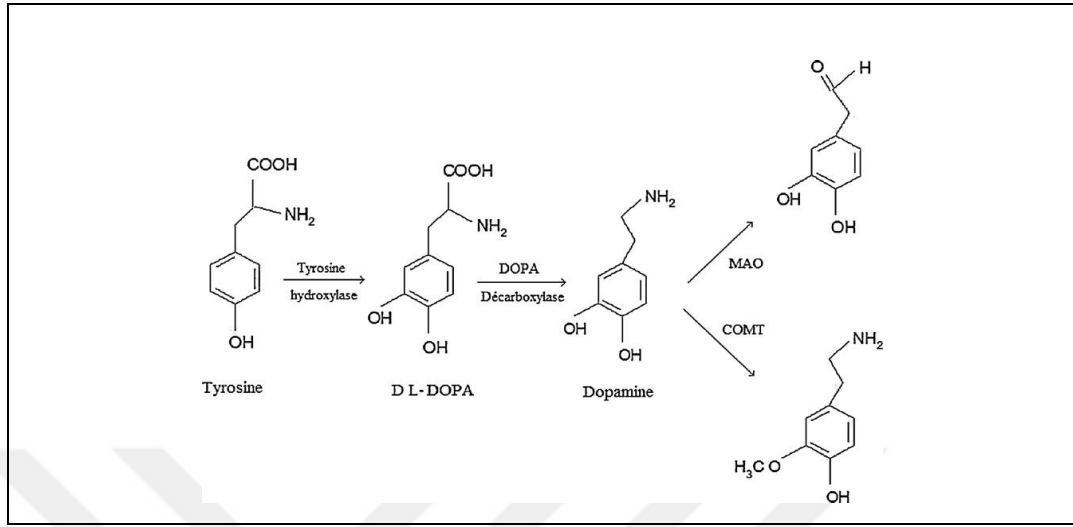
PH tedavisinde; dopamin agonistleri içeren apomorfin, kolinesteraz inhibitörleri içeren donepezil veya D3 dopamin reseptörlerinin inhibitörlerini içeren ropinirole gibi çok sayıda dozaj formu, dikkate değer törepatik etki sağlamaksızın geliştirilmiştir. Fakat bu formlar levodopa içeren formlarla karşılaştırıldığı zaman PH tedavisinde tek aktif ajanın levodopa olduğuna odaklanılmasını sağlamıştır. Son 10 yıldır bu ön ilaç ile ilgili yapılan çalışmaların; uygulanabilirliği, uyumluluğu, güvenilirliği, toleransı, kısa/ uzun süreli etkililiği açısından incelenmesi ve avantajlarının karşılaştırılması açısından faydalı olduğu görülmüştür (Goole, Amighi, 2009).

2.1.1. Dopaminin moleküler metabolizması

Hareketlerin koordinasyonunda önemli rol oynayan dopamin kompleksi beyinin bazal ganglionlarındaki nöronlar tarafından üretilmektedir.

Tirozin hidroksilaz enzimi tarafından amino asit tirozin, L-Dopa'ya dönüştürülür. Bundan sonra L-Dopa aromatik amino asit dekarboksilaz enzimi ile dönüştürülerek

Dopa üretilir. Son olarak üretilen Dopa veziküler monoamin transporter-2 tarafından depolama vezikülleri içine taşınır (Lowlor, During, 2004) (Şekil 1)



Şekil 1. Dopamin sentezi ve yıkımı.

2.1.2. Levodopa ve Parkinson Tedavisi

3-4 dihidroksifeniletilamin türevi bir aromatik amin olan Levodopa (L-Dopa); beyaz veya açık krem renkli, kokusuz, kristalize bir tozdur. Nemli ortamda havadaki oksijenden etkilenerek hızla okside olur ve kararır. Levodopa karboksilik grubun alkil esterlerindeki moleküler değişiklik nedeniyle suda çok çözünürdür. (Şekil 2). Pratik olarak alkol, kloroform ve eterde çözünmez. Karbondioksitten arındırılmış sudaki % 1'lik çözeltisinin pH'sı 4,5 – 7,0 arasındadır (Demircigil, 2010).

Beyinde, sinir hücrelerinin uyarılmasını artıran asetilkolin ile tersi yönde etki gösteren dopamin arasında bir denge vardır. Parkinson hastalığında bu denge dopamin aleyhinde bozulmuştur. Bundan dolayı uygulanan tüm tedaviler ve yapılan araştırmalar dopamin eksikliğini gidermeyi ve bu dengeyi yeniden sağlamayı amaçlar. Fakat oral formdaki dopamin ile yapılan çalışmalar başarısız olmuştur. Çünkü dopamin kan-beyin bariyerini geçemez ve şiddetli periferik yan etkilere yol açar. Bu sorunu aşmak için önce D-Dopa ile çalışmalar yapılmış ancak bu çalışmalardan da bir sonuç elde edilememiştir. Çünkü D-Dopa Dopamine dönüştürülemez ve granülositopeniye (kandaki granülosit yoğunluğunun anormal biçimde düşük olması durumudur) neden olur (Cotzias, Papavasiliou, Gellene, 1969). Ortaya çıkan

hematolojik sorunları önlemek için L-DOPA kullanılmıştır. Doğal bir dopamin öncüsü olan Levodopa kan-beyin bariyerini geçerek beyine ulaşabilir. Burada periferik dekarboksilaz enzimi tarafından dopamine dönüştürülür ve postsinaptik reseptörler üzerine artan bir şekilde salınmak amacıyla veziküllerde saklanır.

2.1.3. Benserazid

Kan-beyin bariyerini geçemeyen Benserazide; periferal etkili aromatik L-aminoasit dekarboksilaz veya ekstraserebral dopa dekarboksilaz inhibitördür.

L-Dopa, beyin dışında kalan dokularda hızlıca Dopamine dönüştürüldüğü için verilen dozun sadece çok az miktarı dopamine dönüşmeden kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Bu nedenle etkili bir sonuç almak için yüksek dozlarda levodopa içeren ilaçların uygulanması gerekmektedir. Hem yüksek doz L-Dopa ya bağlı hem de L-Dopanin dönüşümünden kaynaklı ortaya çıkan Dopamine bağlı olarak genellikle bulantı ve kardiyak aritmiler gibi istenmeyen yan etkiler meydana gelmektedir. Bu sorunu gidermek için L-Dopa'nın genellikle periferal Dopa dekarboksilaz inhibitörleri olan benserazid yada karbidopa ile kombinasyonları kullanılmaktadır.

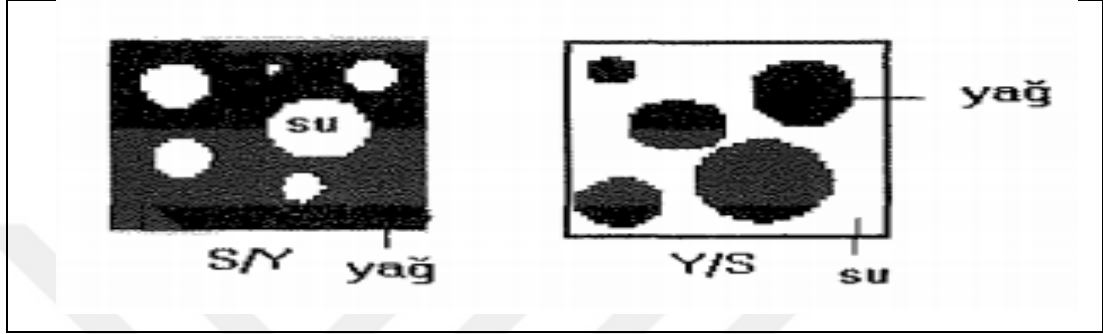
Yapılan çalışmalarda L-Dopa'nın ekstraserebral dopa dekarboksilaz inhibitörleri ile birlikte uygulanması; izin verilen dopamin dönüşümünü engelleyerek etken maddenin plazma eliminasyon yarılanma ömrünü 60 dakikadan 90 dakikaya çıkardığı ve gerekli levodopa dozunun dört kat azaltıldığını göstermiştir (Pinder, Brogden, Sawyer, Speight, Avery, 1976)

2.2. Emülsiyonlar

Birbiri içinde dağılmış iki sıvının oluşturduğu homojen görünümlü heterojen sistemlere emülsiyon denmektedir. Emülsiyonlar termodinamik olarak dayanıklı değildir. Emülsiyonlarda dağılmış damlacıkları içeren kısım karışımın iç fazını, diğeri ise dış fazını (sürekli faz) oluşturur. Kararlı bir emülsiyon oluşturmak için; yağ fazı, su fazı ve emülgatör olmak üzere başlıca üç maddeye gereksinim vardır. Emülsiyonlarda lipofilik kısmı su fazı oluştururken yağ fazı hidrofilik kısmı

oluşturur. Hem hidrofilik hemde hidrofobik kısımları içeren moleküllere ise emülgatör denir.

Fazlarına göre emülsiyonlar yağ/su (Y/S) veya su/yağ (S/Y) olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Yağ damlacıklarının su fazında olduğu emülsiyonlar Y/S, su damlacıklarının yağ fazı içinde olduğu emülsiyonlar ise S/Y şeklinde ifade edilir (Şekil 2).



Şekil 2- Fazlarına Göre Emülsiyon Tipleri

Emülgatör seçimi emülsiyonun tipini belirleyen en önemli etmendir. Eğer suda çözünen bir yüzey etkin madde kullanılırsa Y/S, yağda çözünen kullanılırsa S/Y emülsiyonları elde edilir.

2.2.1. Emülgatörler

Ara yüzey gerilimini düşüren yüzey etkin maddeler (YEM); ara yüzeyde adsorbe olurlar ve damlaların koalesansında bariyer görevi yaparak emülsiyon oluşumunu sağlarlar.

YEM'ler ara yüzeyde oluşturdukları filmin tipi, kimyasal yapıları ve iyonik yükleri gibi farklı özelliklerine göre sınıflandırılabilir (Çelebi,2007; Üstündağ,2008).

YEM'lerin oluşturdukları film tipine göre sınıflandırılması

- Monomoleküler film oluşturanlar
- Multimoleküler film oluşturanlar (Hidrofilik Kolloidler)
- Katı partikül film oluşturanlar (Kolloidal killer, Bentonit, Veegum)

YEM'lerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması

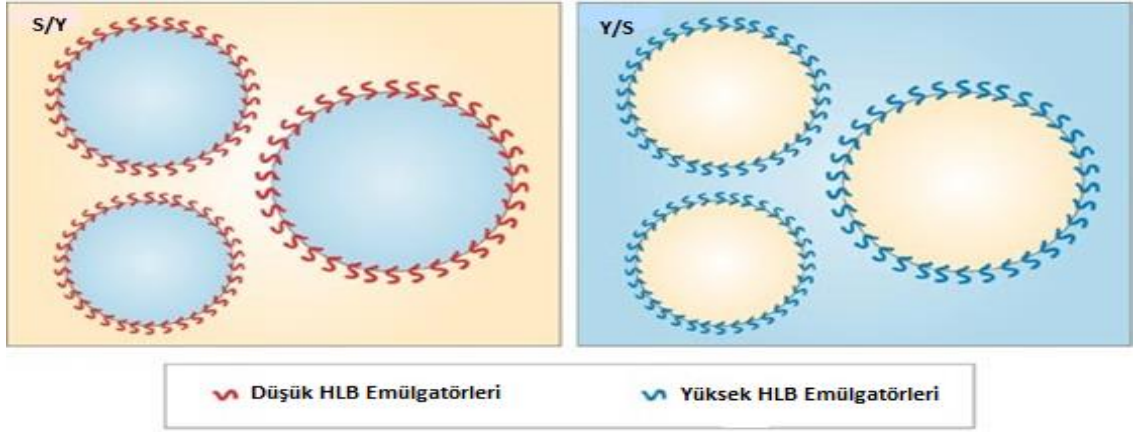
- Sentetik YEM'ler
- Yarı sentetik maddeler (Yağ asitlerinin tuzları, Yağ asitlerinin mono- ve di-gliseritleri...)
- Doğal maddeler (Arap zambkı, jelatin, lesitin, agar, kolestrol vb...)

