İNDOMETAZİN İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Kaan YALÇINKAYA

Eskişehir 2024

İNDOMETAZİN İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Kaan YALÇINKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Evrim AKYIL

Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Haziran 2024

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Kaan YALÇINKAYA'nın "İndometazin İçeren Nanopartiküllerin Hazırlanması ve *İn Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi 16 Temmuz 2024 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Farmasötik Teknoloji programında, yüksek lisans tezi olarak değerlendirilerek kabul edilmiştir.

		İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Evrim AKYIL	.....
Üye	: Prof. Dr. Ebru BAŞARAN	.....
Üye	: Doç. Dr. Umay Merve GÜVEN BÖLGEN	.....

Prof. Dr. Saime ÖNCE

Anadolu Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖZET

İNDOMETAZİN İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Kaan YALÇINKAYA

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Haziran 2024

Danışman: Prof. Dr. Evrim AKYIL

İndometazin, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre Sınıf 2'de yer alan, düşük çözünürlük ve yüksek permeabilite gösteren bir antiinflamatuvar olarak karşımıza çıkmaktadır. Romatoid artrit ve ankilozan spondilit gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bu maddenin özellikle mide üzerine olan olumsuz etkileri yaygınca bilinmektedir. Gastrointestinal sistemin yapısı göz önüne alındığında oral kullanımda bağırsağa hedeflenen maddelerin hedef bölgesine ulaşması ve etkin maddenin o bölgede salımı, bir güçlük olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu güçlüğün ortadan kaldırılması ve olası yan etkilerle birlikte etkinin uzatılması adına bu tez çalışmasında Eudragit® polimerleri ve Dynasan® 116 lipidi kullanılarak polimerik nanopartikül ve katı lipit nanopartikül formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen bu formülasyonların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş, *in vitro* özellikleri belirlenmiş ve sonuç olarak geliştirilen bu formülasyonların bağırsakta etkin madde salımını gerçekleştirdiği ve salım süresini uzattığı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: İndometazin, Polimerik nanopartikül, Katı lipit nanopartikül, Nanoçöktürme.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND *IN VITRO* EVALUATION OF INDOMETHACIN-LOADED NANOPARTICLES

Kaan YALÇINKAYA

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Education, June 2024

Supervisor: Prof. Dr. Evrim AKYIL

Indomethacin, classified as Class 2 in the Biopharmaceutical Classification System, emerges as an anti-inflammatory agent with low solubility and high permeability. Widely used in the treatment of various diseases such as rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis, this substance is well-known for its adverse effects, particularly on the stomach. Considering the structure of the gastrointestinal system, the targeted delivery of orally administered substances to the intestines and the release of the active substance in that region pose a challenge. To overcome this challenge and prolong the effect while mitigating possible side effects, in this thesis study, polymeric nanoparticles and solid lipid nanoparticles were developed using Eudragit® polymers and Dynasan® 116 lipid. Characterization studies of these developed formulations were conducted, their in vitro properties were determined, and ultimately, it was concluded that these developed formulations achieve effective release of the active substance in the intestine and prolong the release duration.

Keywords: Indomethacin, Polymeric nanoparticles, Solid lipid nanoparticles, Nanoprecipitation.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yürüttüğüm bu süreçte ihtiyacım olan maddi veya manevi her türlü desteği sunan, her konuda yanımda hissettiğim, çok sayın danışman hocam Prof. Dr. Evrim AKYIL'a,

Hücre kültürü çalışmaları başta olmak üzere yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Çalışmalarım sırasında deneyimlerine ve bilgilerine sıkça başvurduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Müzeyyen Demirel'e, Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, Prof. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a ve Doç Dr. Alper ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmalarım ve çalışma hayatımda benden destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Sinan ÖZER'e, Araş. Gör. Kadir AYKAÇ'a, Araş. Gör. Ceyda KÖROĞLU ÖZMEN'e,

FT-IR analizlerinde bana yardımcı olan Serkan LEVENT'e,

NMR analizlerinde yardımlarından faydalandığım Süleyman YUR'a

SEM ile yaptığım çalışmalarımda yardımcı olan Şennur GÖRGÜLÜ'ye,

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Ecz. Ömer Barış CAN'a,

Gerek çalışmalarımda gerekse mental olarak bana desteğini esirgemeyen Ecz. Dilhan KÜÇÜK'e,

Eczacılık mesleğini çocukluk yıllarımdan itibaren bana sevdiren, her zaman ve her koşul altında yanımda olan ve sonrasında da olacaklarını bildiğim çok sevgili ailem, babam Ecz. Alp Ragıp YALÇINKAYA ve annem Ecz. Nefise YALÇINKAYA'ya teşekkürü borç bilirim.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

Kaan YALÇINKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa

BAŞLIK ii

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii

ÖZET iii

ABSTRACT iv

TEŞEKKÜR v

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ vi

İÇİNDEKİLER vii

ŞEKİLLER DİZİNİ xii

TABLOLAR DİZİNİ xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xvi

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. KAYNAK BİLGİSİ 3

2.1. İndometazin 3

2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri 3

2.1.2. IND farmakolojik özellikleri 3

2.1.3. IND miktar tayini metotları 5

2.1.4. IND içeren ticari preparatlar 6

2.2. Oral Yoldan İlaç Uygulanması 7

2.3. Nanopartiküler Sistemler 8

2.4. Polimerik Nanopartiküller (PNP) 9

2.4.2. Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri 10

2.4.2.1. Nanoçöktürme yöntemi *10*

2.4.2.2. Emülsifikasyon – çözücü uçurma yöntemi *11*

2.4.2.3. Emülsifikasyon – çözücü difüzyonu yöntemi *12*

2.4.2.4. Tuz ile çöktürme (salting out) yöntemi *12*

2.4.2.5. Süperkritik akışkan teknolojisi *13*

2.4.2.6. Koaservasyon yöntemi *13*

2.4.2.7. Diyaliz yöntemi *14*

2.4.3. PNP karakterizasyonu **14**

2.4.3.1. Partikül boyut ve morfolojisi *14*

2.4.3.2. Zeta potansiyel *14*

2.4.3.3. Etkin madde yüklenmesi ve enkapsülasyon *15*

2.3.4. PNP'lerin üstünlükleri **15**

2.4. Katı Lipit Nanopartiküller (KLN) **15**

2.4.1. KLN formülasyonları **16**

2.4.2. KLN hazırlama metotları **17**

2.4.2.1. Yüksek basınçlı homojenizasyon *17*

2.4.2.2. Çözücü emülsifikasyonu/uçurma yöntemi *18*

2.4.2.3. Çözücü enjeksiyonu yöntemi *18*

2.4.2.4. Mikroemülsiyon yöntemi *18*

2.4.2.5. Çift emülsiyon yöntemi *19*

2.4.2.6. Ultrasonikasyon *19*

2.4.2. Katı lipit nanopartiküllerin karakterizasyonu **20**

2.4.2.1. Partikül boyutu ve zeta potansiyel *20*

2.4.2.2. Kristalizasyon *20*

2.4.2.3. Etkin madde yüklenmesi ve enkapsülasyon *20*

3. GEREÇLER **22**

3.1. Kullanılan Maddeler **22**

3.2. Kullanılan Cihazlar **23**

4. YÖNTEMLER **25**

4.1. IND Çalışmaları **25**

4.1.1. IND morfolojisi **25**

4.1.2. Termal özellikler **25**

4.1.3. Fouriyer dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizi **25**

4.1.4. Proton nükleer manyetik rezonans (^{1}H-NMR) analizi **25**

4.1.5. IND'nin HPLC çalışmaları **26**

4.1.5.1. Doğrusallık ***26***

4.1.5.2. Doğruluk ***27***

4.1.5.3. Kesinlik ***27***

4.1.5.4. Duyarlılık ***27***

4.1.5.5. Seçicilik ***28***

4.2. PNP Formülasyon Çalışmaları **28**

4.3. PNP Karakterizasyonu **29**

4.3.1. Parçacık büyüklük ve dağılımı **29**

4.3.2. Zeta potansiyel **30**

4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (%EE) **30**

4.3.4. Termal analiz **30**

4.3.5. FT-IR analizi **30**

4.3.6. ^{1}H NMR analizi **31**

4.3.7. *İn vitro* salım **31**

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları **31**

4.6. KLN Formülasyon Çalışmaları **33**

4.7. KLN Karakterizasyonu **34**

4.7.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı **34**

4.7.2. Zeta potansiyel **34**

4.7.3. Enkapsülasyon etkinliği (%EE) **34**

4.7.4. Termal analiz **34**

4.7.5. FT-IR analizi **35**

4.7.6. ^{1}H NMR analizi **35**

4.7.7. *İn vitro* salım **35**

5. BULGULAR ve tartışma **36**

5.1. IND ile Yapılan Çalışmalar **36**

5.1.1. Morfolojik özellikleri **36**

5.1.2. Termal analiz **36**

5.1.3. FT-IR analizi **37**

5.1.4. ^{1}H-NMR Analizi **38**

5.1.5. IND'nin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları **39**

5.1.5.1. Doğrusallık ***39***

5.1.5.2. Doğruluk ***42***

5.1.5.3. Kesinlik ***43***

5.1.5.4. Duyarlılık ***45***

5.1.5.5. Seçicilik ***45***

5.2. PNP Formülasyon Çalışmaları **50**

5.2.1. Morfolojik özellikleri **50**

5.2.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı **51**

5.2.3. Zeta potansiyel **52**

5.2.4. Enkapsülasyon etkinliği (%EE) **52**

5.2.5. Termal analiz **53**

5.2.6. FT-IR analizi **55**

5.2.7. ^{1}H NMR analizi **56**

5.2.8. *İn vitro* salım çalışmaları **57**

5.2.9. Hücre kültürü çalışmaları 60

5.3. KLN Formülasyon Çalışmaları 62

5.3.1. Lipit seçimi 62

5.3.2. Morfolojik özellikleri 63

5.3.3. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı 64

5.3.4. Zeta potansiyel 65

5.3.5. Enkapsülasyon etkinliği (%EE) 65

5.3.6. Termal analiz 66

5.3.7. FT-IR analizi 68

5.3.8. ^{1}H NMR analizi 69

5.3.9. *İn vitro* salım çalışmaları 70

5.3.10. Hücre kültürü çalışmaları 72

6. SONUÇ 75

KAYNAKÇA 77

ÖZGEÇMİŞ 88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. *IND'nin açık kimyasal formülü* (Brien vd., 1984) 3
Şekil 2.2. *Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler* (Wilczewska vd., 2012)..... 8
Şekil 2.3. *Tek emülsiyon (A) e çoklu emülsiyon (B) teknikleri ile nanopartikül eldesinin şematik gösterimi* (Vauthier ve Bouchemal, 2009). 11
Şekil 2.4. *Emülsifikasyon – çözücü difüzyonu yönteminin şematik gösterimi* (Zielinska vd., 2020)..... 12
Şekil 2.5. *Sıcak homojenizasyon YBH yöntemi* (Nasirizadeh ve Malaekeh-Nikouei, 2020)..... 17
Şekil 2.6. *Soğuk homojenizasyon YBH yöntemi* (Nasirizadeh ve Malaekeh-Nikouei, 2020)..... 18
Şekil 2.7. *KLN formülasyonlarında etkin maddenin bulunduğu konumlar: matriste dağılmış (a), lipit kabukla çevrili matris çekirdeğinde (b) ve lipit çekirdeğin çevresindeki kabukta dağılmış (c)* (Üner, 2006)..... 21
Şekil 5.1. *IND'ye ait SEM görüntüsü*..... 36
Şekil 5.2. *IND'ye ait termogram*..... 37
Şekil 5.3. *IND'ye ait FT-IR spektrumu* 38
Şekil 5.4. *IND'ye ait* ^{1}*H-NMR spektrumu* 39
Şekil 5.5. *IND'ye ait doğrusallık grafiği (n=6)* 42
Şekil 5.6. *IND'nin mobil fazdaki çözeltisi (a), IND içermeyen PNP çözeltisi (b) ve IND içermeyen KLN çözeltisinin (c) HPLC kromatogramları*..... 46
Şekil 5.7. *PNP (d) ve KLN (e) formülasyonlarının HPLC kromatogramları* 47
Şekil 5.8. *0,1 N HCl (pH 1,2) ortamının (f) ve ortamdaki IND'nin (g) HPLC kromatogramları*..... 48
Şekil 5.9. *PBS (pH 6,8) ortamının (h) ve ortamdaki IND'nin (i) HPLC kromatogramları*..... 49
Şekil 5.10. *PNP'ye ait SEM görüntüsü*..... 51
Şekil 5.11. *IND (a), Eudragit® RLPO-RSPO (b), PNP fiziksel karışım (c) ve PNP'ye (d) ait termogramlar*..... 54
Şekil 5.12. *IND (a), P-2 formülasyonu fiziksel karışımı (b), P-2 formülasyonu plasebo (c) ve P-2 formülasyonunun (d) FT-IR spektrumları*..... 55

Şekil 5.13. *IND (a), P-2 formülasyonunun fiziksel karışımı (b), P-2 formülasyonu plasebo (c) ve P-2 formülasyonunun (d) ^{1}H NMR spektrumları* 57
Şekil 5.14. *IND ve PNP'ye ait in vitro salım profilleri (PBS pH 6,8)* 58
Şekil 5.15. *IND ve PNP'ye ait in vitro salım profilleri (PBS + %1 Tween® 80)*..... 59
Şekil 5.16. *IND, boş PNP ve PNP'ye ait MTT testi sonucu % hücre canlılığı grafikleri* 61
Şekil 5.17. *Kullanılan lipitlerin D değerleri* 63
Şekil 5.18. *KLN'ye ait SEM görüntüsü* 64
Şekil 5.19. *IND (a), Dynasan®116 (b), KLN fiziksel karışım (c) ve KLN'ye (d) ait termogramlar* 67
Şekil 5.20. *IND (a), TS-1 formülasyonu fiziksel karışımı (b), TS-1 formülasyonu plasebo (c) ve TS-1 formülasyonunun (d) FT-IR spektrumları* 68
Şekil 5.21. *IND (a), TS-1 formülasyonunun fiziksel karışımı (b), TS-1 formülasyonu plasebo (c) ve TS-1 formülasyonunun (d) ^{1}H NMR spektrumları* 69
Şekil 5.22. *IND ve KLN'ye ait in vitro salım profilleri (PBS pH 6,8)* 70
Şekil 5.23. *IND ve KLN'ye ait in vitro salım profilleri (PBS + %1 Tween® 80)*..... 71
Şekil 5.24. *IND, boş KLN ve KLN'ye ait MTT testi sonucu % hücre canlılığı grafikleri* 73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. *IND içeriğine sahip müstahzarlar (http-2)* 6
Tablo 2.2. *İnsanda gastrointestinal yolun bölümlerinin özellikleri* (Homayun, Lin ve Choi, 2019b) 7
Tablo 2.3. *Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri* (A. Kumar ve Dixit, 2017) 9
Tablo 2.4. *PNP'lerde kullanılan polimerler* (Vauthier ve Bouchemal, 2009) 10
Tablo 2.5. *KLN sistemlerinin üstünlük ve sakıncaları* (S. Kumar ve Randhawa, 2013) 16
Tablo 2.6. *KLN formülasyonlarında sıkça kullanılan lipitler* (Gordillo-Galeano ve Mora-Huertas, 2018) 16
Tablo 4.1. *HPLC analiz koşulları* 26
Tablo 4.2. *PNP formülasyonları bileşenleri* 29
Tablo 4.3. *KLN formülasyonları bileşenleri* 33
Tablo 5.1. *Seri 1 HPLC sonuçları* 40
Tablo 5.2. *Seri 2 HPLC sonuçları* 40
Tablo 5.3. *Seri 3 HPLC sonuçları* 40
Tablo 5.4. *Seri 4 HPLC sonuçları* 41
Tablo 5.5. *Seri 5 HPLC sonuçları* 41
Tablo 5.6. *Seri 6 HPLC sonuçları* 41
Tablo 5.7. *6 serinin ortalama Alan/R_t değerleri* 42
Tablo 5.8. *50 µg/mL için doğruluk çalışması (n=3)* 43
Tablo 5.9. *100 µg/mL için doğruluk çalışması (n=3)* 43
Tablo 5.10. *150 µg/mL için doğruluk çalışması (n=3)* 43
Tablo 5.11. *50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarında tekrar edilebilirlik çalışması 1. gün (n=3)* 44
Tablo 5.12. *50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarında tekrar edilebilirlik çalışması 2. gün (n=3)* 44
Tablo 5.13. *50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarında tekrar edilebilirlik çalışması 3. gün (n=3)* 44
Tablo 5.14. *IND gün içi ve günler arası kesinlik çalışması sonuçları* 45
Tablo 5.15. *P-2 formülasyonuna ilişkin parçacık büyüklüğü ve dağılımı değerleri* ... 51
Tablo 5.16. *P-2 formülasyonuna ilişkin zeta potansiyel değerleri* 52

Tablo 5.17. *PNP'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS)* 58
Tablo 5.18. *PNP'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS + %1 Tween® 80)* 58
Tablo 5.19. *Çalışılan grupların hücreler üzerinde etkili olduğu IC_{50} değerleri (µM) (n=3)* 61
Tablo 5.20. *KLN formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklük ve dağılımları* 64
Tablo 5.21. *KLN formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri* 65
Tablo 5.22. *KLN'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS)* 70
Tablo 5.23. *KLN'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS + %1 Tween® 80)* 71
Tablo 5.24. *Çalışılan grupların hücreler üzerinde etkili olduğu IC_{50} değerleri (µM) (n=3)* 73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°	Derece
µg	Mikrogram
^{1}H	Hidrojen
BDS	Bidistile su
C	Selsius
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
RLPO	Eudragit® RLPO
RSPO	Eudragit® RSPO
FK	Fiziksel karışım
Form.	Formülasyon
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
g	Gram
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konsülü
İTS	İlaç taşıyıcı sistem
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MeOH	Metanol
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
Ort	Ortalama
PBS	Fosfat tamponu
R^2	Determinasyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
Rt	Alıkonma süresi

SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SH	Standart hata
sn	Saniye
SS	Standart sapma
V	Volt
YEM	Yüzey etkin madde
YBH	Yüksek basınçlı homojenizasyon

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde nanoteknolojinin ilerlemesiyle birlikte nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler hızla geliştirilmekte ve dünya ilaç pazarında da çok çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanotaşıyıcılar, çok düşük boyutlara sahip olmaları, buna bağlı olarak yüzey alanlarının geniş olması ve fizikokimyasal özelliklerinin uygunluğu açısından nanoteknolojik çalışmaların büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır.

İndometazin (IND), indol asetik asit yapısına sahip, aktivitesi çok yüksek, antipiretik, analjezik ve non-steroidal antiinflamatuvar (NSAİİ) özellikte etkin maddedir. Akut gut, travmatik sinovit, akut bursit, akut tendinit vb. ciddi hastalıklarda ve osteoartrit, ankilozan spondilit, romatoid artrit vb. ciddi romatizmal hastalıkların tedavisi amacıyla yaygınca kullanılmaktadır. Fakat terapötik etkinin görülebilmesi için dozlamanın sıklaştırılması ve bunun sonucunda pek çok yan etkinin (renal, kardiyovasküler vb.) görülmesi, ek olarak özellikle gastrointestinal sistem (GİS) hasarı kaçınılmaz olmaktadır. Bu bilgiler ışığında bu tez çalışması kapsamında IND yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmek, geliştirilen nanopartiküler sistemleri karakterize etmek ve sağlıklı epitel hücreleri üzerinde hazırlanan formülasyonların test edilmesi planlanmıştır.

Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler ile sık dozlamanın azaltılması ve kullanılacak polimerler ile yan etki profilinin azaltılması planlanmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler, özet olarak, bir farmasötik bileşiğin insanlar ve hayvanlar üzerinde terapötik etki oluşturmak adına kontrollü şekilde uygulandığı sistemlerdir. Boyutları 1-1000 nanometre arasında değişkenlik gösteren, doğal ya da sentetik yağ ya da polimerlerden üretilen, küresel, katı koloidal partiküllerdir. Etkin madde matriks içinde çözündürülebilir, enkapsüle edilebilir veya nanopartiküle tutundurulabilir.

IND, prostaglandinlerin (PG) sentezini durdurarak antiinflamatuvar etkinlik göstermektedir. IND'nin ilk kullanımından şimdiye kadar görülen yan etkilerine rağmen

dünyada ve ülkemizde geleneksel kapsül ve uzatılmış salımlı kapsül, supozituvar, kolir vb. dozaj formları mevcuttur. IND içeren yeni ilaç taşıyıcı sistem formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik çok fazla miktarda çalışmalar gerçekleştirilmiş olup her geçen gün bu çalışmalara yenileri eklenmekte, yine de yan etkilerin önüne geçilmiş bir sistem hazırlanamamıştır.

Tez çalışması kapsamında hedeflenen yan etki profilini minimuma indirip dozlama aralığını arttırmaktır. Tez çalışmasında biyouyumlu polimer ve katı lipitler kullanarak farklı taşıyıcı sistemler hazırlanıp *in vitro* karakterizasyon testleri ile karşılaştırılacaktır. Hazırlanacak formülasyonların partikül boyut ve dağılımları, elektriksel yükleri, morfolojik özellikleri, enkapsülasyon etkinlikleri (%EE), *in vitro* salım profilleri ve hücre kültürü çalışmaları yapılacaktır.

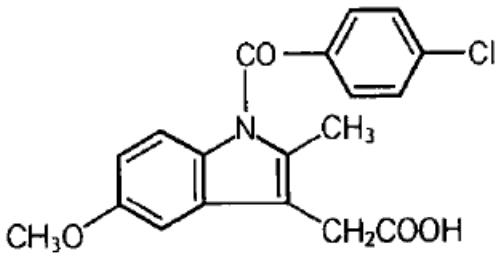
2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. İndometazin

IND (kimyasal isimlendirmesiyle 1-(p-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metilindol-3-asetik asit), antipiretik - analjezik etkili, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) sınıfına dahil bir ilaçtır (Helleberg, 1981). Kullanım alanı çok geniş olmakla birlikte romatoid artrit, ankilozan spondilit, osteoartrit, akut bursit ve akut tendinit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde aktif olarak kullanılmaktadır (Brien, Mccauley ve Cohen, 1984).

2.1.1. Fiziksel ve kimyasal özellikleri

Literatür bilgileri, IND'nin molekül ağırlığını 357.791 g/mol olarak vermektedir. Kapalı förmülü $C_{19}H_{16}ClNO_4$ olan IND'nin kimyasal okunuşu 1-(p-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metilindol-3-asetikasit şeklindedir. IND açık formülü **Şekil 2.1**'de verilmiştir. IND kristal yapıda olup polimorfizm özelliği göstermektedir ve formlardan biri yaklaşık 155°C'de, diğeri ise yaklaşık 162°C'de oluşmaktadır (Valentovic, 2007).



Şekil 2.1. *IND'nin açık kimyasal formülü* (Brien vd., 1984)

2.1.2. IND farmakolojik özellikleri

NSAİİ grubu ilaçların etki mekanizması, genel anlamda siklooksijenaz (COX) enzimini inhibe ederek araşidonik asitten hareketle prostaglandin sentezini azaltmaya dayanmaktadır. COX enzimi, COX-1 ve COX-2 isimli iki adet izoforma sahiptir. COX-

1 neredeyse bütün vücut hücrelerinde bulunmakta ve prostaglandin ve tromboksan A2 sentezinde; COX-2 ise yaralanma veya enflamasyon durumlarında rol oynamaktadır. NSAİİ grubu ilaçlar, genel anlamda hem COX-1 hem de COX-2 enzimine etki eden (non-selektif) ve yalnızca COX-2 enzimine etki eden olmak üzere iki ana kategoride incelenmektedir (Lucas, 2016). IND, COX-1 ve COX-2 enzimlerine etki etmesinden dolayı non-selektif NSAİİ olarak nitelendirilmektedir (Papich, 2016).

IND, romatoid artrit gibi birçok kronik hastalığın tedavisinde ve gut, kas – iskelet sistemindeki ağrılar gibi akut ağrılarda da sıklıkla kullanılan ilaçlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte IND kullanımında özellikle gastrointestinal sistem (GİS) üzerinde yan etki gösterdiği raporlanmıştır (Sava vd., 2021). Yapılan çalışmalarda tedavi süresi ile yan etki gözlenmesi arasında anlamlı bir orantının gözlenmemesi ile birlikte dozun azaltılması veya IND ile pirazol grubu bir ilacın kombine kullanılması yan etkileri azaltmaktadır (Boardman ve Hart, 1967).

IND oral yolla alındığında çok hızlı emilim göstermekte ve 1 ila 2 saat içerisinde maksimum plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır. Oldukça lipofilik yapısı sayesinde kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebilmekte, fakat serum albümine yüksek oranda bağlanması sebebiyle beyin-omurilik sıvısına geçişi sınırlanmaktadır (Villar-Martínez vd., 2021). Yapılan çalışmalar IND'nin %90 ila %99 oranında plazma proteinlerine bağlandığını göstermektedir. IND, plasentaya yüksek oranda, anne sütünde düşük oranda ve beyin veya tükürüğe ise eser miktarlarda geçmektedir (Yeh, 1982).

Yarı ömrü 1,5 saat ila 16 saat arasında değişiklik göstermekle birlikte ortalama 7 saat olarak kabul edilmektedir. Yarı ömrü hakkındaki bu geniş aralık, düzensiz enterohepatik döngüsünden kaynaklanmaktadır (Villar-Martínez vd., 2021). IND, karaciğerde hidrolize uğradıktan sonra öngörülemez ve nadiren de olsa tekrar emilim gösterebilmektedir. Bunula birlikte IND plazma konsantrasyonunda dalgalanmalar gözlenmekte ve buna bağlı olarak yarı ömrü değişebilmektedir. Bunun önüne geçebilmek adına doz sayısının arttırılması tercih edilmektedir (Yeh, 1985).

Yapılan çalışmalarda IND'nin biyotransformasyonu, glukuronid-konjugat oluşumu ağırlıkta olmak üzere O-demetilasyon ve N-açilasyon üzerinden yürümektedir. Metabolitler plazmada gözlenebilirken konjugatlar ve konjugat metabolitleri plazmada görülmemektedir. Bununla birlikte metabolitlerin antiinflamatuvar etkileri bulunmamaktadır (Helleberg, 1981).

IND'nin analjezik etkisi alındıktan yaklaşık 30 dakika sonra başlamakta ve 4-6 saat etkisi sürmekte, tam antiinflamatuvar etkisi 7 gün içerisinde başlamakta ve 1-2 hafta etkisini sürdürmektedir. Gut tedavisinde 24-36 saat içinde başlayıp 3-5 gün içinde etkisini tam olarak göstermektedir. Romatoid artrit tedavisinde maksimum günlük doz 150-200 mg ve bursit veya tendonit tedavisinde ise günlük 75-150 mg olarak uygulanmaktadır. Duktus arteriyozus tedavisinde ise intravenöz olarak 0,2 mg/kg kullanılmakta, eğer hasta 2 günlükten daha küçükse ilk doz olarak 0,2 mg/kg ve sonraki 2 doz 12-24 saat arayla 0,1 mg/kg uygulanmaktadır (Valentovic, 2007).

IND'nin böbrek yetmezliği olan hastalarda kullanımı önerilmemekte ve karaciğer yetmezliği olan hastalarda ise kullanımında dikkatli olunmalıdır. Hamileliğin özellikle 3. trimesterinde kullanılmamalı ve emziren annelerde ise anne sütüne düşük dozda geçmesine bağlı olarak kullanımı kabul edilmekle birlikte başka alternatifler önerilmektedir. Koroner arter bypass greft cerrahisi öyküsü olan hastalarda ise diğer NSAİ ilaçlar gibi IND kullanımı kontrendikedir ve kullanılmamalıdır (http-1).

2.1.3. IND miktar tayini metotları

IND miktar tayininde en çok kullanılan analitik yöntemler arasında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), UV - görünür bölge spektrometrisi, sıvı kromatogrofi-kütle spektrometrisi (LC-MS), misel elektrokinetik kromatografi (MEKC) ve gaz kromatografisi (GC) gösterilebilmektedir (Dandić vd., 2022a).

