



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BURUNDAN BEYNE İLAÇ UYGULAMALARI İÇİN
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Elif ŞİMŞEK

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

ANKARA

2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BURUNDAN BEYNE İLAÇ UYGULAMALARI İÇİN
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Elif ŞİMŞEK
18714206

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN
Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 222S683 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Burundan Beyne İlaç Uygulamaları İçin İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve *İn vitro* Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Elif ŞİMŞEK

Tarih: 04.01.2023

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
Elif ŞİMŞEK tarafından hazırlanan
“Burundan Beyne İlaç Uygulamaları İçin İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve
İn vitro Değerlendirilmesi”
adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY
BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04/01/2023

İmza
Prof. Dr. Tansel ÇOMOĞLU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK
Ankara Üniversitesi

İmza
Doç. Dr. Özgür EŞİM
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xi
Çizelgeler	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Merkezi Sinir Sistemi	5
1.2. Kan Beyin Bariyeri	7
1.3. Merkezi Sinir Sistemine İlaç Taşınmasını Artırma Mekanizmaları	10
1.3.1. İntranazal Uygulama	13
1.3.1.1. İntranazal Uygulamanın Avantaj ve Dezavantajları	15
1.3.1.2. Nazal Anatomi ve Fizyoloji	17
1.3.1.3. Nazal Mukoza ve Eritelden Geçiş Mekanizmaları	19
1.3.1.4. İlaç Taşınma Yol ve Mekanizmaları	21
1.3.1.5. Burundan Beyne İlaç Hedeflendirmede Önemli Faktörler	25
1.3.1.5.1. İlacın/Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri	26
1.3.1.5.2. Formülasyon Faktörleri	28
1.3.1.5.3. Fizyolojik Faktörler	30
1.3.1.5.4. Burundan Beyne İlaç Verilmesinde Kullanılan Cihazlar	32
1.3.1.6. Burundan Beyne Hedeflemede Nanotaşıyıcı Sistemler	32
1.3.1.6.1. Polimerik Nanopartiküller	37
1.3.1.6.2. Lipit Bazlı Nanotaşıyıcılar	38
1.3.1.6.2.1. Katı Lipit Nanopartiküller	40
1.3.1.6.3. Nanoemülsiyonlar	40
1.4. Depresyon	41
1.5. Etkin Madde Hakkında Bilgiler	45
1.5.1. Fizikokimyasal Özellikler	47
1.5.2. Farmakokinetik Özellikler	48
2. GEREÇ ve YÖNTEM	50
2.1. Gereçler	50
2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	50
2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
2.2. Yöntem	52
2.2.1. Nanopartiküllerin Üretimi ve Analizlerde Kullanılacak Tampon Çözeltinin Hazırlanışı	52
2.2.2. Paroksetin Hidroklorürün Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması	52
2.2.3. Paroksetin Hidroklorür Kalibrasyon Denkleminin Belirlenmesi	52
2.2.4. Paroksetin Hidroklorür için Analitik Validasyon Çalışmaları	53
2.2.4.1. Doğrusallık ve Aralığı	54

2.2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde	54
2.2.4.3. Kesinlik	55
2.2.4.3.1. Tekrarlanabilirlik	55
2.2.4.3.2. Ara Kesinlik	55
2.2.4.3.3. Tekrar Elde Edilebilirlik	56
2.2.4.4. Seçicilik (Özgünlük)	56
2.2.4.5. Teşhis ve Tayin Sınırları	56
2.2.5. Paroksetin Hidroklorürün Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi	57
2.2.6. Formülasyonların Hazırlanması	57
2.2.6.1. Kitosan Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması	57
2.2.6.2. PLGA Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması	60
2.2.7. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu	63
2.2.7.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği	63
2.2.7.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı	64
2.2.7.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Ölçümü	64
2.2.7.4. Nanopartiküllerin Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi	64
2.2.7.5. Nanopartiküllerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi	65
2.2.7.6. Nanopartikülerin <i>in vitro</i> Çözünme Hızı Tayini	65
2.2.8. Nanopartiküllerin <i>in vitro</i> Adhezyon Testi	66
2.2.8.1. Tekstür Analiz Cihazı ile Ölçümü	66
2.2.8.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü	67
2.2.9. Stabilite Çalışmaları	68
2.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	68
2.2.10.1. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü Koşulları	68
2.2.10.2. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	69
2.2.10.3. Permeabilite Çalışmaları	70
3. BULGULAR	71
3.1. Paroksetin Hidroklorürün Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması	71
3.2. Paroksetin Hidroklorür Kalibrasyon Denkleminin Belirlenmesi	72
3.3. Paroksetin Hidroklorür için Analitik Validasyon Çalışmaları	73
3.3.1. Doğrusallık ve Aralığı	73
3.3.2. Doğruluk ve Geri Elde	74
3.3.3. Kesinlik	76
3.3.3.1. Tekrarlanabilirlik	77
3.3.3.2. Ara Kesinlik	78
3.3.4. Seçicilik (Özgünlük)	80
3.3.5. Teşhis ve Tayin Sınırları	80
3.4. Paroksetin Hidroklorürün Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi	81
3.5. Formülasyonların Karakterizasyonu	82
3.5.1. Kitosan Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Karakterizasyonu	82
3.5.2. PLGA Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Karakterizasyonu	83
3.5.3. Formülasyonların Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Özelliklerinin İncelenmesi	85
3.5.4. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi	86
3.5.5. Nanopartiküllerin <i>in vitro</i> Çözünme Hızı	89
3.5.6. Formülasyonların <i>in vitro</i> Adhezyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi	96
3.5.6.1. Tekstür Analiz Cihazı ile Ölçümü	96

3.5.6.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü	98
3.6. Formülasyonların Stabilité Verilerinin İncelenmesi	99
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları	100
3.7.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	100
3.7.2. Permeabilite Çalışmaları	101
4. TARTIŞMA	103
4.1. Paroksetin Hidroklorürün Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	103
4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	105
4.2.1. Kitosan Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Değerlendirilmesi	107
4.2.2. PLGA Nanopartikül Formülasyonların Değerlendirilmesi	110
4.3. Morfolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi	114
4.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Bulgularının Değerlendirilmesi	115
4.5. <i>İn Vitro</i> Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi	116
4.6. <i>İn vitro</i> Adhezyon Özelliğinin Değerlendirilmesi	120
4.6.1. Tekstür Analiz Cihazı ile Ölçüm	120
4.6.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü	121
4.7. Formülasyonların Stabilité Verilerinin İncelenmesi	122
4.8. Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi	123
4.8.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	123
4.8.2. Permeabilite Çalışmaları	124
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	126
ÖZET	128
SUMMARY	129
KAYNAKLAR	130
ÖZGEÇMİŞ	140

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında; dünya genelinde gençlerden yaşlılara geniş yaş aralığında pek çok insanın muzdarip olduğu depresyon tedavisinde kullanılan paroksetinin biyoyararlanımını artırmak amacıyla kan beyin bariyeri engeline takılmadan doğrudan burundan beyne ulaştırılması için lipit kaplı kitosan ve poli(laktik-koglikolik asit) (PLGA) bazlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiş ve *in vitro* etkinlik değerlendirmesi yapılmıştır.

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi birikimi ve tecrübesi ile bana yol gösterip ışık olan, her daim güler yüzü ve hoşgörüsünü gösteren, desteğini hep hissettiğim, her zaman kendime örnek aldığım kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmamı 222S683 proje numarası ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Başta Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR olmak üzere anabilim dalımızın tüm değerli hocalarına lisans eğitimimden bu yana bu alanı sevdirdikleri, bana kattıkları ve destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar imkanlarını kullanmam konusunda kolaylık sağladıkları için sayın hocalarım Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL ve Doç. Dr. Zerrin SEZGİN-BAYINDIR'a teşekkürlerimi sunarım.

Bütün bu süreç boyunca manevi ve bilimsel desteklerini esirgemeyen, sevgilerini hep hissettiğim, bana yardımcı olan hocalarım Doç. Dr. Ulya NUMANOĞLU BADILLI ve Dr. Öğr. Üyesi Özge İNAL'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca yanımda olup pozitif enerjisiyle beni hep olumlu etkileyen, yardımlarını ve desteğini hep hatırlayacağım sevgili arkadaşım Dr. Ecz. Özge EŞİM'e sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamda kullandığım etkin maddeyi sağlayan Ali Raif İlaç Sanayi A.Ş.'ye teşekkür ederim.

Varlıklarına her daim şükrettiğim, aldığım her kararda en büyük destekçilerim ve şansım olan sevgili ailem annem Yasemin ŞİMŞEK, babam Ali ŞİMŞEK ve ablam Duygu ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkür ediyorum.



SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrad derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
5-HT	5-hidroksitriptamin
a	Ağırlık
Å	Angström
AÇEM	Açığa çıkan etkin madde
AUC	Eğri altında kalan alan
BDNF	Beyin türevli nörotrofik faktör
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BSS	Bağıl standart sapma
Capmul MCM	Mono&di-gliserit-emülgatör
ChT	Kolin taşıyıcı
cm	Santimetre
Cmax	Maksimum konsantrasyon
CO ₂	Karbondioksit
D2	Dopamin
Da	Dalton
dk	Dakika
DMA	Düşük molekül ağırlıklı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSC	Differential scanning calorimetry, Diferansiyel taramalı kalorimetre
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EE	Enkapsülasyon etkinliği
EHEC	Etil(hidroksietil)selüloz
em	Etkin madde
EMA	European Medicine Agency, Avrupa İlaç Ajansı
FBS	Fötal Sığır Serumumu
FDA	Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç İdaresi
GE	Geri elde
GLUT1	Glikoz taşıyıcı
h	Hacim
H1	Histamin
HCl	Hidroklorür
HPA	Hipotalamik-pitüiter-adrenal eksen
ICH	The International Council for Harmonisation, Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu
IN	İntranazal
ISF	İnterstisyel sıvı
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
IV	İntravenöz
K	Kitosan
KBB	Kan beyin bariyeri
kDa	Kilodalton

kg	Kilogram
L	Lesitin
LAT1	l-tip aminoasit taşıyıcı
LDL	Low density lipoprotein, Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOD	Limit of Detection, Teşhis sınırı
Log	Logaritma
logP	Partisyon katsayısı
LOQ	Limit of Quantification, Tayin sınırı
M	Molar
m	Eğim
MAOI	Monoamin oksidaz inhibitörleri
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	(3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolyumbromit)
n	Kesişim
N	Normal
NDRI	Norepinefrin ve dopamin geri alım inhibitörleri
nm	Nanometre
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
PB	Partikül büyüklüğü
PBS	Fosfat salin tamponu
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
pH	Power of hydrogen, hidrojen gücü
pKa	Asitlik sabiti
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PRX	Paroksetin
PTFE	Politetrafloroetilen
PVA	Polivinil alkol
r	Korelasyon katsayısı
r ²	Determinasyon katsayısı
rpm	Revolutions per minute, Dakikadaki devir sayısı
S	Kalibrasyon doğrusunun eğimi
s	Saniye
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SNRI	Selektif serotonin ve norepinefrin geri alım inhibitörleri
SS	Standart sapma
SSRI	Seçici serotonin geri alım inhibitörleri
Sy.x	Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası
TCA	Siklik veya Trisiklik antidepresanlar
TEM	Transmission Electron Microscopy, Geçirimli Elektron Mikroskobu
UV	Ultraviyole
W	Watt (güç birimi)
YMA	Yüksek molekül ağırlıklı
yy	Yüzyıl
ZP	Zeta potansiyeli
β	Beta
λ _{max}	Maksimum absorbans gözlenen dalga boyu
σ	Regresyon doğrusunun y eksenini kestiği noktanın standart sapması