YEM'lerin iyonik yapılarına göre sınıflandırılması

- Anyonik yüzey etkin maddeler (Laurik ve oleik asidin potasyum, sodyum veya amonyum tuzları, sülfatlar, sulfonatlar...)
- Katyonik yüzey etkin maddeler (Kuatemer amonyum bileşikleri, Setiltrimetilamonyum bromür)
- Noniyonik yüzey etkin maddeler (Sorbitan yağ asidi esterleri, polioksietilen ve polioksipropilen kopolimerleri)

2.2.2. Hidrofilik Lipofilik Balans (HLB) Değeri

Emülgatör seçiminde en çok tercih edilen Hidrofilik Lipofilik Denge (HLB – Hydrophilic Lipophilic Balance) 1949 yılında Griffin tarafından önerilmiştir. HLB değeri hidrofilik grubun mol yüzdesinin beşe bölünmesi ile elde edilir. Bu sistemde emülgatörler hidrofilik ve lipofilik eğilimlerini göstermek için 0-20 arasında derecelendirilir. HLB değeri 20 ye yaklaştıkça hidrofilik özellik artar. Emülgatörler düşük HLB değerlerinde (<6) daha çok yağ fazında çözünerek dayanıklı S/Y emülsiyonu oluştururken; yüksek HLB değerlerindeki (>8) emülgatörler ise dayanıklı Y/S emülsiyonları oluşturmaktadırlar. (Şekil 3)



Şekil 3: Farklı HLB Değerlerinde Emülgatör Davranışları

2.2.3. Mikroemülsiyonlar

Damlacık çapının (10-100 nm) küçük olmasından dolayı homojen bir görünüme sahip olan mikroemülsiyonlar; kendiliğinden oluşan, termodinamik açıdan kararlı sistemlerdir ve su ile yağ arasında çok geniş bir ara yüzeye sahiplerdir.

Yağ ile su fazı arasındaki ara yüzey geriliminin sıfır olmasından dolayı birim yüzeye yüksek miktarda yüzey etken madde kullanımı ile bu sistemler kendiliğinden oluşabilmektedirler (Armağan, 2006; Türkyılmaz, 1998)

Y/S, S/Y ve geçişli (bicontinuous) olmak üzere mikroemülsiyonlar üç tipte olabilirler. S/Y veya Y/S tipindeki mikroemülsiyonlarda, damlacıklar ko-sürfaktan ve sürfaktan moleküllerinden oluşan bir film ile çevrilmiştir. Dış fazın su olduğu Y/S tipi mikroemülsiyonlarda, amfifil moleküllerin hidrofobik kısımları yağ damlacığının içine yönelmiş, hidrofilik kısımları ise dış faza yönelmiş olarak bulunmaktadır. S/Y mikroemülsiyon sisteminde ise, amfifilik molekülün hidrofobik kısmı dış faza, hidrofilik kısmı ise su damlacığının içine yönelmiş durumdadır. Bu tip mikroemülsiyonlara ters miseller de denilmektedir. Su ve yağ oranının yüksek olduğu durumlarda ise farklı bir yapı olan geçişli (bicontinuous) mikroemülsiyonlar oluşmaktadır. Bu model, çok köşeli poligonları içermekte olup, yağ ve su fazları amfifilce zengin bir tabaka ile ayrılmış durumdadır. (Çelebi,2007)

2.3. Nazal Yol İle İlaç Uygulama

İlaç uygulama yöntemlerinden biri olan intranazal ilaç uygulamaya olan ilgi son 15 yıldır giderek artmaktadır. Nazal mukoza epitel hücrelerin sahip olduğu mikrovilliler sayesinde oldukça geniş bir absorpsiyon alanına sahiptir. Aynı zamanda poröz ve ince membran yapısına sahip olması, yaygın damar ağının bulunması ve kan akışının hızlı olmasından dolayı etkin absorpsiyon sağlaması ilginin artmasında etkili olmaktadır (Ehrhardt, Kim, 2008, Özsoy, 2007).

Günümüzde düşük molekül ağırlığındaki etken maddelerin nazal uygulanan formülasyonları mevcut iken yüksek molekül ağırlığına sahip (peptitler, proteinler vb) çeşitli terapötik bileşiklerin özellikle penetrasyon arttırıcıların varlığında intranazal olarak organizmaya verilmesi yaygın olarak araştırılmaktadır (Constantino, Illum, Brandt, Johnson, Quay, 2007).

2.3.1. Nazal Yolun Yapısı ve Özellikleri

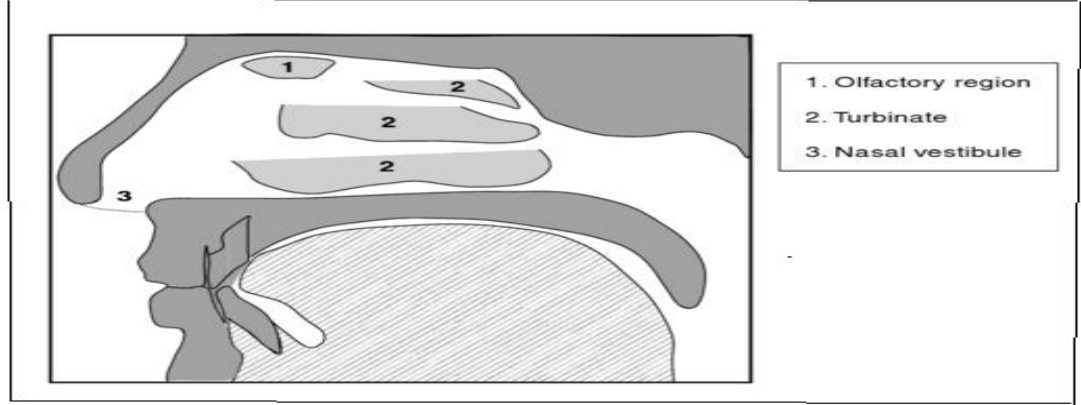
2.3.1.1. Nazal Anatomi ve Fizyoloji

İnsan burnu, septal duvar tarafından ayrılmış iki nazal boşluktan oluşmaktadır. Her burun boşluğu burun deliğinden yüze açılır ve arkaya doğru yaklaşık 10 cm uzunluğundaki nazofarinkse uzanır. Her iki boşluğun toplam yüzey alanı yaklaşık 150 cm² ve hacmi yaklaşık 15 ml'dir. Yüzeyi sahte katmanlı epitel ve uzun kıllarla kaplı olan vestibüler bölge filtre sistemi olarak görev yapar ve hava ile taşınan parçacıkların filtrelenmesini sağlar.

Burnun arka bölgesinde alt, orta ve üst konkalar bulunur (Şekil 4). Burun kan damarları ile birlikte solunan havanın nemlilik ve sıcaklık düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ağız yoluyla solunum yaparak yaşam sürdürülebilir ancak koşullandırılmamış hava akışı hem tatsızdır hem de potansiyel olarak zararlıdır. Burun yoluyla yapılan bir solunumda, oda sıcaklığında (23 °C) %40 nemli olan hava 32 °C %98 neme ayarlanarak akciğerler için uygun duruma getirilir.

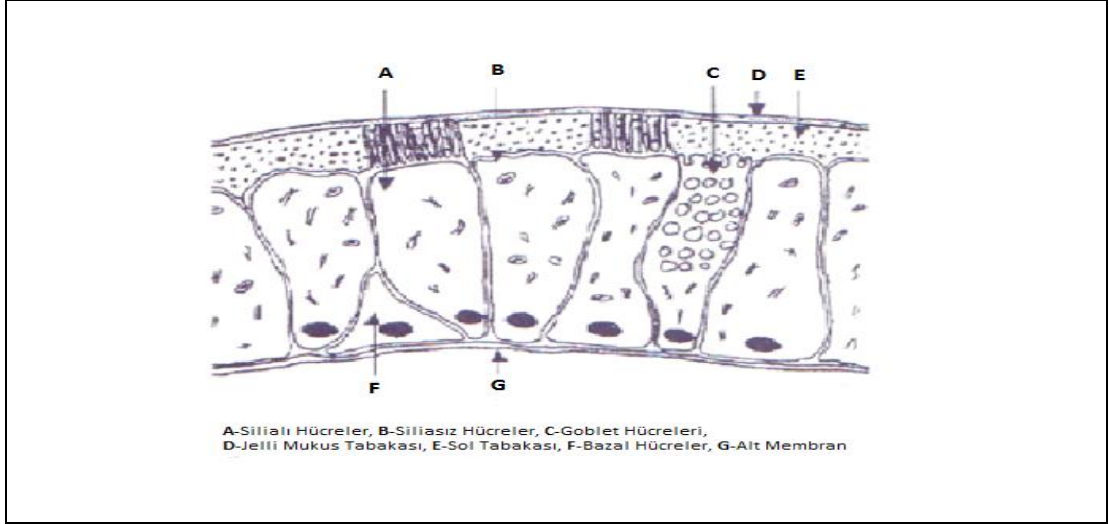
Koklama bölgesi (olfaktör bölge) burnun arkasında, burun boşluğunun üst kısmına yakın bulunur ve kokunun belirlenmesinden sorumlu olan bölgedir. 200-400 mm² yüzey alanına sahiptir (Vaddi, Khan, Reddy, 2007). Merkezi sinir sistemine

doğrudan geçişin, koku alma bölgesine direkt olarak uygulanabilen formülasyonlar tarafından sağlandığı ileri sürülmüştür. Bu durum Parkinson hastalığı gibi durumlar için veya morfin gibi merkezi etkili analjeziklerin uygulanması için ilgi çekicidir. Bu sayede direkt olarak merkezi sinir sistemine daha düşük dozlarda ilaç verilmesi ve yüksek yan etki eğiliminin azaltılması mümkün olacaktır (McInnes, Thapa, Stevens, 2008).



Şekil 4: Nazal Boşluk

Nazal mukozasının büyük bir bölümünü ideal absorpsiyon için geniş yüzey alanı sağlayan silialı hücreler (mikrovilluslarla kaplı) oluşturmaktadır. Silialı hücrelerin yanında siliasız hücreler, goblet ve bazal hücreler de mevcuttur. Mukozadan ve submukozal bezlerden gelen salgılar, mukozayı kaplayan nazal mukus tabakasını oluşturur. Bu tabaka yabancı parçacıkları yakalamak ve burundan uzaklaştırmak için işlev görür (McInnes, Thapa, Stevens, 2008).