2013 yılında yapılan bir çalışmada oküler kullanım hedeflenerek IND yüklü katı lipit nanopartikül (KLN) sistemi geliştirilmiş ve KLN'lerdeki IND miktar tayini için metanol:su:ortofosforik asit (70:28.05:0.05) mobil faz bileşimi kullanılarak 270 nm dalga boyunda HPLC ile gerçekleştirilmiştir (Hippalgaonkar vd., 2013).

IND yüklü KLN geliştirmeye dayanan bir diğer çalışmada ise KLN hazırlanmasında mikrodalga yöntemi kullanılmış, mobil faz olarak metanol:sodyum fosfat (90:10) kullanılarak 318 nm dalga boyunda HPLC ile ölçümler gerçekleştirilmiştir (Shah vd., 2022).

Polimerik nanopartikül (PNP), nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLC) ve KLN sistemlerinin karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise IND miktar tayini için UV-görünür bölge spektrometrisi kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlar 230-350 nm dalga boyları arasında ölçülmüştür (Lúcio vd., 2015).

2005 yılında yapılan bir çalışmada ise IND yüklü KLN ve NLC formülasyonları geliştirilerek diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile karakterizasyonları hedeflenmiş, miktar tayini için UV-görünür bölge spektrometrisi kullanılarak 319 nm dalga boyunda ölçümlerin yapıldığı bildirilmiştir (Castelli vd., 2005).

2.1.4. IND içeren ticari preparatlar

Daha önceki tarihlerde daha fazla farmasötik şekilde piyasada bulunan IND, günümüz itibariyle yalnızca kapsül ve supozituvar formunda piyasada bulunmaktadır. Halihazırdaki ticari preparatları **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. *IND içeriğine sahip müstahzarlar (http-2)*

Preparat	Firma	Farmasötik form
Endol ®	Deva Holding A.Ş.	25 mg IND içeren kapsül
		100 mg IND içeren supozituvar

2.2. Oral Yoldan İlaç Uygulanması

Oral yoldan ilaç uygulanması, diğer uygulama yollarına göre daha yüksek hasta uyuncu, daha az maliyetli üretim koşulları ve daha kolay uygulanabilirlik açısından daha fazla tercih edilmektedir (Sastry, Nyshadham ve Fix, 2000). Bu üstünlüklerine ek olarak oral yoldan hem sistemik hem de lokal etki görülebilmesi de sayılabilmektedir. Her ne kadar fazla sayıda üstünlüğe sahip olsa da düşük çözünürlük, düşük permeabilite, gastrointestinal sistem (GİS) içerisinde hızlı degredasyona uğrama gibi sakıncaları da bulunmaktadır (Xu vd., 2020).

Oral kullanılan ilaçlar, ana yolu transselüler olmak üzere, transsellüler geçiş, parasellüler geçiş, aktif transport ve kolaylaştırılmış difüzyon olmak üzere dört farklı yolla emilime uğrayabilirler. Etkin madde emilim/etki oranı, bağırsak bariyeri ile bağırsak epitelinden emilimi sonrası hepatik bariyerler ile doğrudan ilişkilidir. Yavaş emilim ve birden fazla engel yüzünden acil durumlar için oral yoldan ilaç kullanımı uygun olmamaktadır (Homayun, Lin ve Choi, 2019a).

Tablo 2.2. *İnsanda gastrointestinal yolun bölümlerinin özellikleri* (Homayun, Lin ve Choi, 2019b)

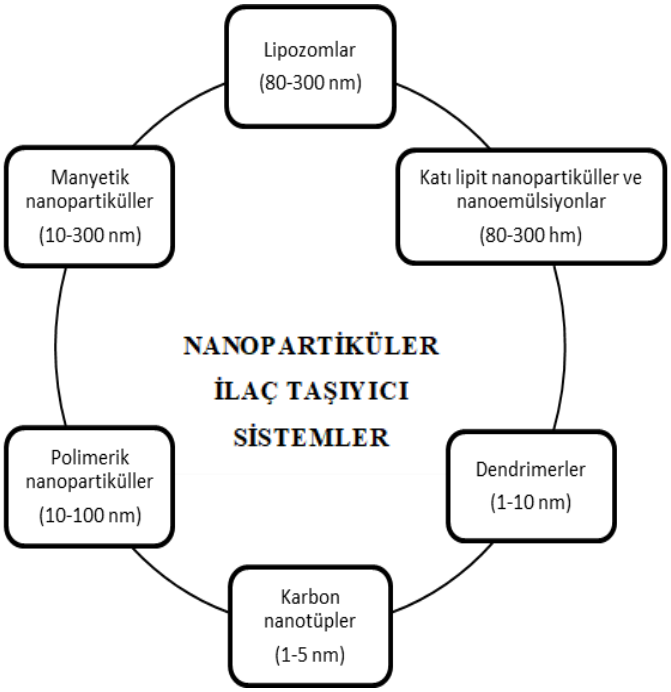
Bölüm	pH	Uzunluk (cm)	Ortalama çap (cm)
Mide	0.8-5	20	Ölçülemez
Duodenum	~7	17-56	4
Jejenum	≥7	28-1000	2-2.5
İleum	≥7	28-1000	3
Kolon	7-8	80-313	4-4.8

Gastrointestinal yol, oral ilaç taşıyıcı sistemler için fizyolojik ve kimyasal olarak bir bariyer etkisi yaratmaktadır (Basha vd., 2021). Oral yolla ilaç uygulamasının karşılaşabileceği engel ve faktörleri elimine etmek veya bu faktörlerin etkisini azaltmak, sağlıklı ve patolojik gastrointestinal sistemlerin daha iyi tanınmasına bağlı olarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla araştırmalar, multipartiküler dozaj sistemleri gibi yeni dozaj formlarına yoğunlaşmıştır (Hua, 2020).

2.3. Nanopartiküler Sistemler

Nanopartiküller, bir iç faz ve 1000 nanometreden küçük boyutta aktif bileşen içeren bir dış fazdan oluşan (Wilczewska vd., 2012), uzun raf ömrü ve sonrasında katı dozaj şekillerine kolaylıkla dönüştürülebilen sıvı dispersiyon sistemleridir. Formülasyonlarında su, etkin madde ve en az bir adet kullanımı güvenli sayılan yardımcı madde bulunmaktadır (Merisko-Liversidge ve Liversidge, 2008).

Piyasaya sunulan yeni etkin maddelerin neredeyse yarısının suda çözünürlük özelliğinin düşük olmasından kaynaklı problemler açısından nanopartikül sistemlerinin kullanımı daha da artmıştır. Nanopartiküllere yüklenen etkin maddeler, çevresel faktörlerden korunmakta ve nanopartikül bileşenlerinin bulunduğu matrisle birlikte suda daha iyi çözünme yetisi kazanabilmektedir. Bununla birlikte geleneksel dozaj şekillerinin olası yan etki riskini düşürmekte, hedeflendirmeye uygun olmaları ve ilk geçiş etkisini ortadan kaldırabilme ihtimalleri ile etkin maddenin toksik etkilerini azaltmaktadırlar (Sobczyński ve Bielecka, 2019).



Şekil 2.2. *Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler* (Wilczewska vd., 2012)

Nanopartiküllerin eldesi için çok fazla yöntem bulunmakla beraber bu yöntemler kondenzasyon, kimyasal sentez ve fiziksel yöntemler olarak üç ana başlıkta incelenebilmektedir (Holister vd., 2003). Sentez yöntemi olarak ise çoğunlukla kullanılan yöntemler polimer dispersiyonu, monomer polimerizasyonu ve iyonik jelasyon veya koaservasyon gösterilebilmektedir (Mohanraj ve Chen, 2007).

Nanopartikül karakterizasyonu, *in vivo* uygulama için hayati önem taşımaktadır (Reddy vd., 2012). Önemli karakterizasyon parametreleri olarak partikül şekil, büyüklük ve dağılımı, yüzey alanı, kararlılık, dağılım özellikleri ve saflık gösterilebilmektedir (A. Kumar ve Dixit, 2017).

Tablo 2.3. *Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri* (A. Kumar ve Dixit, 2017)

Morfolojik	Yüzey özellikleri	Kimyasal	Elektriksel	Optik	Biyolojik
Dinamik ışık dağılımı	X-Işını kristalografisi	UV-Görünür bölge spektroskopisi	Zeta potansiyel	Mikroskopi	*İn vivo*
Elektron mikroskopisi	Brunauer-Emmett-Teller (BET) analizi	Enerji dağılımlı X-Işını spektroskopisi	Voltametri	Raman spektroskopisi	*İn vitro* hücre kültürü
Atomik kuvvet mikroskopisi		FT-IR analizi			Mikrobiyal koloni kültürü

2.4. Polimerik Nanopartiküller (PNP)

Polimerik nanopartiküller, partikül çapı 10 ila 100 nm arasında değişebilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Wilczewska vd., 2012). Nanoküreler ve nanokapsüller olmak üzere iki ana çeşitte incelenebilmektedir. Etkin maddenin polimerik bir çekirdek içerisinde çözünmüş veya dağılmış haldeki sistemler nanoküreler, polimerik olmayan bir çekirdekte çözünmüş veya dağılmış etkin maddenin polimerik bir membran tarafından çevrelenmiş haldeki sistemler ise nanokapsüller olarak adlandırılmaktadır (Müderrisoğlu ve Çomoğlu, 2010). PNP'lerde kullanılan polimerlerin toksik olmayan, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olmaları gerekmektedir (Bhatia, 2016).

Tablo 2.4. *PNP'lerde kullanılan polimerler* (Vauthier ve Bouchemal, 2009)

Sentetik polimerler	Doğal polimerler	Kopolimerler
Polilaktik asit (PLA)	Kitosan	Polilaktik asit – polietilen glikol (PLA-PEG)
Poli-laktik ko-glikolik asit (PLGA)	Aljinat	PLGA-PEG
Poli-ε-kaprolakton (PCL)	Jelatin	PCL-PEG
Poliakrilat ve polimetakrilat türevleri (Eudragit®)	Albümin	

2.4.2. Polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri

PNP hazırlanmasında çok sayıda farklı yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler genel olarak nanoçöktürme, çözücü emülsifikasyonu/uçurma, mikroemülsiyon, çift emülsiyon (Nasirizadeh ve Malaekeh-Nikouei, 2020), tuz ile çöktürme, çözücü deplasman/çöktürme yöntemi ve süperkritik akışkan yöntemleri olarak sıralanabilmektedir (Bhatia, 2016).

2.4.2.1. *Nanoçöktürme yöntemi*

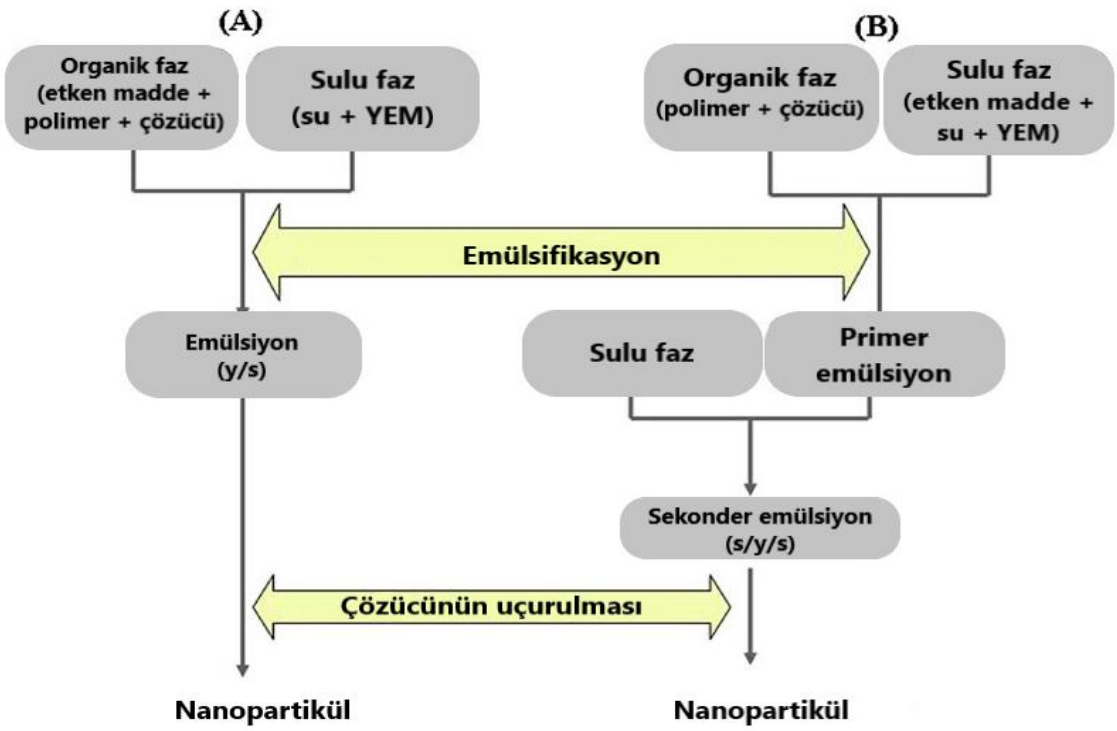
Çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da anılan nano çöktürme yöntemi, basitliğiyle ve ekonomik açıdan uygun olup tekrarlanabilir olmasıyla öne çıkan bir yöntemdir. Bu yöntemde bir polimer, polimerin çözünebildiği bir çözücü ve polimerin çözünmediği başka bir çözücü kullanılmaktadır. Polimer çözücüsü olarak su ile kolayca karışabilir ve uçurulabilir organik çözücülerden seçilmektedir (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

Bu yöntemle elde edilen nanopartiküllerdeki enkapsülasyon yüzdesi genel olarak hidrofilik etkin maddeler için en az %40, lipofilik maddeler için ise en az %90 olarak söylenebilmektedir. Daha öncelerde yalnızca polimerik nanopartiküller için tercih edilen nanoçöktürme yöntemi, günümüzde lipit nanopartikül ve polimer-lipit nanopartikül üretiminde sıkça kullanılmaktadır (Iván Martínez-Muñoz ve Elizabeth Mora-Huertas, 2022).

Nano çöktürme yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin çapı ve enkapsülasyon oranı organik faz/sulu faz oranına, organik fazın enjeksiyon hızına ve sistemin karıştırılma hızına bağlıdır (Jiang, Abedi ve Shi, 2021).

2.4.2.2. *Emülsifikasyon – çözücü uçurma yöntemi*

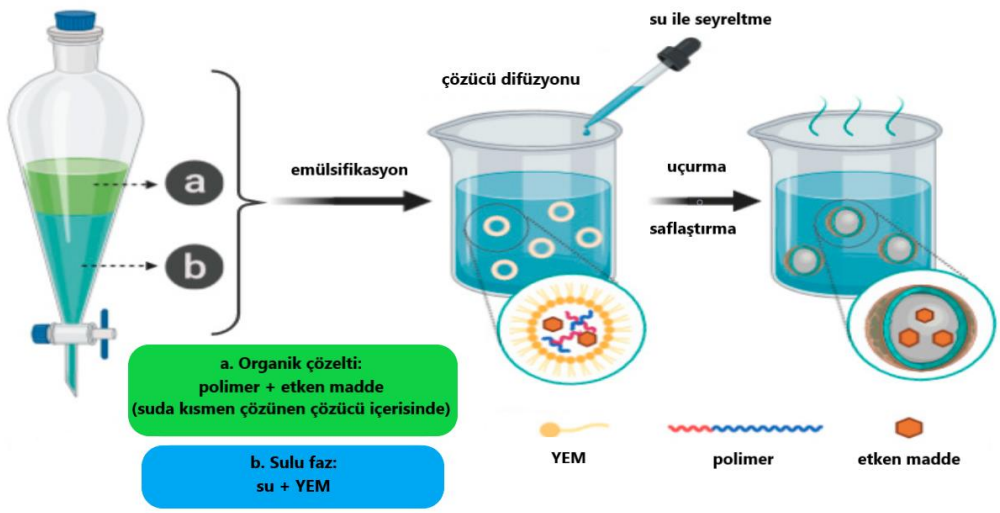
Bu yöntemde polimer, organik bir çözücüde çözündürülerek sulu faz içerisinde yüzey etkin madde varlığında yüksek hızlı homojenizatör kullanılarak veya ultrasonikasyon ile disperse edilmekte, sonrasında ise organik çözücü uçurularak bir nanosüspansiyon oluşturulmaktadır (Crucho ve Barros, 2017). Sonrasında bu nanosüspansiyon santrifüj edilerek ve suyla yıkanarak liyofilize edilebilmektedir (El-Say ve El-Sawy, 2017).



Şekil 2.3. *Tek emülsiyon (A) ve çoklu emülsiyon (B) teknikleri ile nanopartikül eldesinin şematik gösterimi* (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

2.4.2.3. *Emülsifikasyon – çözücü difüzyonu yöntemi*

Bu yöntem su içerisinde yağ (y/s) tipinde emülsiyon oluşturmaya dayanır ve bileşimindeki sıvı fazların ilk termodinamik dengeyi korumak adına enkapsüle eden polimer, suda yüksek oranda çözünmeyen propilen karbonat ya da benzil alkol gibi bir solvan içinde çözündürülerek suyla doyurulur. Sonrasında polimer ve suyla doygun hale gelen çözücü fazı, YEM ihtiva eden sulu faz ile emülsifiye edilerek çözücü fazının dış faza difüze olması sağlanır ve yağ – polimer oranına bağlı olarak nanoküre veya nanokapsül elde edilir. Son adım olarak çözücü filtrasyon veya uçurmayla ortamdan uzaklaştırılır (Bhatia, 2016).



Şekil 2.4. *Emülsifikasyon – çözücü difüzyonu yönteminin şematik gösterimi* (Zielinska vd., 2020)

2.4.2.4. *Tuz ile çöktürme (salting out) yöntemi*

Bu yöntem, etkin madde ve polimer içeren organik bir çözeltinin elektrolitler ile doygunluğa getirilmiş sulu faz ile emülsifikasyonuna dayanmaktadır. Polimer ve suyla karışabilen organik çözücünün kullanıldığı organik faz, doygun sulu faz ile karıştırıldığında tuzla çöktürme etkisi organik çözücü ile suyun karışmasını engellemekte, buna bağlı olarak ise y/s tipinde kararlı bir emülsiyon oluşmaktadır. Oluşan emülsiyona

yüksek miktarda su eklenerek seyreltme gerçekleştirildiğinde ise tuzla çöktürmenin ters etkisi ortaya çıkarak kullanılan organik çözücünün su fazına geçmesi sağlanmakta, böylece nanopartikül oluşumu elde edilmektedir (E. Sah ve Sah, 2015).

Organik çözücü olarak tetrahidrofuran ve aseton, elektrolit olarak magnezyum klorür, magnezyum asetat ve kalsiyum klorür sıkça kullanılmaktadır. Karıştırma hızı, iç ve dış faz oranları, kullanılan polimer yüzdesi, kullanılan YEM ve elektrolit konsantrasyonu bu yöntem için önemli parametrelerdir (Sarcan, Silindir-Gunay ve Ozer, 2018).

2.4.2.5. *Süperkritik akışkan teknolojisi*

Bu yöntem, diğer yöntemlerde organik çözücülerin kullanılmasına bağlı olarak toksisite riskinin olması ve süperkritik akışkanların daha güvenli olması sebebiyle PNP hazırlanmasında alternatif bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır. Süperkritik akışkanlar kullanılarak çok sayıda yöntem geliştirilmesine rağmen en yaygın kullanılanlar arasında süperkritik anti-çözücü (SAS) ve süperkritik çözeltinin sürekli genleşmesi (RESS) yöntemleri gösterilebilir. Bu teknoloji, doğaya karşı daha güvenli olmasına rağmen özel ekipman gerektirmesi sebebiyle oldukça pahalı yöntemlere sahiptir (Bhatia, 2016).

2.4.2.6. *Koaservasyon yöntemi*

Koaservasyon, bir kolloidal sistemin pH değeri veya sıcaklığı gibi fizikokimyasal şartlarının değiştirilmesiyle polimerce zengin faz olan koaservat fazı ve daha seyreltik olan süpernatan fazı olmak üzere iki faza ayrılması olarak tanımlanmaktadır (Blackman vd., 2019). Enkapsülasyon işlemi esnasında karıştırma hızına ve kullanılan polimerin cinsi ve oranına bağlı olarak nanoküreler ve agregatlar halinde nanopartiküller elde edilmektedir. Maliyetinin düşük olması, toksik organik çözücü kullanılmaması, yüksek oranda etkin madde yüklenebilmesi ve enkapsülasyon yüzdesinin yüksek olması bu yöntemin avantajları arasındadır (González-Monje vd., 2021).

2.4.2.7. *Diyaliz yöntemi*

Diyaliz yöntemi, nanoçöktürme yöntemiyle oldukça benzerdir, tek farkları diyaliz yönteminde etkin madde ve polimerin organik çözücüdeki çözeltisinin bir diyaliz membran içinde yer almasıdır. Organik faz, diyaliz tüpünde sulu faza difüze olmakta ve buna bağlı olarak fazların yer değiştirmesi söz konusu olmaktadır. Bu işlem sırasında ise polimer çözünürlüğü düşmekte ve sonuç olarak polimer ve etkin madde kümeler halinde çökerek nanopartikülleri oluşturmaktadır (Sur vd., 2019a).

2.4.3. PNP karakterizasyonu

2.4.3.1. *Partikül boyut ve morfolojisi*

Nanopartikül karakterizasyonu için partikül boyutu tayini büyük önem taşımakta ve partikül boyutu yüksek oranda kullanılan eksipiyanlara, polimere ve yönteme bağlıdır. Partikül boyutu ve morfolojisi tayini için temel olarak foton korelasyon spektroskopisi ve elektron mikroskobu kullanılmaktadır (Sur vd., 2019b).

Partikül boyutu büyüdükçe etkin madde yükleme kapasitesi artarken salım hızı düşmektedir. Partikül boyutu azaldıkça yüzey alanı artmakta ve böylelikle ilaç salımı daha hızlı gerçekleşmekte; buna karşın depolanma ve taşınma sırasında agregat oluşumu söz konusu olabilmektedir. Yine de partikül boyutu küçüldükçe sistemin kararlılığı artmaktadır (Bhatia, 2016).

2.4.3.2. *Zeta potansiyel*

Zeta potansiyel, nanopartikül yüzeyindeki yükün ölçümüdür. Zeta potansiyel değeri, nanopartiküler sistemin kararlılığını doğrudan etkilemektedir. Ayrıca sistemin pH değeri de zeta potansiyeli etkilemektedir (Sur vd., 2019b).

2.4.3.3. *Etkin madde yüklenmesi ve enkapsülasyon*

İdeal bir nanopartiküler sistemin içerdiği etkin maddenin olabildiğince yüksek ve etkin maddenin bulunduğu matris ve diğer materyallerin olabildiğince düşük miktarda olması gerekmektedir. Etkin madde, nanopartikül oluşturma esnasında veya nanopartikül oluşumundan sonra adsorbe veya absorbe edilmek suretiyle iki ayrı yöntem ile yüklenebilmektedir (Mohanraj ve Chen, 2007).

Enkapsülasyon yüzdesi ve etkin madde yüklenme oranı denklem (2.3)'e göre hesaplanır.

$$\text{Enkapsülasyon yüzdesi} = \frac{\text{toplam em miktarı - serbest em miktarı}}{\text{toplam em miktarı}} \times 100$$

$$\text{Yüklenme oranı} = \frac{\text{enkapsüle edilmiş toplam em miktarı}}{\text{toplam nanopartikül ağırlığı}} \times 100 \qquad (2.3)$$

2.3.4. PNP'lerin üstünlükleri

Polimerik nanopartiküllerin üstünlükleri, genel anlamda partiküllerin nano boyutta olması ve hazırlanmalarında biyobozunur maddelerin kullanılmasından dolayı karşımıza çıkmaktadır. Bu iki özellik sayesinde vücuttaki toksisite azalmakta ve ilacın hedeflenen bölgede uzun süre salımı gerçekleşebilmektedir. Diğer üstünlükleri arasında etkin madde yüklenme kapasitelerinin yüksek olması, üretim tekniklerinin kolay ve ucuz olması, oral yolla verildiğinde ilacın biyoyararlanımının artması gibi özellikleri sayılabilmektedir (Derman, Kızılbey ve Akdeste, 2013).

2.4. Katı Lipit Nanopartiküller (KLN)

Katı lipit partiküller, oda sıcaklığında katı halde bulunan, polar olmayan lipitlerin kolloidal dispersiyonları olarak tanımlanabilir (Mirchandani, Patravale ve Brijesh, 2021). Katı lipit nanopartiküller, düşük polimer toksisitesi, görece daha ucuz bileşenlere sahip olması ve organik çözücülerin kullanılmaması açısından diğer nanopartiküler ilaç taşıyıcı

sistemlerden ayrılmakta ve diğer sistemlere göre daha uygun ilaç salım profili göstermektedir (S. Kumar ve Randhawa, 2013).

Tablo 2.5. *KLN sistemlerinin üstünlük ve sakıncaları* (S. Kumar ve Randhawa, 2013)

Üstünlük	Sakınca
Salım kontrolü	Düşük yüklenme oranı
Hedeflendirme	Soğutma sırasında enkapsülasyon bozunumu
Yüksek kararlılık	Soğutma esnasında kristalizasyon
Işığa duyarlı maddelerle çalışabilirlik	Soğutma esnasında polimorfik değişimler
Aside dirençsiz maddelerle çalışabilirlik	

2.4.1. KLN formülasyonları

Formülasyonda kullanılan lipitler başlıca yağ asitleri (stearik asit vb.), yüksek saflıkta trigliseritler (tripalmitin vb.) ve vücut ısısında erimeyen balmumlarıdır (setil palmitat vb.). Yağ fazı ve su fazı arasındaki yüzey gerilimini düşürmek adına YEM (Polisorbat 80 vb.) kullanılmaktadır. KLN formülasyonları yaklaşık %0,1-30 (a/a) lipit ve %0,5-5 (a/a) YEM içerirler. Uygun lipit ve YEM seçimi, formülasyonun parçacık boyutu, kararlılığı, etkin madde yüklenme oranı ve salım özellikleri açısından büyük önem arz etmektedir (Katopodi ve Detsi, 2021).

Tablo 2.6. *KLN formülasyonlarında sıkça kullanılan lipitler* (Gordillo-Galeano ve Mora-Huertas, 2018)

Monogliserit türevleri	Trigliserit türevleri	Yağ asitleri	Yağ alkolleri	Karışımlar	Balmumları
Gliseril monostearat (Geleol®)	Tricaprin (Dynasan®110)	Stearik asit	Stearil alkol	Witepsol®W35*	Setil palmitat
Gliseril behenat (Compritol® 888 ATO)	Trilaurin (Dynasan®112)	Oleik asit	Setil alkol	Witepsol®H35**	Beyaz balmumu
Gliseril palmitostearat (Precirol® ATO 5)	Trimiristin (Dynasan®114)	Palmitik asit	Lauril alkol	Miglyol®812***	Karnauba mumu
	Tripalmitin (Dynasan®116)	Behenik asit			
	Tristearin (Dynasan®118)				

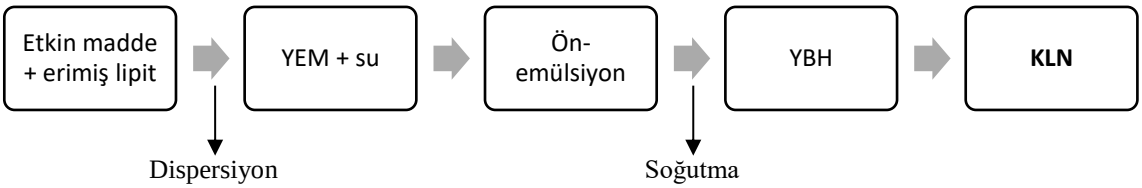
* %65-80 oranında trigliserit, %10-35 digliserit ve %1-5 monogliserit karışımı.
** Trigliserit, en fazla %15 oranında digliserit, en fazla %1 oranında monogliserit karışımı.
*** Orta zincirli kaprilik/kaprik trigliserit karışımı.