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Merkezi sinir sisteminde yer alan bariyerler	6
Şekil 1.2. KBB boyunca taşınmada potansiyel yollar	11
Şekil 1.3. Nazal boşluğun anatomik yapısı	17
Şekil 1.4. Nazal epitelden beyne ilaç taşınma yollarının kavramsal temsili	21
Şekil 1.5. Nazal uygulama sonrası ilacın beyne taşınması için farklı yollar	23
Şekil 1.6. Burun boşluğundan beyne taşınmada görevli yolların şematik gösterimi	24
Şekil 1.7. Paroksetin hidroklorürün yapısal formülü	47
Şekil 2.1. Paroksetin yüklü kitosan-lesitin nanopartiküllerin üretim şeması	59
Şekil 2.2. Paroksetin yüklü kitosan-lesitin nanopartiküllerin üretimi	59
Şekil 2.3. Paroksetin yüklü PLGA nanopartiküllerin üretim şeması	61
Şekil 2.4. Ultrasonik prob ile PLGA nanopartikül üretimi	62
Şekil 2.5. TA.XT Plus Tekstür Analiz Cihazı ile <i>in vitro</i> adhezyon ölçümü	67
Şekil 3.1. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamındaki UV spektrumu	71
Şekil 3.2. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki UV spektrumu	71
Şekil 3.3. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamındaki kalibrasyon doğrusu	72
Şekil 3.4. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki kalibrasyon doğrusu	72
Şekil 3.5. Paroksetin hidroklorürün saf sudaki doğrusallık grafiği	74
Şekil 3.6. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki doğrusallık grafiği	74
Şekil 3.7. Paroksetin hidroklorürün DSC termogramı	81
Şekil 3.8. Paroksetin hidroklorür yüklü (a) S1, (b) S2 ve (c) S6 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri	86
Şekil 3.9. Kitosanın DSC termogramı	87
Şekil 3.10. Lesitin DSC termogramı	87
Şekil 3.11. PVA'nın DSC termogramı	88
Şekil 3.12. PLGA'nın (50:50) DSC termogramı	88
Şekil 3.13. S6 kodlu kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül	89

formülasyonun DSC termogramı

Şekil 3.14. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki çözünme hızı grafiği 90

Şekil 3.15. Farklı miktarda etkin madde içeren kitosan bazlı nanopartiküllerden paroksetin hidroklorür çıkış grafiği 90

Şekil 3.16. Farklı L:K oranına sahip kitosan bazlı nanopartiküllerden paroksetin hidroklorür çıkış grafiği 91

Şekil 3.17. DMA kitosan çözeltisi üzerine pH 6,4 PBS ortamının ilavesi ile hazırlanan F6 kodlu nanopartikül formülasyonundan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği 91

Şekil 3.18. pH 6,4 PBS ortamındaki DMA kitosan çözelti pH'sının 7.5'e ayırılması ile hazırlanan F10 kodlu nanopartikül formülasyonundan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği 92

Şekil 3.19. Farklı primer emülsiyon yağ fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonlardan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği 92

Şekil 3.20. Farklı sekonder emülsiyon dış su fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonlardan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği 93

Şekil 3.21. F6 formülasyonuna ait adhezyon grafiği 96

Şekil 3.22. S1 formülasyonuna ait adhezyon grafiği 97

Şekil 3.23. S2 formülasyonuna ait adhezyon grafiği 97

Şekil 3.24. S6 formülasyonuna ait adhezyon grafiği 98

Şekil 3.25. *In vitro* adhezyon özelliğın tayini için zeta potansiyelindeki değışimin grafiksel gösterimi 99

Şekil 3.26. Caco-2 hücre hattında saf paroksetin, boş nanopartikül formülasyonları ve S1, S2, S6 kodlu nanopartikül formülasyonlarının 24 saatlik inkübasyonu sonundaki sitotoksik etkileri 100

Şekil 3.27. Caco-2 hücre hattında saf paroksetin, boş nanopartikül formülasyonları ve S1, S2, S6 kodlu nanopartikül formülasyonlarının 48 saatlik inkübasyonu sonundaki sitotoksik etkileri 101

Şekil 3.28. Caco-2 hücre hattında saf paroksetin, boş nanopartikül formülasyonları ve S1, S2, S6 kodlu nanopartikül formülasyonlarının 72 saatlik inkübasyonu sonundaki sitotoksik etkileri 101

Şekil 3.29. Rodamin B yüklü nanopartiküllerin Caco-2 hücre hattında 102 permeasyon verilerine ait grafik

Şekil 3.30. Rodamin B yüklü nanopartiküllerin Caco-2 hücre hattında 102 permeasyon çalışmasına ait görüntüler (a:Rodamin B yüklü nanopartikül içeren Transwell® insert, b: Akseptör bölge üstünde Transwell® insert, c: permeabilite çalışma sonucunda alt bölgeye geçebilen Rodamin B yüklü nanopartikül)



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. KBB geçiş yolları ve mekanizmaları	12
Çizelge 1.2. Sistemik etki için nazal uygulanan ilaçlara örnekler	15
Çizelge 1.3. Paroksetin hidroklorürün farklı ortamlardaki çözünürlüğüne ait bilgiler	48
Çizelge 2.1. Farklı miktarda paroksetin hidroklorür (PRX) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	59
Çizelge 2.2. Farklı L:K oranı ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	60
Çizelge 2.3. Farklı DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen ortam ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları	60
Çizelge 2.4. Farklı pH'da hazırlanan nanopartikül formülasyonları	60
Çizelge 2.5. Farklı primer emülsiyon yağ fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonları	62
Çizelge 2.6. Farklı dış su fazı pH değerlerinde hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonları	63
Çizelge 2.7. Farklı sekonder emülsiyon dış su fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonları	63
Çizelge 3.1. Farklı ortamlarda paroksetin hidroklorür kalibrasyon denklemlerine ait veriler	73
Çizelge 3.2. Paroksetin hidroklorürün farklı ortamlardaki doğrusallık parametreleri (n=6)	73
Çizelge 3.3. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamında UV spektrofotometre ile doğruluk ve geri elde değerleri	75
Çizelge 3.4. Paroksetin hidroklorürün pH 6.4 PBS ortamında UV spektrofotometre ile doğruluk ve geri elde değerleri	76
Çizelge 3.5. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamında UV spektrofotometre ile tekrarlanabilirlik değerleri	77
Çizelge 3.6. Paroksetin hidroklorürün pH 6.4 PBS ortamında UV spektrofotometre ile tekrarlanabilirlik değerleri	78
Çizelge 3.7. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamında UV spektrofotometre	79

ile ara kesinlik değerleri

Çizelge 3.8. Paroksetin hidroklorürün pH 6.4 PBS ortamında UV 80
spektrofotometre ile ara kesinlik değerleri

Çizelge 3.9. Paroksetin hidroklorürün farklı ortamlardaki teşhis ve tayin 81
sınırları

Çizelge 3.10. Farklı miktarda paroksetin hidroklorür içeren nanopartikül 82
formülasyonların karakterizasyonu

Çizelge 3.11. Farklı L:K oranlarıyla hazırlanan nanopartikül 82
formülasyonlarının karakterizasyonu

Çizelge 3.12. DMA kitosan çözeltisi üzerine farklı ortamların ilavesiyle 83
hazırlanan nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu

Çizelge 3.13. pH değeri farklı ortamlarda hazırlanan nanopartikül 83
formülasyonların karakterizasyonu

Çizelge 3.14. Farklı primer emülsiyon yağ fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA 84
nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu

Çizelge 3.15. Farklı dış su fazı pH değerlerinde hazırlanan PLGA 84
nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu

Çizelge 3.16. Farklı sekonder emülsiyon dış su fazı bileşeni ile hazırlanan 85
PLGA nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu

Çizelge 3.17. PLGA nanopartikül formülasyonlara ait salım kinetik 94
parametreleri

Çizelge 3.18. Kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlara ait salım kinetik 95
parametreleri

Çizelge 3.19. Tekstür Analiz cihazından elde edilen sonuçlar 96

Çizelge 3.20. *İn vitro* adhezyon özelliğın tayini için zeta potansiyeli değerleri 98

Çizelge 3.21. S1, S2, S6 kodlu formülasyonlara ait 6 aylık stabilite verileri 99

1. GİRİŞ

Depresyon, dünyada en çok yeti kaybına neden olan hastalıklar arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Aynı zamanda depresyon iyi tedavi edilmezse başka ruhsal hastalıklara, alkol ve madde kullanım sorunlarına da zemin hazırlamaktadır. En kötü tablo ise, intihara yol açabilir olmasıdır. Ayrıca, iyi tedavi edilmemiş ve uzamış depresyon kalp hastalıkları ve diyabet gibi bazı bedensel hastalıklara da sebep olabilmekte ve hastalıkların seyrini kötüleştirip ölüm riskini bile artırmaktadır (DSÖ, 2017).

Depresyon ile ilgili araştırmalar 20 yy.'nin ikinci yarısında hız kazanmıştır. Depresyonun etiyolojisi henüz bütünüyle ortaya koyulamamış olsa da meydana gelme sebepleri genetik, çevresel, psikolojik, yaşamsal olaylar, tıbbi durumlar (kanser, kronik kalp hastalıkları vb.) ve biyolojik faktörlere bağlanmaktadır (Balcıoğlu, 1999; Yemez ve Alptekin, 1998). Görülme sıklığına ait yapılan çalışmalar, depresyonun %33 oranında genetik kökenli olduğunu göstermektedir. Depresyon gelişiminde cinsiyet farklılığı genetik aktarımda da etkilidir. Kadınların erkeklerden daha yüksek riskli grupta olduğu belirlenmiştir (Kendler ve ark., 2006; Lyons ve ark., 1998).