Şekil 5: Nazal mukoza hücre yapısı

2.3.2. Nazal Absorbsiyon Mekanizması

İlaçlar sistemik etki göstermek için önce nazal mukus tabakasından sonra da epitel tabakadan geçmek zorundadırlar. İlaçlar, transselüler, parasellüler ve transsitoz olmak üzere üç yolla burun epiteline nüfuz ederler. Hücresel geçiş, hücre membranı boyunca gerçekleşirken, parasellüler emilim hücreler arasındaki sıkı kavşaklardan (tight junctions) gerçekleşir. Lipofilik moleküller transselüler yol ile absorbe edilirken, küçük polar moleküller öncelikle parasellüler yol ile absorbe edilirler. 1 kd'den küçük moleküllerin geçişini sağlayan hücre bağlantılarındaki gözenek çapı yaklaşık 1 nm'dir. Transselüler geçiş, konsantrasyon gradienti ile kolaylaştırılmıştır. Lipofilik moleküller burun mukozasından yüksek oranda geçirgenlik gösterirler ve nazal olarak verildikten sonraki farmakokinetik profilleri ile intravenöz uygulamadan sonraki profilleri karşılaştırılabilir. Polar moleküllerin absorpsiyonları düşüktür. Çünkü hücreler arasındaki gözenek alanı, emilim için mevcut toplam yüzey alanının yalnızca bir bölümünü oluşturur. Protein ve peptit gibi moleküllerin molekül büyüklüğü ve hidrofiliğinden dolayı genellikle parasellüler yoldan absorbe edilirler. Ancak gözenek çapından daha büyük molekül boyutuna sahip proteinler ve peptitler burun epiteline nüfuz edemez. Üçüncü geçiş yolu transsitozdur. Burada, partikül bir vezikül içine alınır ve hücreye nakledilir (Vaddi, Khan, Reddy, 2007).

2.3.2.1. Nazal Yoldan İlaç Absorpsiyonunu Etkileyen Faktörler

Nazal ilaç emilimini etkileyen faktörler; burun fizyolojisi, ilacın fizikokimyasal özellikleri ve formülasyona ait özellikler olarak üç başlık altında toplanabilir. Burundan verilen ilacın biyoyararlanımı; emilimin gerçekleştiği yüzey alanı, ilaç ve emilim bölgesi arasındaki temas süresi, ilacın metabolizması ve emici dokunun patolojisi de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir (Ehrhardt, Kim, 2008).

1. Fizyolojik Faktörler :

Patolojik koşullar; alerjik rinit, polip ve soğuk algınlığı gibi patolojik koşullar ve mukosilyer klirensi etkileyen nem, sıcaklık ve kirlilik gibi çevresel faktörler (Gupta, Patel, Ahsan, 2015).

Mukosilyer Klirens ve Temas Süresi; Burun epitelinden ilaç emiliminin gerçekleşmesi için dozaj formlarının, ilacın burun mukozasını geçmesine izin verecek kadar yeterli bir süre absorpsiyon bölgesinde kalmaları gerekmektedir. Genellikle, ilacın emici dokularla temas halinde bulunduğu süre, mukozayı geçen ilaç miktarını etkiler (Ehrhardt, Kim, 2008). Sağlıklı insanlardaki mukosilyer klirens hızı yaklaşık 5 mm / dak olarak kabul edilir. Mukosilyer klirens hızının artması nazal absorpsiyonu azaltmaktadır. Formülasyonun viskozitesi artırılarak, biyoadeziv polimer esaslı formülasyonlar veya mikrosferler kullanılarak ilaçların absorpsiyon bölgesinde kalış süresi uzatılabilir.

Enzimler; Nazal olarak verilen peptit veya protein ilaçlarının burun boşluğu/epitel hücrelerinde bulunan peptidazlara bağlı olarak düşük biyolojik yararlanım ile sonuçlandığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, peptit/protein ilaçlarının enzimatik bozunması, gastrointestinal sistemde gerçekleşen bozunmadan genellikle daha küçüktür (Ehrhardt, Kim, 2008; Gupta, Patel, Ahsan, 2015).

2. İlacın Fizikokimyasal Özellikleri:

Nazal olarak verilen ilaçların fizikokimyasal özellikleri nazal emilimi etkileyebilir. Bunlar; ilacın molekül ağırlığı (moleküler ağırlığı 1,000 Da' dan büyük olan bileşikler için nazal absorpsiyon çok düşüktür), çözünürlüğü, çözünme oranı, yükü, partiyon katsayısı, pKa değeri, parçacık boyutu, polimorfizmi, hidrofiliği veya lipofiliği olarak sıralanabilir (Ehrhardt, Kim, 2008).

3. Formülasyon Etkisi:

İlaçların nazal absorpsiyonunda başarı elde etmek için formülasyon ile ilgili dikkate alınması gereken faktörler; ilacın konsantrasyonu, uygulama hacmi ve dozu, pH, viskozite ve ilacın çözündüğü solüsyonun osmolaritesidir. Genel olarak kullanılan yardımcı maddelerde (koruyucular ve emilim arttırıcılar gibi) biyoyararlanımı etkilemektedir. Buna ek olarak, dozaj formları (örneğin damlalar, sprey veya toz formlar), uygulama teknikleri de (örn., inhalasyon, mekanik destekli veya diğerleri) emilim seviyesini etkiler (Gupta, Patel, Ahsan, 2015).



3. Gereç Ve Yöntem

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Manyetik Karıştırıcı.....	IKA RO15
Hassas Terazî.....	Radwag
pH metre.....	Mettler Toledo
İletkenlik Ölçüm Cihazı.....	Mettler Toledo
Refraktometre.....	ATAGO
Viskozimetre.....	Brookfield
Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı.....	Malvern Mastersizer Hydro MV
IVIS Spektrum.....	
Transdermal Diffusion Cell Drive Console.....	LOGAN
LCMS/MS.....	Shimadzu-8040
C-18 (2.1*50mm 3.5µm) Kolon.....	Agilent

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Yardımcı Maddeler:

Tween 80.....	Sigma - Aldrich
Propylenglycol.....	Sigma - Aldrich
Ethylolate	Sigma – Aldrich
Levodopa	Sigma
Benserazid	Sigma
Hidroklorik Asit (0,25M).....	
Metanol.....	Merck
Serum Fizyolojik.....	Polifarma

3.3. Yöntem ve Deneyler

3.3.1. Levodopa ve Benserazidin LCMS/MS'e İnfüsyonu ve Standart Eğri Çizimi

Shimadzu marka LCMS/MS cihazı ile kolon olarak Agilent marka C18 kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak Methanol:%0.5 lik Fosforik asit (v:v) (3:7) çözeltisi hazırlanarak ultrasonik banyoda degaze edilip sisteme verilmiştir. Salım hızı 0.3 mL/dakika, enjeksiyon miktarı 10 µL dir.

İlk olarak levodopa ve benserazidin 500 ng/ml lik standartları hazırlanarak LCMS/MS e tanımlama işlemi olan infüzyon işlemi yapıldı. Yapılan işlem sonucunda levodopa ve benserazidin ana iyonu ve parçalanma iyonları ile optimum cihaz ayarları elde edildi.

Levodopa standart eğrisi için; 500 µl/ml lik ana stok çözeltilerinden seyreltme işlemi yapılarak sırasıyla 0.1; 0.5; 1; 5; 10; 25 ve 50 µl/ml lik konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Benserazid' in standart eğrisi için 500 µl/ml lik ana stok çözeltilerinden seyreltme işlemi yapılarak sırasıyla 0.5; 1; 2.5; 5; 10 ve 25 µl/ml lik konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Cihaza verilen standartların verdikleri alanlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi. Çizilen eğrinin denklemi ve r² değeri hesaplandı.

3.3.1.1. LOD ve LOQ Hesaplama

LOD (Limit of detection): Gözlenebilme sınırıdır. Zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilen fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit derişimidir.

LOD = ((Gürültü x En küçük derişim) / Sinyal) x 3 yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

LOQ (Limit of quantification): Tayin sınırıdır Uygun doğruluk ve kesinlikte miktarı saptanabilen en küçük derişimdir.

LOQ = ((Gürültü x En küçük derişim) / Sinyal) x 10 yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır

3.3.2. Formülasyon Çalışmaları

3.3.2.1. Mikroemülsiyon Formülasyon Çalışmaları

3.3.2.1.1. Formülasyonda Kullanılacak Maddelerin Seçimi

Mikroemülsiyon formülasyonunda yağ fazı olarak etil oleat; surfaktan olarak Tween 80; ko-surfaktan olarak propilen glikol; su fazı olarak distile su kullanıldı.

3.3.2.1.2. Mikroemülsiyon Formülasyonunu Belirlemek için Yapılan Çalışmalar

Formülasyon geliştirme çalışmalarında; farklı oranlarda surfaktan/ko-surfaktan kullanılarak ideal formülasyon bulunmaya çalışılmıştır. Çalışılan Surfaktan/ko-surfaktan (a/a) oranları (1:1) ve (2:1) dir. Surfaktan/ko-surfaktan ve yağ karışımı beher içinde, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımı ile 400 rpm hızda karıştırılırken, formülasyonlar bulanma noktasına kadar distile su ile titre edilmiştir. Bulanma noktasındaki su sarfiyatı kaydedilmiştir. Yapılan formülasyonlar aşağıdaki Tablo 1 ve Tablo 2 de gösterilmiştir.

Tablo 1: Surfaktan/ko-surfaktan oranı (a/a) (2:1) olan formülasyon geliştirme verileri

2:1 S/Co-S						
Toplam Ağırlık	Yağ Miktarı (gr)	Yağ %	S/Co-S Miktarı(gr)	S/Co-S %	Su Sarfiyatı (gr)	Su %
13,17	2	15,186	8	60,744	3,17	24,070
11,846	3	25,325	7	59,092	1,846	15,583
10,81	4	37,003	6	55,504	0,81	7,493
10,716	5	46,659	5	46,659	0,716	6,682
10,615	6	56,524	4	37,683	0,615	5,794
10,523	7	66,521	3	28,509	0,523	4,970
10,371	8	77,138	2	19,285	0,371	3,577

Tablo 2: Sürfaktan/ko-sürfaktan oranı (a/a) (1:1) olan formülasyon geliştirme verileri

1:1 S/Co-S						
Toplam Ağırlık	Yağ Miktarı (gr)	Yağ %	S/Co-S Miktarı(gr)	S/Co-S %	Su Sarfıyatı (gr)	Su %
11,159	2	17,923	8	71,691	1,159	10,386
10,525	3	28,504	7	66,508	0,525	4,988
10,310	4	38,797	6	58,196	0,310	3,007
10,302	5	48,534	5	48,534	0,302	2,931
10,288	6	58,320	4	38,880	0,288	2,799
10,218	7	68,507	3	29,360	0,218	2,133
10,180	8	78,585	2	19,646	0,180	1,768

3.3.2.1.3. Üçgen Faz Diyagramının Çizimi

Formülasyon geliştirme çalışmalarında elde edilen veriler, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde geliştirilen bir bilgisayar programına (Ege, Karasulu, Güneri, 2004) yüklenerek her bir S/Co-S oranı için üçgen faz diyagramları çizilmiştir. En yüksek mikroemülsiyon alanını veren surfaktan/ko-surfaktan (2:1) oranı ideal oran olarak kabul edildi. Faz diyagramında belirlenen mikroemülsiyon oluşum bölgesinin ağırlık merkezi kullanılarak optimum mikroemülsiyon formülasyonu hesaplanarak geliştirildi.

3.3.2.1.4. Levodopa ve Benserazide ile Formülasyon Çalışmaları

Üçgen faz diyagramında en büyük alanı veren ve alanın ağırlık merkezinden hesaplanan optimum formülasyona 5 mg Levodopa ve 1.25 mg benserazide eklendi. Toz haldeki etken madde mikroemülsiyonda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözülerek berrak bir mikroemülsiyon oluşturuldu. Hazırlanan formülasyonlar fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesinde ve in-vitro geçiş çalışmalarında kullanıldı.