2.4.2. KLN hazırlama metotları

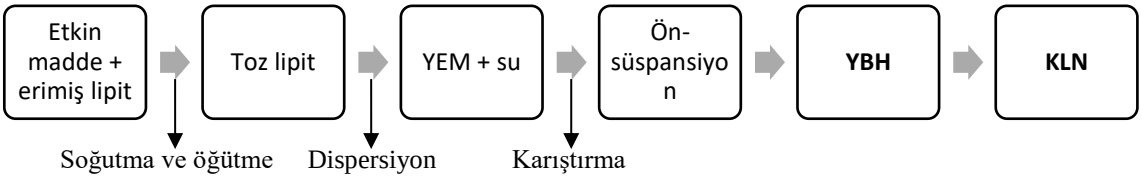
KLN formülasyonları; yüksek basınçlı homojenizasyon (YBH), çözücü emülsifikasyonu/uçurma yöntemi, çözücü enjeksiyonu yöntemi, mikroemülsiyon yöntemi, çift emülsiyon yöntemi, liyofilizasyon ve püskürterek kurutma yöntemleri gibi çok sayıda farklı yöntemle hazırlanabilmektedir (Nasirizadeh ve Malaekeh-Nikouei, 2020).

2.4.2.1. *Yüksek basınçlı homojenizasyon*

YBH yöntemi, genel anlamda iki şekilde gerçekleşmektedir. Sıcak homojenizasyon yönteminde lipit, normal erime derecesinin az üzerindeki sıcaklıkta eritilerek etkin maddenin içinde çözündürülmesi sağlanır. YEM içeren sulu faz da aynı sıcaklığa getirilerek bir karıştırıcı yardımıyla y/s tipinde bir ön-emülsiyon oluşturulur. Elde edilen bu ön-emülsiyon, lipidin erime derecesinden daha yüksek bir sıcaklıkta yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilip 25°C'ye (oda sıcaklığına) kadar soğutulur ve sonuçta katılaşan damlacıklar katı lipit nanopartikülleri oluşturur. Soğuk homojenizasyon yönteminde ise etkin madde, eritilen lipitte çözündürülerek soğutulur. Karışım toz edilerek elde edilen toz lipitler, su ve YEM karışımında disperse edilir. Elde edilen dispersiyon, en yüksek oda sıcaklığında olmak üzere yüksek basınçlı homojenizatör ile homojenize edilir (Demirel ve Yazan, 2000).



Şekil 2.5. *Sıcak homojenizasyon YBH yöntemi* (Nasirizadeh ve Malaekeh-Nikouei, 2020)



Şekil 2.6. *Soğuk homojenizasyon YBH yöntemi* (Nasirizadeh ve Malaekeh-Nikouei, 2020)

2.4.2.2. *Çözücü emülsifikasyonu/uçurma yöntemi*

Bu yöntemde lipit, suyla karışmayan organik çözücüde çözündürülür, YEM ve su karışımı ile emülsiyon hale getirilerek organik çözücü basınçlı ortamda uçurulur. Bu uçurulma sırasında lipit, suda çözünmediğinden dolayı sulu ortamda nanopartiküller halinde çöker. Bu yöntemin ana üstünlüğü herhangi bir şekilde bir ısıtma işleminden yararlanılmamasıdır. Diğer yandan bu yöntem, lipitlerin organik çözücüdeki düşük çözünürlüğü nedeniyle oldukça seyreltik süspansiyon eldesi veya organik çözücü kaynaklı toksisite risklerini de beraberinde getirmektedir (Trotta, Debernardi ve Caputo, 2003).

2.4.2.3. *Çözücü enjeksiyonu yöntemi*

Lipidin suyla karışmayan iki organik çözücü karışımında çözündürülmesi ve sürekli karıştırıldığı sırada sulu fazın düzenli olarak bir iğne yardımıyla enjekte edilmesi esasına dayanır. Bu yöntemde sulu fazda YEM kullanılmamaktadır. Enjeksiyon sonrasında oluşan dispersiyon süzülerek fazla lipit uzaklaştırılır (Schubert ve Müller-Goymann, 2003).

2.4.2.4. *Mikroemülsiyon yöntemi*

İlk işlem olarak erimiş lipit, etkin madde ve YEM kullanılarak bir mikroemülsiyon oluşturulur. Sonrasında bu mikroemülsiyon, soğuk suda disperse edilerek KLN

dispersiyonu elde edilir ve bu dispersiyon liyofilize edilerek veya ultrafiltrasyon yönteminden geçirilerek KLN formülasyonu elde edilmiş olur. Bu yöntemin ana sakıncası, kullanılan YEM miktarının çok yüksek olmasıdır. Kullanılan suyun sıcaklığı ve mikroemülsiyonun veriliş hızı KLN formülasyonunu doğrudan etkileyen faktörlerdir (Giri, 2019).

2.4.2.5. *Çift emülsiyon yöntemi*

Bu yöntem, etkin maddenin iç fazda kalmasını sağlamak ve organik çözücü uçurulurken etkin maddenin dış faza geçmesini engellemek esasına dayanmaktadır. Etkin madde, su ve YEM karışımı, erimiş lipit ve organik çözücü karışımı içerisinde yüksek hızlı karıştırma işlemiyle karıştırılarak s/y tipinde bir primer emülsiyon oluşturulur. Oluşturulan bu primer emülsiyon, içerisinde stabilize edici bir ajan barındıran sulu ortamda düşük derecelerde hızla karıştırılarak s/y/s tipinde bir çift emülsiyon elde edilir (Üner, 2006). Karıştırma sırasında belli bir süre sonra sıcaklık da arttırılarak organik çözücünün uçması sağlanır. Çözücü uçurulduktan sonra kalan kısım dondurularak kurutulur ve KLN elde edilmiş olur (Yassin vd., 2010).

2.4.2.6. *Ultrasonikasyon*

Ultrasonikasyon, genel anlamda nanoemülsiyon oluşturma işlemini akustik enerjiyle desteklemek için kullanılmaktadır. Eritilen lipit ve sulu fazın belirli bir amplifikasyon değerindeki ses enerjisine belirli süre maruz tutulması esasına dayanır. Uygulama süresi saniyelerle veya birkaç dakika ile kısıtlıdır, bunun sebebi oluşan nanoemülsiyonun maruz kaldığı enerji sebebiyle bir ısı artışı gözlenmesi olarak açıklanabilir. Bu artışın önüne geçilmesi için ultrasonikasyon işlemi düşük sıcaklıktaki ortamlarda gerçekleştirilebilir. Bu şekilde oluşturulan nanoemülsiyonlardaki partikül boyutu 100 nanometrenin altındadır ve bu da sistemin kinetik açıdan kararlı olmasını sağlamaktadır (Ahmad vd., 2018).

2.4.2. Katı lipit nanopartiküllerin karakterizasyonu

2.4.2.1. *Partikül boyutu ve zeta potansiyel*

Partikül boyutu birçok parametreye bağlı olarak değişmektedir. Bu parametreler başlıca formülasyon bileşimi, hazırlama yöntemleri ve hazırlama koşulları olarak gruplandırılabilmektedir. Formülasyon bileşimindeki YEM veya YEM karışımının oranı lipide oranla arttıkça oluşan partikül boyutu küçülmektedir. Aynı şekilde KLN hazırlama esnasında yüksek sıcaklıklarda çalışıldığında partikül boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir (Üner, 2006). Partikül boyutu ölçümleri foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ile belirlenebilmektedir. PCS ile aynı zamanda 0-1 arasında değer alan polidispersite indisi (PDI) de belirlenebilmektedir. Bu indis değeri 0'a yaklaştıkça daha homojen bir dağılımı ve 1'e yaklaştıkça geniş aralıklı dağılımı göstermektedir (Demirel ve Yazan, 2000). Zeta potansiyel ise süspansiyonun kararlılığı hakkında bilgi vermekte ve +25 mV'tan yüksek veya -25 mV'tan düşük bir değerde olması beklenmektedir. Zeta potansiyel ölçümleri ise dinamik ışın saçılım yöntemi (DLS) ile yapılmaktadır (Giri, 2019).

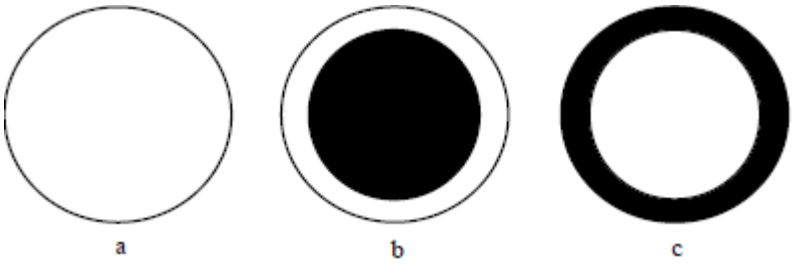
2.4.2.2. *Kristalizasyon*

Kristalizasyon sıcaklığı ve derecesi, formülasyonların kararlılığı ile etkin madde yüklenmesi ve salım profilini doğrudan etkilemektedir. Termodinamik davranışların incelenmesi adına diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve özellikle kullanılan materyallerin polimorfik durumlarının analizi için X-ışını kırınım defraktometresi (XRD) cihazları sıkça kullanılmaktadır (Özdemir, Çelik ve Üner, 2019).

2.4.2.3. *Etkin madde yüklenmesi ve enkapsülasyon*

Etkin maddenin yüklenme oranı erimiş lipitteki etkin maddenin çözünürlüğüne, erimiş etkin madde ile erimiş lipidin karışabilirliğine, katı lipit matrisin fizikokimyasal yapısına ve lipidin polimorfik durumuna bağlıdır. Etkin madde; katı lipit matriste dağılmış olarak,

lipit kabukla çevrili halde matrisin çekirdeğinde veya lipit çekirdeğin çevresindeki kabukta dağılmış olarak 3 farklı durumda bulunabilir (Üner, 2006).



Şekil 2.7. *KLN formülasyonlarında etkin maddenin bulunduğu konumlar: matriste dağılmış (a), lipit kabukla çevrili matris çekirdeğinde (b) ve lipit çekirdeğin çevresindeki kabukta dağılmış (c)* (Üner, 2006)

Enkapsülasyon yüzdesi (EE) ve etkin madde yüklenme yüzdesi (LE) için farklı yöntemler bulunmakla birlikte sıkça kullanılan yöntem santifüjleme ve süpernatan üzerinden miktar analizi gerçekleştirmektir.

$$\%EE = \frac{W_T - W}{W_T} \times 100$$

$$\%LE = \frac{W_T - W}{W_T + W_L - W} \times 100 \qquad (2.4)$$

Burada W_T toplam etkin madde miktarını, W süpernatantta boştaki etkin madde miktarını, W_L ise kullanılan toplam lipit miktarını temsil etmektedir (Yassin vd., 2010).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Madde	Firma
İndometazin	Deva, Türkiye
Asetonitril	Carlo Erba, Almanya
Compritol® 888 ATO	Gattefossé, Fransa
Diklorometan	Sigma Aldrich, Almanya
Dynasan® 114	Condea, Almanya
Dynasan® 116	Condea, Almanya
Eudragit® RLPO	Röhm, Almanya
Eudragit® RSPO	Röhm, Almanya
Gelucire® 44/15	Gattefossé, Fransa
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Kloroform-D6	Merck, Almanya
Metanol	Carlo Erba, Almanya
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide %98)	Alfa Aesar, Almanya
o-Fosforik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Potasyum fosfat (monobazik)	Sigma Aldrich, Almanya
Precirol® ATO 5	Gattefossé, Fransa
Sodyum hidroksit	Tekkim, Türkiye
Span® 80	Sigma Aldrich, Almanya
Tween® 80	Merck, Almanya
Mikropipet uçları	Eppendorf, Almanya
Santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
2 mL'lik Eppendorf tüp	Eppendorf, Almanya
Hücre kültürü flaskları	Greiner bio-one, Amerika
Steril enjektör	Hayat, Türkiye

3.2. Kullanılan Cihazlar

Madde	Firma
Buzdolabı	Arçelik No Frost, Türkiye
Çeker ocak	Hedlab, Türkiye
Diferansiyel taramalı kalorimetri	Shimadzu DSC-60, Japonya
Distile su cihazı	Agilent, Almanya
Etüv	Nüve FN500, Türkiye
Elektroeğirme cihazı	İnovenso, Amerika
Fouriyer dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi (FT-IR)	Shimadzu IR Prestige-21, Japonya
Hassas terazi	Mettler Toledo, Çin
Kolon	Thermo Fisher Scientific, Amerika
Liyofilizatör	Operon, Güney Kore
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Multimod mikroplaka okuyucu	ELISA Reader, BioTek, Amerika
Nükleer manyetik rezonans (NMR)	Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Almanya
Otoklav	Eryiğit A.Ş., Türkiye
Otomatik hücre sayımı cihazı	Logos Biosystems, Güney Kore
Çok fonksiyonlu plaka okuyucu	BioTek HTX Synergy, Amerika
Parçacık büyüklüğü analiz cihazı	Malvern-Zetasizer NanoSeries, İngiltere
pH metre	Mettler Toledo, Çin
Santrifüj	Hettich-Rotina 420R, Almanya
Sınıf 2 laminar akış kabini	Labogene ApS, Danimarka
Termometre	Ebro, Almanya
Taramalı elektron mikroskobu	Hitachi TM 3030 Plus Masaüstü Tip, Japonya

Ultrasonik banyo	Wisd Laboratory Instruments, Güney Kore
Ultratoraks	Heidolph, Almanya
Vorteks	Scilogex, Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Shimadzu, Japonya
Zeta potansiyel analizi cihazı	Malvern-Zetasizer NanoSeries, İngiltere

4. YÖNTEMLER

4.1. IND Çalışmaları

4.1.1. IND morfolojisi

IND'nin parçacık şeklinin ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi adına SEM cihazından (SEM, Hitachi TM 3030 Plus, Japonya) faydalanılmıştır.

4.1.2. Termal özellikler

IND'nin (~4 mg) termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) cihazı (DSC-60, Shimadzu Scientic Instruments, Columbia, MI, ABD) kullanılarak, basınç altında sıkıca kapatılan alüminyum numune kabında, 10°C/dk sıcaklık yükselişi ve 50 mL azot gazı akış hızında 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı yapılmıştır. Cihazdan elde edilen bu termogram IND'nin formülasyon aşamalarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenmesi adına ilerideki termal analizlerde referans alınmıştır.

4.1.3. Fouriyer dönüşümlü kızılötesi spektrofotometri (FT-IR) analizi

IND'nin formülasyon aşamalarından etkilenip etkilenmediğinin belirlenebilmesi adına FT-IR (IR Prestige – 21 Shimadzu, Tokyo, Japonya) analizi, 4000-400 cm^{-1} dalga boyunda gerçekleştirilerek bulunan sonuç, ilerideki analizlerde referans alınmıştır.

4.1.4. Proton nükleer manyetik rezonans (^{1}H-NMR) analizi

IND'nin yapısı, ^{1}H-NMR analiz cihazı kullanılarak (Ultra-Shield™ CPMAS NMR, Brucker, Rheinstetten, Almanya) solvan olarak dötorokloroform kullanılarak 25°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

4.1.5. IND'nin HPLC çalışmaları

Miktar tayini için HPLC (Shimadzu, Japonya) cihazı kullanılmış olup koşullar **Tablo 4.1**'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. *HPLC analiz koşulları*

ANALİZ	KOŞUL
Aygıt	Shimadzu 20-A
HPLC kolonu	ThermoFisher Scientific HyPurity Advance C8, 150 x 4.6 mm, 5 µm
MF (mobil faz)	o-fosforik asit(%2,5)/Metanol/Asetonitril (40:20:40 h/h)
Detektör	Shimadzu Fotodiyot Dizisi
Fırın (°C)	25
Dalga Boyu (nm)	240
Akış	1 mL/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Metot validasyonu, metodun uygunluğunu, doğruluk ve güvenilirlik parametrelerini elde edilen verilerle ispatlayarak göstermeyi amaçlamaktadır. Yapılan çalışmada miktar tayini analitik metot validasyonu kapsamında doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve duyarlılık parametreleri incelenmiş olup bu parametrelerin eldesi için Uluslararası Harmonizasyon Konsülü'nün Q2(R1) – Analitik İşlem Validasyonu kılavuzu kaynak alınmıştır (ICH, 2005b).

4.1.5.1. *Doğrusallık*

Doğrusallık, önceden belirlenmiş bir konsantrasyon aralığında numunedeki etkin madde konsantrasyonu ile doğru orantılı test sonuçları elde edilmesi ile açıklanmaktadır. Doğrusallık çalışmaları yürütülürken en az 5 farklı konsantrasyonda çalışılması gerekmektedir (ICH, 2005b).

Yapılan çalışmada HPLC yönteminde kullanılacak IND'ye doğrunun belirlenmesi amacıyla 500 µg/mL derişimde bir stok çözeltisi hazırlanarak 25-200 µg/mL arası derişimlerde 8 farklı numune elde edilmiştir. Her test üçer kez tekrar edilerek her bir noktaya denk gelen eğri altındaki alan değerleri bulunmuştur.

4.1.5.2. *Doğruluk*

Doğruluk, analiz edilen numunedeki etkin madde miktarının beklenen değerlere yakınlığı olarak ifade edilmektedir. Doğruluk, belirlenen aralık içerisinde oluşturulmalı, bu aralık içerisindeki üç farklı konsantrasyonda en az üçer numune üzerinde gerçekleştirilmelidir (ICH, 2005b).

Yapılan çalışmada doğruluğun belirlenmesi amacıyla 50-100-150 $\mu g.mL^{-1}$ olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda IND içeren numune hazırlanmış, her bir numune için üçer defa ölçüm gerçekleştirilmiştir.

4.1.5.3. *Kesinlik*

Kesinlik, belirlenen koşullarda aynı örneğin çoklu örneklendirilmesinden elde edilen ölçümler arasındaki uyumun yakınlığını göstermektedir. Kesinlik; tekrarlanabilirlik, ara hassasiyet ve tekrar elde edilebilirlik olmak üzere üç düzeyde belirlenmektedir (ICH, 2005b).

Yapılan çalışmada 50-100-150 $\mu g.mL^{-1}$ olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda IND içeren numune hazırlanmış, bu numuneler gün içi kesinliğin belirlenmesi amacıyla aynı gün içinde üçer kez analiz edilmiş; günler arası kesinliğin belirlenmesi amacı ile bu prosedür üç farklı günde tekrarlanmıştır.

4.1.5.4. *Duyarlılık*

Analitik yöntemin duyarlılığı, numunede bulunabilmesine rağmen kesin miktarı bulunamayan saptama sınırı (LOD) ve numunedeki etkin madde miktarının kesin olarak bulunabilmesi olan miktar tayini sınırı (LOQ) parametrelerinin belirlenmesiyle açıklanmaktadır. LOD ve LOQ değerleri ICH kılavuzunda bulunan ve aşağıda verilen denklemlere göre hesaplanabilmektedir (ICH, 2005b).

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

Denklem (4.1)'de SS ifadesi, ordinat eksenindeki kesim değerlerinin standart sapmasını; m değeri ise korelasyon denkleminin eğimini göstermektedir.

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

Denklem (4.1)'deki SS ifadesi, ordinat ekseni kesim değerlerinin standart sapmasını; m değeri ise korelasyon denkleminin eğimini göstermektedir.

4.1.5.5. *Seçicilik*

Seçicilik, kullanılan etkin maddenin bir karışım içerisinde spesifik olarak tespit edilebilmesi olarak ifade edilmektedir. Ortamdaki diğer maddelerden dolayı analiz sonuçları etkilenmemelidir (ICH, 2005b).

4.2. PNP Formülasyon Çalışmaları

Optimum PNP formülasyonunun belirlenebilmesi için farklı oranlarda Eudragit® RLPO ve Eudragit® RSPO polimerleri kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır. Tüm formülasyonlarda sulu faz olarak bidistile su ve %1 Tween® 80 kullanılmış, organik fazın çözücüsü olarak ise diklorometan (DCM) tercih edilmiştir.

Tablo 4.2. *PNP formülasyonları bileşenleri*

Formülasyon kodu	IND	Eudragit® RLPO	Eudragit® RSPO	Sulu faz
P-1	5 mg	50 mg	-	20 mL bidistile su : %1 Tween® 80
P-2	5 mg	25 mg	25 mg	20 mL bidistile su : %1 Tween® 80
P-3	5 mg	-	50 mg	20 mL bidistile su : %1 Tween® 80

Hem etkin madde içeren formülasyonların hem de plasebo formülasyonların hazırlanmasında emülsifikasyon – çözücü uçurma yöntemi kullanılmıştır. Plasebo formülasyonlarda polimerler 5 mL DCM içinde çözündürülmüş ve sulu faza enjektör pompası kullanılarak belirli bir akış hızında ve 10000 rpm hızda sürekli karıştırılarak damla damla eklenmiştir. Oluşan emülsiyonlar, çeker ocak altında manyetik karıştırıcı kullanılarak 350 rpm hızda karıştırılmış ve organik fazın uçması sağlanmıştır. Sonrasında ise formülasyonlar 11000 rpm hızda santrifüjlenerek süzüntü ayrılmış, kalan çökelti halindeki nanopartiküllere 15 mL bidistile su eklenerek çökeltinin dağılması sağlanmış ve bu işlem 3 kez tekrar edilerek PNP'lerin yıkanması sağlanmıştır. Yıkama işlemi sonrasındaki PNP'ler tekrar 10 mL distile suda dağıtılarak -20°C'de dondurulmuş ve -65°C sıcaklıktaki liyofilizatörde kurutularak katı formdaki PNP'ler elde edilmiştir. Etkin madde içeren formülasyonlarda ise IND, organik faza eklenmiş ve aynı işlemler tekrarlanmıştır.

4.3. PNP Karakterizasyonu

4.3.1. Parçacık büyüklük ve dağılımı

Hazırlanan PNP formülasyonlarının parçacık büyüklüğü ve dağılımı lazer kırınım cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

4.3.2. Zeta potansiyel

Formüle edilen PNP'lerin zeta potansiyel değerleri, 25°C sıcaklıkta zeta hücreleri kullanılarak ve formülasyonun distile suyla seyreltilmesiyle Malvern Zetasizer cihazında ölçülmüştür.

4.3.3. Enkapsülasyon etkinliği (%EE)

Hazırlanan formülasyonun %EE değerinin hesaplanabilmesi için öncesinde bahsi geçen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi koşulları kullanılmıştır. Bunun için tam olarak tartılmış 5 mg PNP formülasyonu üzerine 1 mL mobil faz eklenmiş ve 2 dakika süresince ultrasonik banyoda tutularak formülasyonun çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında HPLC cihazı kullanılarak IND miktarı elde edilmiştir.

$$\%EE = \frac{Pratik\ bulunan\ IND\ miktarı}{Teoride\ olması\ gereken\ IND\ miktarı} \times 100 \qquad (4.4)$$

4.3.4. Termal analiz

PNP formülasyonlarının termal analizi, yaklaşık 4 mg formülasyon içeren ve basınçla kilitlenmiş alüminyum numune kapları kullanılarak DSC cihazında azot akış hızı 50 mL/dk, sıcaklık artışının 10°C/dk, sıcaklık aralığının 30-300°C, referans kabı boş alüminyum kabı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.3.5. FT-IR analizi

Formüle edilen PNP'nin tüm bileşenlerinin analizi 4000-400 cm^{-1} dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

4.3.6. ^{1}H NMR analizi

Formüle edilen PNP'nin tüm bileşenlerinin ^{1}H NMR analizi, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak 25°C'de gerçekleştirilmiştir.

4.3.7. *İn vitro* salım

PNP formülasyonundan IND salımı, mide (pH 1,2) ve ince bağırsak (pH 6,8) ortamlarını simüle eden ortamlarda gerçekleştirilmiş salım çalışmasıyla belirlenmiştir. Bu çalışma için diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır (Öztürk, Banderas, vd., 2019). Diyaliz membranlar, 24 saat öncesinden salım ortamına alınarak bekletilmiş ve sonrasında içlerine yaklaşık 3 mg IND içerecek şekilde formülasyon ve 1 mL salım ortamı konularak iki ucu da sızdırmayacak şekilde kapatılmıştır. 50 mL 0,1 N hidroklorik asit (HCl) (pH 1,2) içeren salım ortamında 37 ± 0,5 °C sıcaklıkta 100 rpm hızla çalışma başlatılmış ve önceden kararlaştırılan örnekleme zamanlarında (30. dakika, 1. saat, 2. saat) 1'er mL numuneler alınarak ortamlara aynı miktarda aynı sıcaklığa getirilmiş 0,1 N HCl eklenmiştir. 2 saatin sonunda membranlar, 37 ± 0,5 °C'ye getirilmiş ve 100 rpm hızla karışan 50 mL PBS (pH 6,8) ortamına geçirilmiş ve önceden kararlaştırılan örnekleme zamanlarında (4. saat, 8. saat, 12. saat, 18. saat, 24. saat, 36. saat, 48. saat) 1'er mL numuneler alınarak ortamlara aynı miktarda ve sıcaklıkta taze PBS ilave edilmiştir.

Alınan numunelerdeki IND miktarı, önceden belirtilen analiz koşullarında HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında salınan IND miktarı ile hesaplanmış % kümülatif değerler, zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Çalışma 6 kez tekrarlanmıştır.

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında tek başına IND ve hazırlanan formülasyonların hücre canlılığı üzerine etkilerine MTT deneyi ile bakılmıştır. Bu amaçla öncelikle IND 1 µM – 100 µM

konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlanmış ve bu konsantrasyonların formülasyona karşılık gelen miktarları da hesaplanmıştır. Analizde tek başına IND ile birlikte, boş formülasyon ve yüklü formülasyonlar HUVEC hücrelerine uygulanarak 24- 48 saatlik canlılık değerleri belirlenmiştir. Analizler çalışılan grupların ilgili hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi zamana ve konsantrasyona bağlı olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar istatistiksel analizlerle birlikte grafikler üzerinde gösterilmiştir. Analizler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmış ve sonuçlar Graphpad Prism 9.0 programı aracılığıyla değerlendirilmiştir. Her bir grubun hücreler üzerinde gösterdiği IC50 değerleri de hesaplanmıştır.

MTT yöntemi Tim Mosmann tarafından ilk kez kullanılmıştır. Hücre üretme metodu amacının yanı sıra kemoterapötik ilaçların etkisini kanser hücreleri üzerinde göstermek amacıyla kullanılmıştır. Sitotoksisitenin ve hücre üremesinin kantitatif ölçümünü gerçekleştiren bu metot, mitokondri aktivitesi varlığında MTT [Thiazolyl Blue; 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolum bromür] çözeltisindeki tetrazol halkasının, spesifik enzimlerle tepkimeye girip suda çözünmeyen formazan kristallerini oluşturmasına dayanır. Bu boya sonucunda oluşan renk, mitokondriyal aktiviteyle uygun solvan ilavesi sonrasında mora dönüşmekte, formazan kristallerinin yoğunluğuna bağlı olarak ortaya çıkan renk skalasına bağlı olarak ölçüm gerçekleştirilmektedir. Canlı hücreler bulunmadığında formazan kristalleri gözlenmemektedir.

Mikroplakalara uygun besiyeriyle her kuyucuk içine 1x104 hücre olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekim sonrasında hücreler 24 saat boyunca inkübe edilerek plaka tabanına yapışmaları sağlanmış, 24 saat sonrasında 100 µL besiyeri uzaklaştırılarak farklı konsantrasyonda maddeler 100 µL besiyeri içinde hazırlanarak eklenmiştir. Tekrar 24 saat inkübe edilmesinin ardından her bir kuyucuk içine 20 µL stok olacak şekilde MTT çözeltisinden (5 mg/mL konsantrasyonunda PBS içerisinde çözündürülmüş ve filtrelenmiş MTT çözeltisi) eklenerek 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında formazan kristallerinin çözünebilmesi adına 100 µL DMSO eklenmiş, belirli bir süre

ışıksız ortamda çalkalandıktan sonra mikroplaka okuyucusu ile 540 nm dalga boyunda gözlenen renk değişimlerinin optik yoğunlukları (absorbansları) okunmuştur.

24 ve 48 saatlik analizler sonucunda, enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri belirlenmiştir. Deneylerde kontrol amaçlı çözücü kontrol grubu üzerinden hesaplamalar yapılmıştır.