Antidepresanların esas çalışma prensibi nörotransmitter maddelerin sinapslarda geri Emilimini önlemektir. Geri Emilimi önlenen nörotransmitterler hücre dışında kalmaya devam etmektedir. Nörotransmitter üretiminin düşük olduğu bu süre zarfında geri Emilimin önlenmesi bireyin kendini iyi hissetmesini sağlamaktadır. Tedavinin temellerini sinapslarda monoaminlerin konsantrasyonlarını artırmak oluşturmaktadır. Antidepresan tedavilerinin çoğu “norepinefrin”, “serotonin” ve “dopamin”in sinapslarda bulunan miktarının ayarlanmasını amaçlamaktadır. Günümüzde tedavide kullanılan ilaçların büyük bir kısmı bu nörotransmitterlerin miktarlarının ayarlanması baz alınarak oluşturulmuştur. Ancak tedavilerin monoamin hipotezine dayanılarak gerçekleştirilmesi depresyon belirtilerinin tamamını

sağaltmaya yetmediğinden, yeni alternatif sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu görülmüştür (Özkaya ve Aydemir, 2021).

Antidepresan ilaçlar birinci ve ikinci nesil olmak üzere temelde iki sınıfa ayrılmaktadırlar. Monoamin oksidaz inhibitörleri ve trisiklik antidepresanlar birinci nesilde yer alırken; noradrenerjik ve spesifik gerilim inhibitörleri, selektif serotonin gerilim inhibitörleri, dopamin ve norepinefrin gerilim inhibitörleri, norepinefrin ve serotonin gerilim inhibitörleri, serotonin antagonisti / gerilim inhibitörleri ve melatonerjik ajanlar ikinci nesilde yer almaktadır (Özkaya ve Aydemir, 2021). Belirtilen antidepresan sınıflarından, seçici serotonin gerilim inhibitörleri (SSRI), diğerlerine göre daha tolere edilebilir olmaları nedeniyle en çok tercih edilenlerdir. Ayrıca, kontrollü SSRI çalışmaları, hastaların intihar eğilimini şiddetlendirmedeğini göstermiştir (Xu ve ark., 2020).

Tez çalışmamız kapsamında model etkin madde olarak seçilen Paroksetin (PRX), SSRI grubunda yer alan antidepresan ve anksiyolitik özellik gösteren bir moleküldür. Sinaptik aralıktan 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin) gerilimini güçlü bir şekilde inhibe etmektedir. Ayrıca muskarinik α_1 , α_2 , β -adrenerjik, dopamin, 5-HT₁, 5-HT₂ ve histamin reseptörlerine karşı düşük afiniteye sahiptir. Paroksetin, nöronal membranda serotoninin gerilimini engeller ve bir nörotransmitter üretimini azaltarak serotonerjik nöro-iletimini artırır. Sinaptik reseptörlerdeki etkinliğini bu şekilde genişletir ve Merkezi sinir sistemi (MSS)'de 5-HT'yi yükseltir. Paroksetinin oral dozu günde bir kez 10-60 mg'dır. 21 saatlik bir plazma yarı ömrüne sahiptir, ancak CYP2D6 yoluyla majör karaciğer metabolizması nedeniyle oral biyoyararlanımı oldukça düşüktür (%50'den az) (Thakkar ve ark., 2021). Karaciğer enzimleriyle yoğun bir şekilde metabolizasyona uğrayan ilaçlarda karşılaşılan aktivite kaybının üstesinden gelebilmek için ya oral dozda artışa gidilir ya da ilacın uygulama yolu değiştirilir. Dozun artırılması beraberinde toksik etkileri ve yan etkileri getireceği için genellikle biyoyararlanımı artırmak için alternatif bir ilaç verme sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Merkezi olarak etki eden ilaçlar için, oral biyoyararlanımdaki salt artış yeterli değildir. İlaç kan beyin bariyerini (KBB) geçemediği için MSS'ye ulaşamadığında istenilen farmakolojik etki elde edilemez.

Karaciğerden ilk geçiş etkisi parenteral, transdermal ve nazal yol gibi alternatif bir yolla uygulanması ile aşılabılır. Merkezi etkili bir ilaç olan paroksetin, intranasal (İN) yolla verilmeye uygun ajanlar arasında sınıflandırılmaktadır (Pandey ve ark., 2015; Sharma ve Dang, 2020; Yüksel, 2007).

Son yıllarda; İN uygulamalar KBB'yi geçmek ve ilaç taşıyıcı sistemi doğrudan beyne taşımak için invaziv olmayan doğası nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Ayrıca, ilk geçiş etkisinin olmaması, hızlı adsorbsiyon, yüksek biyoyararlanım, düşük enzimatik aktivite ve oral yola göre daha düşük dozda etkinliğin oluşması diğer uygulama yollarına göre üstünlük sağlamaktadır (Awad ve ark., 2022; Giunchedi ve ark., 2020; Sipos ve ark., 2021; Trevino ve ark., 2020). KBB, terapötiklerin çoğunun MSS'ye girmesini önleyen endotel hücrelerinden oluşan oldukça seçici, yarı geçirgen bir zardır. Yüksek moleküler ağırlığa, yüksek hidrofilikliğe ve p-glikoprotein dışı akım mekanizmasına duyarlılığa sahip ilaçlar KBB'yi geçememektedirler. Merkezi olarak etkili ilaçların çoğu, yüksek sistemik mevcudiyete rağmen MSS'ye ulaşamaz ve bu nedenle zayıf farmakolojik yanıt göstermektedirler. İlaçların burundan beyne taşınması genellikle bir burun boşluğunun çatısında yer alan olfaktör ve trigeminal sinir yolları yoluyla kolaylaştırılmaktadır. Çünkü nöroepitel, MSS'nin doğrudan dış atmosfere açık olan soliter kısmıdır. Bu nedenle, koku alma alanı, aktif bir terapötik molekülün, nazal adsorbsiyondan sonra burun yoluyla beyne girmesi için tek geçit olarak anlaşılmaktadır. Bu nedenle, olfaktör/trigeminal epitel yoluyla emilim, ilacın nazal yoldan beyne hedeflenen dağıtımının ana yoludur (Mistry ve ark., 2015; Vasa ve ark., 2015). Epitel hücre tabakaları boyunca ilaç taşınımının gerçekleşmesini sağlayan iki ana mekanizma tanımlanmaktadır. Bunlar paraselüler (epitel hücreler arasından) ya da transelüler (epitel hücrelerin uç kısmından bazolateral kısmına epitel hücreler boyunca) mekanizmalardır. Nazal epitelde paraselüler ilaç taşınımı için en büyük molekül ağırlığı 1000 Da olarak hesaplanmıştır (Sharma ve ark., 2014). Ancak, nazal boşluğun sınırlı kapasitesi, hidrofilik moleküller için düşük membran geçirgenliği yanında hızlı mukosilyer klirens etkisi nazal ilaç adsorbsiyonu için hız kısıtlayıcı ana faktörleri oluşturmaktadır (Karavasili ve Fatouros, 2016). Ayrıca klasik nazal iletimin nazal mukozanın üst kısmında bulunan

olfaktör ve trigeminal yolların hedeflenmesinin zor olması ve nazal mukozanın ilacı metabolize etme kapasitesi gibi sınırlamaları da bulunmaktadır (Wavikar ve Vavia, 2015). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, mukoadhezif polimer sistemler (Rassu ve ark., 2016; Sharma ve ark., 2014), lipit bazlı nanosistemler (Gabal ve ark., 2014; Kaur ve ark., 2015; Sipos ve ark., 2021; Toksoy ve Tırnaksız, 2021), *in situ* jel formülasyonları (Costa ve ark., 2021b; Wavikar ve Vavia, 2015), nanoemülsiyonların (Hosny ve Hassan, 2014; Jaiswal ve ark., 2016) kullanımı gibi çeşitli yaklaşımlar bildirilmiştir.

Nanopartiküller gibi kolloidal taşıyıcıların kullanımı, etkin madde moleküllerinde herhangi bir değişiklik yapmadan ilaçların İN uygulama ile beyne iletilmesinde kullanılan umut verici bir stratejidir (Sabir ve ark., 2022). Doğal lipitlerden ve polimerlerden hazırlanan nanopartiküller, beyin tarafından hızla alınmaları, biyoyumlu ve biyobozunur olmaları, yüksek stabilite sağlamaları, yüksek taşıma kapasitesine sahip olmaları, hidrofilik ve hidrofobik maddelerin her ikisi ile de kullanılabilmesi ve konvensiyonel uygulamalar ile karşılaştırıldıklarında daha az toksisite göstermeleri nedeniyle beyne hedeflendirme için ilgi çekici sistemlerdir (Sabir ve ark., 2022; Xu ve ark., 2020).

Yukarıda bahsedilen bilgilerin ışığında bu tez projesinde; depresyon tedavisinde kullanılan paroksetin hidroklorürün (HCl) oral kullanımı sonrası görülen düşük biyoyararlanımının artırılması ve dozun yükseltilmesine bağlı yan etkilerin ortadan kaldırılmasını sağlayacak alternatif bir uygulama yolunun geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, suda çözünürlüğü yüksek olan etkin maddenin polimer ve lipit-polimer bazlı nanopartikül sistemine yüklenmesi aracılığı ile nazal mukozadan absorpsiyonunu artırarak beyne doğrudan hedeflendirilebilen, böylece KBB'yi aşabilecek, nazal mukozada kalış süresi uzatılmış bir formülasyon geliştirilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızın ilk aşamasında paroksetin HCl içeren lipit-kitosan bazlı ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) bazlı nanopartiküller hazırlanmış ve formülasyonların enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, partikül büyüklüğü dağılımı, *in vitro* salım özellikleri gibi karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki adımda seçilen optimum

formülasyonların morfolojik yapıları, mukoadhezyon özellikleri, stabilite özellikleri ve termal davranışları incelenmiş, *in vitro* sitotoksosite ve permeabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

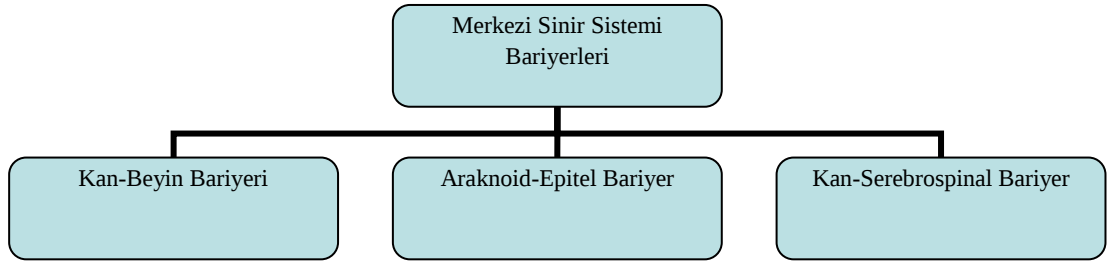
1.1. Merkezi Sinir Sistemi

İnsan vücudunun kontrol sistemi olarak anılan sinir sistemi, merkezi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemi (MSS) kafatasının kraniyal kavitesindeki beyin ile, omurların oluşturduğu spinal kanaldaki omurilikten meydana gelmektedir (Woolsey ve ark., 2017).