3.3.3. Mikroemülsiyonun Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Hazırlanan mikroemülsiyonun fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için; mikroemülsiyonun fiziksel görüntüsü, pH'sı, yoğunluğu, refraktif indeksi, viskozitesi, iletkenlik ve partikül boyutu çalışmaları yapılmıştır. Tüm parametreler için üç paralel olacak şekilde ölçüm yapılmıştır.

3.3.3.1. Fiziksel Görünüm

Yeni hazırlanmış bir mikroemülsiyonun fiziksel görünümü oda sıcaklığında (25 ± 2 °C) göz ile incelenmiştir. Formülasyonda berrak homojen bir görünüm elde edilmiştir.

3.3.3.2. pH Ölçümü

pH ölçümleri Mettler Toledo seven multi marka pH metre cihazı ile yapılmıştır. pH sı 4.00, 7.00 ve 9.21 olan standart tampon solüsyonlar kullanılarak cihazın doğruluğu kontrol edildikten sonra oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonun pH sı üç paralel olacak şekilde ölçülmüştür. Elde edilen değer Tablo 5' te gösterilmiştir.

3.3.3.3. Refraktif İndeks Ölçümü

Refraktif indeks ölçümleri Atago RX 7000CX marka refraktometre cihazı ile yapılmıştır. Refraktif indeksi 1.35171 olan refraktometre kalibrasyon standardı kullanılarak cihazın doğruluğu kontrol edildikten sonra oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonun refraktif indeksi üç paralel olacak şekilde ölçülmüştür. Damlacık boyutu tayininde bu değerden yararlanılmıştır. Elde edilen değer Tablo 5' te gösterilmiştir.

3.3.3.4. Yoğunluk Ölçümü

Dansisite ölçümleri için ilk olarak Isolab marka 5 ml'lik kalibre bir balon jojenin hassas terazi yardımı ile darası alınmıştır. Darası alınıp sıfırlanan balonjoje içerisine hazırlanan formülasyondan 5 ml olacak şekilde tartılmış ve ağırlık kaydedilmiştir.

$d=m/V$ dansisite formülü kullanılarak hesaplama yapılmıştır. Elde edilen değer Tablo 5' te gösterilmiştir.

3.3.3.5. Viskozite Ölçümü

Brookfield DV-II+Pro marka viskozimetre kullanılarak mikroemülsiyonların viskozitesi üç paralel olacak şekilde ölçülmüştür. Elde edilen değer Tablo 5' te gösterilmiştir.

3.3.3.6. Elektrik İletkenliği Ölçümü

Elektrik iletkenliği ölçümleri Mettler Toledo Seven Multi marka iletkenlik ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Elektrik iletkenliği 1413 μ S/cm olan iletkenlik standardı kullanılarak cihazın doğruluğu kontrol edildikten sonra oda sıcaklığında hazırlanan formülasyonun Elektrik iletkenliği üç paralel olacak şekilde ölçülmüştür. Elde edilen değer Tablo 5' te gösterilmiştir.

3.3.3.7. Partikül Boyutunun Saptanması

Mikroemülsiyonun partikül boyutu oda sıcaklığında Malvern Zeta Sizer kullanılarak altı paralel olacak şekilde ölçülmüştür.

3.3.3.8. Etkin Madde Miktarının Tayini

Üçgen faz diyagramında belirlenmiş olan miktarlardaki (2:1) surfaktan/ko-surfaktan, yağ ve su oda sıcaklığında beher içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak optimum formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyon içerisine 5 mg Levodopa ve 1.25 mg Benserazid ilave edilerek çözündürülmüştür. Etkin madde içeren formülasyondan 1 ml alınarak üzerine 1 ml metanol eklenmiştir. Karışım 5 dakika karıştırma işleminden sonra 4000 rpm de 5 dakika santrifüj

edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan iki fazdan metanollü olan fazdan alınan örnek 10 kat seyreltilmiştir. 7.5, 12.5, 25 ve 50 µg/ml derişimindeki standartlar ile birlikte örnek cihaza verilmiştir.

3.3.4. İn-Vitro Geçiş Çalışması

Levodopa ve benserazise içeren mikroemülsiyonların Logan marka Transdermal Diffusion Cell Drive Console cihazı kullanılarak sentetik membrandan geçiş çalışmaları yapılmıştır. İki hücreli sitemlerden alt hücreye 5 ml serum fizyolojik, üstteki hücreye ise 0.5 ml mikroemülsiyondan eklenmiştir. Membran bir gece boyunca serum fizyolojikte bekletildi. Membranın iç kısmı örnek ile temas edecek şekilde iki hücre arasına yerleştirildi. Sistemin sıcaklığı 37°C ±1 ye ayarlandı. Örnekleme zamanı, nazal mukosilyer klirens hızı (5-20 dk) dikkate alınarak maksimum olabilecek geçişi görmek için 30 dakika olarak belirlendi ve 0. dakika, 30. dakika, 60. Dakika, 90. Dakika, 120. Dakika, 180. Dakika, 360. Dakikada ve 480. dakika sonunda örnekleme yapıldı. Geçiş çalışmasının tüm aşamalarında magnetik bar ile örneklemenin yapıldığı hücrede düzenli bir karıştırma gerçekleştirildi. Aynı anda hazırlanmış dört paralel örnek ile çalışma yapıldı. Alınan örnekler etken madde miktarı tayini için Shimadzu LCMS/MS cihazına verildi. Cihazdan elde edilen değerler kalibrasyon eğrisinde yerine konularak mikroemülsiyondan difüze olan etken madde miktarı tayin edildi.

3.3.5. İn-Vivo Görüntüleme

İn-vivo görüntüleme çalışmaları Ege Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik kurulunun 17.07.2014 tarih ve 2014-056 sayılı onayı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Benserazide' in, levodopanin istenilen bölgeye geçişindeki etkisini görebilmek için bu çalışmada iki farklı formülasyon hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlardan biri 5 mg levodopa ve 1.25 mg benserazide içerirken diğeri sadece 5 mg levodopa içermektedir. Hazırlanan örneklerden 2'şer ml alınarak içerisine 2 mg işaretleme ajanı olan FTIC eklendi. FTIC eklenen formülasyonlar karanlık ortamda 12 saat manyetik karıştırıcı yardımıyla karışmaya bırakıldı. Hazırlanan bu iki formülasyon iki farklı sığana intranazal olarak uygulanmıştır.

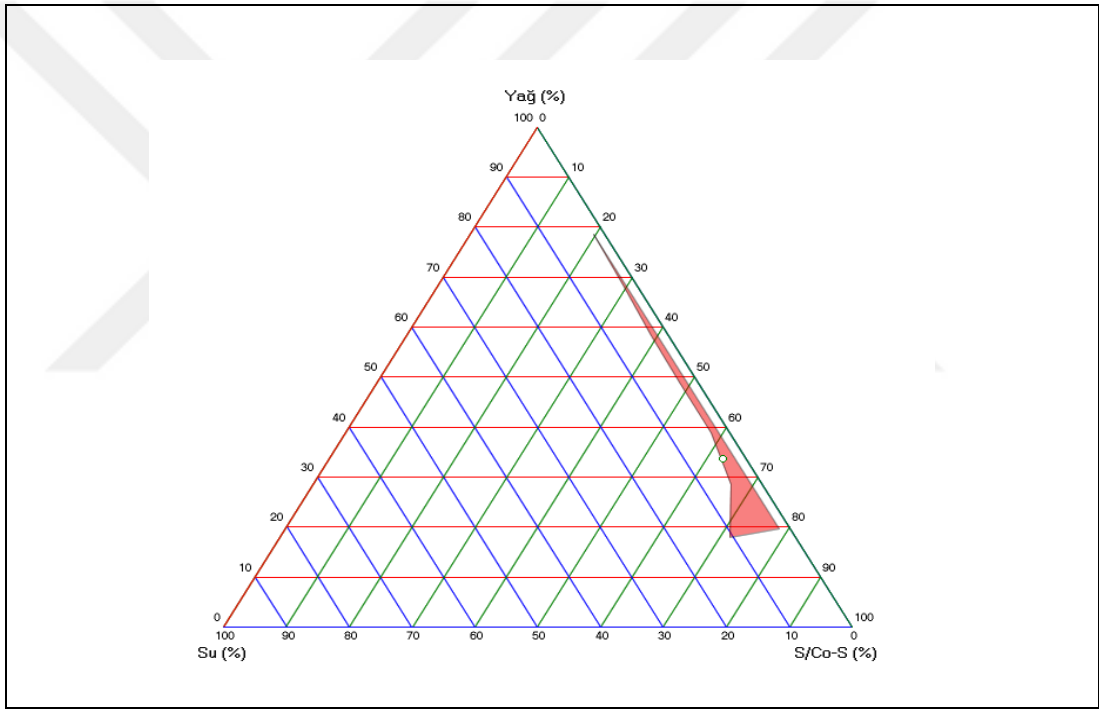
Uygulamadan sonra 40; 90; 180; 240 ve 300. Dakikalarda sıçanlar isofloran ile bayıltılarak IVIS Spektrumda görüntülemeleri yapılmıştır.



4. Bulgular

4.1. Formülasyon Çalışmalarının Sonuçları

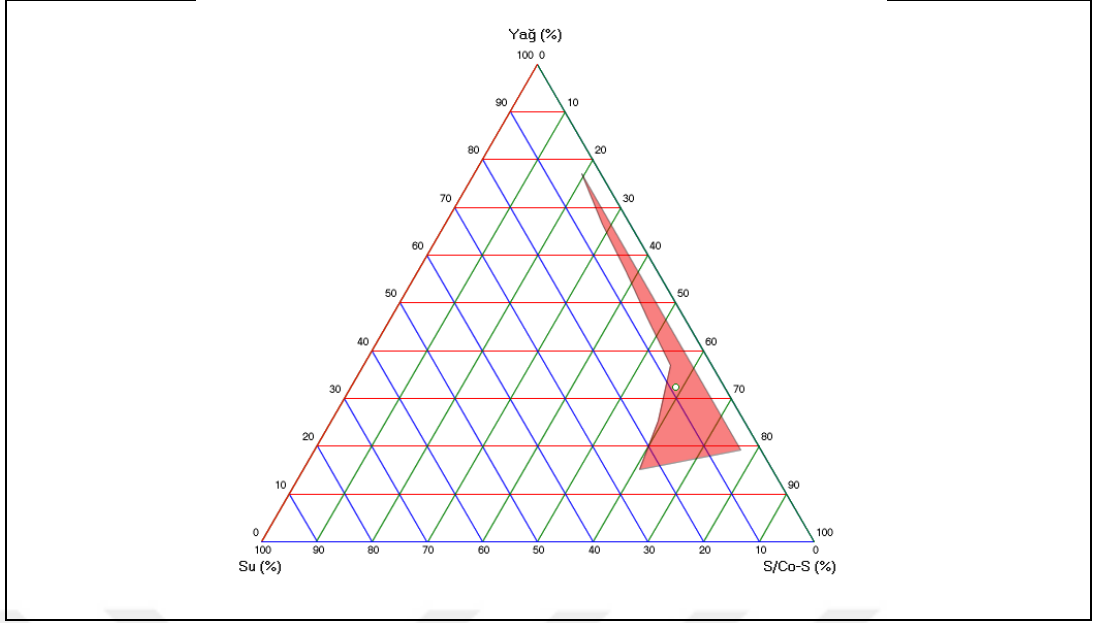
1:1 ve 2:1 surfaktan/kosurfaktan oranlarında hazırlanan formülasyonlardan elde edilen değerler ile üçgen faz diyagramı çizilmiştir. Formülasyonlara ait diyagramlar Şekil 6 ve Şekil 7 de gösterilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3 ve Tablo 4 te belirtilmiştir. Elde edilen üçgen faz diyagramlarında da görüldüğü üzere en yüksek mikroemülsiyon bölgesini surfaktan/kosurfaktanın 2:1 oranında olduğu formülasyon vermiştir. Ağırlık merkezi beyaz yuvarlak şeklinde gösterilmiştir.