4.6. KLN Formülasyon Çalışmaları

Optimum KLN formülasyonunun belirlenebilmesi için farklı oranlarda yüzey etkin madde içeren 3 formülasyonun parçacık büyüklükleri, polidispersite indisleri ve zeta potansiyel değerleri karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.3. *KLN formülasyonları bileşenleri*

Formülasyon içeriği	TS-1	TS-2	TS-3
IND	0,1 g	0,1 g	0,1 g
DYN	1 g	1 g	1 g
Tween® 80	0,26 g	0,18 g	0,12 g
Span® 80	0,14 g	0,12 g	0,8 g
Bidistile su	18,5 g	18,6 g	18,7 g

Hem etkin madde içeren formülasyonların hem de plasebo formülasyonların hazırlanmasında emülsifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Plasebo formülasyonlarda DYN ve Span® 80 karıştırılmış, Tween® 80 ve bidistile su içeren diğer fazla birlikte su banyosunda 70°C'ye ısıtılarak karıştırılmış ve karışım soğuyana kadar 13000 rpm sabit hızda karıştırılmıştır. Etkin maddeli formülasyonlar için ise IND yağ fazına eklenerek aynı işlemler tekrarlanmıştır. Sonrasında formülasyonlar -20°'de dondurulmuş ve liyofilize edilerek KLN'ler elde edilmiştir.

4.7. KLN Karakterizasyonu

4.7.1. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan KLN formülasyonlarının parçacık büyüklüğü ve dağılımı lazer kırınım cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

4.7.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan KLN formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri, 25°C sıcaklıkta zeta hücreleri kullanılarak ve formülasyonun distile suyla seyreltilmesiyle Malvern Zetasizer cihazında ölçülmüştür.

4.7.3. Enkapsülasyon etkinliği (%EE)

Hazırlanan formülasyonun %EE değerinin hesaplanabilmesi için öncesinde bahsi geçen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi koşulları kullanılmıştır. Bunun için tam olarak tartılmış 10 mg KLN formülasyonu tartılarak 1 mL metanol eklenmiş ve 2 dakika süresince ultrasonik banyoda tutularak enkapsüle edilememiş IND'nin metanolde çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında santrifüj edilerek süzüntü alınmış ve miktar tayini yapılarak enkapsüle edilememiş IND miktarı hesaplanmıştır.

$$\%EE = 100 - \left(\frac{Pratik\ bulunan\ IND\ miktarı}{Teoride\ olması\ gereken\ IND\ miktarı} \times 100\right) \qquad (4.5)$$

4.7.4. Termal analiz

KLN formülasyonlarının termal analizi, yaklaşık 4 mg formülasyon içeren ve basınçla kilitlenmiş alüminyum numune kapları kullanılarak DSC cihazında azot akış hızı 50 mL/dk, sıcaklık artışının 10°C/dk, sıcaklık aralığının 30-300°C, referans kabı boş alüminyum kabı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.7.5. FT-IR analizi

KLN formülasyonun tüm bileşenlerinin FT-IR analizi 4000-400 cm^{-1} dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

4.7.6. ^{1}H NMR analizi

Hazırlanan formülasyonun tüm bileşenlerinin ^{1}H NMR analizi, çözücü olarak dötorokloroform kullanılarak 25°C'de gerçekleştirilmiştir.

4.7.7. *İn vitro* salım

KLN'lerden IND salımı, mide (pH 1,2) ve ince bağırsak (pH 6,8) ortamlarını simüle eden ortamlarda gerçekleştirilmiş salım çalışmasıyla belirlenmiştir. Bu çalışma için diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır (Öztürk, Banderas, vd., 2019). Diyaliz membranlar, 24 saat öncesinden salım ortamına alınarak bekletilmiş ve sonrasında içlerine yaklaşık 3 mg IND içerecek şekilde formülasyon ve 1 mL salım ortamı konularak iki ucu da sızdırmayacak şekilde kapatılmıştır. 50 mL 0,1 N hidroklorik asit (HCl) (pH 1,2) içeren salım ortamında 37 ± 0,5 °C sıcaklıkta 100 rpm hızla çalışma başlatılmış ve önceden kararlaştırılan örnekleme zamanlarında (30. dakika, 1. saat, 2. saat) 1'er mL numuneler alınarak ortamlara aynı miktarda aynı sıcaklığa getirilmiş 0,1 N HCl eklenmiştir. 2 saatin sonunda membranlar, 37 ± 0,5 °C'ye getirilmiş ve 100 rpm hızla karışan 50 mL PBS (pH 6,8) ortamına geçirilmiş ve önceden kararlaştırılan örnekleme zamanlarında (4. saat, 8. saat, 12. saat, 18. saat, 24. saat, 36. saat, 48. saat) 1'er mL numuneler alınarak ortamlara aynı miktarda ve sıcaklıkta taze PBS ilave edilmiştir.

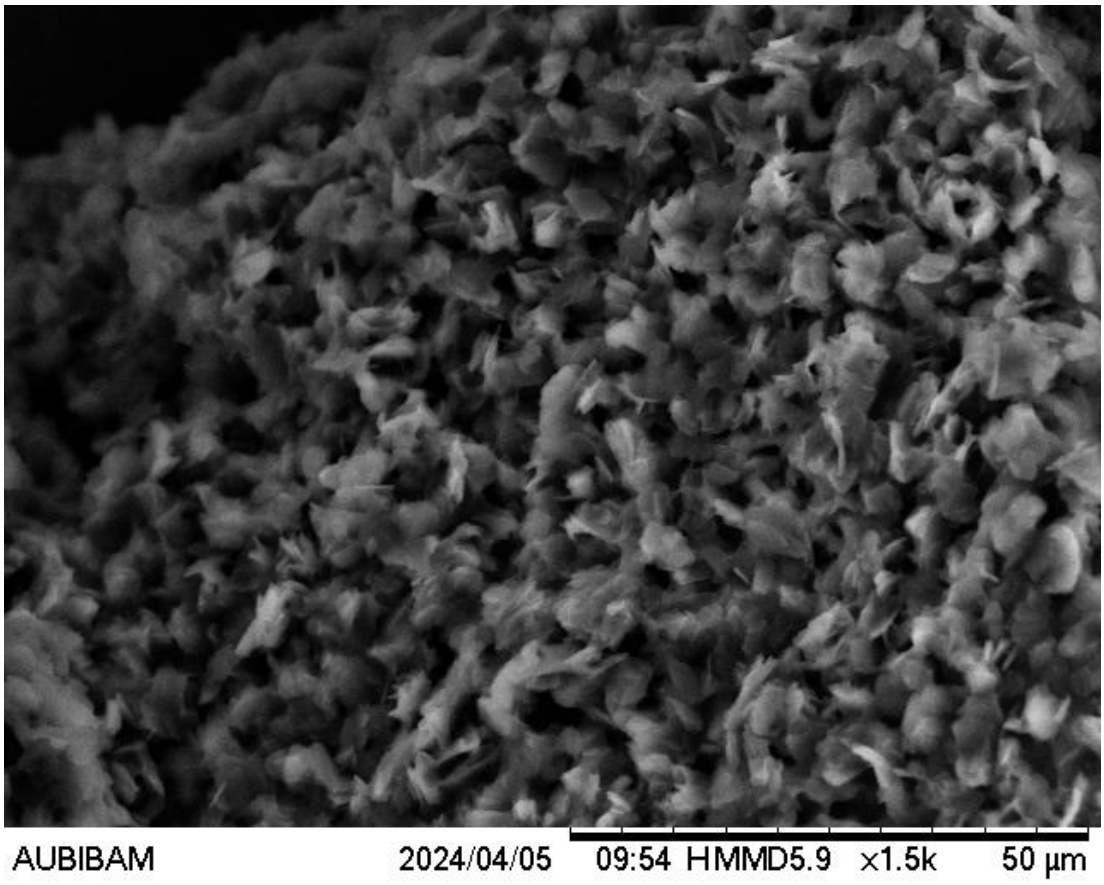
Alınan numunelerdeki IND miktarı, önceden belirtilen analiz koşullarında HPLC cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında salınan IND miktarı ile hesaplanmış % kümülatif değerler, zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Çalışma 6 kez tekrarlanmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. IND ile Yapılan Çalışmalar

5.1.1. Morfolojik özellikleri

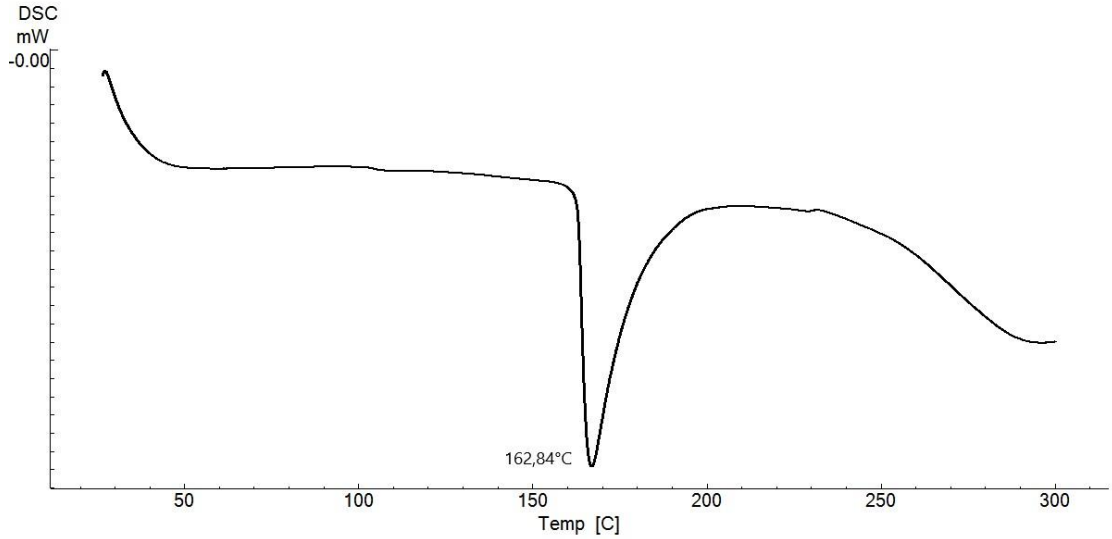
IND'ye ait yüzey özellikleri ve parçacık şekline dair SEM görüntüsü **Şekil 5.1**'de verilmiştir.



Şekil 5.1. *IND'ye ait SEM görüntüsü*

5.1.2. Termal analiz

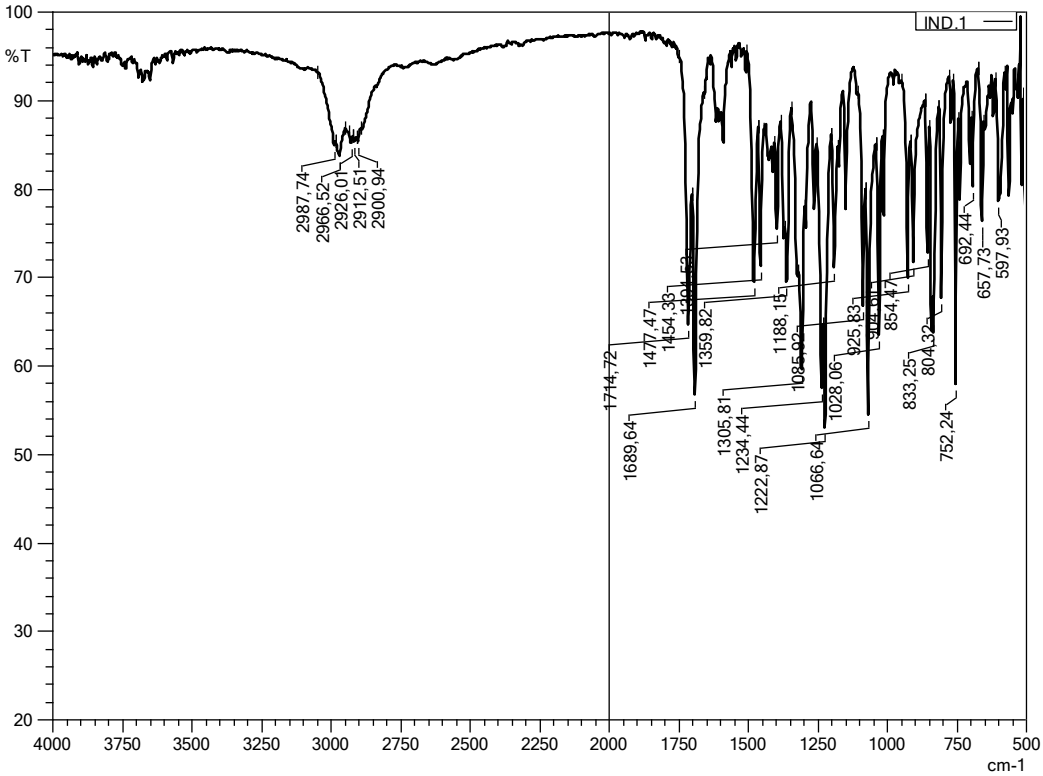
DSC analizleri incelendiğinde IND erime derecesi pikinin 162°C'de olduğu görülmüş ve bu verinin literatürle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Lin, 1991). IND'nin DSC termogramı **Şekil 5.2**'de verilmiştir.



Şekil 5.2. *IND'ye ait termogram*

5.1.3. FT-IR analizi

FT-IR spektroskopisi oldukça hızlı, doğru ve hassas olmasıyla sıkça kullanılmakta olan ve moleküler yapıyı gösteren bir karakterizasyon analizidir (Nandiyanto, Oktiani ve Ragadhita, 2019). Bu tez çalışmasında etkin maddenin kimyasal olarak hiçbir basamakta olası etkileşimlere sahip olmadığının belirlenmesi amacıyla FT-IR analizi yapılmıştır. IND'ye ait FT-IR spektrumu **Şekil 5.3**'te verilmiştir.

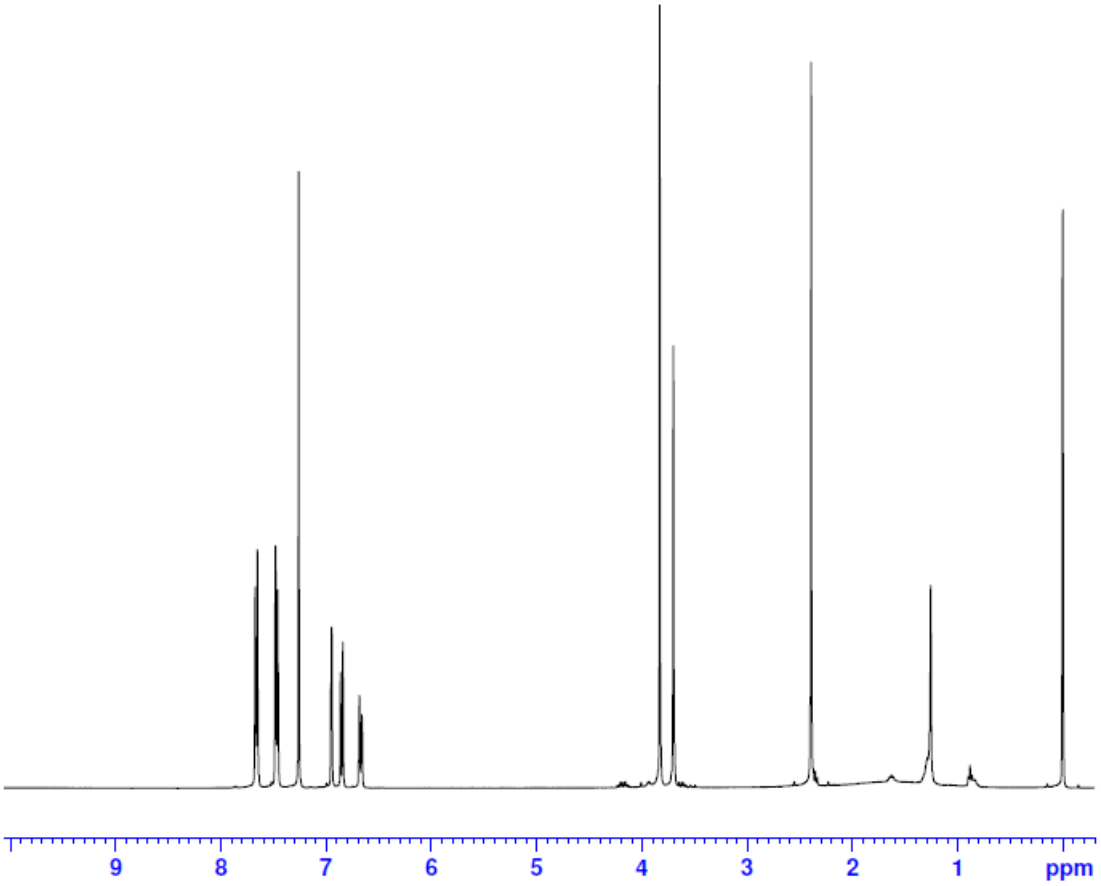


Şekil 5.3. *IND'ye ait FT-IR spektrumu*

IND'nin FT-IR spektrumları incelendiğinde IND'ye ait 3200 cm^{-1} – 3000 cm^{-1} bandında aromatik C-H gerilimi, 3000 cm^{-1} – 2800 cm^{-1} aralığında C-H gerilme titreşimleri, 1800 cm^{-1} – 1600 cm^{-1} aralığında C=O gerilme titreşimleri, 1200 cm^{-1} – 1000 cm^{-1} aralığında ise simetrik aromatik O-H gerilme titreşimleri görülmüş; bütün bu piklerin literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Dupeyrón vd., 2013; Elkhodairy, Elsaghir, ve Al-Subayiel, 2014).

5.1.4. ^{1}H-NMR Analizi

IND'ye ait ^{1}H-NMR spektrumu **Şekil 5.4**'te verilmiştir.



Şekil 5.4. *IND'ye ait ^{1}H-NMR spektrumu*

Yapılan ^{1}H-NMR analiz sonuçları incelendiğinde ise IND'ye ait karakteristik pikler (~7ppm Ar-H, ~4,2ppm -OH, ~3,1ppm -CH) gözlemlenmiş olup bu veriler literatür bilgileriyle onaylanmıştır (Jambhekar, Casella, ve Maher, 2004).

5.1.5. IND'nin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini ve validasyon çalışmaları

5.1.5.1. *Doğrusallık*

Kullanılacak olan eğrinin belirlenebilmesi amacıyla ortam olarak mobil faz kullanılarak 25-200 µg/mL konsantrasyon aralığında 6 farklı seri hazırlanmış ve HPLC

kullanılarak analiz edilmiştir. IND konsantrasyonlarına karşılık gelen alan ve tutulma zamanı (R_t) değerleri belirlenmiş ve bu iki değer oranlanarak **Tablo 5.1-5.6**'da verilmiştir.

Tablo 5.1. *Seri 1 HPLC sonuçları*

Seri 1	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/R_t
1	25	1484292	4,038	367580,9807
2	50	3013182	4,038	746206,5379
3	75	4792547	4,042	1185687,0361
4	100	5825461	4,043	1440875,8348
5	125	7401441	4,040	1832039,8515
6	150	8878966	4,041	2197219,9951
7	175	10465070	4,040	2590363,8614
8	200	11929589	4,051	2944850,4073

Tablo 5.2. *Seri 2 HPLC sonuçları*

Seri 2	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/R_t
1	25	1517678	4,044	375291,2957
2	50	3024472	4,046	747521,5027
3	75	4469706	4,042	1105815,4379
4	100	5982554	4,042	1480097,4765
5	125	7449295	4,041	1843428,6068
6	150	8918098	4,043	2205812,0208
7	175	10416692	4,050	2572022,7160
8	200	11971753	4,049	2956718,4490

Tablo 5.3. *Seri 3 HPLC sonuçları*

Seri 3	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/R_t
1	25	1511392	4,046	373552,1503
2	50	2904237	4,046	717804,4983
3	75	4441363	4,041	1099075,2289
4	100	5975038	4,037	1480068,8630
5	125	7440330	4,045	1839389,3696
6	150	8894900	4,040	2201707,9208
7	175	10371325	4,045	2563986,4030
8	200	11927671	4,045	2948744,3758

Tablo 5.4. *Seri 4 HPLC sonuçları*

Seri 4	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/R_t
1	25	1505436	4,037	372909,5863
2	50	3087973	4,039	764538,9948
3	75	4496167	4,035	1114291,6976
4	100	5909662	4,038	1463512,1347
5	125	7407552	4,037	1834915,0359
6	150	8879515	4,041	2197355,8525
7	175	10356473	4,051	2556522,5870
8	200	11880288	4,048	2934853,7549

Tablo 5.5. *Seri 5 HPLC sonuçları*

Seri 5	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/R_t
1	25	1525915	4,037	377982,4127
2	50	3033601	4,043	750334,1578
3	75	4393332	4,035	1088805,9480
4	100	5944668	4,042	1470724,3939
5	125	7475825	4,045	1848164,4005
6	150	8919804	4,044	2205688,4273
7	175	10379263	4,041	2568488,7404
8	200	11882675	4,047	2936168,7670

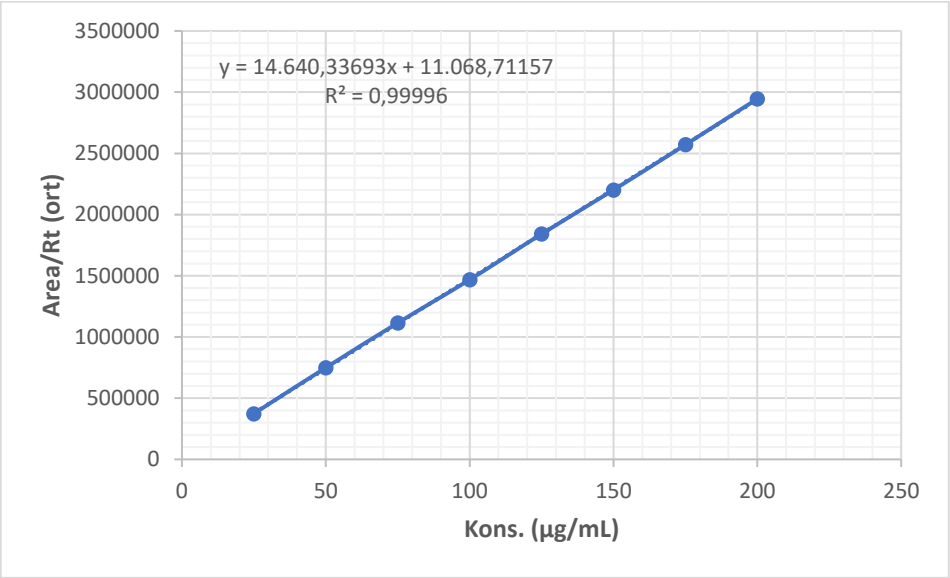
Tablo 5.6. *Seri 6 HPLC sonuçları*

Seri 6	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/R_t
1	25	1516485	4,038	375553,4918
2	50	3104509	4,038	768823,4274
3	75	4426257	4,044	1094524,4807
4	100	5944810	4,038	1472216,4438
5	125	7476565	4,040	1850634,9010
6	150	8892238	4,043	2199415,7804
7	175	10406052	4,043	2573844,1751
8	200	11956645	4,049	2952987,1573

Analiz edilen altı serinin ortak değerlendirilebilmesi için tüm değerlerin ortalaması alınmış ve sonuçlar **Tablo 5.7**'de verilmiştir.

Tablo 5.7. *6 serinin ortalama Alan/R_t değerleri*

Konsantrasyon (µg/mL)	Seri numarası	Alan/R_t ORT (n=6)
25	1	373811,6529
50	2	749204,8532
75	3	1114699,972
100	4	1467915,858
125	5	1841428,694
150	6	2201199,999
175	7	2570871,414
200	8	2945720,485



Şekil 5.5. *IND'ye ait doğrusallık grafiği (n=6)*

Şekil 5.5'te verilen doğru denklemi IND miktar tayini çalışmalarında kullanılmıştır.

5.1.5.2. *Doğruluk*

Doğruluk çalışması için çalışma aralığında (25-200 µg/mL) üç farklı konsantrasyon (50, 100, 150 µg/mL) seçilmiş ve bu konsantrasyonlarda IND içeren numuneler hazırlanmıştır. Elde edilen değerler ± %2 farka sahip olmalı ve %98-102 aralığında

olmalıdır (ICH, 2005). Bulunan sonuçlar, yöntemin iyi geri kazanım gösterdiğini ispatlamıştır.

Tablo 5.8. *50 µg/mL için doğruluk çalışması (n=3)*

Numune no.	Alan/R_t	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri kazanım
1	740835,0185	49,84627816	99,6926
2	742599,5062	49,9668005	99,9336
3	731994,0799	49,24240281	98,4848
	% Geri kazanım ORT	99,3703	
	% Fark	-0,6297	
	SS	0,3881	
	% BSS	0,3906	
	SH	0,2241	

Tablo 5.9. *100 µg/mL için doğruluk çalışması (n=3)*

Numune no.	Alan/R_t	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri kazanım
1	1465580,717	99,34962648	99,3496
2	1456286,668	98,7148017	98,7148
3	1457063,025	98,76783032	98,7678
	% Geri kazanım ORT	98,9441	
	% Fark	-1,0559	
	SS	0,3522	
	% BSS	0,3560	
	SH	0,2033	

Tablo 5.10. *150 µg/mL için doğruluk çalışması (n=3)*

Numune no.	Alan/R_t	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri kazanım
1	2178562,176	148,049425	98,6996
2	2185260,321	148,5069381	99,0046
3	2193508,533	149,0703276	99,3802
	% Geri kazanım ORT	99,0282	
	% Fark	-0,9718	
	SS	0,5114	
	% BSS	0,5164	
	SH	0,2952	

5.1.5.3. *Kesinlik*

Kullanılan yöntemin gün içi tekrarlanabilirliğini ve günler arası tekrar edilebilirliğini göstermek amacıyla 50, 100 ve 150 µg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonda n=3 olmak üzere numuneler hazırlanmış ve her bir numune 3 farklı gün analiz edilmiştir. Elde edilen verilerin SS ve BSS değerleri **Tablo 5.11**'de verilmiştir.