Beyin, vücudumuzda yağ doku hariç en fazla lipid içeriğine sahip, genel dolaşımdan izole olan, sahip olduğu sıkı bağlantı kavşakları dolayısıyla sınırlı geçirgenlikteki endotel hücreleri, enzimatik aktivitesi ve p-glikoprotein aktif transport sisteminin varlığı ile karakterize hassas bir organdır (Liu ve ark., 2021b; Patel ve ark., 2012).

Normal beyin fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için, nöral çevrenin dar bir homeostatik aralık içinde korunması gerekmektedir. Bu da kan ve beyin arasında moleküller, iyonlar ve hücrelerin taşınmasının sıkı bir şekilde düzenlenmesini gerektirmektedir. Bu sıkı düzenleme MSS’de kan beyin bariyeri adı verilen benzersiz bir anatomik ve fizyolojik bariyer tarafından sağlanmaktadır (Serlin ve ark., 2015).

MSS’de üç temel bariyer bulunmaktadır. Bunlardan ilki; kan beyin bariyeridir. Kan ile beyin interstisyel sıvısını ayıran son derece özelleşmiş endotel hücre tabakasından meydana gelmektedir. İkincisi; kan ile subaraknoid serebrospinal sıvı (beyin-omurilik sıvısı, BOS) arasında bir tabaka görevi görerek bunları birbirinden ayıran araknoid epitel bariyeridir. Üçüncüsü ise; özelleşmiş BOS’u serebral ventriküllere salgılayan koroid pleksus epiteliyle kan arasında bulunan kan-BOS bariyeridir (Choudhari ve ark., 2021; Serlin ve ark., 2015). MSS bariyerleri Şekil 1.1’de gösterilmektedir.



Şekil 1.1. Merkezi sinir sisteminde yer alan bariyerler.

BOS, bir yetişkinde yaklaşık 140 mL hacimde bulunan, renksiz ve berrak bir sıvıdır. Temel kimyasallar, oksijen ve glikozun sistemik dolaşımından nöronlar ve nörogliaya taşınmasında rol oynamaktadır. Bileşiminde glikoz, üre, bazı proteinler, kationlar, anyonlar ve laktik asit bulunmaktadır. Koroid pleksus adı verilen özel kılcıl damar kümeleri tarafından yaklaşık 20 mL/saat hızda üretilmektedir. (Choudhari ve ark., 2021; Verrees ve Selman, 2004). Beyin dokusu ile doğrudan temas etmektedir (Liu ve ark., 2021b).

MSS; nörodejeneratif (Parkinson ve Alzheimer hastalıkları), onkolojik (glioblastoma), inflamatuvar (Multiple Skleroz), bulaşıcı (çocuk felci, ensefalit) ve genetik (Huntington hastalığı) hastalıklardan etkilenebilmektedir (Gratpain ve ark., 2021). MSS hasarları dünyanın önde gelen engellilik nedenleri arasında yer almaktadır.

MSS hastalıkları oldukça karmaşık çok faktörlü hastalıklar olduğundan, patolojik mekanizmalar ve özellikle genetik veya epigenetik seviyesinde altta yatan metabolik mekanizmalar hakkında yeterli bilgiye sahip olmayışımız, araştırmacılar için bu alanda yeni ilaçların keşfini zorlaştırmaktadır. Güvenilirlik, etkinlik ve finansal konular da araştırmacıları kısıtlayan diğer faktörler arasında yer almaktadır (Gratpain ve ark., 2021). Bunlara ek olarak; ilaç moleküllerinin beyne iletimi KBB ve kan-BOS bariyerinin ortaklaşa oluşturduğu fizyolojik, metabolik ve biyokimyasal engeller tarafından oldukça zorlaşmaktadır (Tiwari ve ark., 2012).

Bu zorlu engeller nedeniyle birçok nöroterapötik ilaç beyne etkili bir şekilde iletilemediğinden MSS hastalıklarının tedavisi özel bir gayret gerektirmektedir (Patel ve ark., 2012).

1.2. Kan Beyin Bariyeri

İlk kez Paul Ehrlich tarafından 1880 yılında MSS ile periferik dolaşım ve vasküler kapasite arasında fiziksel bir arayüz şeklinde kan beyin bariyerinin varlığı tespit edilmiştir. Daha sonra Ehrlich'in öğrencisi Edwin Goldmann 1913 yılında, doğrudan BOS içine tripan mavisi enjekte edildiğinde boyanın periferdekileri değil MSS içindeki hücreleri boyadığını göstermiştir. Ayrıca Reese ve Karnovsky, kan ve beyin arasında endotelial sıkı bağlantı kompleksleri anlamına gelen, çözünenler için değişim bariyeri sunan sınırlayıcı bir elementin varlığını göstermişlerdir (Formica ve ark., 2022; Serlin ve ark., 2015; Şengel-Türk ve ark., 2007).

KBB temelde bağışıklık hücreleri, astrositler, endotel hücreleri, perisitler ve bazal membrandan meydana gelen hücresel bir yapıdır (Choudhari ve ark., 2021; Thangudu ve ark., 2020). MSS'yi sistemik dolaşımdan ayıran immünolojik, metabolik, fiziksel, taşıyıcı ve yüksek derecede seçici bir bariyerdir (Giunchedi ve ark., 2020; Serlin ve ark., 2015). Beyin kapillerinin endotel hücreleri ile birbirine kilitlenen sıkı bağlantılardan oluşmaktadır (Choudhari ve ark., 2021). Kan ve beyin dokusu arasında hücreler, moleküller ve iyonların giriş ve tahliyesini düzenleyen seçici geçirgen yapısı sayesinde MSS'nin fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri korunmakta, homeostazın sürdürülmesi sağlanmaktadır (Choudhari ve ark., 2021; Şengel-Türk ve ark., 2007; Thangudu ve ark., 2020).

KBB'nin fizyolojik birimlerinin işlevinde önemli rol oynayan nörovasküler ünite, bazal membran ve nöronlar ile bunlar arasındaki interstisyel sıvının bir bölgesi olan Virchow-Robin boşluğundan oluşmaktadır (Choudhari ve ark., 2021). Bu penetran damarlar ve venler çevresinde endotel hücreler ve beyin dokusu arasındaki

boşlukta, bazı bağışıklık işlevlerini yürüten perivasküler makrofajlar bulunmaktadır (Serlin ve ark., 2015).

Bazal membran esas olarak endotel hücreleri, tip IV kolajen, perisitler, laminin, heparin sülfat, glikoprotein, matris protein ve fibronektinden oluşmaktadır (Choudhari ve ark., 2021). Bitişik endotel hücreler arasında; *cingulin* ve *zonula occludens 1* ve *2* gibi yardımcı proteinler ile okludinler, jonksiyon adhezyon molekülleri ve klaudin 1, 3 ve 5 içeren transmembran proteinler tarafından sıkı bağlatılar oluşturulmaktadır. Klaudin ve okludin homofilik etkileşimlerle bağlanır ve aktin hücre iskeletine *zonula okludens* proteinleri ile bağlanmaktadır (Choudhari ve ark., 2021; Correia ve ark., 2022). Astrositler parenkimal su dengesinin, metabolitlerin ve elektrokimyasal aktivitenin izlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Perisitler beyin kılcal damarlarını ve vasküler endotel hücrelerini kaplar ve bazal membran içinde tahmini 3:1 perisit:endotel hücre oranında çevrelenmektedir. Bu sayede perisitler, anjiyogenezde, beyin geçirgenliğinin korunmasında ve hatta doku sağkalımı sırasında KBB'nin oluşumunda ve olgunlaşmasında önemli bir rol oynayan çoklu sinyal yollarına sahiptir (Choudhari ve ark., 2021). MSS immün sürveyansını sınırlamak için perisitler gereklidir (Daneman ve ark., 2010).

KBB besinlerin ve hormonların seçici bir şekilde geçişine izin verirken; toksinlerin, yabancı maddelerin, patojenlerin geçişine izin vermemektedir (Formica ve ark., 2022). Zararlı maddelerin yanı sıra peptid-proteinler, antibiyotikler, suda çözünen etkin maddeler, plazma bileşenleri, lökositler, kırmızı kan hücreleri gibi pek çok maddenin de beyne geçmesine engel teşkil etmektedir (Şengel-Türk ve ark., 2007; Wilson, 2019).

Büyük moleküllerin neredeyse tamamı, küçük moleküllerin ise yaklaşık %98'inden fazlası, hidrofilik moleküllerin çoğu KBB'den geçemez. Yağda çözünen moleküllerin geçişi ise partisyon katsayısı ile orantılıdır (Zeiadeh ve ark., 2018). Partisyon katsayısı yüksek olan bileşikler kan beyin bariyerini geçebilmektedir. Verimli bir taşıma için ideal partisyon katsayısı 1,5-2,7 olarak söylenmektedir (Van Woensel ve ark., 2013).

Yağda çözünen maddeler KBB'yi difüzyon yoluyla geçebilmektedir. KBB prensip olarak suya da geçirendir. Ancak endoenzimler ve ektoenzimlerle birlikte apikal ve bazal membrandaki çözünen taşıyıcıları, küçük çözünenlerin giriş ve akışını düzenlemektedir. KBB'nin yüzeyinde esansiyel maddelerin girişine izin veren insülin reseptörü, transferrin reseptörü, glikoz taşıyıcı GLUT1 gibi spesifik taşıyıcı protein ve reseptörler bulunmaktadır. Endotel hücreler üzerindeki bazı akış taşıyıcıları, p-glikoprotein ve çoklu ilaç taşıyıcıları, ilaçların ve örneğin hemoglobinin bozunma ürünü olan ve MSS'ye girerse nörotoksik etki göstererek önemli hasara neden olabilen bilirubin gibi diğer lipofilik moleküllerin beyin dokusuna erişimini kısıtlamakta ve sistemik dolaşıma geri dönmeleri için molekülleri zorlamaktadır (Formica ve ark., 2022; Serlin ve ark., 2015). KBB'nin üzerindeki zar negatif yüklüdür. Bu nedenle pozitif yüklü bileşenlere karşı ilgi göstermektedir (Thangudu ve ark., 2020). Ancak sıkı bağlantıları oluşturan proteinlerin, özellikle de okludin ve kaludin etkileşimi oldukça karmaşıktır ve polar maddelerin kandan potansiyel parasellüler yollar boyunca serbest difüzyonunu etkili bir şekilde bloke etmektedir. Böylece çözünenlerin beyin interstisyel sıvısına serbestçe erişimi engellenmektedir (Begley, 2004).