Şekil 6: (1:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı

Tablo 3: (1:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı sonuçları

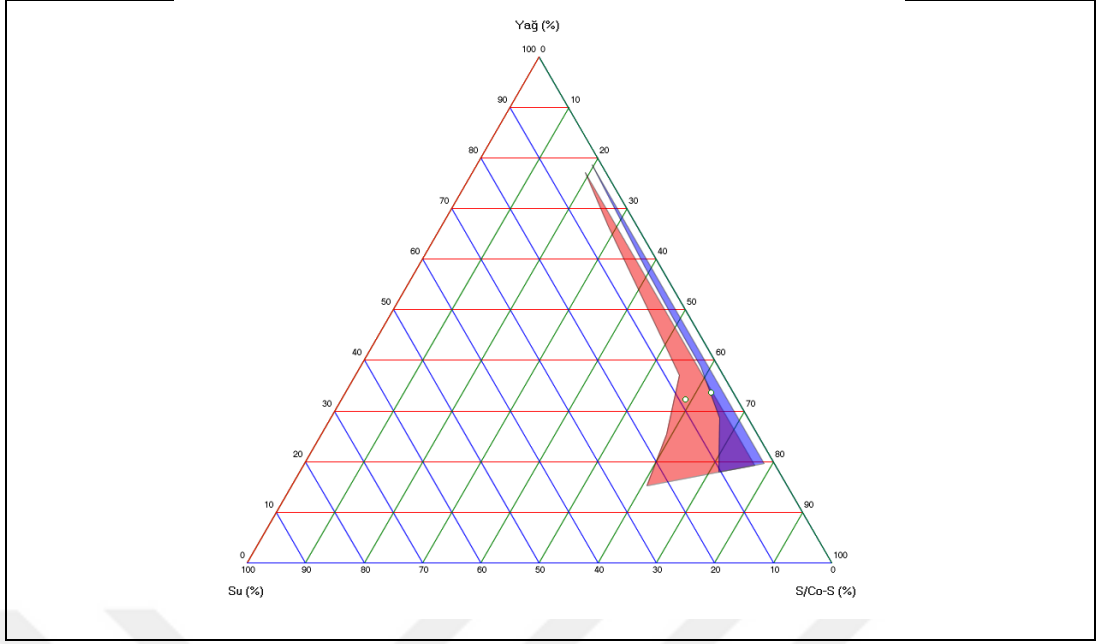
Grup	Oil	Sur	Water	X	Y	Area
2.00	33.61	62.62	3.78	0.79	0.29	94.86



Şekil 7: 2:1 oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı

Tablo 4: (2:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyona ait üçgen faz diyagramı sonuçları

Grup	Oil	Sur	Water	X	Y	Area
1.00	32.37	58.74	8.88	0.75	0.28	260.93



Şekil 8: (1:1) ve (2:1) oranında surfaktan/kosurfaktandan hazırlanan formülasyonlara ait üçgen faz diyagramının birlikte gösterimi

4.2. Mikroemülsiyonun Fizikokimyasal Test Sonuçları

3.3.3' te anlatıldığı üzere yapılan fizikokimyasal çalışmalar sonucunda hazırlanan formülasyonun pH' sı 5.78, yoğunluğu 1.0058, viskozitesi 1730.0, rekraktif indeksi 1.4498, elektrik iletkenliği ise 16.02 olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 5: Mikroemülsiyonun fizikokimyasal çalışma sonuçları

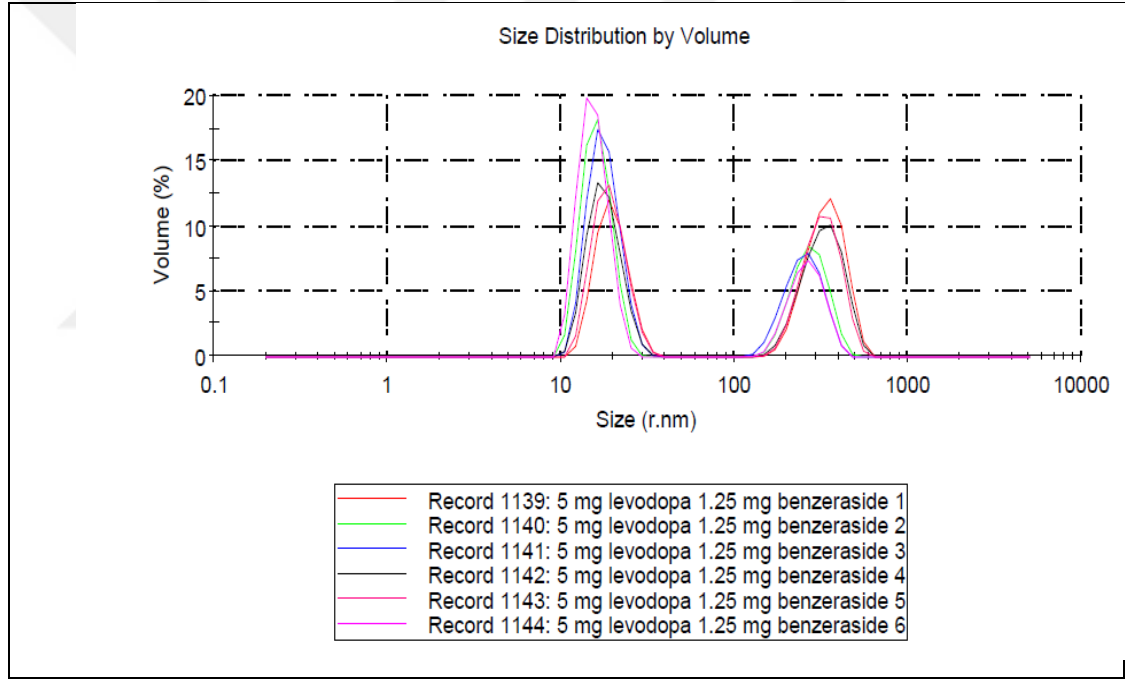
Görünüm	pH	Yoğunluk(g/ml)	Viskosite(cP)	Refraktif İndeks	Elektrik İletkenliği (µs/cm)
Berrak	5.78	1.0058	1730.0	1.4498	16.02

4.2.1 Mikroemülsiyonun Partikül Boyutu Ölçüm Sonuçları

Ölçümü yapılan mikroemülsiyona ait damlacık boyutu, polidispersite indeks, zeta-average değerleri Tablo 6’da verilmiştir. Bu formülasyonlara ait damlacık boyutu grafikleri Şekil 9’ da verilmiştir.

Tablo 6: Mikroemülsiyonun polidispersite indeksi, Z-average ve partikül boyutu değerleri

Sıcaklık	Z-Average (D.Nm)	Pd _i	Partikül Boyutu (nm)
25°C	321.4	0.441	15.51



Şekil 9: Levodopa ve benserazid içeren formülasyona ait partikül boyutu grafiği

4.2.2 Etken Madde Miktarı Tayin Sonucu

Bölüm 3.3.3.8’ de belirtilen derişimlerde cihaza verilen standartlardan kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Levodopa için çizilen kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=2440930x-9417380$ şeklinde bulunup r^2 si 0.998 olarak bulunmuştur. Kalibrasyon denkleminde 10 kat seyreltilen örnekteki levodopa miktarı 47.96 $\mu\text{g/ml}$ olarak

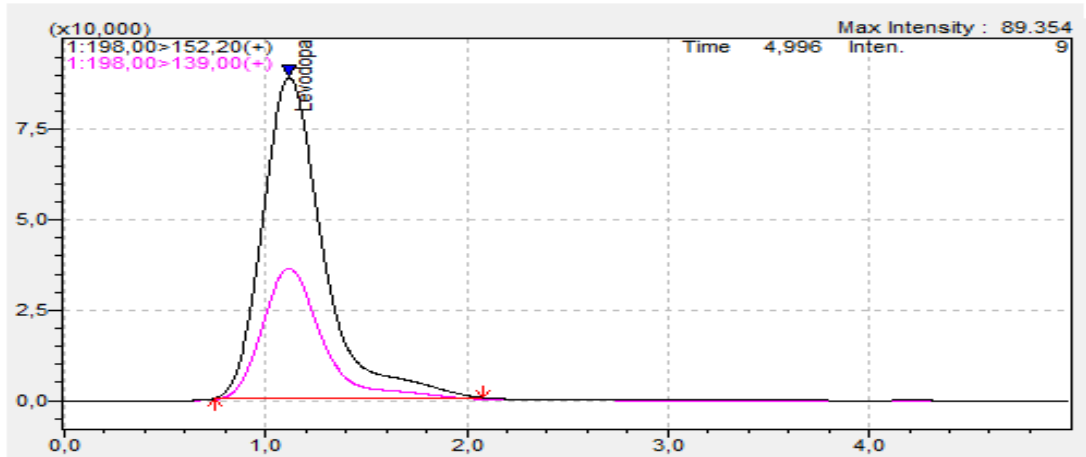
hesaplanmıştır. Aynı şekilde benserazid için çizilen kalibrasyonun denklemi $y=1734020x-5511800$ şeklinde bulunup r^2 si 0.998 olarak bulunmuştur. 10 kat seyreltilmiş örnekteki benserazid derişimi ise 10.76 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır.