Tablo 5.11. *50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarında tekrar edilebilirlik çalışması 1. gün (n=3)*

Numune konsantrasyonu (µg/mL)	Alan/R_t	Bulunan konsantrasyon (µg/mL)
50	750278,5960	50,49131642
	753123,0656	50,68560632
	755435,7652	50,84357397
100	1468614,8931	99,55687418
	1479119,9507	100,2744162
	1476864,3401	100,120348
150	2207200,5413	150,0055525
	2203919,3707	149,781434
	2226065,9774	151,2941455

Tablo 5.12. *50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarında tekrar edilebilirlik çalışması 2. gün (n=3)*

Numune konsantrasyonu (µg/mL)	Alan/R_t	Bulunan konsantrasyon (µg/mL)
50	761452,2873	51,25452914
	752978,1058	50,67570493
	759169,7789	51,09862368
100	1480174,5016	100,3464468
	1489894,3870	101,0103581
	1479278,6522	100,2852563
150	2220314,3772	150,9012857
	2217923,2472	150,7379609
	2198337,0206	149,4001347

Tablo 5.13. *50, 100 ve 150 µg/mL konsantrasyonlarında tekrar edilebilirlik çalışması 3. gün (n=3)*

Numune konsantrasyonu (µg/mL)	Alan/R_t	Bulunan konsantrasyon (µg/mL)
50	754622,0202	50,78799158
	753496,6790	50,71112578
	756779,9607	50,93538849
100	1484382,8951	100,6338987
	1482664,0394	100,5164932
	1488334,2358	100,9037928
150	2208135,7477	150,0694312
	2207817,9355	150,0477233
	2211572,5886	150,3041827

Tablo 5.14. *IND gün içi ve günler arası kesinlik çalışması sonuçları*

50 µg/mL	1. Gün	2. Gün	3. Gün	Günler arası
ORT	50,67349891	51,00961925	50,81150195	50,83154004
SS	0,176440606	0,299500766	0,113964884	0,168953736
% BSS	0,348191085	0,587145661	0,22428954	0,33237973
100 µg/mL	**1. Gün**	**2. Gün**	**3. Gün**	**Günler arası**
ORT	99,98387949	100,5473537	100,6847283	100,4053205
SS	0,37773589	0,402139102	0,198589964	0,371385682
% BSS	0,377796793	0,399949962	0,19723941	0,369886457
150 µg/mL	**1. Gün**	**2. Gün**	**3. Gün**	**Günler arası**
ORT	150,3603773	150,3464604	150,1404457	150,2824278
SS	0,816394237	0,823600664	0,142215189	0,39133436
% BSS	0,542958359	0,547801831	0,094721438	0,26039928

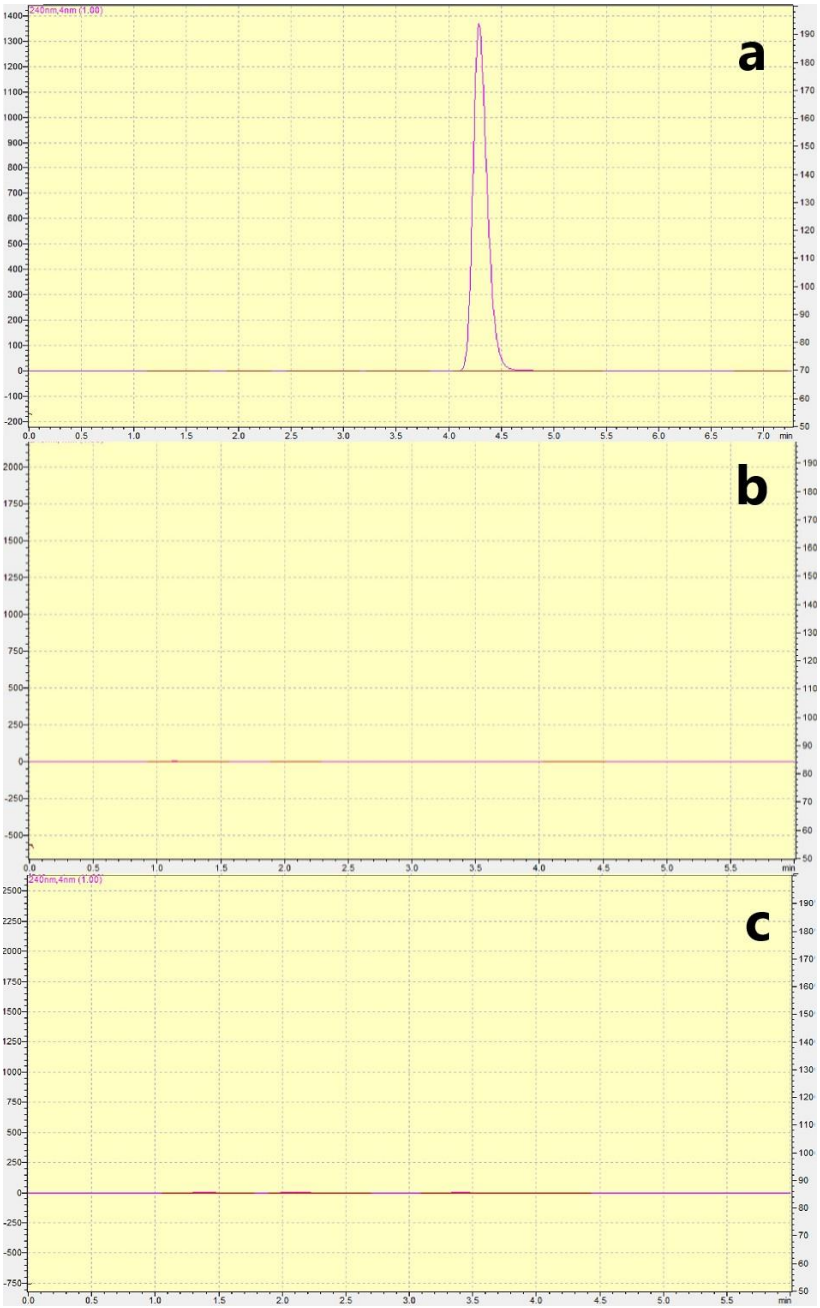
Sonuçların % BSS değerlerinin %2'nin altında olduğu görülmekte ve bu sayede yöntemin kesinliği kanıtlanmaktadır. Aynı şekilde gün içi ve günler arası değerlerin % BSS değeri %2'nin altında bulunmuş, bu şekilde kullanılan analitik yöntemin kesinliği de kanıtlanmıştır.

5.1.5.4. *Duyarlılık*

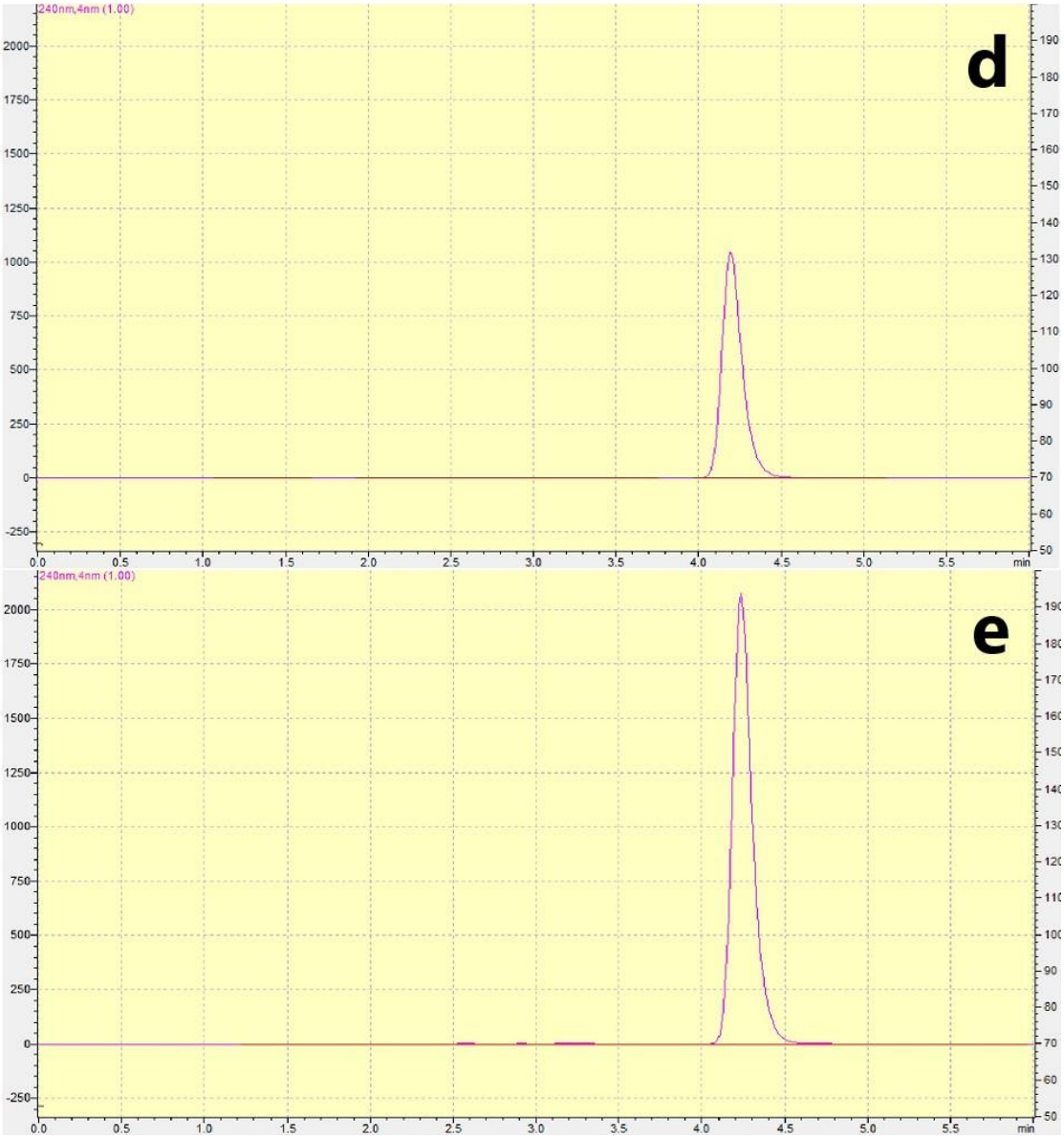
Denklem 4.1 kullanılarak LOD değeri 0,000033 µg/mL; Denklem 4.2 kullanılarak LOQ değeri 0,000099 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Analitik yöntem validasyonu için çalışılan en düşük IND konsantrasyonu 25 µg/mL olup bulunan LOD ve LOQ değerlerinin bu değerden düşük olması kullanılan yöntemin duyarlılığının uygunluğunu kanıtlamaktadır.

5.1.5.5. *Seçicilik*

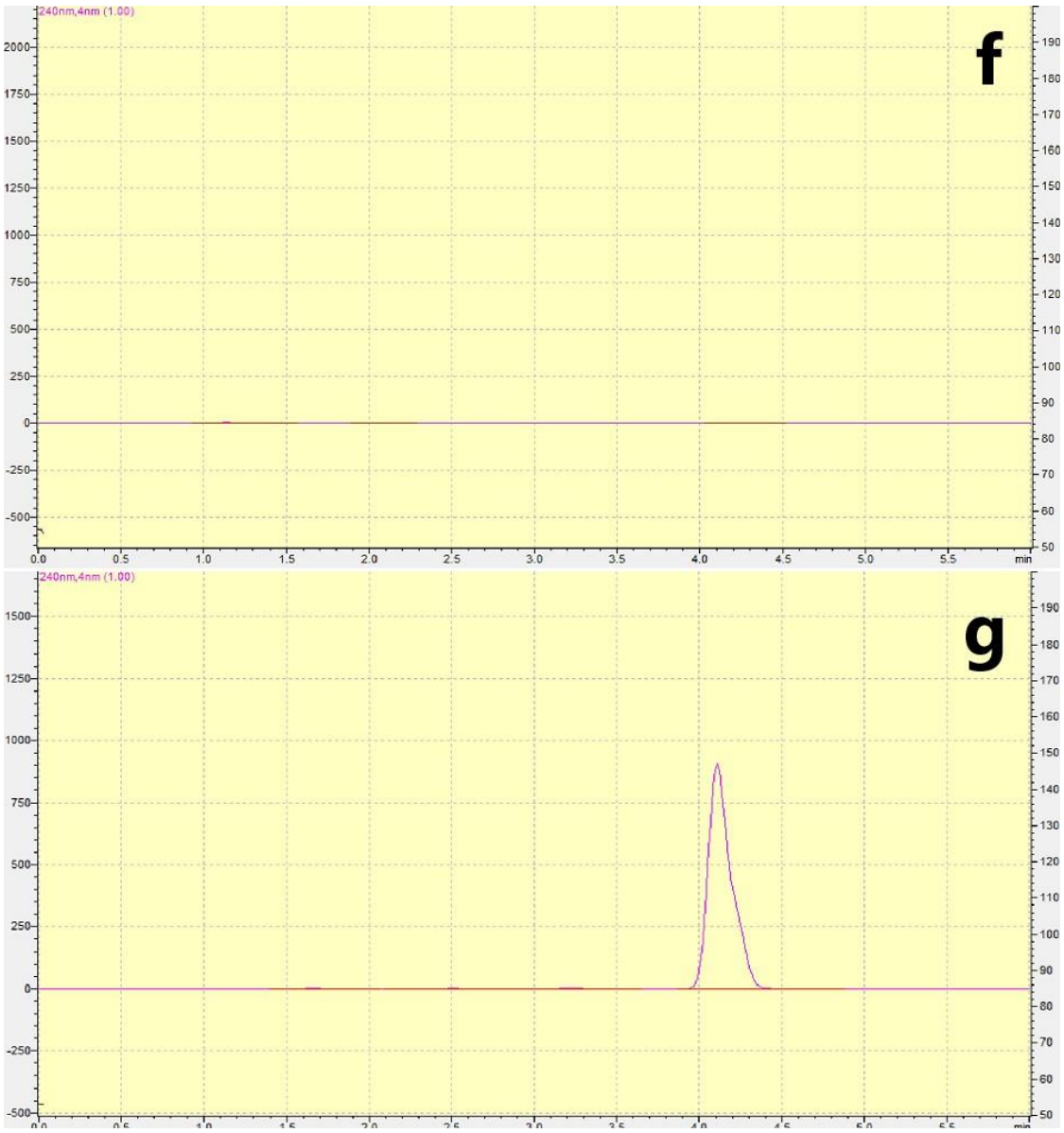
Yöntemin seçiciliğinin kanıtlanması doğrultusunda IND ile formülasyon çalışmalarında kullanılan tüm bileşenlerin HPLC cihazında 240 nm dalga boyunda elde edilen sinyallerinin birbirleriyle çakışma olasılığı kontrol edilmiştir. Bunun için mobil fazdaki IND çözeltilerinin, salım ortamlarındaki IND çözeltilerinin, IND içeren ve içermeyen formülasyonların analizlerine ilişkin kromatogramlar **Şekil 5.6-5.9**'da verilmiştir.



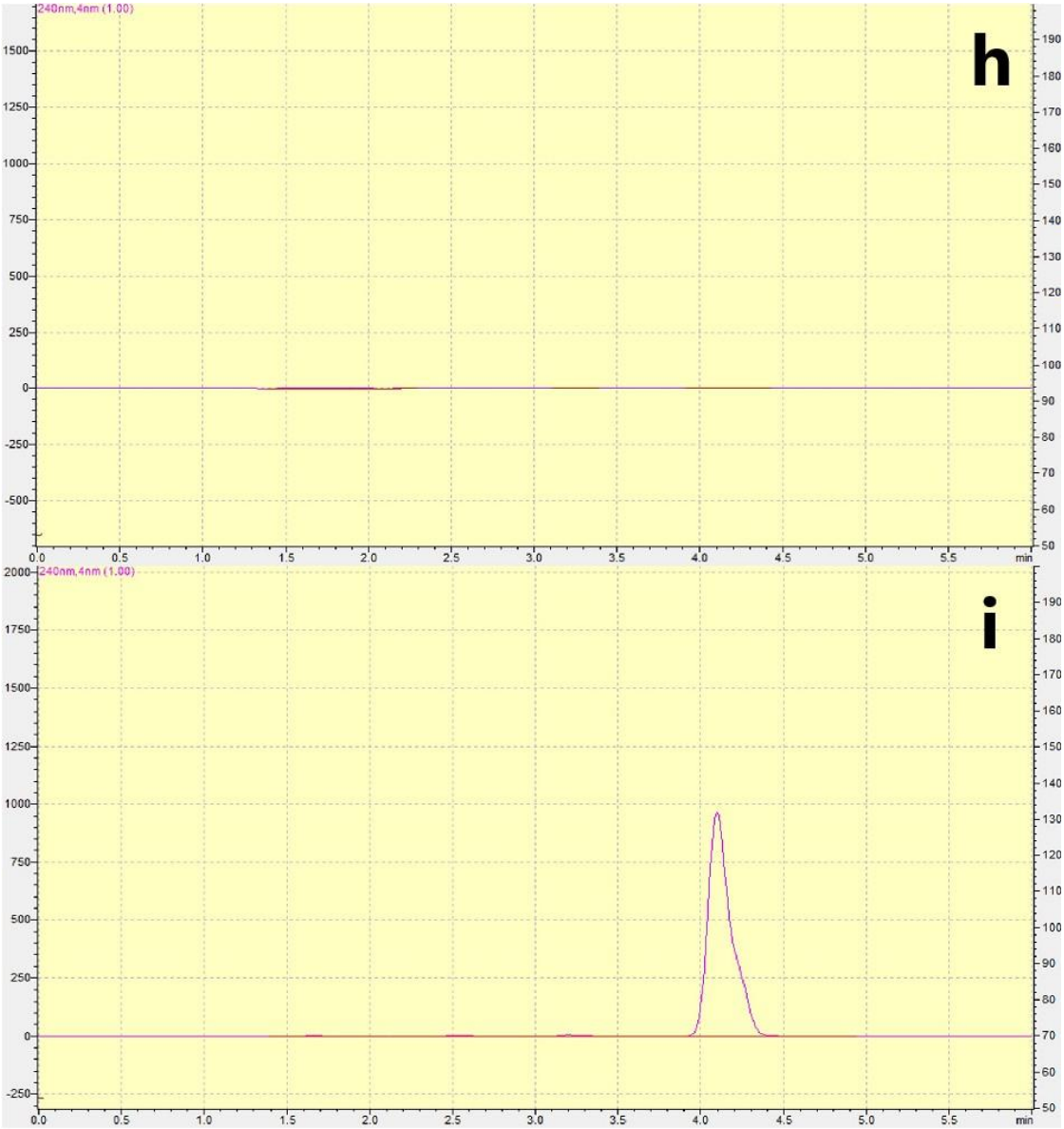
Şekil 5.6. *IND'nin mobil fazdaki çözeltisi (a), IND içermeyen PNP çözeltisi (b) ve IND içermeyen KLN çözeltisinin (c) HPLC kromatogramları*



Şekil 5.7. *PNP (d) ve KLN (e) formülasyonlarının HPLC kromatogramları*



Şekil 5.8. *0,1 N HCl (pH 1,2) ortamının (f) ve ortamdaki IND'nin (g) HPLC kromatogramları*



Şekil 5.9. *PBS (pH 6,8) ortamının (h) ve ortamdaki IND'nin (i) HPLC kromatogramları*

Kullanılan analitik yöntem, literatür verilerine (Dandić vd., 2022b) küçük modifikasyonlar yapılarak yeni bir yöntem olarak belirlenmiştir ve maksimum absorbansın elde edildiği 240 nm dalga boyu seçilmiştir. Geliştirilen yöntemin ICH tarafından yayınlanan kılavuzlarına dayanarak yapılan validasyon çalışmalarında r^2 değerinin 0,999'dan büyük olduğu görülmüş, doğruluk çalışmasında % geri kazanım

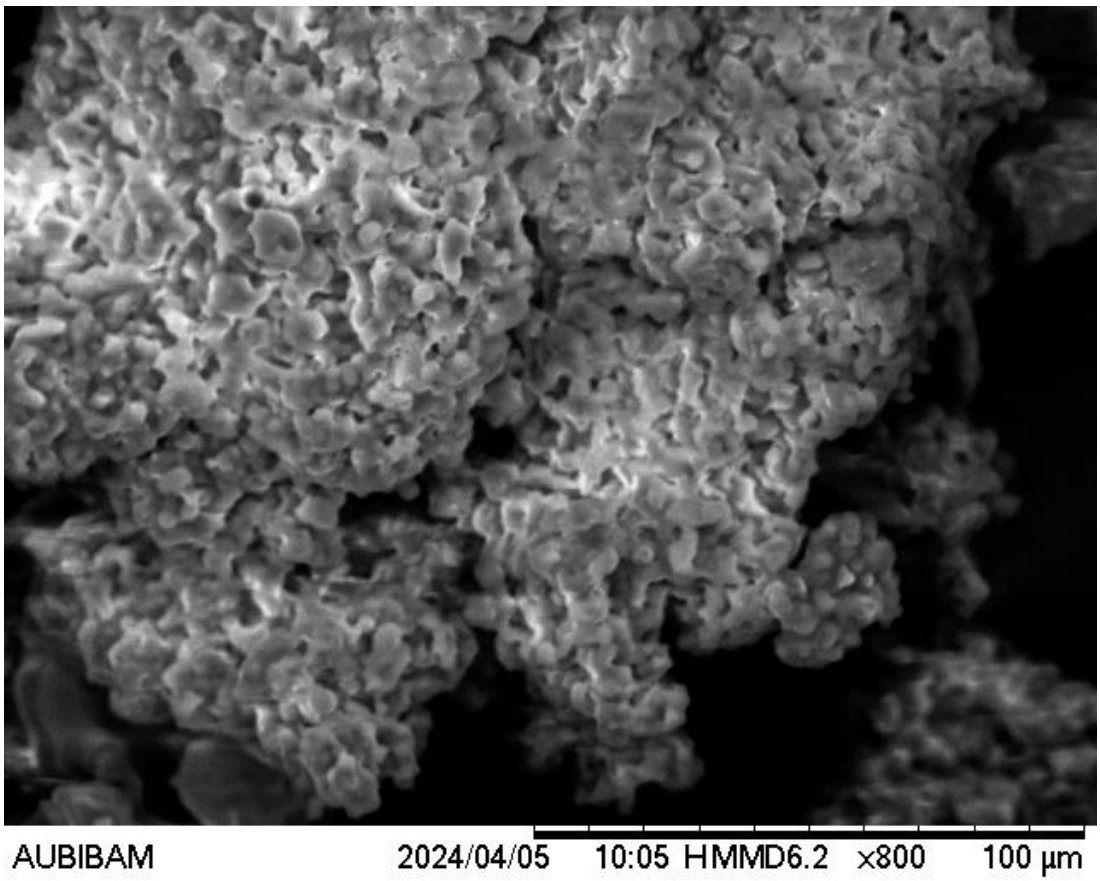
değerinin ve kesinlik çalışmasında varyasyon katsayısının ±2 aralığında olduğu bulunmuştur. Alınan tüm kromatogramlara bakıldığında IND'ye ait sinyalin diğer tüm bileşen, çözücü ve etkin madde içermeyen formülasyonların verdiği sinyalden ayrı olduğu görülmüş ve bu sayede yöntemin seçiciliği kanıtlanmış, bu yöntemin ileri aşamalardaki miktar tayini ölçümlerinde güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Tüm analizler hesaplanan LOQ değerinin üzerinde gerçekleştirilmiştir.

5.2. PNP Formülasyon Çalışmaları

PNP formülasyonlarında polimer olarak Eudragit® RLPO ve Eudragit ® RSPO polimerleri kullanılmıştır. Her iki polimer de etkin madde salım süresini uzatmasıyla bilinmektedir. pH'dan bağımsız olarak biyoparçalanmayan polimerler olması açısından tezde kullanımı tercih edilmiştir (Cetin vd., 2013; Gandhi, Jana, ve Sen, 2014a; Verma ve Banu, 1996). Optimum formül olarak RLPO:RSPO (1:1) kullanılan formül belirlenmiştir (Öztürk vd., 2018). Bu formülasyonun bileşenleri "*4.3.1.3. PNP hazırlanması*" bölümünde verilen **Şekil 4.2**'de P-2 formülasyonu adı altında belirtilmiştir.

5.2.1. Morfolojik özellikleri

PNP'ye ait yüzey özellikleri ve parçacık şekline dair SEM görüntüsü **Şekil 5.10**'da verilmiştir.



Şekil 5.10. *PNP'ye ait SEM görüntüsü*

5.2.2. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan P-2 formülasyonuna ilişkin parçacık büyüklüğü ve dağılımı değerleri **Tablo 5.15**'te verilmiştir.

Tablo 5.15. *P-2 formülasyonuna ilişkin parçacık büyüklüğü ve dağılımı değerleri*

Ölçüm numarası	Parçacık büyüklüğü (nm)	PDI
1	191,1	0,488
2	206,3	0,430
3	148,2	0,438
ORT	181,867	0,452
SH	17,396	0,018

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata, PDI: Polidispersite indeksi)

5.2.3. Zeta potansiyel

Hazırlanan P-2 formülasyonuna ilişkin zeta potansiyel değerleri **Tablo 5.16**'da verilmiştir.

Tablo 5.16. *P-2 formülasyonuna ilişkin zeta potansiyel değerleri*

Ölçüm numarası	Zeta potansiyel (mV)
1	-16,9
2	-19,7
3	-19,7
ORT	-18,767
SH	0,933

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata)

Zeta potansiyel değerinin belirlenmesi, kolloidal dispersiyon sistemlerinin kararlılığı hakkında ön bilgi vermektedir. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değerinin bilinmesi, yüzey özelliklerinin karakterizasyonunun sağlanması açısından oldukça önem taşımaktadır (Evrim Yenilmez, 2017). Zeta potansiyel değerinin ±0-10 mV olması oldukça kararsız, ±10-20 mV olması kararlı, ±20-30 oldukça kararlı ve >±30 olması ise yüksek oranda kararlı bir formülasyon elde edildiğinin göstergesi olarak kabul görmektedir (Başaran, 2017a).

Çalışmada IND içeren optimum PNP formülasyonunun zeta potansiyel değeri -18,8 bulunmuş, literatür verilerine dayanarak formülasyonun kararlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Başaran, 2017b; Öztürk, Çınar, ve Yenilmez, 2019).

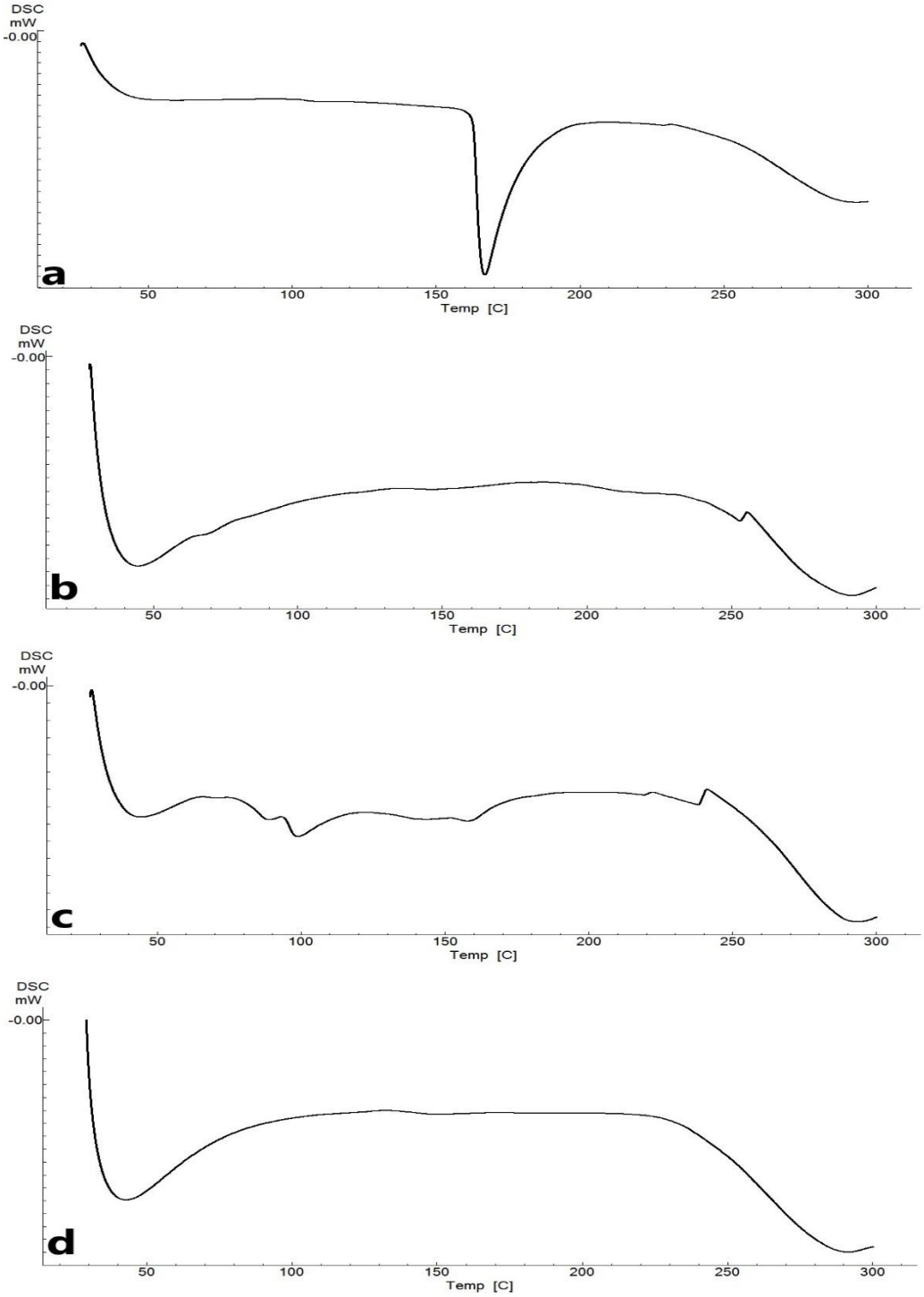
5.2.4. Enkapsülasyon etkinliği (%EE)

%EE değeri, nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Yüksek %EE değeri, etkili dozun daha düşük miktarda olmasını sağlamaktadır (Öztürk, Yenilmez, Şenel, vd., 2020). IND içeren PNP formülasyonunun %EE değeri Denklem 4.4 kullanılarak hesaplanmış ve sonuç olarak %31,0908 ± 0,0409 bulunmuştur.

5.2.5. Termal analiz

DSC analizleri, oluşabilecek yapısal değişimlerin belirlenmesinde büyük rol oynamaktadır. Görülen piklerin değişimi, ek pik görünümü veya pik kaybolması ile oluşturulan kompleks ve olası değişimler belirlenebilmektedir (Başaran vd., 2022).