Serum proteinlerine düşük oranda bağlanan, düşük molekül ağırlıklı, lipofilik ve fizyolojik pH'da iyonize olmamış halde bulunan moleküller KBB'yi diğer moleküllere oranla daha iyi geçebilmektedirler (Şengel-Türk ve ark., 2007). Moleküler ağırlığı 400-600 Da'dan düşük ve hidrojen bağı sayısı 8'den az olan lipofilik yapıdaki küçük bileşikler kan beyin bariyerini geçebilmektedirler. Hidrofilik maddeler kan-BOS bariyeri/koroidal pleksusları geçerek beyin omurilik sıvısına girebilmektedir (Choudhari ve ark., 2021; Thangudu ve ark., 2020; Van Woensel ve ark., 2013).

Yaklaşık 7000 ilaç üzerinde yapılan bir araştırmada sadece %1'inin KBB'den geçebildiği ve MSS'de etkili olabildiği ortaya konulmuştur (Thangudu ve ark., 2020). Son yıllardaki gelişmelere rağmen KBB ve kan-BOS bariyeri nedeniyle beyine özgü ilaç dağıtımı hala zorlu bir alandır (Choudhari ve ark., 2021).

1.3. Merkezi Sinir Sistemine İlaç Taşınmasını Artırma Mekanizmaları

Multiple Skleroz, epilepsi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, serebrovasküler hastalıklar, nörolojik enfeksiyonlar ve serebral iskemi gibi ilacın mutlaka beyne ulaşmasını gerektiren çeşitli nörolojik hastalıklar vardır ve bunlar kronik tedavi gerektirmektedir (Choudhari ve ark., 2021; Giunchedi ve ark., 2020).

Konvansiyonel ilaç dağıtım yaklaşımları ile ilaçların beyne ve MSS'ye etkili ve verimli bir şekilde ulaştırılması KBB olarak adlandırılan beynin koruyucu anatomisi nedeniyle oldukça zordur. Herhangi bir terapötik ajanın klinik potensi yalnızca biyoyararlanımına değil aynı zamanda KBB ve BOS'a nüfuz etme yeteneğine de bağlıdır. MSS'yi hedef alan terapötik ajanlar KBB'yi aşarak daha az metabolik ortama maruz kalıp daha yüksek emilim oranına ulaşarak potansiyel etkilerini ortaya koymaktadırlar (Patel ve ark., 2019a).

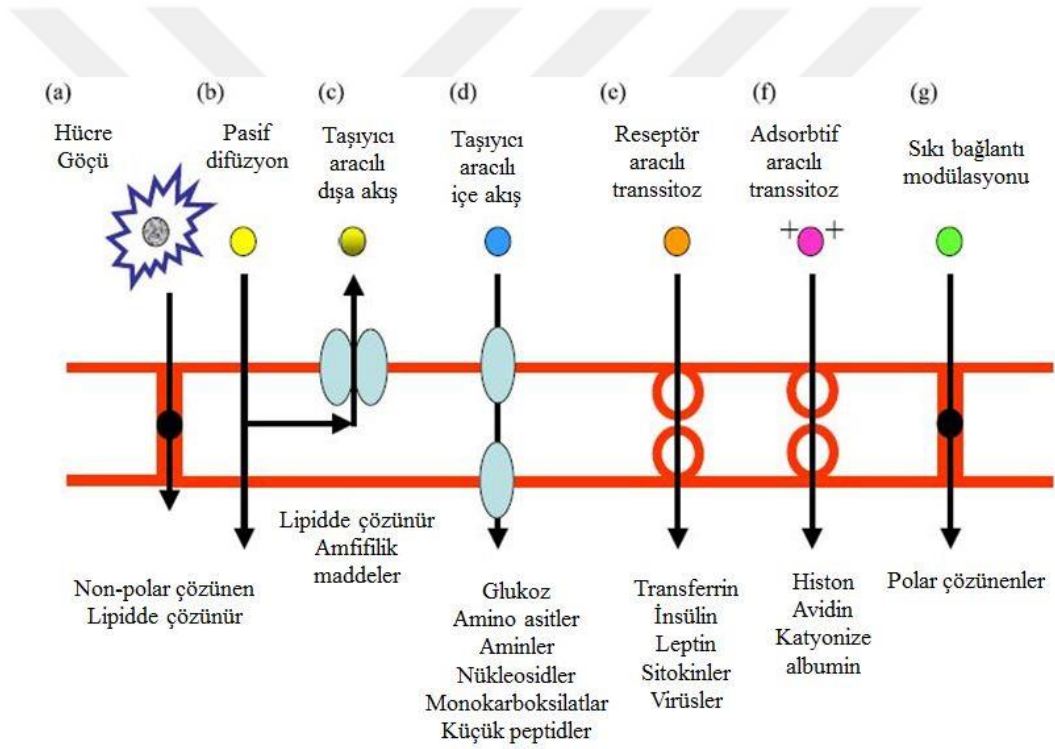
Hidrofilik bileşikler KBB'yi pasif parasellüler yol ile geçerken, lipofilik bileşikler sıklıkla enerji kullanımı gerektiren transsellüler yol ile geçmektedirler. Transsellüler yol akış taşıyıcıları, transendositoz, taşıyıcı aracılı taşınma, reseptör aracılı taşınma gibi mekanizmaları içermektedir (Choudhari ve ark., 2021).

KBB'den pasif difüzyonla ancak lipofilik ve küçük moleküller geçebilmektedir. Nanoilaçlar bu yolla kan beyin bariyerinden geçemezler. Ancak Parkinson hastalığı, bazı kanser türleri, Multiple Skleroz gibi kan beyin bariyerinde hasara neden olan durumlarda nanoilaçlar da bariyerden pasif difüzyon yoluyla geçebilmektedirler (van den Broek ve ark., 2022).

Beyin homeostazını sağlamakla görevli aminoasitler, LDL, glikoz gibi bazı küçük moleküller de makromoleküller gibi KBB'den aktif taşınma ile geçmektedirler. Nanoilaçların taşınmasında da esas olarak bu yol kullanılmaktadır. Aktif taşınma yollarından biri olan taşıyıcı aracılı taşınmada maddeler membran taşıyıcıları aracılığıyla transsellüler olarak taşınmaktadır. Öte yandan reseptör aracılı

taşınmada ise endositoz, ardından ekzositoz yoluyla maddeler KBB boyunca taşınmaktadır (van den Broek ve ark., 2022).

Aminoasitler ve glikoz polariteleri nedeniyle beyne pasif difüzyonla taşınamazlar. Glikoz taşıyıcı (GLUT1), l-tip aminoasit taşıyıcı (LAT1), kolin taşıyıcı (ChT) gibi taşıyıcı sistemler aracılığıyla aktif olarak taşınırlar. Reseptör aracılı taşınmada, nanoilaçlar bir taşıyıcıya bağlanan taşıyıcı molekülle konjuge edilerek taşınmaktadır. Bu tip taşınmalarda nanoilaçlar pH gibi değişen çevresel şartlara karşı dayanıklı olmalıdır (van den Broek ve ark., 2022). Şekil 1.2’de KBB boyunca maddelerin taşınmasında rol alan potansiyel yollar sunulmuştur.



Şekil 1.2. KBB boyunca taşınmada potansiyel yollar (Begley, 2004)

KBB’yi aşarak beyne etkili bir şekilde ilaç ulaştırmak amacıyla uygulanan hedeflendirme stratejileri invaziv ve non-invaziv yöntemler olarak iki temel gruba ayrılmaktadır. Yöntemler Çizelge 1.1’de özetlenmiştir (Choudhari ve ark., 2021; Khan ve ark., 2017; Wilson, 2019).

Çizelge 1.1. KBB geçiş yolakları ve mekanizmaları

1. İnvaziv Stratejiler
 - a. KBB modölyasyonu
 - b. Ultrasona dayalı KBB açılması
 - c. İntraserebral implantlar
 - d. İntraventriköler enjeksiyon / infüzyon
2. İnvaziv Olmayan Stratejiler
 - a. Biyolojik
 - Monoklonal antikor konjugatlar
 - Taşıyıcı olarak kimerik peptidler
 - Reseptör / vektör aracılı
 - b. Kimyasal
 - İlaç konjugatları
 - Ön-ilaç
 - c. Kolloidal sistemler
 - Lipozomlar
 - Nanopartiköller
 - Nanojeller
 - Miseller
 - Dendrimerler
 - d. İntranazal taşınma

İnvaziv yöntemler, kan-beyin bariyerinin geri dönuşömlü bozulması, cerrahi uygulamalar ve beyine giden arterlere direkt enjeksiyon uygulamalarını kapsadığı için bu metotların büyük sınırlamaları vardır. Terapötik moleküllerin yanı sıra, toksik moleküllerin de beyine geçişini arttırılabileceğı için yüksek yan etkileri vardır, düşük verimlidirler ve yeterince emniyetli değillerdir. İnvaziv olmayan yöntemler ise; terapötik maddenin kendisine veya bir taşıyıcı sistem içerisinde bulunması durumunda bu taşıyıcı sisteme bir yapı bağlanması veya terapötik maddenin biyolojik bir yol kullanılarak beyne hedeflendirilmesine dayanmaktadır. Güvenilir oldukları için invaziv olmayan yöntemler daha fazla tercih edilmektedirler (Toksoy ve Tırnaksız, 2021).

İnvaziv olmayan yöntemler arasında yer alan intranazal taşınma küçük polar moleküllerden DNA gibi büyük moleküllere kadar pek çok terapötik ajanın beyne ulaştırılmasında başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Aly ve ark., 2019; Begley, 2004; Ding ve ark., 2015; Gonzalez ve ark., 2021; Nour ve ark., 2016). Tez çalışmamızda, İN yoldan beyine hedeflendirme yoluyla ilaç taşıyıcı sistemlerin

geliştirilmesi planlandığı için, bu bölümde sadece invaziv olmayan bir yöntem olan İN taşıma stratejisi anlatılmıştır.