4.3. Levodopa ve Benserazid'in LCMS/MS' te Tayini

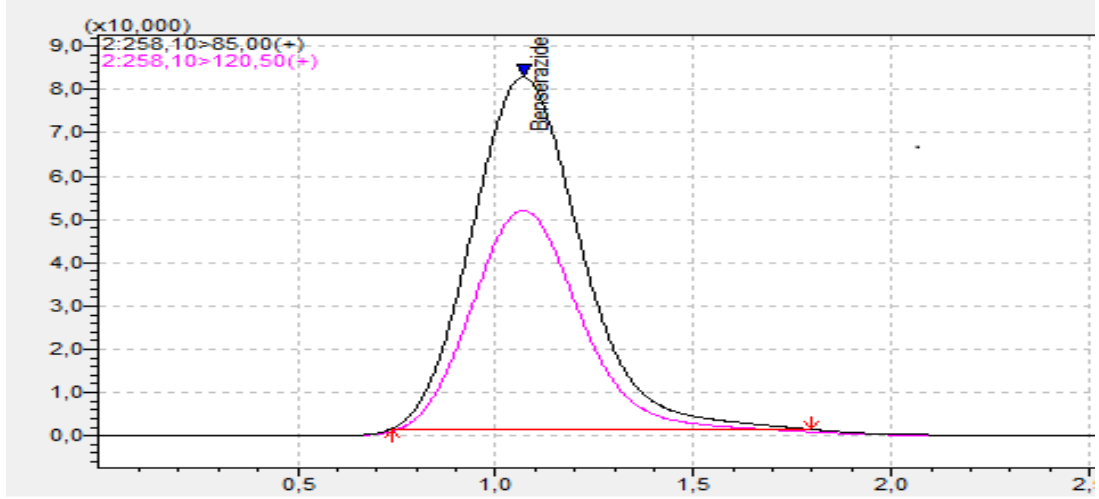
Levodopa ve benserazid in LCMS/MS te infüsyonu sonrası cihazdan elde edilen veriler Tablo 7 de verilmiştir. İnfüsyon sonrası cihaza verilen levodopa ve benserazid standartlarına ait pikler net bir şekilde tespit edilmiştir (Şekil 10) (Şekil 11)

Tablo 7: Levodopa ve Benserazid için LCMS/MS ten elde edilen değerler

Madde Adı	Precursor ion(m/z)	Product(m/z)	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias(V)
Levodopa	198.00	152.20	-22,0	-14,0	-30,0
		139.00	-22,0	-18,0	-25,0
Benserazid	258.10	85,00	-18,0	-24,0	-16,0
		120.50	-18,0	-8,0	-13,0



Şekil 10: Levodopa'nın LCMS/MS teki tayini

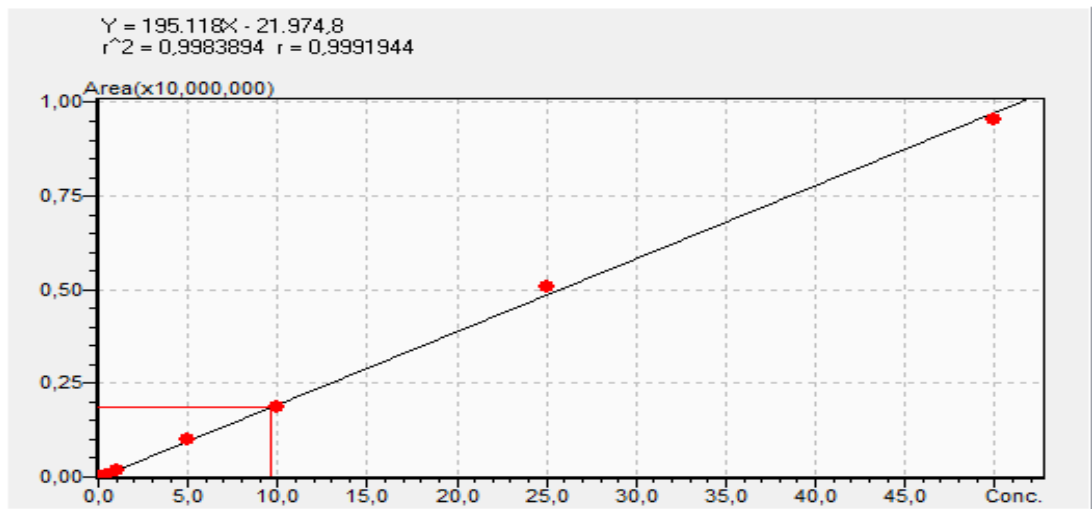


Şekil 11: Benserazid LCMS/MS teki tayini

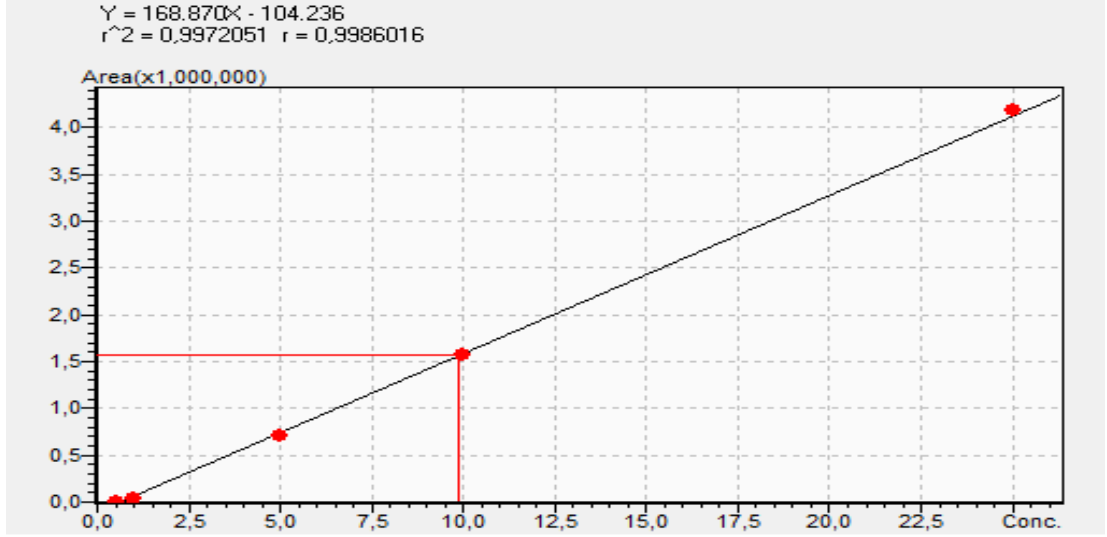
4.3.1. Levodopa ve Benserazid' in Kalibrasyon Eğrisi Çizimi

Bölüm 3.3.1' de anlatıldığı şekilde yapılan çalışma sonucunda Levodopa ve Benserazid için elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil-16 ve Şekil-17 te gösterilmiştir. Levodopa için elde edilen doğru denklemi; $y = 195,118x - 21974,8$ olarak bulunurken determinasyon katsayısı (r^2) ise 0,9984 olarak bulunmuştur.

Benserazid için elde edilen doğru denklemi; $y = 168,870x - 104,236$ olarak bulunurken determinasyon katsayısı (r^2) ise 0,9972 olarak bulunmuştur.



Şekil 12: Levodopaya ait Kalibrasyon Eğrisi Grafiği



Şekil 13: Benserazide ait Kalibrasyon Eğrisi Grafiği

4.3.2. LOD-LOQ Hesaplanması

3.3.1.1' de anlatıldığı üzere yapılan hesaplamalar sonucu Levodopa için LOD değeri 29,30 ng/ml, LOQ değeri ise 97,66 ng/ml olarak bulundu. Benserazid için LOD değeri 29,392 ng/ml, LOQ değeri ise 97,973 ng/ml olarak bulundu.

4.4. İn vitro Geçiş Çalışması Sonuçları

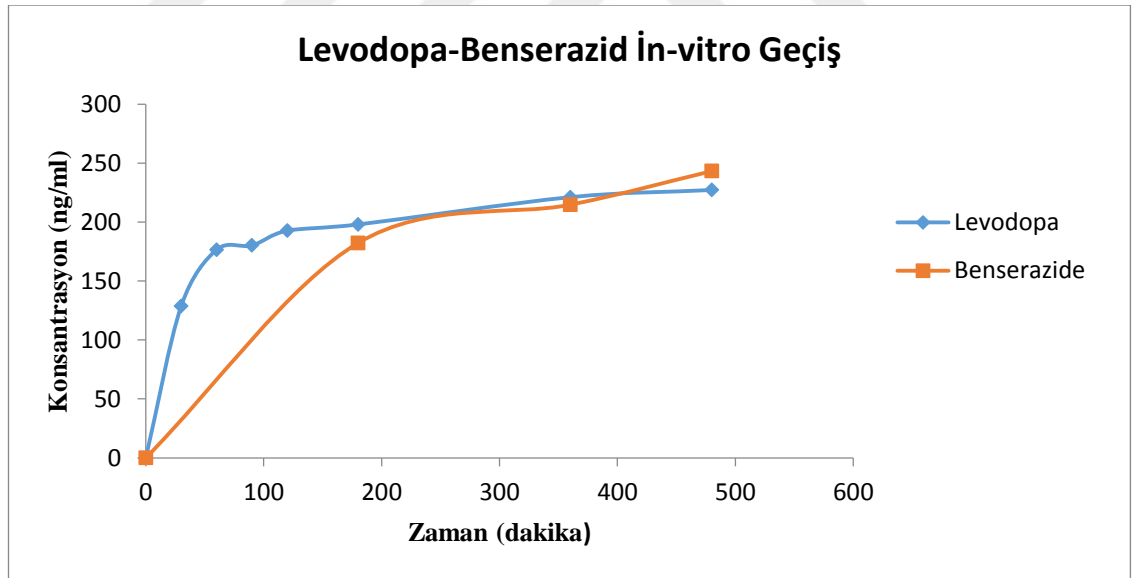
Levodopa ve Benserazid'nin in-vitro geçiş çalışması bölüm 3.3.4' te anlatıldığı gibi yapılmıştır. Belirli aralıklarla yapılan ve toplamda 8 saat süren çalışma sonucu alınan örnekler, levodopa ve benserazid için oluşturulan metod ile LCMS/MS cihazına verilmiştir. Benserazid için küçük derişimlerde sağlıklı sonuç alamadığımız için örneklere sadece benserazid'i içeren standart katma yöntemi uygulanmıştır. Levodopa için elde edilen değerler Tablo 8 de benserazid için elde edilen değerler ise Tablo 9 da gösterilmiş olup sonuçların grafiğe geçirilmiş hali ise Şekil 14 te verilmiştir. Sonuçlara göre; alınan tüm örneklerde levodopa geçişi görülürken benserazid geçişi 180. dakika ve sonrasında gerçekleşmiştir.

Tablo 8: Levodopa geçiş çalışması sonucu hesaplanan derişim, ortalama derişim ve standart sapma değerleri

Zaman	Örnek No	C(ng/ml)	Ortalama C (ng/ml)	Standart Sapma
30. dakika	1	123,00	128,75	0,0225
	2	115,00		
	3	115,00		
	4	162,00		
60. dakika	1	177,00	176,5	0,0066
	2	185,00		
	3	175,00		
	4	169,00		
90. dakika	1	182,00	180,25	0,0042
	2	182,00		
	3	174,00		
	4	183,00		
120. dakika	1	184,00	192,75	0,0142
	2	214,00		
	3	186,00		
	4	187,00		
180. dakika	1	193,00	198	0,0052
	2	203,00		
	3	202,00		
	4	194,00		
360. dakika	1	227,00	221,15	0,0097
	2	227,00		
	3	225,00		
	4	207,00		
480. dakika	1	220,00	227,25	0,0085
	2	222,00		
	3	239,00		
	4	228,00		