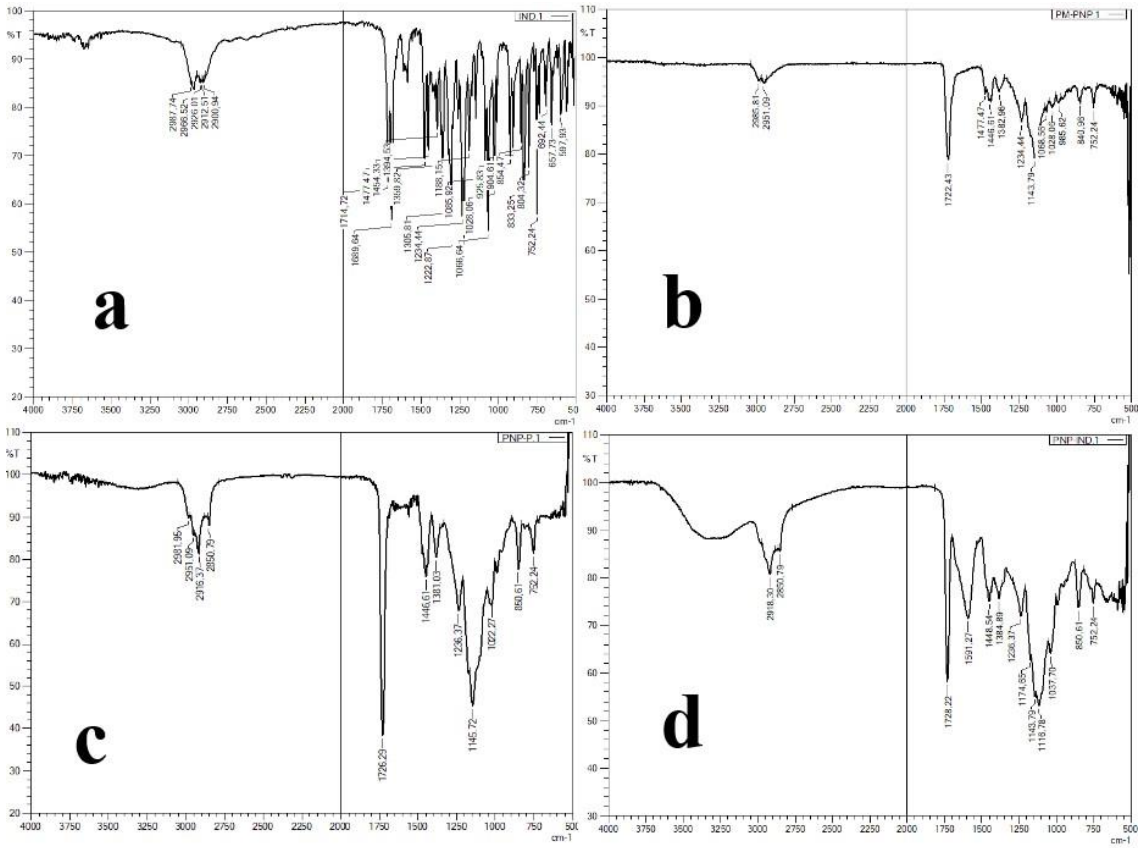
IND, Eudragit® RLPO ve Eudragit® RSPO fiziksel karışımı, PNP fiziksel karışımı ve PNP formülasyonuna ait DSC termogramları **Şekil 5.11**'de verilmiştir. Termogramlardaki pikler incelendiğinde fiziksel karışımda ve formülasyonda IND'ye ait pikin kaybolduğu görülmektedir. Etkin maddeye ait pikin kaybolması, homojen polimer matriks oluşumunu veya amorf yapıyı göstermektedir (Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2019).



Şekil 5.11. *IND (a), Eudragit® RLPO-RSPO (b), PNP fiziksel karışım (c) ve PNP'ye (d) ait termogramlar*

5.2.6. FT-IR analizi

FT-IR analizi, PNP formülasyonlarında saf etkin maddenin yapısı ve formülasyonda yer alan diğer polimer veya polimerlerle görülebilecek olası etkileşimleri belirleyebilmesi açısından oldukça büyük önem taşımaktadır (Güven ve Başaran, 2021). Hazırlanan plasebo ve etkin maddeli formülasyonların, formülasyonda kullanılan polimer ve etkin maddenin fiziksel karışımının ve IND'nin FT-IR spektrumları **Şekil 5.12**'de verilmiştir.



Şekil 5.12. *IND (a), P-2 formülasyonu fiziksel karışımı (b), P-2 formülasyonu plasebo (c) ve P-2 formülasyonunun (d) FT-IR spektrumları*

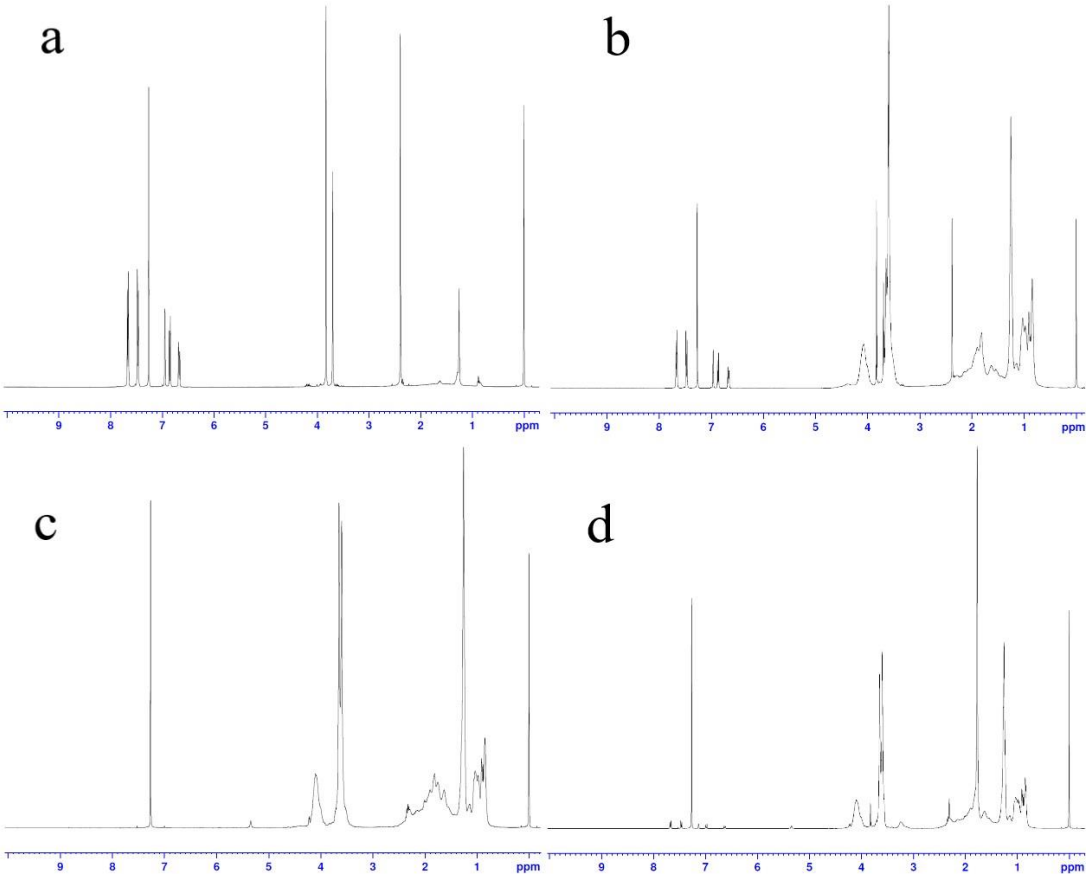
Literatür bilgisine dayanarak, IND'ye ait karakteristik piklerin yoğunluğundaki azalma ve spektrumdaki hafif kaymalar, IND ile polimerler arasındaki hidrojen bağını göstermektedir (Öztürk, Yenilmez, Arslan, vd., 2020). FT-IR spektrumları

incelendiğinde PNP yapısının korunduğu ve IND'nin polimer içerisine enkapsüle halde olduğu yorumu çıkarılabilmektedir.

5.2.7. ^{1}H NMR analizi

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin ve diğer bileşenlerle olası etkileşimlerinin gözlenebildiği bir diğer yöntem ^{1}H NMR spektroskopisi olarak karşımıza çıkmaktadır (Öztürk, Banderas, vd., 2019). PNP oluşma sürecinde maddelerin protonlarının kimyasal kaymalarının belirlenmesi ve böylece formülasyonun olası yapısal değişikliklerinin belirlenmesi için bu analiz gerçekleştirilmektedir (Başaran vd., 2022).

Hazırlanan plasebo ve etkin maddeli formülasyonların, formülasyonda kullanılan polimer ve etkin maddenin fiziksel karışımının ve IND'nin ^{1}H NMR spektrumları **Şekil 5.13**'te verilmiştir.



Şekil 5.13. *IND (a), P-2 formülasyonunun fiziksel karışımı (b), P-2 formülasyonu plasebo (c) ve P-2 formülasyonunun (d) ^{1}H NMR spektrumları*

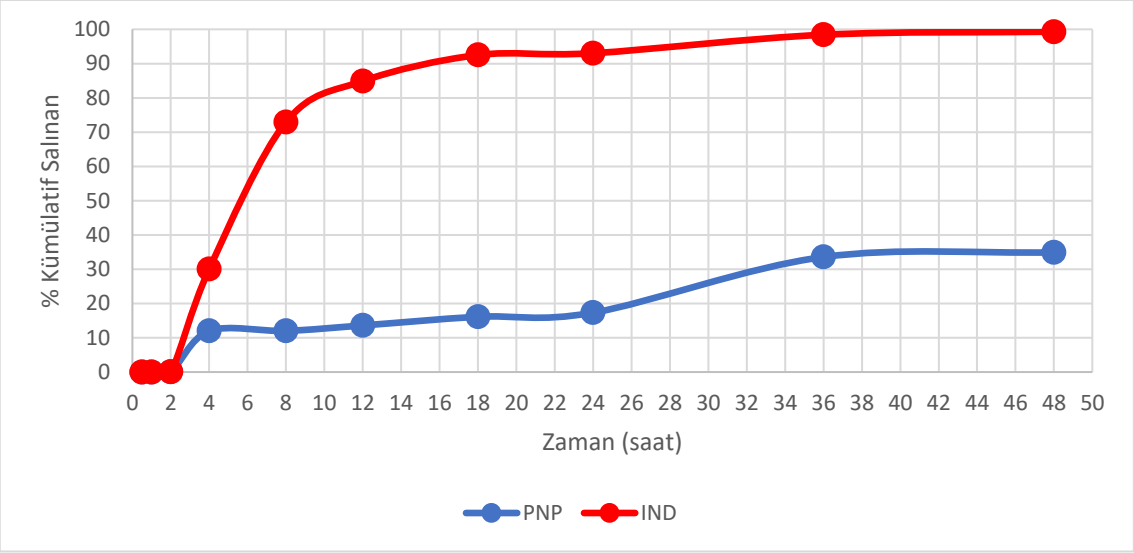
IND'ye ait spesifik pikler, fiziksel karışım ve PNP spektrumlarında da görülmekle birlikte IND miktarına bağlı olarak piklerdeki yoğunluk değişkenlik göstermektedir. Spektrumlara bakıldığında kimyasal bir değişim gözlenmediği literatür bilgisiyle desteklenmiştir (Kırımlıoğlu vd., 2018).

5.2.8. *İn vitro* salım çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları, hem yüzey etkin madde içermeyen PBS (pH 6,8) ortamında hem de %1 Tween® 80 içeren PBS (pH 6,8) ortamında gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen değerler **Tablo 5.17-5.18**'de ve % kümülatif salım sonuçlarının zamana karşı grafiği **Şekil 5.14-5.15**'te verilmiştir.

Tablo 5.17. *PNP'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS)*

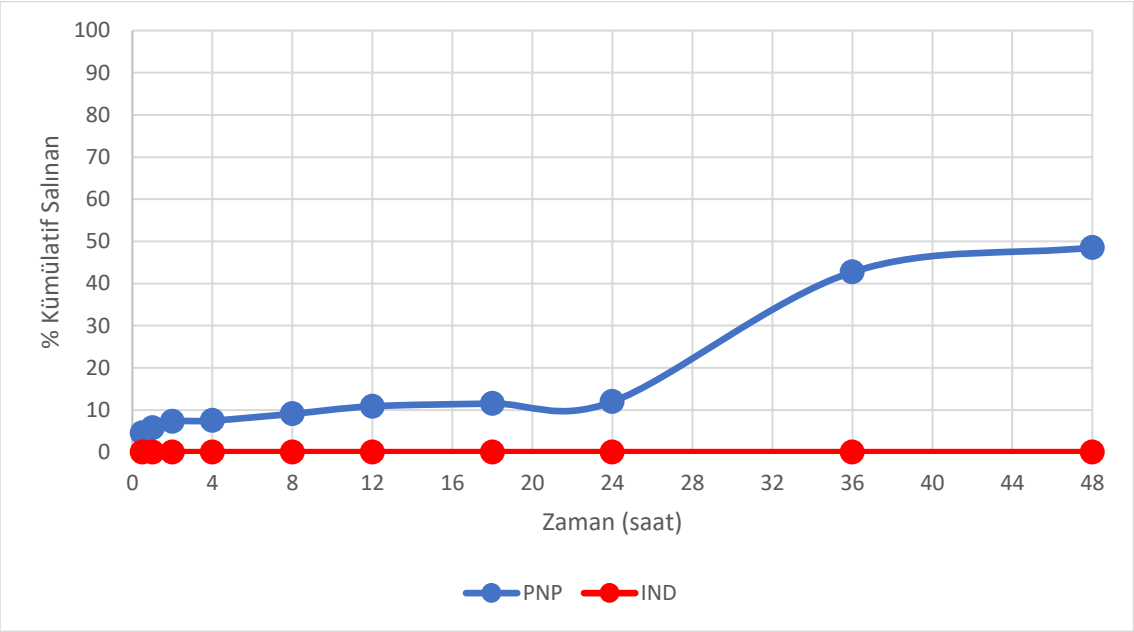
KOD	30 DK	1 SA	2 SA	4 SA	8 SA	12 SA	18 SA	24 SA	36 SA	48 SA
P1	0	0	0,001	3,017	3,011	2,877	2,626	3,240	10,918	10,330
P2	0	0	0,020	2,233	2,154	2,219	2,564	3,306	9,255	8,350
P3	0	0	0	2,192	2,267	2,304	2,683	3,767	9,494	9,150
P4	0	0	0,004	1,721	3,178	3,403	3,651	3,815	1,672	10,550
P5	0	0	0,050	2,300	1,571	2,963	3,263	3,463	2,493	9,982
P6	0	0	0,051	1,750	3,077	2,308	2,556	2,758	4,091	9,468
ORT	0	0	0,021	11,991	12,009	13,592	16,126	17,317	33,564	34,925



Şekil 5.14. *IND ve PNP'ye ait in vitro salım profilleri (PBS pH 6,8)*

Tablo 5.18. *PNP'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS + %1 Tween® 80)*

KOD	30 DK	1 SA	2 SA	4 SA	8 SA	12 SA	18 SA	24 SA	36 SA	48 SA
P1	9,997	10,235	11,392	12,830	12,866	16,004	15,357	17,474	35,276	36,901
P2	1,242	3,393	6,281	9,882	9,669	9,945	14,142	16,638	29,844	29,965
P3	1,972	2,983	6,218	9,983	10,278	13,744	15,100	15,419	30,621	32,814
P4	0,007	4,038	8,240	12,819	13,920	14,714	19,342	20,005	35,228	38,674
P5	2,473	12,478	13,022	14,383	12,169	13,107	17,846	18,622	37,395	36,638
P6	0,309	3,993	7,895	12,049	13,155	14,040	14,970	15,742	33,019	34,556
ORT	7,47	9,08	10,87	11,52	11,96	42,72	48,54	7,47	9,08	10,87



Şekil 5.15. *IND ve PNP'ye ait in vitro salım profilleri (PBS + %1 Tween® 80)*

İn vitro salım çalışmaları hem yüzey etkin madde içermeyen 0,1N HCl (pH 1,2) ve PBS (pH 6,8) ortamlarında, hem de %1 Tween® 80 içeren PBS (pH 6,8) ortamında gerçekleştirilmiştir. Yüzey etkin madde içermeyen ortamda yapılan çalışmada IND ve PNP 30, 60 ve 120. dakikalarda örnek alınmak üzere 2 saat süresince 0,1N HCl ortamında çalışılmış ve 120. dakikadan sonra membranlar PBS ortamlarına aktarılarak 48. saate kadar belirli zamanlarda örnek alınarak analiz edilmiştir. pH 1,2'de PNP'den salınan miktar, saf IND'den salınan miktara göre çok daha düşük olarak gözlenmiş, buna bağlı olarak salımın gastrik pH'da başlamadığı sonucuna ulaşılmıştır.

pH 6,8'e aktarıldıktan sonra devam eden çalışmada ise PNP'den salıverilen miktarın saf etkin maddeye göre daha az olduğu gözlemlenmiştir. 48 saatin sonunda IND %99,29 salım gösterirken PNP, PBS ortamında %34,92; yüzey etkin maddeli ortamda ise %48,54 salım göstermiştir. Elde edilen bu sonuçlar göz önünde bulundurularak PNP'nin gastrik pH'da çözünmediği ve böylelikle IND'nin olası yan etkilerinden korunabilineceği,

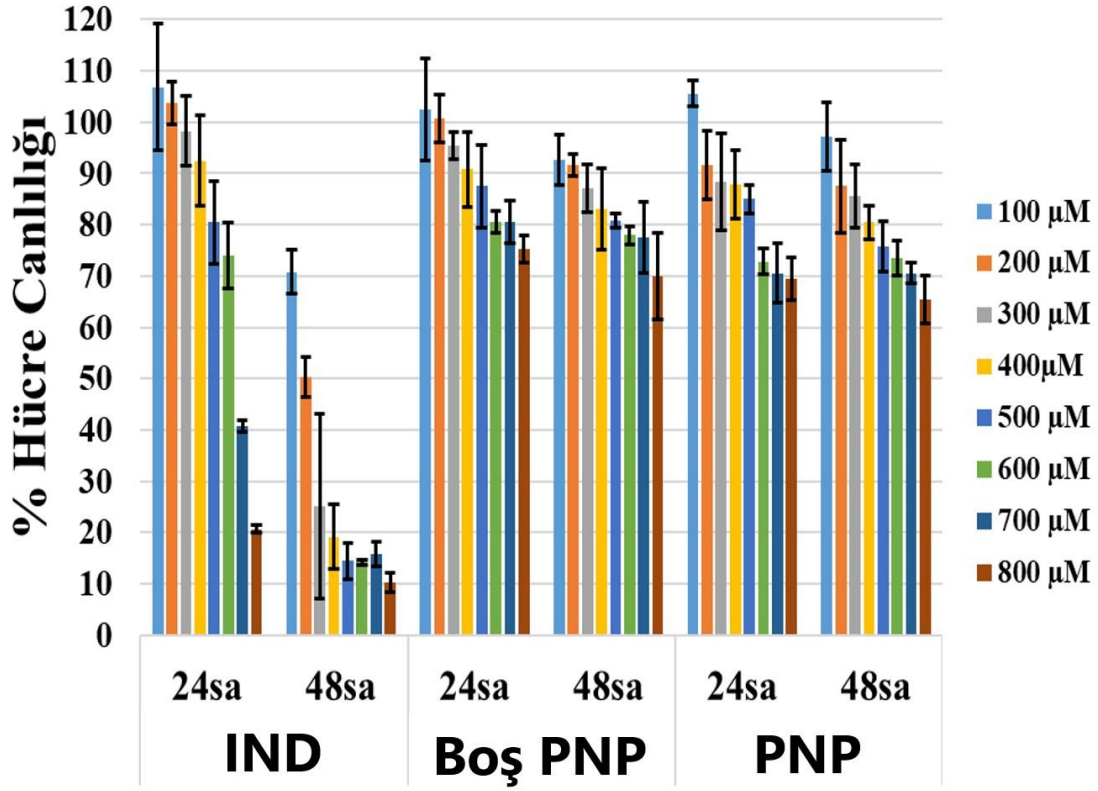
intestinal pH’da ise salım süresinin uzunluğu göz önünde bulundurularak dozlama sıklığının düşürülebilineceği sonucuna varılmıştır.

Elde edilen salım sonuçları literatürle karşılaştırıldığında, Eudragit® RLPO ve BCS Sınıf 2’de yer alan asiklovir kullanılarak yapılan bir çalışmada salım süresinin 24 saati aştığı bildirilmiş ve çalışmamızdaki PNP formülasyonunun salımıyla benzerlik gösterdiği görülmüştür (Gandhi, Jana ve Sen, 2014).

IND, Eudragit® RS100 ve Eudragit® S100 kullanılarak elektroeğirme yöntemi kullanılarak elde edilen IND nanofiber formülasyonu çalışmasında ise pH 1,2’de yapılan *in vitro* salım çalışmasında formülasyonlardan ilk iki saat içerisinde salım gerçekleşmediği bildirilmiştir (Akhgari vd., 2017).

5.2.9. Hücre kültürü çalışmaları

Uluslararası standart ISO 10993-5'e göre çalışılan etkin maddeye maruz bırakılan hücrelerin canlılığı, herhangi bir maddeye maruz kalmayan kontrol hücrelerine kıyasla %70'ten daha az ise göre açık bir sitotoksik etki görüldüğü belirtilmektedir. Buna bilgiden yola çıkılarak IND ve PNP’nin analiz sonuçları değerlendirildiğinde IND için 24. saatte 600 µM ve 48. saatte 100 µM’dan sonra, boş PNP için 24 ve 48. saatte 800 µM’dan sonra, PNP için 24 ve 48. saatte 600 µM’dan sonra sitotoksik etki görülmeye başlanmıştır.



Şekil 5.16. *IND, boş PNP ve PNP'ye ait MTT testi sonucu % hücre canlılığı grafikleri*

Tez kapsamında hazırlanan boş formülasyonların ve IND yüklü formülasyonların hücreler üzerindeki etkisi konsantrasyon ve zamana karşı değerlendirilmiş ve grafik olarak gösterildikten sonra her bir maddenin IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Buna göre çalışılan konsantrasyonlarda bazı hücreler üzerinde IC_{50} değerleri saptanamamıştır. Sonuçlar toplu halde **Tablo 5.19**'da verilmiştir.

Tablo 5.19. *Çalışılan grupların hücreler üzerinde etkili olduğu IC_{50} değerleri (µM) (n=3)*

IND		Boş PNP		PNP	
24 saat	**48 saat**	**24 saat**	**48 saat**	**24 saat**	**48 saat**
653	201	-*	-*	-*	-*

* Çalışılan konsantrasyonlarda IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.

IND'nin PLLA/PLGA polimerleri ile hazırlanmış bir başka formülasyon çalışmasında formüllerin A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan tek başına IND2nin IC50 değerinin 48. Saate 131 µM olarak

belirlenirken, formülasyonun 48 saatteki IC50 değeri 223 µM olarak saptanmıştır. Araştırmacılar artan ilaç konsantrasyonu ile birlikte inkübasyon süresinin de hücre canlılığı üzerine etki ettiğini rapor etmişlerdir (Kang vd., 2008).

IND'nin Eudragit L 100 ile hazırlanan formülasyonu ile ilgili yapılan bir başka çalışmada HepG2 hücreleri üzerindeki etki MTT ile değerlendirilmiş ve 1250 µg/mL'ye kadarki dozlarda %80'den fazla canlılık gözlenmiştir (Froder vd., 2016).

5.3. KLN Formülasyon Çalışmaları

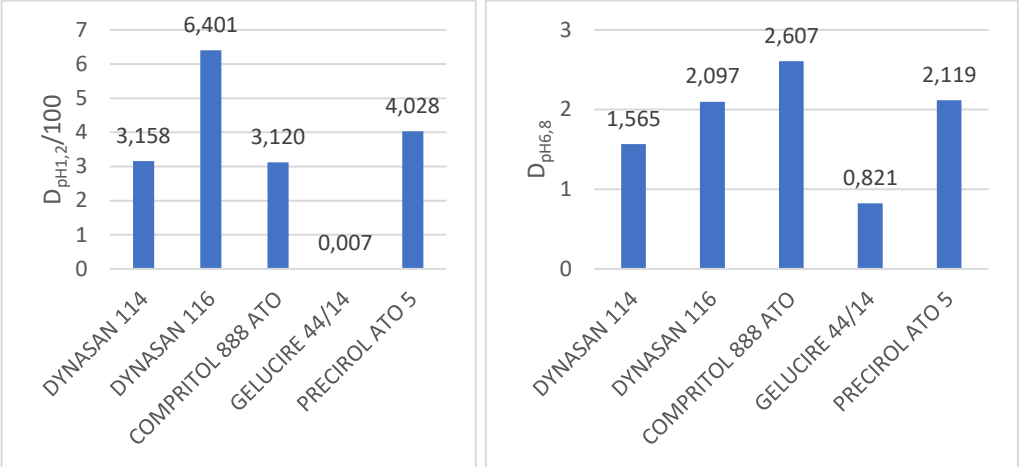
KLN formülasyonu geliştirme çalışmalarında Dynasan® 114, Dynasan® 116, Compritol® 888 ATO, Gelucire® 44/14 ATO ve Precirol® ATO 5 lipitleri kullanılarak pH 1.2 ve 6.8'de formülasyonlar hazırlanmış ve aralarında en yüksek IND tutum kapasitesini gösteren lipit seçilerek ileri çalışmalara geçilmiştir. Sonrasında farklı oranlarda Tween® 80 ve Span® 80 kullanılarak formülasyonlar hazırlanmış ve bu formülasyonların karakterizasyon çalışmaları yapılarak optimum KLN formülasyonu seçilmiştir. Formülasyonların içeriği "*4.5.1.3. KLN hazırlanması*" bölümünde verilen **Tablo 4.3**'teki oranlardan oluşmaktadır.