1.3.1. İntranazal Uygulama

Oral yoldan ilaç verilmesi basitliği, hasta uyuncu ve rahatlığı nedeniyle tedavide en yaygın kullanılan yoldur. Ancak oral yoldan alınan ilaçlarda ilk geçiş eliminasyonu, gastrointestinal kanaldan düşük miktarda geçiş ve kimyasal degradasyon nedeniyle biyoyararlanım azalmaktadır (Karavasili ve Fatouros, 2016).

Aslında nazal yolla ilaç verilmesi yeni bir yöntem değildir. Antik dönemlerde psikoterapötikler ve “*nasya rasayana*” adı verilen diğer bileşiklerin verilmesinde kullanılmıştır. Günümüzde ise MSS’ye konvansiyonel yollarla ilaç verilmesinde karşılaşılan pek çok sorun ve burundan beyne hedeflemenin sağladığı avantajlar göz önünde bulundurulduğunda son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir (Patel ve ark., 2019a).

İlaçların İN yolla beyne doğrudan verilmesi yöntemi ilk olarak 1989 yılında Alzheimer Araştırma Merkezi’nden William H. Frey II tarafından önerilmiş ve bir omurilik yaralanması modelinde nörotropik faktörleri yaralı nöronu desteklemek amacıyla olfaktör yol aracılığıyla MSS’ye hedeflemek için geliştirilmiştir (Liu ve Zhang., 2019; Patel ve ark., 2019a). Peptidleri ve diğer terapötik maddeleri KBB’yi atlayarak nazal mukoza ve MSS arasındaki olfaktör nöral yol boyunca doğrudan beyne iletmek için patent başvurusunda bulunmuştur (Awad ve ark., 2022).

Bir ilaç molekülünün KBB’yi aşarak MSS’ye girebilmesi için lipofilik yapıda olması önem teşkil etmektedir. Ancak lipofilik özellikteki artış sudaki çözünürlüğün azalmasına neden olduğundan ilacın sistemik dolaşımında taşınması güçleşmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla, ilaç konsantrasyonunun artırılması hedef etki bölgesi olan MSS dışında kalan bölgelerde yan etki gözlenme riskini artırmaktadır (Katare ve ark., 2015). İşte bu durumda İN uygulama; nazal mukoza ve

beyin arasındaki nöral bağlantılar ile terapötik ajanların MSS'ye ulaştırılmasında, KBB'yi etkin bir şekilde aşan ve girişimsel olmayan alternatif bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır (Alam ve ark., 2014).

İN uygulama; sunduğu geniş yüzey alanı, yüksek oranda vaskülarize yapısı ve nispeten yüksek kan akışı sayesinde hızlı bir absorpsiyon elde edilmesini sağlamaktadır. Hepatik ilk geçiş eliminasyonundan kaçış, nazal mukozaya kolay ulaşılabilirlik, iğnesiz ilaç uygulama, düşük molekül ağırlıklı maddelerin iyi penetrasyonu, hızlı etki başlangıcı, aşılama sonrası lokal ve uzak mukozal bağışıklık tepkilerinin indüklenmesi gibi pek çok avantaj sunmaktadır. Ancak bu yolla beyne ulaştırılmak istenen ilaçlar için mukosilyer klerens ana engel olarak karşımıza çıkmaktadır (Hosny ve Hassan, 2014; Liu ve Zhang, 2019).

İN yolla KBB aşılarak nükleotidlerden kemoterapötiklere, hücrelerden viral vektörlere kadar pek çok terapötik ajan beyne ulaştırılabilmektedir (Van Woensel ve ark., 2013). Ancak piyasadaki intranazal ürünlerin çoğu küçük moleküllerdir ve alerjik rinit, nazal konjesyon, enflamatuvar nazal hastalıklar, nazal polipler gibi burundaki lokal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Örneğin beklametazon dipropiyonat, triamnisolon asetonit, budesonid, ipratropium bromür, deksametazon, flutikazon porpiyonat gibi. Lokal etkili farmasötiklerin yanı sıra az da olsa sistemik etki gösteren preparatlar da bulunmaktadır (Behl ve ark., 1998; Liu ve Zhang, 2019). Çizelge 1.2' de sistemik etki gösteren ve nazal yolla uygulanan preparatlara örnekler verilmiştir.

Çizelge 1.2. Sistemik etki için nazal uygulanan ilaçlara örnekler (Behl ve ark., 1998; Grassin-Delyle ve ark., 2012).

Etkin madde	Piyasa adı	Endikasyon
Buserelin	Suprefact nasal [®]	Prostat kanseri
Nafarelin	Synarel [®]	Endometriyozis, erken ergenlik
Desmopressin	Minirin [®] DDAVP [®]	<i>Diabetes insipiduslu</i> hastalarda polidipsi, poliüri ve dehidratasyonun önlenmesi ve kontrolü
Kalsitonin	Miacalcin [®]	Menopoz sonrası osteoporoz
Dihidroergotamin	Diergo-spray [®]	Migren ve küme baş ağrısı
Sumatriptan	İmigran [®]	Migren ve küme baş ağrısı
Butorfanol	Stadol NS [®]	Migren baş ağrıları da dahil olmak üzere ağrılarda
Fentanil	Instanyl [®] , PecFent [®]	Kanser hastalarının ağrılarında
Östradiol	Aerodiol [®]	Hormon replasman tedavisi
Nikotin	Nicotrol NS [®]	Sigara bırakma
Oksitosin	Syntocinon [®]	Doğum indüksiyonu ve emzirmede uyarım
Siyanokobalamin	Nascobal [®]	Vitamin B12 eksikliği
İnfluenza aşısı	FluMist [®]	Mevsimsel ya da H1N1 grip önlenmesinde
Desmopressin asetat	Stimate [®]	Hemofili A ve von Willebrand's hastalığı (Tip I)

1.3.1.1. İntranazal Uygulamanın Avantaj ve Dezavantajları

İntranazal ilaç uygulamaları sunduğu benzersiz avantajların yanı sıra dezavantajları da beraberinde getirir. Bunlar aşağıda belirtilmiştir.

Avantajlar (Behl ve ark., 1998; Chugh ve ark., 2009; Grassin-Delyle ve ark., 2012; Hasçıçek, 1999; Özsoy, 2007; Patel ve ark., 2019a; Xu ve ark., 2020):

1. İlaçların iletiminde girişimsiz, basit, hızlı ve kullanışlı bir metottur.
2. Plazma profili intravenöz (IV) yolla benzerdir. Absorbsiyon hız ve miktarı IV uygulama ile karşılaştırılabilir derecede iyidir. Etki hızlı başlar.
3. Nazal mukoza epitel tabakanın çok sayıda mikrovilluslar içermesi nedeniyle geniş bir yüzey alanına sahiptir.

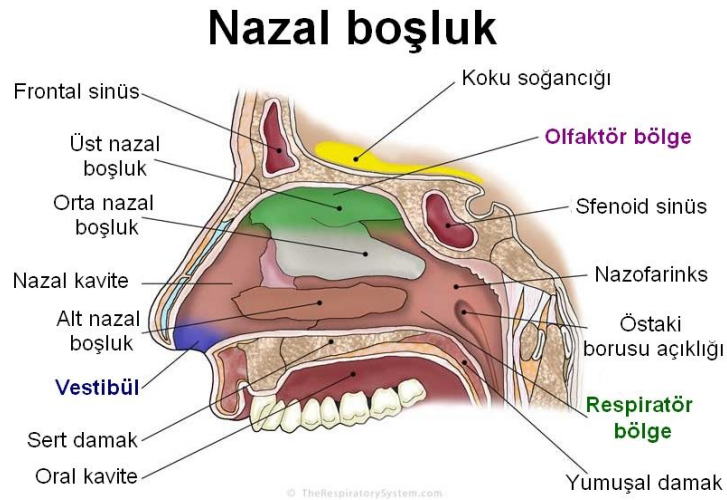
4. Nazal mukozanın zengin damar ağı ve yüksek geçirgenlik gösteren yapısı ilaç absorpsiyonunu fazlasıyla artırır.
5. KBB'ye uğramadan geçilir ve MSS hedef alınır. Böylece birçok nörolojik ve psikiyatrik bozukluğun tedavisine olanak sağlar.
6. Çok çeşitli molekülün iletimi gerçekleştirilebilir.
7. Taşınımı yapılacak terapötik ajan için herhangi bir modifikasyona gerek yoktur.
8. Ayrıca büyüklükleri hormonlardan proteinlere kadar değişen moleküllerin nazal biyoyararlanımı, periferal uygulamaya göre daha fazladır. Bu sayede gerekli dozaj azalır.
9. Sistemik maruziyeti azaltır. Böylece sistemik yan etkileri ve toksisiteyi engeller.
10. Peptid yapılı ilaçların degradasyon problemi belirli bir derecede en aza indirgenmiştir.
11. Gastrointestinal kanaldaki yıkımlardan ve karaciğer ilk geçiş etkisinden kaçınmak suretiyle ilaçların biyoyararlanımını artırır.
12. Hastanın kendisinin uygulayabileceği kolay bir yoldur ve hasta uyuncu iyidir.
13. Bulantı ve kusma görülen hastalarda kullanımı kolaydır.
14. Doz aşımı riski düşüktür.
15. Molekül ağırlığı 1 kDa'dan küçük lipofilik ilaçlar için yüksek absorpsiyon gösterir.
16. Enfeksiyon hastalıklarının bulaşma riskini azaltır.
17. Şiddetli gastrointestinal ve çevresel koşullardan kaçınmayı sağlar.

Dezavantajlar (Behl ve ark., 1998; Chugh ve ark., 2009; Grassin-Delye ve ark., 2012; Hasçıçek, 1999; Özsoy, 2007):

1. Beynin ve omuriliğin farklı bölgelerine ulaştırılabilen doz miktarı her bir terapötik ajanda değişiklik gösterebilir.
2. Yüksek molekül ağırlıklı ve hidrofilik ilaçların iletimi sınırlıdır.
3. Bazı ilaçlar nadiren de olsa nazal mukozada kısmen degrade olurlar.