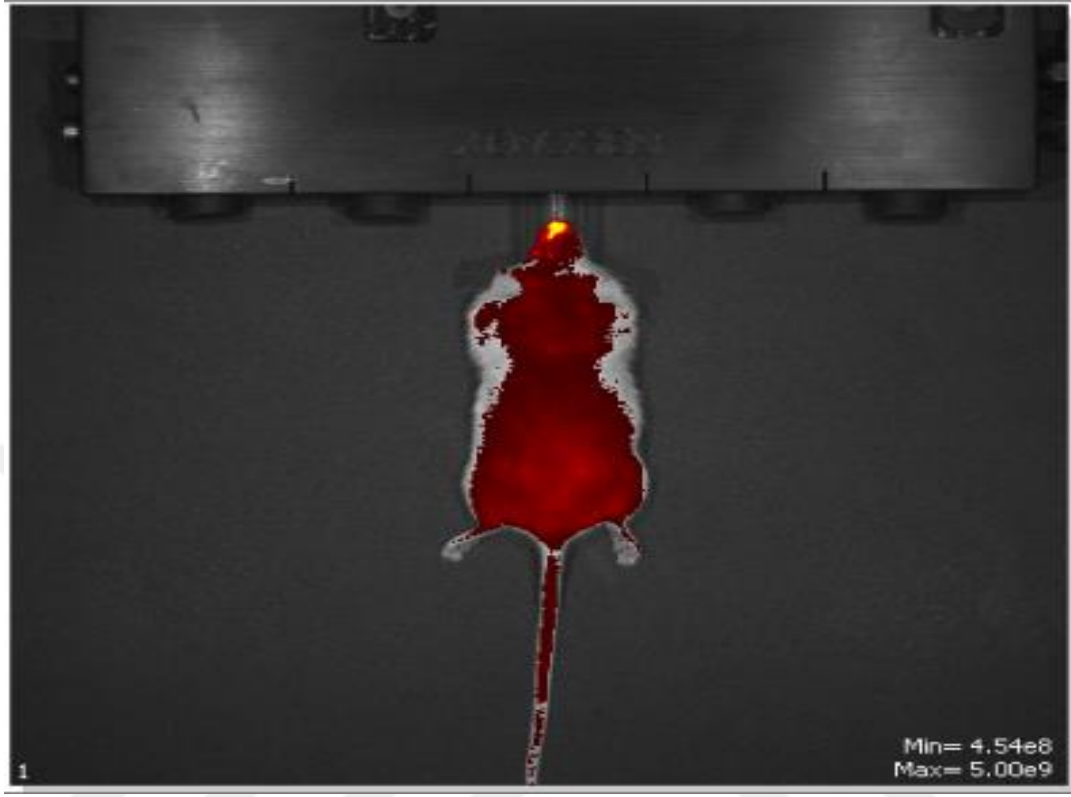
Tablo 9: Benserazid geçiş çalışması sonucu hesaplanan derişim, ortalama derişim ve standart sapma değerleri

Zaman	Örnek No	C(ng/ml)	Ortalama C (ng/ml)	Standart Sapma
180. dakika	1	183,00	182,25	3,304
	2	178,00		
	3	186,00		
	4	182,00		
360. dakika	1	221,00	214,75	4,349
	2	211,00		
	3	214,00		
	4	213,00		
480. dakika	1	249,00	243,25	5,315
	2	246,00		
	3	237,00		
	4	241,00		

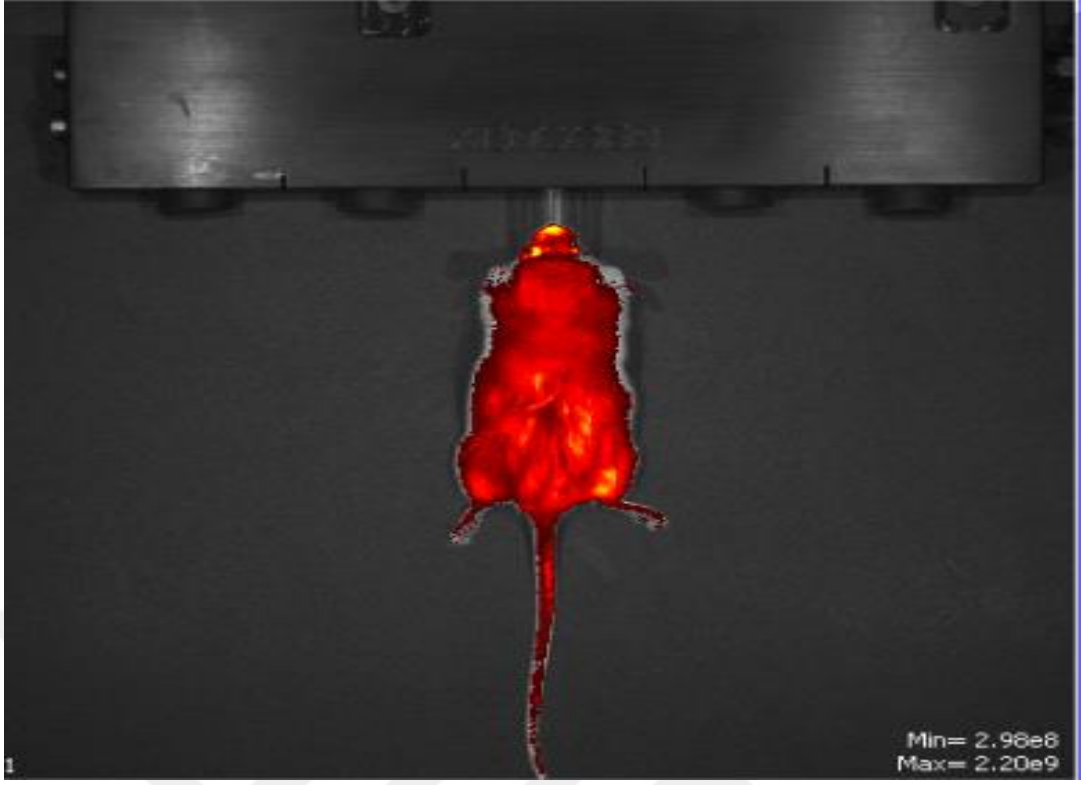


şekil 14: Levodopa ve Benserazid İn-vitro geçiş çalışması sonuçlarının grafiksel birlikte gösterimi

4.5. İn-Vivo Görüntüleme Çalışması Sonuçları



Şekil 15: FITC ile İşaretlenmiş Levodopa ve Benserazid ME IVIS Görüntü (40. Dk)



Şekil 16: FITC ile İşaretlenmiş Levodopa ve Benserazid ME IVIS Görüntü (90. Dk)

5. Tartışma

5.1. Formülasyon Çalışmaları Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Etkin maddenin salınımı, elde edilen formülasyona ve kullanılan yardımcı maddelere önemli ölçüde bağlıdır. Formülasyon geliştirme çalışmalarında yağ fazı olarak etil oleat ve surfaktan olarak non-iyonik Tween 80 seçilmiştir. Mikroemülsiyon çalışmalarında etken maddenin penetrasyonunu artırmaya yardımcı olacak maddelerin seçilmesine dikkat edilmiştir. Çalışmamızda penetrasyonu artırmak amacı ile yapılan literatür araştırmaları sonucu ko-surfaktan olarak propilen glikol seçilmiştir (Değim,2007).

Ağız yoluyla alınan formülasyonlardaki levodopanin büyük bir kısmı gastrointestinal sistemde ilk geçiş etkisine uğrar. Vücuda alınan levodopanin sadece % 1-3 ü santral sinir sistemine geçerek etki gösterebilir. Bu yüzden PH' nin tedavisinde kullanılan oral formülasyonlardaki levodopa miktarı (125-250 mg/doz) yüksektir ve günde ağız yoluyla alınan 300-800 mg levodopa ile optimal etki sağlanmaktadır. Çalışmamızda intranasal uygulama ile ilk geçiş etkisi ortadan kaldırılacağı için geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonuna eklenecek levodopa miktarı, günlük alınabilecek ortalama oral levodopa miktarının %1' i olacak şekilde belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmaları levodopanin karbidopa, benserazid gibi dekarboksilaz inhibitörleri ile birlikte uygulanması sonucu günlük doz miktarında %70-80 oranında bir azalma olduğunu göstermiştir (Kaya, 2007). Bu bilgi doğrultusunda etken madde olan Levodopa' nın periferik dekarboksilasyonunu engellemek, uygulama dozunun azaltmak ve düşük biyoyararlanımını artırmak için dekarboksilaz inhibitörü olan benserazid ile kombine edilmiştir. Levodopa ve dekarboksilaz inhibitörlerinin doz oranları ayarlanarak maximum etkinliğe ulaşmak için yapılan çalışmalarda; Levodopa/karbidopa oranı 10:1 olduğu zaman mide bulantısı ve kusma gibi yan etkilerin insidansının yüksek olduğu bildirilmiştir. Hem benserazid hem de karbidopa için doz oranı 4:1 olarak değiştirildiğinde ise yan etkilerin azaldığı saptanmıştır (Kaya, 2007). Bu bilgi doğrultusunda çalışmada levodopa/benserazid oranı 4:1 olacak şekilde ayarlanarak 5 mg Levodopa ile 1.25 mg benserazid kullanılmıştır.

Intranazal uygulamalar birçok teröpatik ajanın sistemik ve lokal salınımı için çekici bir seçenek olmuştur. Nazal mukozanın diğer mukozalar ile karşılaştırıldığında daha kolay ulaşılması, küçük ve büyük moleküller için pratik geçiş portalı sunması, hızlı terapötik etkilerin ortaya çıkması, ilk geçiş etkisi ve gastrointestinal degradasyonun olmaması gibi nedenler ile sıklıkla tercih edilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucu ilaç formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerinin intranazal uygulamalarda ilacın biyolojik membrandan geçiş hızını ve derecesini etkilediği görülmüştür (Bitter, Suter- Zimmermann, Surber, 2011). Çalışmamızda geliştirmeye çalıştığımız mikroemülsiyon intranazal uygulamaya uygun olacak şekilde formüle edilmiş ve ikinci kısımda yapılan fizikokimyasal analizlerin sonuçları bu bilgiler doğrultusunda değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda geliştirdiğimiz formülasyon üzerinde fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için; görünüş, tip, pH, iletkenlik, refraktif indeks, partikül boyutu dağılımı ve viskozite çalışmaları yapılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda mikroemülsiyonun tipi S/Y tipinde bulunmuştur. Formülasyonun pH'sı 5.78 olarak bulunmuştur. Nazal epitelyumun pH sı 5.5-6.5 arasındadır. pH 5.5' ten düşük yada 6.5 ten yüksek olduğu durumda nazal epitelinin tamponlama kapasitesi aşıldığından dolayı lokal yan etkilere ve ilaç geçişinin etkilenmesine neden olmaktadır (Bitter, Suter- Zimmermann, Surber, 2011). Bu bilgi çerçevesinde formülasyonun pH sı literatür ile uyumlu çıkmıştır.

Formülasyonun viskozitesi 1730.0 cP olarak bulunmuştur. Nazal yol ile uygulanacak formülasyonların biyolojik viskozitesinin olması gereken düzeyi bilinmemektedir. Fakat nazal ürün girişte veya nazofarinkse doğru ürün kaybını önlemek için formülasyonun viskozitesinin yüksek olması bir avantaj iken çok yüksek ürün viskoziteleri temizleme mekanizmasını teşvik edeceğinden dolayı bir dezavantajdır.

Bir ışık demetinin bir ortamdan yoğunluğu farklı bir ortama geçerken yön değiştirmesine kırılma denir. Refraktif indeks bir maddenin saflığının bir göstergesidir. Formülasyonun refraktif indeksi 1.4498 olarak bulunmuştur.

Yoğunluğu 1.0058g/ml olarak bulunan formülasyonun elektrik iletkenliği ise 16.02 $\mu\text{s/cm}$ olarak bulunmuştur.

Mikro/ Nano boyutlu ilaç sistemleri; boyutları nedeniyle hücre membranından yüksek derecede geçiş sağlamaları ve bu nedenle taşıdıkları ilaç moleküllerinin hücresel alımlarını artırmaları, artırılmış penetrasyon ve uzatılmış kalış süreleri gibi

özelliklerinin bulunması, düşük toksisiteleri, artırılmış biyoyararlanım sağlamaları nedeniyle hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli yapılardır. Partikül boyutu çalışmalarında formülasyonun partikül boyutu 15.51 nm olarak bulunmuştur. Çıkan sonuç mikroemülsiyon tanımında verilen aralığa uygun olarak bulunmuştur (Şimşek, 2010).

Etken madde miktar tayininde elde edilen sonuçlara göre Levodopa için %95,92 geri kazanım sağlanırken benserazid için %86,10 geri kazanım elde edilmiştir. Sonuçlar bize formülasyon içinde etken maddenin homojen bir şekilde dağılım gösterdiğini ve etken madde miktarının formülasyon hazırlanırken eklenen madde miktarı ile uyumlu olduğunu göstermektedir.