5.3.1. Lipit seçimi

Lipit seçimi için Dynasan® 114, Dynasan® 116, Compritol® 888 ATO, Gelucire® 44/14 ATO ve Precirol® ATO 5 olmak üzere beş farklı lipit seçilmiş ve yüzey etkin madde kullanılmadan formülasyonlar oluşturulmuştur. Formülasyon aşamasında yağ fazı ve sulu faz ayrı ayrı su banyosunda ısıtılarak aynı sıcaklığa getirilmiş ve yağ fazı sulu faza eklenerek 10000 rpm hızında 5 dakika süresince karıştırılmıştır. Sonrasında formüller oda sıcaklığında kontrollü soğutularak fazların ayrılması sağlanmış ve sulu fazdan örnek alınarak HPLC cihazında miktar tayini yapılmıştır. Bulunan sonuç, Denklem 5.1'de yerine konularak D değerleri hesaplanmıştır.

$$D = \frac{Olması\ gereken\ IND\ miktarı - Sulu\ fazdaki\ IND\ miktarı}{Sulu\ fazdaki\ IND\ miktarı} \quad (5.1)$$

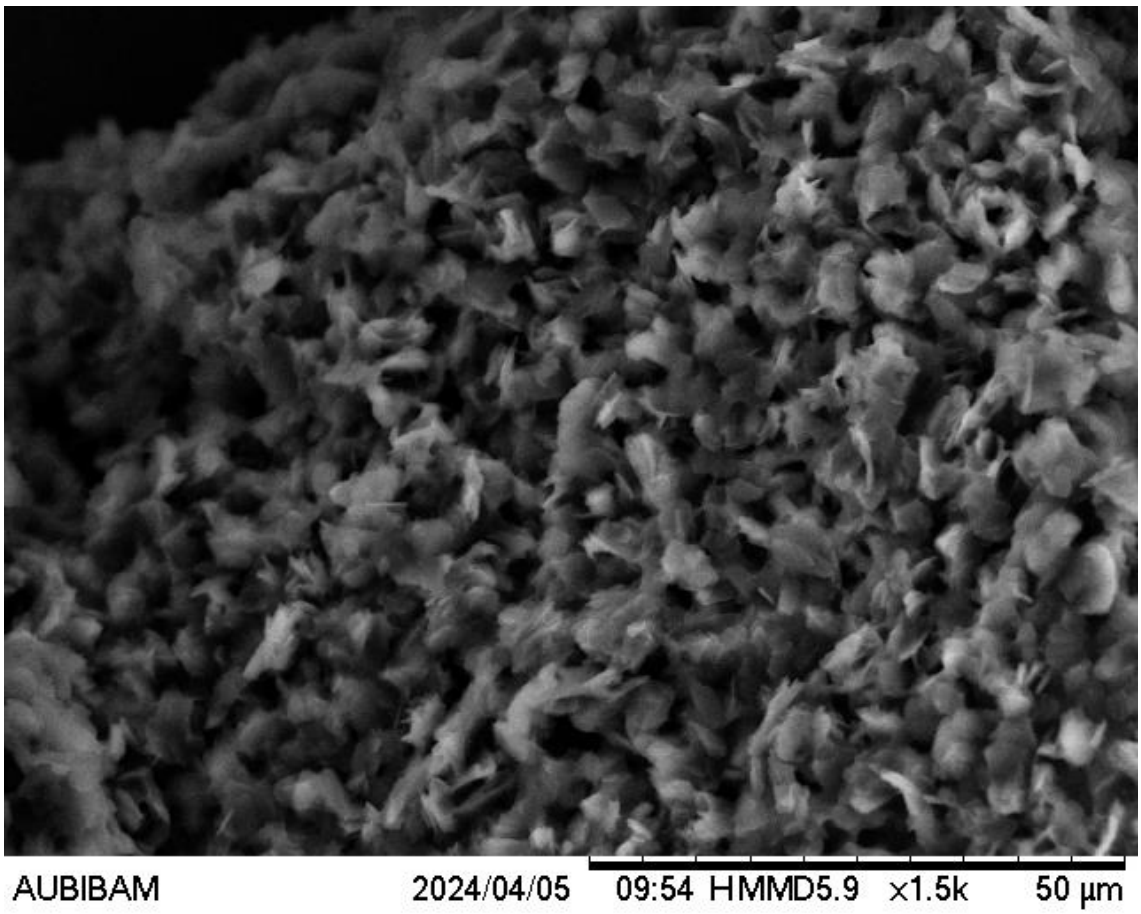
En yüksek D değerini gösteren formülasyonda kullanılan lipit olan Dynasan® 116 seçilerek ileri çalışmalara geçilmiştir. Hesaplanan D değerleri **Şekil 5.17**'de verilmiştir.



Şekil 5.17. *Kullanılan lipitlerin D değerleri*

5.3.2. Morfolojik özellikleri

KLN'ye ait yüzey özellikleri ve parçacık şekline dair SEM görüntüsü **Şekil 5.18**'de verilmiştir.



Şekil 5.18. *KLN'ye ait SEM görüntüsü*

5.3.3. Parçacık büyüklüğü ve dağılımı

Hazırlanan formülasyonlara ilişkin parçacık büyüklüğü ve dağılımı değerleri **Tablo 5.20**'de verilmiştir.

Tablo 5.20. *KLN formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklük ve dağılımları*

Formülasyon	Parçacık büyüklüğü ORT (nm)	Parçacık büyüklüğü SH (nm)	PDI	PDI SH
TS-1	74,66	1,008	0,368	0,009
TS-2	474,4	11,049	0,598	0,012
TS-3	1116	40,501	0,910	0,070

(ORT: Ortalama, SH: Standart hata, PDI: Polidispersite indeksi)

Elde edilen değerlerde de görüldüğü gibi %4 oranında Tween® 80 ve Span® 80 karışımına sahip olan TS-1 formülasyonu en iyi sonuçları vermiş, sırasıyla %3 ve %2 oranında kullanılan TS-2 ve TS-3 formülasyonlarının parçacık büyüklüklerinin çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda optimum formülasyon olarak TS-1 formülasyonu seçilmiştir.

2016'da yapılan bir KLN çalışmasında formülasyonların partikül boyutunun160-185 nm aralığında olduğu bildirilmiş ve 200 nm'den küçük boyuta sahip olduğu için literatüre uygunluğu belirtilmiştir (Büyükköroğlu vd., 2016).

5.3.4. Zeta potansiyel

Hazırlanan formülasyonlara ilişkin zeta potansiyel değerleri **Tablo 5.21**'de verilmiştir.

Tablo 5.21. *KLN formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri*

Formülasyon kodu	Zeta potansiyel ORT (mV)	SH
TS-1	-18,4	0,841
TS-2	-22,2	0,328
TS-3	-14,8	0,775

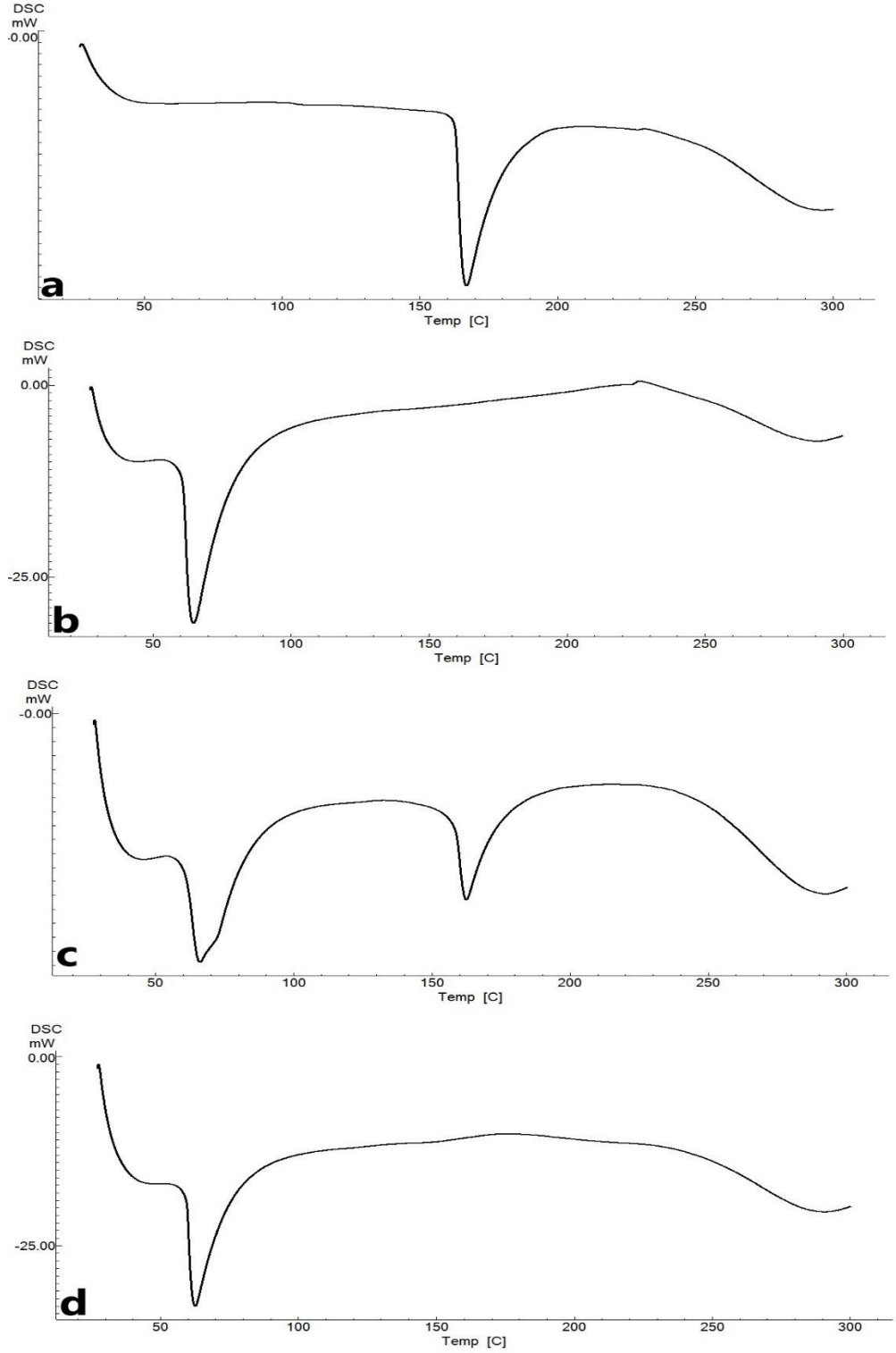
Elde edilen sonuçlara göre TS-1 kararlı bir yapı gösterirken TS-2 formülasyonunun oldukça kararlı bir yapıda ve TS-3 ise daha az kararlı bir yapıda görülmektedir (Başaran, 2017a).

5.3.5. Enkapsülasyon etkinliği (%EE)

%EE değeri, nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Yüksek %EE değeri, etkili dozun daha düşük miktarda olmasını sağlamaktadır (Öztürk, Yenilmez, Şenel, vd., 2020). IND içeren KLN formülasyonunun %EE değeri Denklem 4.5 kullanılarak hesaplanmış ve sonuç olarak %22,2288 ± 0,1689 bulunmuştur.

5.3.6. Termal analiz

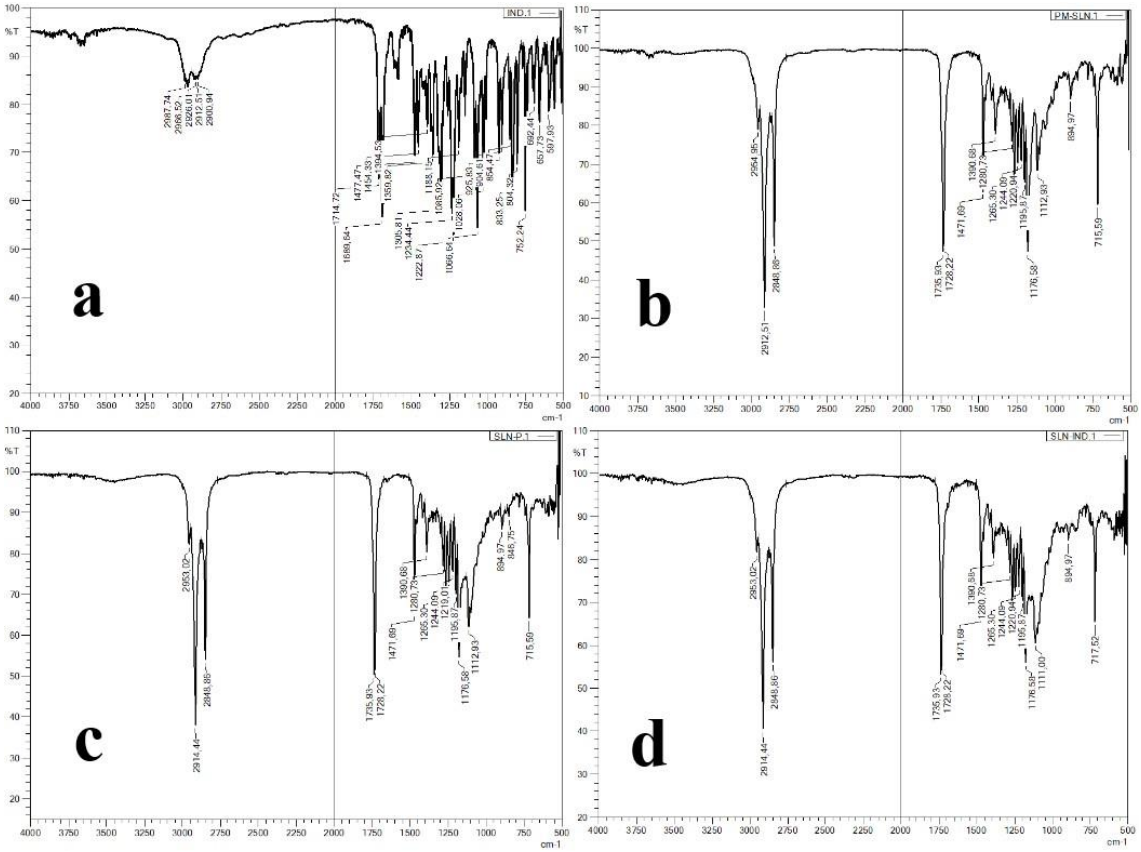
IND, Dynasan® 116, KLN fiziksel karışımı ve KLN formülasyonuna ait DSC termogramları **Şekil 5.19**'da verilmiştir. Termogramlardaki pikler incelendiğinde fiziksel karışımda ve formülasyonda IND'ye ait pikin kaybolduğu görülmektedir. Etkin maddeye ait pikin kaybolması, homojen polimer matriks oluşumunu veya amorf yapıyı göstermektedir (Öztürk, Yenilmez ve Yazan, 2019).



Şekil 5.19. *IND (a), Dynasan®116 (b), KLN fiziksel karışım (c) ve KLN'ye (d) ait termogramlar*

5.3.7. FT-IR analizi

Hazırlanan plasebo ve etkin maddeli formülasyonların, formülasyonda kullanılan lipit ve etkin maddenin fiziksel karışımının ve IND'nin FT-IR spektrumları **Şekil 5.20**'de verilmiştir.

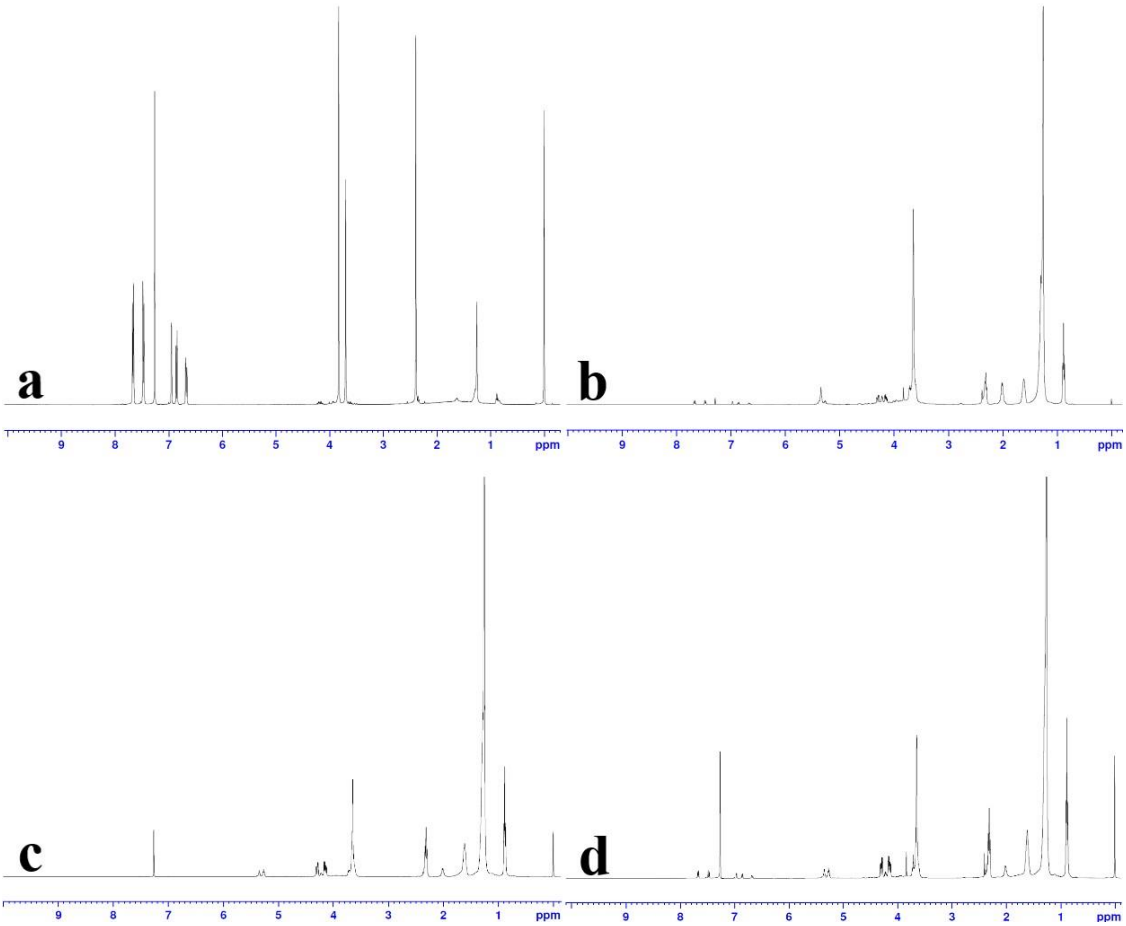


Şekil 5.20. *IND (a), TS-1 formülasyonu fiziksel karışımı (b), TS-1 formülasyonu plasebo (c) ve TS-1 formülasyonunun (d) FT-IR spektrumları*

IND'ye ait piklerin fiziksel karışım ve KLN formülasyonundaki değişimleri, IND'nin amorf yapısına işaret edebilmekle birlikte spesifik piklerin tüm durumlarda görünmesi, taşıyıcı – etkin madde arasında kimyasal bir değişimin görülmediğini, IND'nin lipit içerisine enkapsüle edildiğini göstermektedir (Yurtdaş, Demirel, ve Genç, 2011).

5.3.8. ^{1}H NMR analizi

Hazırlanan plasebo ve etkin maddeli formülasyonların, formülasyonda kullanılan lipit ve etkin maddenin fiziksel karışımının ve IND'nin ^{1}H NMR spektrumları **Şekil 5.21**'de verilmiştir.



Şekil 5.21. *IND (a), TS-1 formülasyonunun fiziksel karışımı (b), TS-1 formülasyonu plasebo (c) ve TS-1 formülasyonunun (d) ^{1}H NMR spektrumları*

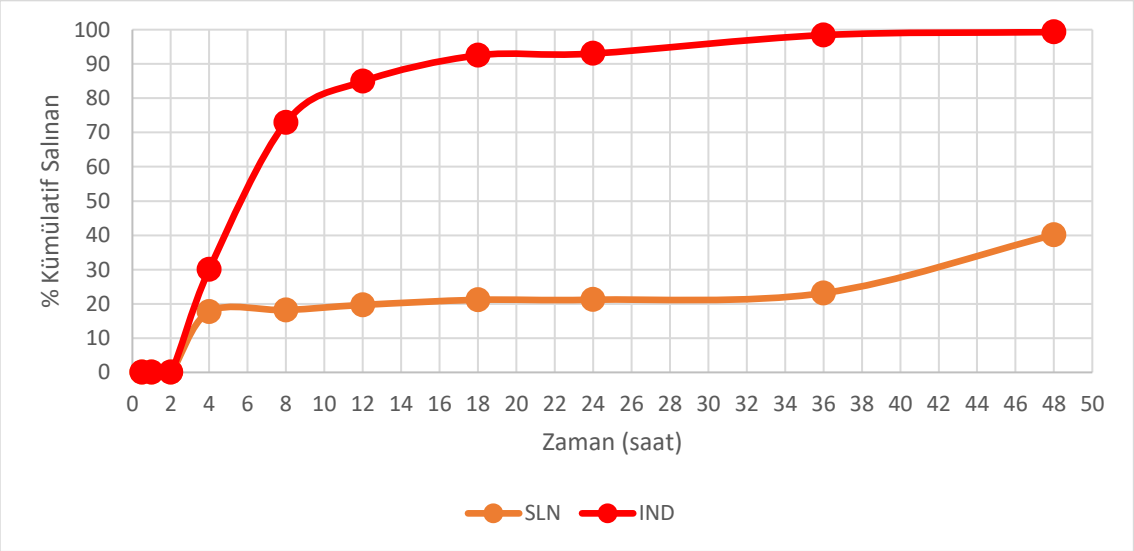
Etkin maddenin bazı piklerinin fiziksel karışım ve formülasyonda görülmemesi veya az yoğunlukta görülmesi, IND'nin başarılı bir şekilde lipitte enkapsüle edildiğine işaret etmektedir (E. Yenilmez, Başaran, ve Yazan, 2011).

5.3.9. *İn vitro* salım çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları, hem yüzey etkin madde içermeyen PBS (pH 6,8) ortamında hem de %1 Tween® 80 içeren PBS (pH 6,8) ortamında gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda elde edilen değerler **Tablo 5.22-5.23**'te ve % kümülatif salım sonuçlarının zamana karşı grafiği **Şekil 5.22-5.23**'te verilmiştir.

Tablo 5.22. *KLN'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS)*

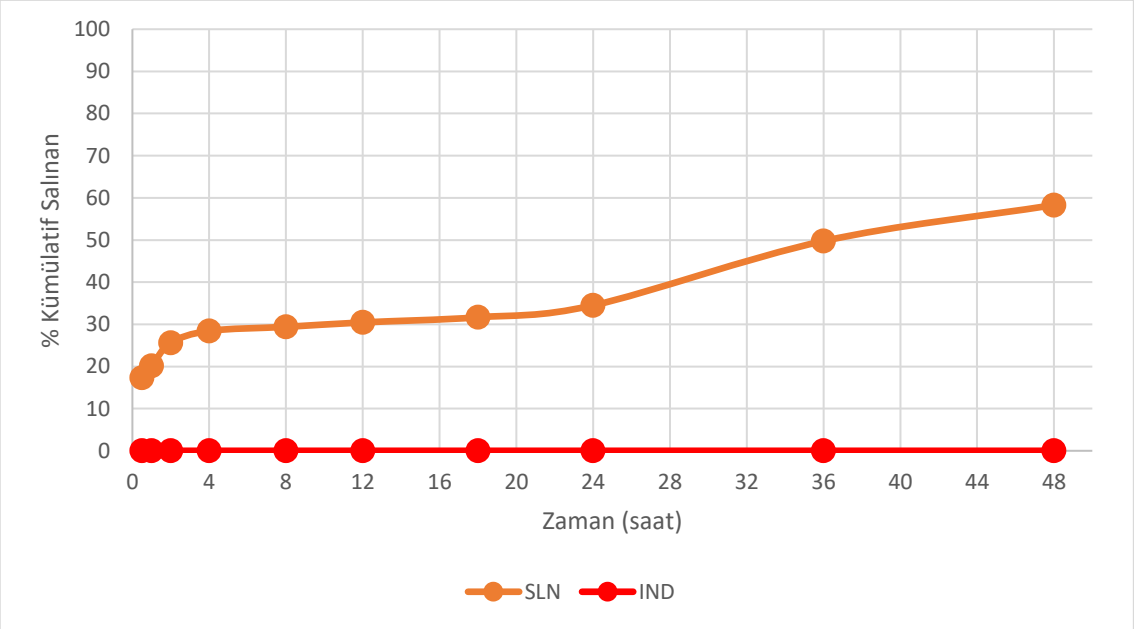
KOD	30 DK	1 SA	2 SA	4 SA	8 SA	12 SA	18 SA	24 SA	36 SA	48 SA
S1	0	0	0,001	19,089	19,200	24,598	25,038	24,752	29,624	49,846
S2	0	0	0,020	19,594	20,229	18,063	22,658	22,518	22,315	40,955
S3	0	0	0	15,966	16,040	16,034	20,248	20,260	20,210	39,559
S4	0	0	0,004	15,570	15,539	19,775	19,983	20,062	23,922	38,931
S5	0	0	0,050	17,903	19,574	18,499	18,057	18,424	21,811	35,381
S6	0	0	0,051	18,222	18,527	21,106	20,999	21,193	20,956	36,204
ORT	0	0	0	17,724	18,185	19,679	21,164	21,202	23,140	40,146



Şekil 5.22. *IND ve KLN'ye ait in vitro salım profilleri (PBS pH 6,8)*

Tablo 5.23. *KLN'nin in vitro salım çalışmasına ait % kümülatif değerler (PBS + %1 Tween® 80)*

KOD	30 DK	1 SA	2 SA	4 SA	8 SA	12 SA	18 SA	24 SA	36 SA	48 SA
S1	18,640	20,737	26,265	27,886	29,250	30,524	31,538	36,681	49,651	60,149
S2	18,492	20,205	25,590	29,426	27,683	29,131	30,583	32,802	49,997	57,423
S3	16,524	18,958	25,114	27,706	30,426	31,385	31,759	35,815	48,942	56,182
S4	16,065	19,102	24,742	27,701	27,716	28,795	29,119	30,923	45,864	52,084
S5	15,980	19,540	23,775	26,357	28,926	29,615	31,989	34,375	49,982	58,602
S6	18,297	22,456	28,085	31,580	32,403	33,292	35,000	36,397	54,067	65,274
ORT	17,33	20,17	25,60	28,44	29,40	30,46	31,66	34,50	49,75	58,29



Şekil 5.23. *IND ve KLN'ye ait in vitro salım profilleri (PBS + %1 Tween® 80)*

İn vitro salım çalışmaları hem yüzey etkin madde içermeyen 0,1N HCl (pH 1,2) ve PBS (pH 6,8) ortamlarında, hem de %1 Tween® 80 içeren PBS (pH 6,8) ortamında gerçekleştirilmiştir. Yüzey etkin madde içermeyen ortamda yapılan çalışmada 30, 60 ve 120. dakikalarda örnek alınmak üzere 2 saat süresince 0,1N HCl ortamında çalışılmış ve IND salımının 60. dakikadan sonra başladığı, KLN salımının ise ilk 120 dakikada başlamadığı görülmüştür. 120. dakikadan sonra membranlar PBS ortamlarına aktarılarak 48. saate kadar belirli zamanlarda örnek alınarak analiz edilmiştir.

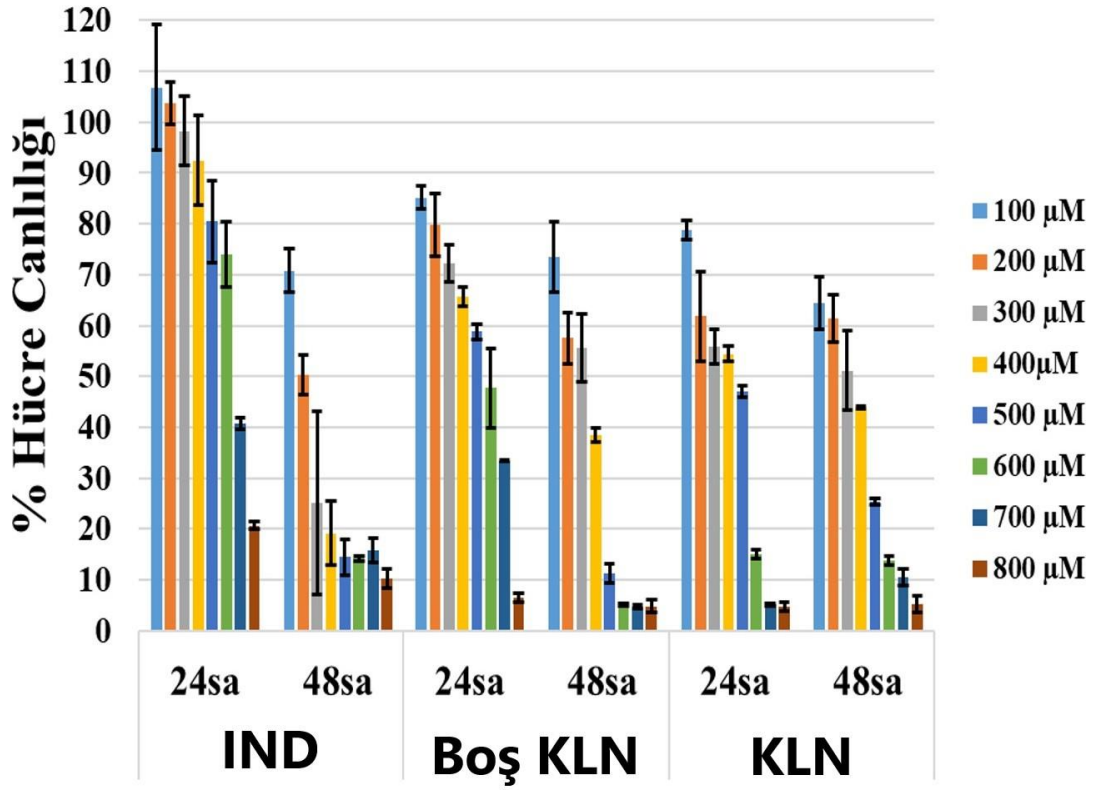
pH 6,8'e aktarıldıktan sonra devam eden çalışmada ise KLN'den salıverilen miktarın saf etkin maddeye göre daha az olduğu gözlemlenmiştir. 48 saatin sonunda IND %99,29 salım gösterirken KLN, PBS ortamında %40,42; yüzey etkin maddeli ortamda ise %58,29 salım göstermiştir.