4. Bazı ilaçlar nazal mukozada irritasyona neden olabilirler.
5. Drenaj nedeniyle nazal boşluğa uygulanacak ilaç hacmi 25-200 µL ile sınırlıdır.
6. Nazal boşlukta silia hareketi ve mukosilyer klerens mukoza ile dozaj şekillerinin temas süresini azaltan iki önemli faktördür. Absorbsiyon süresi silia hareketi ve mukosilyer klerens nedeniyle sınırlıdır. Dolayısıyla bu faktörler etkin maddenin düşük biyoyararlanım göstermesine sebep olurlar.
7. Gastrointestinal mukoza ile karşılaştırıldığında absorbsiyon yüzeyi düşüktür.
8. Kronik hastalıklarda bu yolun sıklıkla kullanılması mukozal hasarla sonuçlanabilir. Enfeksiyon ve koku alma bozukluklarına yol açabilir.
9. Alerji ya da gribin neden olduğu burun tıkanıklığı bu metotla yapılan ilaç iletimini engelleyebilir.
10. Nazal mukozanın normal defans mekanizması ilaçların permeabilitesini etkiler.

1.3.1.2. Nazal Anatomi ve Fizyoloji



Şekil 1.3. Nazal boşluğun anatomik yapısı (The Respiratory System, 2022).

Burun, simetrik olarak median septum tarafından iki burun boşluğuna ayrılmaktadır. Boyu 12-14 cm ve alanı 120-150 cm² olan farklı epitel bölgelerden oluşmuştur (Grassin-Delye ve ark., 2012; Hasçıçek, 1999). Burun boşluğu sadece nefes alma ve koku görevini değil aynı zamanda alveollere ulaşmadan önce havayı süzen koruyucu organ olma görevini de yerine getirmektedir (Patel ve ark., 2019a). Nazal kavite nazal septum tarafından ikiye bölünür ve her iki kavite de respiratör, olfaktör ve vestibular olmak üzere 3 bölgeden oluşmaktadır (Trevino ve ark., 2020). Şekil 1.3'te gösterilmektedir. Nazal vestibül burnun girişidir, yassı keratinize epitel ile kaplıdır ve burun kılı (vibrissa) ve yağ bezleri içermektedir (Trevino ve ark., 2020). Vestibular bölge dışa açılan ve havadaki partikülleri süzerek koruma sağlayan bölgedir (Vasa ve ark., 2015). Respiratör bölge alanı insanlarda burun boşluğunun %80-90'ına kadar ulaşabilmektedir (Van Woensel ve ark., 2013). Kirpikli psödostratifiye (yalancı çok katlı) silindirik epitel (respiratör epitel) ile kaplıdır ve nazal süngerimsi kemikleri (burun konkası) içermektedir (Trevino ve ark., 2020). Boşluğun yan taraflarında 3 konka ve her bir burun deliğinin orta tarafında nazal septum da dahil olmak üzere her bir nazal boşluğun iç kısmını oluşturmaktadır (Vasa ve ark., 2015). Burun konkaları, gelen havayı nemlendirip ısıtan ve venöz konjesyona izin veren sinüzoidler ve erektile doku içeren yapılardır (Trevino ve ark., 2020). Bu bölgede bazal ve goblet hücreler de bulunmaktadır. Goblet hücreler tarafından nazofarenkse doğru itilen mukus salgılanır (Van Woensel ve ark., 2013). Vestibular ve respiratör bölgeler, ilaç Emilimi ve taşınması için uygun yüzey alanını artıran mikrovilluslu epitel hücrelerle kaplıdır (Patel ve ark., 2019a). Olfaktör bölge ise burun boşluğunun çatısında, burun deliklerinden yaklaşık olarak 7 cm uzaklıkta bulunmaktadır. Yalancı çok katlı silindirik epitel ile kaplıdır ve KBB'yi atlayarak doğrudan MSS'ye erişim sağlayan olfaktör siniri içermektedir (Trevino ve ark., 2020). Olfaktör bölgede, koku soğancığı ve sinirler, nöro-epitel hücreler aracılığıyla koku alma fonksiyonundan sorumludur. Nazal mukozal epitelde hava ile taşınan partikülleri içine hapsetmek ve sindirmek için karboksilesteraz, glutatyon S-transferaz ve sitokrom P450 enzimleri gibi enzimler bulunmaktadır (Patel ve ark., 2019a). Bu bölge ilaç uygulaması için 5 cm² alan sunmaktadır (Formica ve ark., 2022). İnsanlarda nazal boşluğun yaklaşık %8-10'unu oluşturan olfaktör bölge yaklaşık 5 µm kalınlığında mukus tabakası ile kaplıdır. Nazal mukus pH'ı yaklaşık

5,5-6,5 aralığında olmakla birlikte, pH 3-10 aralığındaki solüsyonları tolere edebilmektedir. Olfaktör mukoza, olfaktör reseptör hücreler (olfaktör reseptör nöronlar olarak da adlandırılır), destekleyici epitel hücreler ve basal hücreler olmak üzere 3 farklı hücre tipinden meydana gelmektedir. Olfaktör reseptör nöronlar, modifiye silialar ile birkaç uzun lifler şeklinde çatallaşan tek bir dendritik çıkıntıya sahip bipolar nöronlardır. Olfaktör reseptör nöronların aksonları MSS'nin olfaktör soğancığına uzanır ve bu iki bölgeyi doğrudan birbirine bağlar. Olfaktör bölgedeki mukus klirens hızı respiratör bölgedekine göre 240 kat daha yavaştır (yaklaşık 1-2 mm/saat). Bu da olfaktör bölgeyi intranasal formülasyonların daha çok tutulabilmesi için potansiyel olarak öne çıkarmaktadır (Vasa ve ark., 2015).

Mukus, mukozada goblet hücreler tarafından salgılanan, %1 inorganik tuzlar, %1 albumin, %2 müsin, %95 su, lizozimler, immünoglobulinler, laktoferrin ve lipidlerden (%1) oluşan kompleks bir karışımdır. Alt kısmı solüsyon, üst kısmı ise silialar tarafından ileri doğru hareket ettirilen yüzeysel bir jel örtü olan iki tabakadan oluşmaktadır (Liu ve Zhang, 2019; Van Woensel ve ark., 2013). Silialar aracılığıyla farinkse doğru itilmektedir. Olfaktör mukozadaki silialar hareketsiz olduğundan sadece respiratör mukozada bulunan silialar tarafından mukus hareket ettirilebilmektedir. Dakikada 1000 vuruşluk bir frekansla mukus dakikada 5 mm itilebilmektedir (Van Woensel ve ark., 2013).

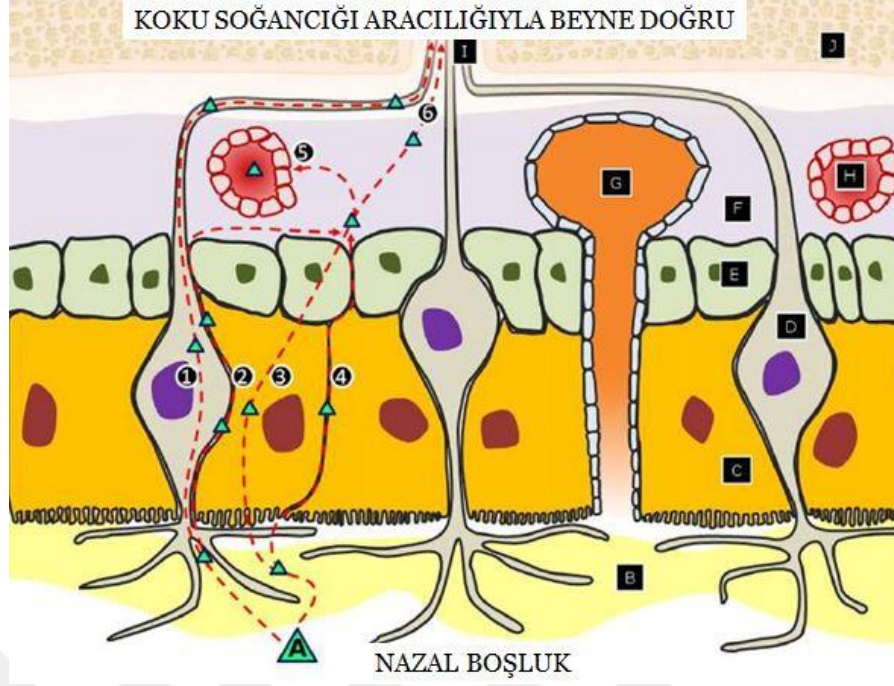
1.3.1.3. Nazal Mukoza ve Epitelden Geçiş Mekanizmaları

Epitel hücre tabakası boyunca ilaç taşınmasında rol oynayan üç mekanizma bulunmaktadır. Aşağıda özetlenen bu mekanizmalar Şekil 1.4'te gösterilmektedir.

1. Transsellüler yol: İlaç destekleyici epitel hücrelere endositoz yoluyla nüfuz etmektedir. İlaç molekülünün bu yoldan emilimi suda çözünürlük, lipofilisite, biyoyararlanım, molekül ağırlığı gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Patel ve ark., 2019a). Transsellüler yolda taşınma, epitel hücre yoluyla apikalden

basolaterale doğru gerçekleşmektedir (Sharma ve ark., 2014). Transsellüler yolda bir molekül bir konsantrasyon gradyanının altında pasif difüzyon ile ya da aktif transport, reseptör veya membran taşıyıcıları aracılığıyla hücreleri geçebilmektedir (Grassin-Delye ve ark., 2012). Özellikle olfaktör epitelin destekleyici hücreleri boyunca çoğunlukla sıvı faz endositoz, reseptör aracılı endositoz ya da pasif difüzyon şeklinde taşınma gerçekleşmektedir (Aderibigbe, 2018; Rassu ve ark., 2016).

2. Paraselüler yol: Paraselüler yolda taşınma, olfaktör epitelin destekleyici hücreleri ile olfaktör nöronlar arasındaki sıkı bağlantılarda gerçekleşmektedir (Aderibigbe, 2018; Rassu ve ark., 2016).
3. Olfaktör sinir yolu: İlaç endositoz ya da pinositoz yoluyla sinir hücrelerinde emildikten sonra intraselüler aksonal yoldan nanotaşıyıcılar vasıtasıyla koku soğancığına taşınmaktadır (Patel ve ark., 2019a). İntranöronal yoldan akson boyunca, ektranöronal yoldan ise perinöral kanallar aracılığıyla taşınma gerçekleşmektedir (Formica ve ark., 2022). Olfaktör yol lamina propria, olfaktör epitel ve olfaktör soğancıktan oluşmaktadır (Xu ve ark., 2020). 200 nm'den küçük maddeler kaveola-aracılı endositozla geçerken, 200-1000 nm aralığındaki maddeler klattrin aracılı endositoz yolunu kullanmaktadır (Van Woensel ve ark., 2013).