5.2. Levodopa ve Benserazid in LCMS/MS' te Tayin Çalışmasının Değerlendirilmesi

Çalışmamızın bu aşamasında Levodopa ve Benserazidin Shimadzu marka LCMS/MS'te tayini için yöntem geliştirilmiştir. Cihaz için elde edilen optimum değerler Tablo 7 de verilmiştir.

Geliştirilen formülasyondan miktar tayini yapmak ve in-vitro geçiş çalışmaları sonucu elde edilen örneklerdeki etken madde miktarını tayin etmek için Levodopa ve benserazid için ayrı ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Levodopa için elde edilen doğru denklemi ($y = 195,118x - 21974,8$) şeklindedir. Kalibrasyon eğrisinde r^2 nin 0,9984 olması bize denklemi miktar tayini için güvenle kullanabileceğimizi göstermiştir. Benserazid için elde edilen doğru denklemi ($y = 168,870x - 104,236$) şeklindedir. Aynı şekilde kalibrasyon eğrisinde r^2 nin 0,9972 olması bize denklemi geçiş çalışması için güvenle kullanabileceğimizi göstermiştir.

5.3. İn-Vitro Geçiş Çalışması Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İn-vitro geçiş çalışmaları için Franz difüzyon hücreleri kullanılmıştır. Donör kompartmana taze hazırlanmış formülasyon eklenirken reseptör kompartmana ise serum fizyolojik eklenmiştir. Isıtma ceketleri yardımı ile sıcaklığın sürekli sabit olarak 37 °C de kalması sağlanmıştır. Ayrıca reseptör kompartman içerisinde bulunan manyetik balıklar yardımı ile geçiş olan ortamın sabit hızda sürekli

kariştirilmesi sağlanmıştır. Belirli zamanlarda reseptör kompartmandan alınan örneklerden miktar tayini yapılmıştır. 4 paralel olacak şekilde yapılan çalışmalardan aynı zamanda alınan örneklerden elde edilen sonuçlar arasında anlamlı bir farklanma olmamıştır. Tablo 8 ve Tablo 9 da sonuçlar ve sonuçlar arasında hesaplanan standart sapmalar verilmiştir. Tabloda da bir farklanma olmadığı, sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görölmektedir.

Geçiş çalışması sonucunda Levodopa için ilk 60 dakikada geçişin hızlı olduğu, 60 dakikadan sonra ise daha yavaş bir geçiş gerçekleştiği görölmüştür. Benserazid için 180. Dakikaya kadar geçiş olduğu tespit edilemedi fakat 180. Dakikan sonra geçişin meydana geldiği ve sonrasında artarak devam ettiği gözlenmiştir.

5.4. İn-Vivo Görüntüleme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bölüm 3.3.5' te anlatıldığı üzere levodopa - benserazid içeren ve sadece levodopa içeren iki farklı formülasyon ile denemeler yapıldı Ekstraserebral dopa dekarboksilaz inhibitörü olan benserazide varlığının formülasyondaki L-Dopanin istenilen bölgeye geçişine etkisi görölmek istendi. Fakat FTIC ile floresans özellik kazandırılan Levodopa ve Benserazid mikroemülsiyonu intranasal uygulandığında beyine geçiş elde edilemedi. Deney hayvanlarında mikroemülsiyon uygulama sonrası burun sekresyonlarında artış göröldü ve buna bağlı olarak yeterli ilaç konsantrasyonu sağlanamadı.

6. Sonuç ve Öneriler

Kan-beyin bariyerini geçemeyen dopaminin yerine ön ilaç olarak tercih edilen L-dopa, PH' nın tedavisinde oral yoldan kullanılan ilaç formunda veya ince barsaktan sürekli infüzyon şeklinde uygulanan jel formunda kullanılmaktadır. Bu çalışma ile bu kullanımlara alternatif olabilecek intranasal yoldan uygulanabilen bir formülasyon geliştirmeyi düşündük.

Sonuç olarak bu çalışmaya başlarken hedeflenen bu amaçlar doğrultusunda geliştirilen mikroemülsiyon farmakolojik dozaj şeklinin, L-Dopa için uygun bir taşıyıcı sistem olabileceği düşünülebilir. Fakat yapılan in vivo denemelerden elde edilen sonuçlar, geliştirilen formülasyonun intranasal uygulama için yeterli olmadığını, geliştirilerek intranasal uygulamaya uygun hale getirilebileceğini göstermiştir.

7. Kaynaklar

- Armağan, V (2006). Antitümöral İlaç İçeren Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Geliştirilmesi Ve Antitümöral Etkinliğinin Araştırılması Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Bitter, C., Suter- Zimmermann, K., Surber, C., (2011). Nasal Drug Delivery in Humans, Surber C, Elsner P, Farage MA (eds.), Topical Applications and the Mucosa, (s.20-35), Basel: Karger.
- DEMİRCİGİL, B. T., (2010). İkili İlaç Etkin Madde Karışımlarının Elektrokimyasal olarak İncelenmesi (Doktora Tezi). Erişim adresi: <http://acikarsiv.ankara.edu.tr/browse/26840/tez.pdf?show>
- Costantino H.R, Illum L, Brandt G, Johnson P.H, Quay S.C., (2007). Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *International Journal of Pharmaceutics*, s.1-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.025>
- Cotzias, C.G., Papavasiliou, P.S., Gellene, R., (1969). Modification of parkinsonism chronic treatment with L-dopa, Calne D.B (Ed), *Drug for the treatment of Parkinson's disease* (s. 337-345), London: Springer-Verlag.
- Çelebi, N. (2007). Emülsiyonlar, *Modern Farmasötik Teknoloji, Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını* (s. 277-299) Ankara.
- Değim, T. (2007). Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar, *Modern Farmasötik Teknoloji* 8s. 337-364), Ankara: Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını.
- Ege, M.A., Karasulu, H.Y., Güneri, T., (2004). Triangle Phase Diagram Analysis Software, The 4th International postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics. *Abstract Book*, (İstanbul).
- Ehrhardt, C, Kim, K.J., (2008) Drug absorption studies: In situ, in vitro and in silico models, Ehrhardt C, Kim K.J, (editors), *In vitro cellular models for nasal drug absorption studies* (s. 216-221), New York: Springer.
- Fahn, S., (2006). Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.Suppl*, 71, s. 1–15 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17447410#>
- Goole, J., Amighi K. (2009). Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson's disease. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.07.026>

- Gupta, N, Patel B, Ahsan F., (2015). Drug delivery, Mitra A.K, Kwatra D, Vadlapudi A.D (editors), Pulmonary and nasal drug delivery (s. 326-329), Burlington: Jones&Bartlett Learning.
- Kaya, S. (2007). Levodopa Ve Benserazidin Denetimli Salınım Yapan İlaç Şekillerinin Geliştirilmesi, Bunların Ticari Preparatlarının Salınım Testleri Ve Analizi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Lowlor, P.A., During, M.J., (2004). Gene therapy for Parkinson's disease. <https://doi.org/10.1017/S146239940400746X>
- McInnes, F., Thapa, M., Stevens, H.N.E., (2008). Enhanceg nasal delivery with lyophilized inserts, Willams III R.O, Taft D.R, McConville J.T. (Editors), Advanced drug formulation design to optimize therapeutic outcomes, (s. 281-286) New York, London: Informa.
- Özsoy, Y., (2007). Nazal yolla ilaçların verilmesi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, Cilt 36, Sayı 4*, (s.267-284)
- Parkinson, J., (1817). An Essay on the Shaking Palsy. Sherwood, Neely and Jones, London. Erişim Adresi: <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Pinder, R.M., Brogden, R.N., Sawyer, P.R., Speight, T.M., Avery, G.S., (1976). Levodopa and decarboxylase inhibitors: a review of their clinical pharmacology and use in the treatment of parkinsonism, *Drugs* (s. 329–377), New Zealand: Australasian Drug Information Services. <https://doi.org/10.2165/00003495-197611050-00001>
- Shastry, B.S., (2001). Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neuroscience Research*,41, s. 5–12. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-0102\(01\)00254-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-0102(01)00254-1)
- Şimşek, S., (2010). Beyne Hedeflendirilmiş Polisorbat 80 Kaplı/Atorvastatin Yüklü Amfifilik Plga-B-Peg Nanopartiküllerinin Hazırlanması Ve İn-Vivo Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve NanotıpAnabilim Dalı, Ankara.
- Türkyılmaz, A. (1998). Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nün Gastrointestinal Sistem Ülserlerindeki Etkisinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Üstündağ, N. (2008), Naproksen İçeren Farklı Transdermal Mikroemülsiyon Formülasyonlarının İn Vitro – İn Vivo Değerlendirilmesi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Vaddi, H.K., Khan, M.A., Reddy, I.K. (2007). Ocular, Nasal, and otic drug delivery, Desai, A., Lee, M., (editors). Gibaldi's drug delivery systems in pharmaceutical care, (s. 65-71), Bethesda: Maryland American Society of Health-System Pharmacists.



8. Ekler

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2014-056
KONU: Onay

17.07.2014

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **“LEVODOPA’NIN BİYOYARARLANIMININ ARTTIRILMASI VE YENİ DOZAJ ŞEKLİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ”** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Öğr.Gör.Dr. İskender İNCE, Ege Üniversitesi ARGEFAR
Prof.Dr. Ercüment KARASULU, Ege Üniversitesi ARGEFAR
Uzm.Ecz. Tuğçe TURGAY, Ege Üniversitesi ARGEFAR
Biyolog Hatice KÖYLÜ, Ege Üniversitesi ARGEFAR

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Rasih YILMAZ
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN *Katılmadı*

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR *Katılmadı*

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI

Özcan NALBANTOĞLU

Tingiz ÖZCAN *Katılmadı*

9. Teşekkür

Tecrübe ve bilgi birikimiyle her zaman yanımda olan, yoğun iş temposu arasında çok değerli vakitlerini ayırarak benden destek ve yardımlarını esirgemeyen Tez Danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ercüment KARASULU' ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez konusunun belirlenmesinden tezin son aşmasına gelene kadar bana yol gösteren, olumlu ve yapıcı eleştirileri ile beni yönlendiren, tecrübeleri ile bana ışık tutan saygıdeğer hocam Öğr. Gör. İskender İNCE' ye sonsuz teşekkür ederim.

IVIS Spektrum cihazında In-vivo görüntüleme çalışmalarında bana yardımcı olan Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Fizikokimya Ana Bilim Dalının değerli öğretim üyesi Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM' a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarında emeği geçen, beni her koşulda destekleyen değerli çalışma arkadaşlarıma ve tüm ARGEFAR çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli annem ve babam Fatma- Cafer KÖYLÜ ile kıymetli eşim Murat ÇETİN' e teşekkürü borç bilirim.

İzmir, 2019

Hatice ÇETİN

10. Özgeçmiş

19 Mayıs 1988 tarihinde Isparta’ da doğdum. Üniversite eğitimime 2007 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümünde başladım ve 2012 yılında bölüm birincisi olarak mezun oldum. 2012 yılında Ege Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Eğitimini başarıyla tamamladım. Aynı yıl Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi -ARGEFAR ‘ da Araştırmacı Operatör olarak çalışmaya başladım ve halen aynı kurumda çalışma hayatıma devam etmekteyim. 2013 yılı şubat ayında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım. Halen aynı Anabilim Dalı’ nda eğitimime devam etmekteyim.

htcekoylu@gmail.com