Dynasan® türevleri ve BCS sınıf 2'de yer alan klozapin ile yapılan bir çalışmada salım süresinin 30 saati aştığı bildirilmiş, çalışmamızda kullanılan KLN formülasyonuyla uyumlu sonuç verdiği görülmüştür (Venkateswarlu ve Manjunath, 2004).

Etkin madde olarak IND, sıvağ olarak sulu ve yağlı olmak üzere iki farklı sıvağ kullanılarak gerçekleştirilen bir supozituvar formülasyonunda, %1 Tween® 80 içeren ortamda yapılan *in vitro* salım çalışmasında salım süresinin 48 saate ulaştığı ve yağda çözünen sıvağ kullanılarak yapılan supozituvarların 45 saat sonunda yaklaşık %60 kümülatif salım gösterdiği belirtilmiştir (M. L. Sah ve Saini, 2008).

5.3.10. Hücre kültürü çalışmaları

Uluslararası standart ISO 10993-5'e göre çalışılan etkin maddeye maruz bırakılan hücrelerin canlılığı, herhangi bir maddeye maruz kalmayan kontrol hücrelerine kıyasla %70'ten daha az ise göre açık bir sitotoksik etki görüldüğü belirtilmektedir. Buna bilgiden yola çıkılarak IND ve KLN'nin analiz sonuçları değerlendirildiğinde IND için 24. saatte 600µM ve 48. saatte 100 µM'dan sonra, boş KLN için 24. saatte 300 µM ve 48. saatte 100 µM'dan sonra, KLN için 24. ve 48. saatte 100 µM'dan sonra sitotoksik etki görülmeye başlanmıştır.



Şekil 5.24. *IND, boş KLN ve KLN'ye ait MTT testi sonucu % hücre canlılığı grafikleri*

Tez kapsamında hazırlanan boş formülasyonların ve IND yüklü formülasyonların hücreler üzerindeki etkisi konsantrasyon ve zamana karşı değerlendirilmiş ve grafik olarak gösterildikten sonra her bir maddenin IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Buna göre çalışılan konsantrasyonlarda bazı hücreler üzerinde IC_{50} değerleri saptanamamıştır. Sonuçlar toplu halde **Tablo 5.24**'te verilmiştir.

Tablo 5.24. *Çalışılan grupların hücreler üzerinde etkili olduğu IC_{50} değerleri (µM) (n=3)*

IND		Boş KLN		KLN	
24 saat	**48 saat**	**24 saat**	**48 saat**	**24 saat**	**48 saat**
653	201	572	318	436	305

PCL, Tween 80 ve Kaprik/Kaprilik trigliserit ile hazırlanan nanokapsüllerin MCF-7 ve HACAT hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, polimerik taşıyıcı sistemin HACAT hücreleri üzerinde çalışılan en yüksek doz olan 100 µM'da sitotoksik etki

yaratmadığı , fakat MCF-7 hücrelerinde EPR etkisiyle daha fazla hücrelerarası ve hücre içine giriş olarak sitotoksisite gösterdiği belirtilmiştir (Franco vd., 2021).

Literatürdeki sınırlı sayıda IND yüklü lipidik formülasyon çalışmaları ile karşılaştırıldığında çalışmamızdan farklı sonuç alınmasının sebebi olarak hem hücre farklılığı hem de formülasyonumuzda daha fazla IND bulunmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

6. SONUÇ

Çalışmaların ana hedefi olarak IND'nin salım süresini uzatmak ve olası yan etkilerini azaltmak amacıyla KLN ve PNP formülasyonları hazırlanmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla IND'nin çözünme özellikleri, termal karakteritikleri, FT-IR ve ^{1}H NMR spektrumları, literatür ve firma verileriyle uyumlu olarak gözlemlenmiştir.

Analitik miktar tayininde literatürden de faydalanılarak yeni bir analitik yöntem geliştirilmiş ve bu yöntemin validasyon koşullarına uygunluğu ispatlanmıştır. %EE sonuçları ise yeterli düzeyde IND'nin yüklendiğini göstermektedir.

PNP ve KLN formülasyonları için optimum koşullar belirlenmiş ve bu koşullar ile optimum formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonların katı hal özellikleri ve partikül özellikleri analiz edilmiş, tüm karakterizasyon analizleri ile elde edilen formülasyonların çalışma için uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen salım sonuçları göz önünde bulundurularak PNP'nin ve KLN'nin gastrik pH'da çözünmediği ve böylelikle IND'nin olası yan etkilerinden korunabilineceği, intestinal pH'da ise salım süresinin uzunluğu göz önünde bulundurularak dozlama sıklığının düşürülebilineceği düşüncesine varılmıştır.

Bu tez kapsamında hazırlanan hem boş formülasyonların hem de IND yüklü formülasyonların hücreler üzerindeki etkisini değerlendirmek amacı ile MTT testi kullanılmıştır. Sonuçlar değerlendirirken bilim otoriteleri tarafından kabul edilen ve Uluslararası Standart ISO 10993-5'e göre "Test sonucunda hücre canlılığının %30 dan fazla azalması, sitotoksik etki olarak kabul edilmektedir" bilgisi dikkate alınmıştır.

Tez çalışmamızda HUVEC hücreleri üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite analizlerinde 24. saatte 600 µM'ın üstünde 48. saatte ise 200'µM'ın üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik özellik göstermeye başlayan IND'nin polimerik/lipidik nanopartikül içerisine yüklendikten sonra bu sitotoksik etkisinin azaldığı gözlenmiştir.

Temel olarak antiinflamatuvar etkisi olan IND'nin özellikle yaşlılarda ve ülseratif hastalık öyküsü olan hastalarda gastrit ve mide ülserlerine neden olduğu bilinmektedir

Eudragit nanoparçacıklarının mide koruyucu potansiyeli göz önüne alındığında, bu sonuçlar hazırlanan bu formülasyonun IND gibi antiinflamatuvar ilaçlar ve mide-bağırsak yaralanmalarına neden olan diğer ilaçlar için bir dağıtım mekanizması olarak kullanılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

Dynasan® 116 ile hazırladığımız lipidik nanopartiküllerle ile ilgili yaptığımız MTT analizine baktığımızda ise boş nanopartiküllerin 24. saatte 300 µM ve 48. saatte 100 µM'dan sonra sitotoksik etki göstermeye başlarken, IND yüklü formülasyonlarda ise bu sitotoksisite etkisi daha da düşük dozlarda görülmeye başlanmıştır.

Yapılan tüm sitotoksisite analizlerinde IND yüklü polimerik/lipidik nanopartiküllerin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre içine geçtiğini ve etkinliğini gösterdiği söylenebilir.

Tüm bu sonuçlar ışığında IND içeren KLN ve PNP formülasyonlarının *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi ve kararlılıklarının incelenmesi ileri planlarımız arasındadır.

KAYNAKÇA

Ahmad, N., Ahmad, R., Alam, M. A., Ahmad, F. J., Amir, M. 2018. "Impact of ultrasonication techniques on the preparation of novel Amiloride-nanoemulsion used for intranasal delivery in the treatment of epilepsy". Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, *46*(sup3), S192-S207.

Akhgari, A., Heshmati, Z., Afrasiabi Garekani, H., Sadeghi, F., Sabbagh, A., Sharif Makhmalzadeh, B., Nokhodchi, A. 2017. "Indomethacin electrospun nanofibers for colonic drug delivery: In vitro dissolution studies". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, *152*, 29-35.

Basha, S. K., Dhandayuthabani, R., Muzammil, M. S., Kumari, V. S. 2021. "Materials Today : Proceedings Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery". Materials Today: Proceedings, *36*, 313-324.

Başaran, E. 2017a. "Diritromisin yüklü polimerik nanopartiküllerin oküler uygulanması: İn vitro değerlendirme". Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, *14*(2), 191-200.

Başaran, E. 2017b. "Diritromisin yüklü polimerik nanopartiküllerin oküler uygulanması: İn vitro değerlendirme". Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, *14*(2), 191-200.

Başaran, E., Öztürk, A. A., Şenel, B., Demirel, M., Sarıca, Ş. 2022. "Quercetin, Rutin And Quercetin-Rutin Incorporated Hydroxypropyl β-Cyclodextrin Inclusion Complexes". European Journal of Pharmaceutical Sciences, *172*.

Bhatia, S. 2016. "*Natural Polymer Drug Delivery Systems Nanoparticles: Nanoparticles, Mammals and microbes*". *Springer* (C. 1).

Blackman, L. D., Gunatillake, P. A., Cass, P., Locock, K. E. S. 2019. "An introduction to zwitterionic polymer behavior and applications in solution and at surfaces". Chemical Society Reviews, *48*(3), 757-770.

Boardman, P. L., Hart, F. D. 1967. "Side-effects of Indomethacin". Annals of the Rheumatic Diseases, (26), 127-132.

Brien, M. O., Mccauley, J., Cohen, E. 1984. "Indomethacin". Analytical Profiles of Drug Substances, *13*, 211-238.

Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Gezgin, S., Dinh, T. 2016. "The simultaneous delivery of paclitaxel and Herceptin® using solid lipid nanoparticles: In vitro evaluation". Journal of Drug Delivery Science and Technology, *35*, 98-105.

Castelli, F., Puglia, C., Sarpietro, M. G., Rizza, L., Bonina, F. 2005. "Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry". International Journal of Pharmaceutics, *304*(1-2), 231-238.

Cetin, M., Atila, A., Sahin, S., Vural, I. 2013. "Preparation and characterization of metformin hydrochloride loaded-Eudragit®RSPO and Eudragit®RSPO/PLGA nanoparticles.". Pharmaceutical development and technology, *18*(3), 570-576.

Crucho, C. I. C., Barros, M. T. 2017. "Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods". Materials Science and Engineering C, *80*, 771-784.

Dandić, A., Rajkovača, K., Jozanović, M., Pukleš, I., Széchenyi, A., Budetić, M., Samardzić, M. 2022a. "Review of characteristics and analytical methods for determination of indomethacin". Reviews in Analytical Chemistry, *41*(1), 34-62.

Dandić, A., Rajkovača, K., Jozanović, M., Pukleš, I., Széchenyi, A., Budetić, M., Samardzić, M. 2022b, Ocak 1. "Review of characteristics and analytical methods for determination of indomethacin". Reviews in Analytical Chemistry. Walter de Gruyter GmbH.

Demirel, M., Yazan, Y. 2000. "Kati lipit nanopartiküller (SLN)". Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences, *25*(4), 167-179.

Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste, Z. M. 2013. "Polimerik Nanopartiküller". Sigma : Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, *31*(1), 107-120.

Dupeyrón, D., Kawakami, M., Ferreira, A. M., Cáceres-Vélez, P. R., Rieumont, J., Azevedo, R. B., Carvalho, J. C. T. 2013. "Design of indomethacin-loaded nanoparticles: Effect of polymer matrix and surfactant". International Journal of Nanomedicine, *8*, 3467-3477.

Elkhodairy, K. A., Elsaghir, H. A., Al-Subayiel, A. M. 2014. "Formulation of indomethacin colon targeted delivery systems using polysaccharides as carriers by applying liquisolid technique". BioMed Research International, *2014*.

El-Say, K. M., El-Sawy, H. S. 2017. "Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery". International Journal of Pharmaceutics, *528*(1-2), 675-691.

Franco, C., Silva, M. L., Viana, A. R., Ourique, A. F., Krause, L. M. F. 2021. "Cytotoxicity evaluation of indomethacin-loaded polymeric nanoparticles in a human breast adenocarcinoma cell model/ Avaliação da citotoxicicidade de nanopartículas poliméricas contendo indometacina em modelo celular de adenocarcinoma de mama humano". Brazilian Journal of Development, *7*(7), 67004-67014.

Froder, J. G., Dupeyrón, D., Carvalho, J. C. T., Maistro, E. L. 2016. "In vitro study of the cytotoxic and genotoxic effects of indomethacin-loaded Eudragit® L 100 nanocapsules". Genetics and Molecular Research, *15*(3).

Gandhi, A., Jana, S., Sen, K. K. 2014a. "In-vitro release of acyclovir loaded Eudragit RLPO® nanoparticles for sustained drug delivery". International Journal of Biological Macromolecules, *67*, 478-482.

Gandhi, A., Jana, S., Sen, K. K. 2014b. "In-vitro release of acyclovir loaded Eudragit RLPO® nanoparticles for sustained drug delivery". International Journal of Biological Macromolecules, *67*, 478-482.

Giri, T. K. 2019. "*Solid lipid nanoparticles for the delivery of drug molecules*". *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier Inc.

González-Monje, P., Ayala García, A., Ruiz-Molina, D., Roscini, C. 2021. "Encapsulation and sedimentation of nanomaterials through complex coacervation". Journal of Colloid and Interface Science, *589*, 500-510.

Gordillo-Galeano, A., Mora-Huertas, C. E. 2018. "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, *133*(August), 285-308.

Güven, U. M., Başaran, E. 2021. "In vitro-in vivo evaluation of olopatadine incorporated chitosan nanoparticles for the treatment of ocular allergy". Journal of Drug Delivery Science and Technology, *64*.

Helleberg, L. 1981. "Clinical Pharmacokinetics of Indomethacin". Clinical Pharmacokinetics, *6*(4), 245-258.

Hippalgaonkar, K., Adelli, G. R., Hippalgaonkar, K., Repka, M. A., Majumdar, S. 2013. "Indomethacin-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Development, characterization, and in vitro evaluation". Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, *29*(2), 216-228.

Holister, P., Weener, J.-W., Vas, C. R., Harper, T., Cientifica. 2003. "Nanoparticles: Technology White Paper No.3". Científica, (3), 11.

Homayun, B., Lin, X., Choi, H. J. 2019a. "Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals". Pharmaceutics, *11*(3).

Homayun, B., Lin, X., Choi, H. J. 2019b. "Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals". Pharmaceutics, *11*(3).

Hua, S. 2020. "Advances in Oral Drug Delivery for Regional Targeting in the Gastrointestinal Tract - Influence of Physiological, Pathophysiological and Pharmaceutical Factors". Frontiers in Pharmacology, *11*(April), 1-22.

ICH. 2005a. "*International Conference on Harmonisation of Technical Reqirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)*".

ICH. 2005b. "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)", 1-17.

Iván Martínez-Muñoz, O., Elizabeth Mora-Huertas, C. 2022. "Nanoprecipitation technology to prepare carrier systems of interest in pharmaceutics: An overview of patenting". International Journal of Pharmaceutics, *614*(November 2021).

Jambhekar, S., Casella, R., Maher, T. 2004. "The physicochemical characteristics and bioavailability of indomethacin from β-cyclodextrin, hydroxyethyl-β-cyclodextrin, and hydroxypropyl-β-cyclodextrin complexes". International Journal of Pharmaceutics, *270*(1-2), 149-166.

Jiang, X., Abedi, K., Shi, J. 2021. "Polymeric nanoparticles for RNA delivery". Içinde *Encyclopedia of Nanometarials* (ss. 1-19).

Kang, Y., Wu, J., Yin, G., Huang, Z., Yao, Y., Liao, X., … Liao, L. 2008. "Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of indomethacin-loaded PLLA/PLGA microparticles using supercritical CO2 technique". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, *70*(1), 85-97.

Katopodi, A., Detsi, A. 2021. "Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers of natural products as promising systems for their bioactivity enhancement: The case of essential oils and flavonoids". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, *630*(September), 127529.

Kırımlıoğlu, G. Y., Ozer, S., Buyukkoroglu, G., Yazan, Y. 2018. "*Formulation and In Vitro Evaluation of Moxifloxacin Hydrochloride-Loaded Polymeric Nanoparticles for Ocular Application*". *Article in LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY*. Geliş tarihi gönderen https://www.researchgate.net/publication/327885045

Kumar, A., Dixit, C. K. 2017. "Methods for characterization of nanoparticles". Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids, 44-58.

Kumar, S., Randhawa, J. K. 2013. "High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles". Materials Science and Engineering C, *33*(4), 1842-1852.

Lin, S.-Y. 1991. "Isolation and Solid-state Characteristics of a New Crystal Form of lndomethacin". 572 1 Journal of Pharmaceutical Sciences, *81*(6), 572-576.

Lucas, S. 2016. "The Pharmacology of Indomethacin". Headache: The Journal Of Head And Face Pain, *56*(2), 436-446.

Lúcio, M., Carvalho, A., Lopes, I., Gonçalves, O., Bárbara, E., Oliveira, M. 2015. "Polymeric Versus Lipid Nanoparticles: Comparative Study of Nanoparticulate Systems as Indomethacin Carriers". Journal of Applied Solution Chemistry and Modeling, *4*(2), 95-109.

Merisko-Liversidge, E. M., Liversidge, G. G. 2008. "Drug Nanoparticles: Formulating Poorly Water-Soluble Compounds". Toxicologic Pathology, *36*(1), 43-48.

Mirchandani, Y., Patravale, V. B., Brijesh, S. 2021. "Solid lipid nanoparticles for hydrophilic drugs". Journal of Controlled Release, *335*(May), 457-464.

Mohanraj, V. J., Chen, Y. 2007. "Nanoparticles - A review". Tropical Journal of Pharmaceutical Research, *5*(1), 561-573.

Müderrisoğlu, A. E., Çomoğlu, T. 2010. "An overview of polymeric particulate drug delivery system formulations". Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, *39*(4), 343-368.

Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., Ragadhita, R. 2019. "How to read and interpret ftir spectroscope of organic material". Indonesian Journal of Science and Technology, *4*(1), 97-118.

Nasirizadeh, S., Malaekeh-Nikouei, B. 2020. "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers in oral cancer drug delivery". Journal of Drug Delivery Science and Technology, *55*(July 2019), 101458.

Özdemir, S., Çelik, B., Üner, M. 2019. "*Properties and therapeutic potential of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as promising colloidal drug delivery systems*". *Materials for Biomedical Engineering: Nanomaterials-based Drug Delivery*.

Öztürk, A. A., Banderas, L. M., Otero, M. D. C., Yenilmez, E., Şenel, B., Yazan, Y. 2019. "Dexketoprofen trometamol-loaded poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles: Preparation, in vitro characterization and cyctotoxity". Tropical Journal of Pharmaceutical Research, *18*(1), 1-11.

Öztürk, A. A., Çınar, N. İ., Yenilmez, E. 2019. "Development of nano-sized ketoprofen lysine incorporated Eudragit ® S100 nanomedicine by double emulsion solvent evaporation and in vitro characterization". Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, *7*(1), 47-58. Geliş tarihi gönderen http://jppres.com/jppres

Öztürk, A. A., Guven, U., Yenilmez, E., Kaytaz Şenel, B. 2018. "Effects of Different Derivatives of Eudragit Polymer on Entrapment Efficiency, In Vitro Dissolution, Release Kinetics and Cell Viability Results on Extended Release". Article in LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY. Geliş tarihi gönderen https://www.researchgate.net/publication/328132556

Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Arslan, R., Şenel, B., Yazan, Y. 2020. "Dexketoprofen trometamol loaded solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, in vitro and in vivo evaluation". Journal of Research in Pharmacy, *24*(1), 82-99.

Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Şenel, B., Kıyan, H. T., Güven, U. M. 2020. "Effect of different molecular weight PLGA on flurbiprofen nanoparticles: formulation, characterization, cytotoxicity, and in vivo anti-inflammatory effect by using HET-CAM assay". Drug Development and Industrial Pharmacy, *46*(4), 682-695.

Öztürk, A. A., Yenilmez, E., Yazan, Y. 2019. "Dexketoprofen trometamol-loaded eudragit® rl 100 nanoparticle formulation, characterization and release kinetics". Acta Pharmaceutica Sciencia, *57*(1), 69-84.

Papich, M. G. 2016. "Indomethacin". Içinde *Saunders Handbook of Veterinary Drugs* (ss. 396-397). W.B. Saunders.

Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., Couvreur, P. 2012. "Magnetic nanoparticles: Design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications". Chemical Reviews, *112*(11), 5818-5878.

Sah, E., Sah, H. 2015. "Recent trends in preparation of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles by mixing polymeric organic solution with antisolvent". Journal of Nanomaterials, *2015*.

Sah, M. L., Saini, T. R. 2008. "Formulation Development and Release Studies of Indomethacin Suppositories". Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, *July*, 498-501. Geliş tarihi gönderen www.ijpsonline.com

Sarcan, E. T., Silindir-Gunay, M., Ozer, A. Y. 2018. "Theranostic polymeric nanoparticles for NIR imaging and photodynamic therapy". International Journal of Pharmaceutics, *551*(1-2), 329-338.

Sastry, S. V., Nyshadham, J. R., Fix, J. A. 2000. "Recent technological advances in oral drug delivery – a review". Pharmaceutical Science & Technology Today, *3*(4), 138-145.

Sava, A., Buron, F., Routier, S., Panainte, A., Bibire, N., Profire, L. 2021. "New nitric oxide-releasing indomethacin derivatives with 1,3-thiazolidine-4-one scaffold:

Design, synthesis, in silico and in vitro studies". Biomedicine and Pharmacotherapy, *139*.

Schubert, M. A., Müller-Goymann, C. C. 2003. "Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - Evaluation of the method and process parameters". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, *55*(1), 125-131.

Shah, R. M., Eldridge, D. S., Palombo, E. A., Harding, I. H. 2022. "Stability mechanisms for microwave-produced solid lipid nanoparticles". Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, *643*, 128774.

Sobczyński, J., Bielecka, G. 2019. "*Nanostructure lipid carriers*". *Nanoparticles in Pharmacotherapy*.

Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K. R., Chouhan, R. S., Sadhu, V. 2019a. "Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system". Nano-Structures and Nano-Objects, *20*, 100397.

Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K. R., Chouhan, R. S., Sadhu, V. 2019b. "Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system". Nano-Structures and Nano-Objects, *20*, 100397.

Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O. 2003. "Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique". International Journal of Pharmaceutics, *257*(1-2), 153-160.

Tutun H, Kaya MM. İn vitro sitotoksisite testleri. Kart A, editör. Toksisite Testleri. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2023. p.69-76.

Üner, M. 2006. "Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): Their benefits as colloidal drug carrier systems". Pharmazie, *61*(5), 375-386.

Valentovic, M. 2007. "Indomethacin". Içinde *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (ss. 1-5).

Vauthier, C., Bouchemal, K. 2009. "Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles". Pharmaceutical Research, *26*(5), 1025-1058.

Venkateswarlu, V., Manjunath, K. 2004. "Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles". Journal of Controlled Release, *95*(3), 627-638.

Verma, P. R. P., Banu, V. 1996. "*Sustained Release of Theophylline from Eudragit RLPO and RSPO Tablets*". *Drug Development and Industrial Pharmacy* (C. 22).

Villar-Martínez, M. D., Moreno-Ajona, D., Chan, C., Goadsby, P. J. 2021. "Indomethacin-responsive headaches—A narrative review". Headache, *61*(5), 700-714.

Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., Car, H. 2012. "Nanoparticles as drug delivery systems". Pharmacological Reports, *64*(5), 1020-1037.

Xu, Y., Shrestha, N., Préat, V., Beloqui, A. 2020. "Overcoming the intestinal barrier: A look into targeting approaches for improved oral drug delivery systems". Journal of Controlled Release, *322*(February), 486-508.

Yassin, A. E. B., Khalid Anwer, M. D., Mowafy, H. A., El-Bagory, I. M., Bayomi, M. A., Alsarra, I. A. 2010. "Optimization of 5-fluorouracil solid-lipid nanoparticles: A preliminary study to treat colon cancer". International Journal of Medical Sciences, *7*(6), 398-408.

Yeh, K. C. 1982. "Indomethacin and Indomethacin Sustained Release - A Comparison of Their Pharmacokinetic Profiles". Seminars in Arthritis and Rheumatism, *12*(2), 136-141.

Yeh, K. C. 1985. "Pharmacokinetic overview of indomethacin and sustained-release indomethacin". The American Journal of Medicine, *79*(4), 3-12.

Yenilmez, E., BaŞaran, E., Yazan, Y. 2011. "Release characteristics of vitamin e incorporated chitosan microspheres and in vitro-in vivo evaluation for topical application". Içinde *Carbohydrate Polymers* (C. 84, ss. 807-811).

Yenilmez, Evrim. 2017. "Desloratidin-euragit® RS100 nanopartikülleri: Formülasyon ve karakterizasyon". Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, *14*(2), 148-156.

Yurtdaş, G., Demirel, M., Genç, L. 2011. "Inclusion complexes of fluconazole with β-cyclodextrin: Physicochemical characterization and in vitro evaluation of its formulation". Içinde *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* (C. 70, ss. 429-435).

Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., … Souto, E. B. 2020. "Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology". Molecules, *25*(16).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad-Soyad : Kaan YALÇINKAYA

Yabancı Dil : İngilizce (C1)

Eğitim ve Mesleki Geçmiş

2024-Halen, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

2021-2024, Anadolu Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Yüksek Lisans Programı

2016-2021, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Lisans

2011-2016, Balıkesir Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi

DEVELOPMENT AND *IN VITRO* EVALUATION OF INDOMETHACIN-LOADED NANOPARTICLES.

[1]Yalcinkaya K., [2]Akyil E., [3]Senel B.

[1] Anadolu University, Department of Pharmaceutical Technology, Eskisehir, Turkey, kaan_yalcinkaya@anadolu.edu.tr

[2] Anadolu University, Department of Pharmaceutical Technology, Eskisehir, Turkey, evrim_akyil@anadolu.edu.tr

[3]Anadolu University, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Eskisehir, Turkey, behiyek@anadolu.edu.tr

Introduction: Indomethacin is a non-steroidal anti-inflammatory drug that has various side effects and low solubility in water (1). Nanoparticles are defined as particulate dispersions or solid particles in the size of 10-1000 nanometers, which the drug is dissolved, entrapped or encapsulated to a matrix (2). Therefore, this study aims at overcoming those challenges by loading the drug into SLNs and PNPs.

Materials and Methods: Indomethacin (IND) (kindly gifted by Deva, Turkiye), Dynasan® 116 (Condea Chemie GmbH, Germany), Eudragit® RLPO (Röhm GmbH, Germany), Eudragit® RSPO (Röhm GmbH, Germany). All other chemicals were in analytical grade. For optimum lipid for the SLN formulation, 5 different lipids were tested for attached IND molecules by preparing formulations without surfactants. SLN formulation was prepared by using emulsifying method and PNP formulation was made by using emulsifying – solvent evaporation method. HPLC method was used for determination of Indomethacin. Prepared formulations were evaluated for particle size (PS), polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP) and encapsulation efficiency (%EE).

Results: Formulations prepared without using surfactants showed that the formulation with Dynasan® 116 had the most amount of IND loaded.

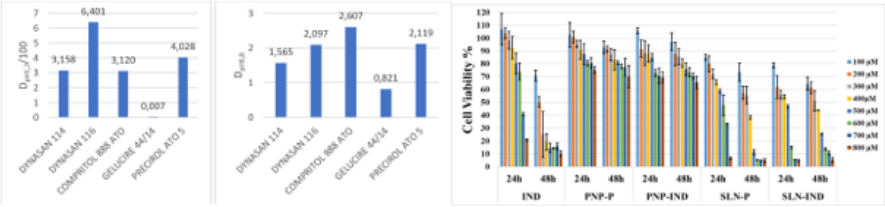


Figure 1. Calculated amount of IND in different lipids and MTT assay results.

Table 1. Characterizations of IND-loaded SLN and PNP formulations (n=3)

Code	PS (nm)	PDI	ZP (mV)	%EE
SLN	74,66	0,368	-18,4	22,2 ± 0,17
PNP	181,9	0,452	-18,8	31,1 ± 0,04

Conclusions:

Dynasan® 116 was determined as the optimum lipid for the SLN formulation according to the results of IND amount loaded. IND-loaded SLN and PNP formulations' zeta potential and particle size results indicated that formulations have good stability (3). Encapsulation efficiency values are appropriate as desired. Further studies such as *in vitro* dissolution and drug releasing tests can be considered. As a result of MTT analysis of indomethacin application for 24 and 48 hours, a linear correlation was observed between drug concentration and cell viability, and it was determined that the PNP formulation had less toxic effects among the formulations. This proves that the PNP nanocarrier is safer for normal cells.

References:

1. Villar-Martinéz MD et al. (2021). Headache, 61(5):700-714.
2. Mohanraj VJ, Chen Y (2006). Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 5(1);561-573.
3. Ozturk AA et al. (2019). Polymers, 11(10).