Şekil 1.4. Nazal epitelden beyne ilaç taşınma yollarının kavramsal temsili. A:İlaç molekülü/ilaç yüklü nanotaşıyıcılar, B:Mukus, C:Olfaktör epitel hücreler, D:Olfaktör nöronlar, E:Bazal hücreler, F:Lamina propria, G:Salgı bezi, H:Kan hücreleri, I:Olfaktör boşluk, J:Etmoid kemğin kalbur şeklindeki delikli bölümü. Transelüler olarak; (1) olfaktör nöron içine alınan ilaç aksonal taşınma sonucu olfaktör soğan aracılığıyla beyne ulaşır. Paraselüler olarak; (2) olfaktör nöronlar ile epitel hücreler veya (4) epitel hücrelerin arasından veya transelüler olarak (3) olfaktör epitel hücrelerin içinden önce lamina propriaya ardından ya (5) kan hücreleri vasıtasıyla sistemik dolaşıma karışarak ya da (6) ekstraselüler olarak perinöral/perivasküler kanallardan geçerek beyne ulaşır (Katare ve ark., 2017).

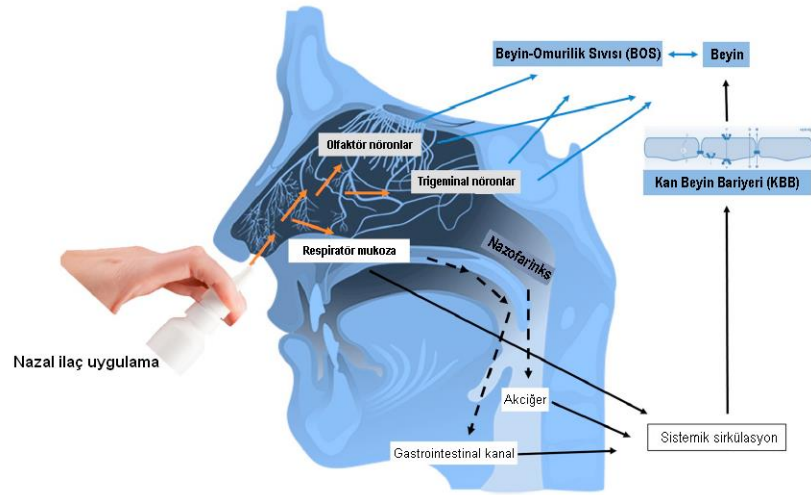
1.3.1.4. İlaç Taşınma Yol ve Mekanizmaları

Bir kez inhale edildiğinde maddeler, burun kılları, hava boşluğu ve 12 µm'den büyük mukozal temas filtresi partiküllerinin bulunduğu nazal vestibüle girmektedir. Nazal konkalar ve kıkırdaklardan oluşan nazal valften geçtikten sonra solunum bölgesine ulaşır. Nazal konkalar, seçici otonomik inervasyon nedeniyle her 3-7 saatte bir değişen konjesyon ve dekonjesyona uğramaktadır. Burnun en küçük kesit alanına sahip olan nazal valfteki küçük değişikliklerin hava akışını etkilemesi muhtemeldir. Bu mekanizma da olfaktör bölgeye ulaşan madde miktarını azaltmaktadır. Ancak

özel cihazlarla bir ilacın %45 kadarı olfaktör bölgeye iletilebilmektedir. Kalan kısmı ise, en geniş burun yüzey alanına (yaklaşık 130 cm²) ve zengin bir damar kaynağına sahip olan respiratör bölgede emilebilir. Trigeminal sinirin maksiller dalı respiratör bölgeyi innerve etmektedir ve pons yoluyla MSS'ye girmektedir. Bu sayede intranazal olarak uygulanan makromoleküller KBB'yi atlayarak MSS'ye girebilmektedir. Nazal valfi aşan ilaç ise, beynin dış dünyayla buluştuğu tek yer olan olfaktör bölgeye girmektedir. Burundan beyne iletim için en etkili ilaç emilim bölgesi işte bu olfaktör bölgedir. İnsan olfaktör bölge yüzey alanı 2-10 cm²'dir. Olfaktör epiteli geçen ilaç, olfaktör sinir boyunca hücre içi ve hücre dışı taşınmaktadır. Lipofilik ilaçlar paraselüler pasif difüzyonla taşınırken, hidrofilik ilaçlar taşıyıcı aracılı taşıma yoluyla ilerlemektedir. Endositoz ve aksonal taşıma diğer yollara göre daha küçük bir rol oynamaktadır. Olfaktör soğancığa ulaşan ilaç, özelliklerine bağlı olarak pasif difüzyon, taşıyıcı aracılı taşıma veya aksonal taşıma yoluyla beyne girebilir. Ekstraselüler yol, olfaktör mukozanın paraselüler boşluğundan lamina propriaya ve perivasküler ve perinöral taşıma yoluyla BOS'a absorpsiyonunu içermektedir. Lamina propriada ilaç sinirler, damarlar ve lenfatikler boyunca hücre içi ve hücre dışı taşıma, perivasküler pompalama ve yığın akışı gibi farklı taşıma mekanizmalarına maruz kalmaktadır (Katare ve ark., 2017; Trevino ve ark., 2020).

Şekil 1.5'te de gösterildiği gibi nazal uygulamadan sonra üç ana taşıma yolu vardır. Bu yollar (Mistry ve ark., 2015; Vasa ve ark., 2015):

- Sistemik yol (nazal respiratör epitelden sistemik sirkülasyona geçer ardından KBB boyunca taşınır)
- Olfaktör sinir aracılığıyla (olfaktör nöral yol) veya olfaktör epitel aracılığıyla (olfaktör epitel yol) paraselüler ya da transsellüler olarak doğrudan taşıma
- Respiratör ve olfaktör epitelde yer alan trigeminal sinir aracılığıyla taşıma (trigeminal yol)



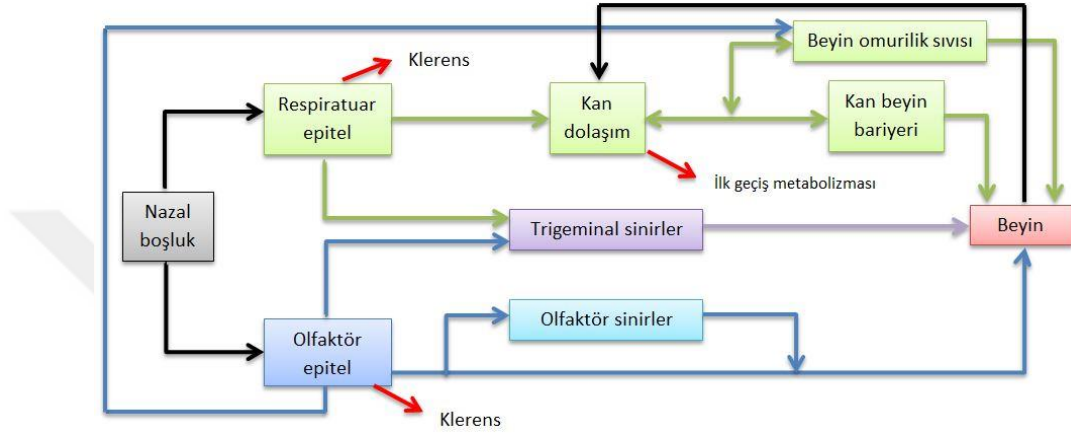
Şekil 1.5. Nazal uygulama sonrası ilacın beyne taşınması için farklı yollar (Costa ve ark., 2019)

Beyindeki ilaç dağılımından esas olarak sorumlu yollar, olfaktör bölgede bulunan olfaktör nöron yolağı ve respiratör bölgede bulunan trigeminal nöron yolağıdır (Choudhari ve ark., 2021; Kaur ve ark., 2015).

Olfaktör soğancık (koku soğancığı), olfaktör nöronlar sayesinde nazal ortamla doğrudan temas halinde olan MSS'nin tek bölgesidir. Parkinson, Multipl Skleroz, Alzheimer hastalığı, demans ve migren tedavisi için intranasal taşınmayı detaylandıran patentler bu yola olan ilgiyi artırmaktadır. Sitokinler ve büyük biyomoleküller (büyüme faktörleri de dahil) de İN uygulama yoluyla MSS'ye giriş için umut vaad etmektedir (Vasa ve ark., 2015). İlaç olfaktör aksonlar boyunca taşınır, olfaktör soğanda birikir ve beyne difüze olur (Rassu ve ark., 2016). Ancak dar dış burun delikleri, karmaşık burun geometrisi ve dinamik fizyolojik değişiklikler olfaktör bölgede hedeflenen birikimin elde edilmesinde zorluk oluşturabilmektedir (Vasa ve ark., 2015).

Trigeminal sinir en büyük kranial sinirdir. Bir kısmı ponstan başlayarak ilacın beyin sapına taşınmasına katkıda bulunan kribriform plakadan geçer ve daha sonra arka beyinden geçer (Patel ve ark., 2019a). Hem respiratör hem de olfaktör mukozayı beslemektedir. Trigeminal sinir ponstan beyin sapına girer ve hem arka hem de ön

beyne kadar ulaşır. Aksonlar boyunca intrasellüler transport ve perivasküler boşluklar, perinöronal kanallar veya beyin omurilik sıvısı ve beyin dokusuna bağlı lenfatik kanallardan difüzyon ve toplu akış yoluyla ekstrasellüler transport gerçekleşmektedir (Formica ve ark., 2022). Burundan beyne taşınmada görevli yolların şematik gösterimi Şekil 1.6’da sunulmuştur.



Şekil 1.6. Burun boşluğundan beyne taşınmada görevli yolların şematik gösterimi (Bourganis ve ark., 2018)

İN ve arteriyel uygulamayı karşılaştıran prelinik çalışmalar sıçanlarda, İN olarak uygulanan maddelerin uygulamadan sonraki 20 dk içinde serebral perivasküler boşluklarda bulunduğunu, dura mater ve Willis çemberinde daha yüksek konsantrasyonlara ulaştığını, derin ve yüzeysel servikal düğümlerde daha yüksek konsantrasyonlara sahip olduğunu bulmuştur. Minimal miktarda İN ilaç, maksiller, oftalmik ve fasiyal arterler dahil olmak üzere karotid arterin dalları yoluyla MSS’ye girmektedir. Vasküler endotelin geçirgenliği bu yol için ana sınırlayıcı bariyerdir. Olfaktör bölgeye ulaşamayan ilaçlar enzimatik bozunmaya ve mukosiliyer klerense uğramaktadır. Kalan ilacın küçük bir miktarı da potansiyel olarak respiratör mukoza yoluyla sistematik dolaşıma geri emilmektedir (Trevino ve ark., 2020).

Burundan beyne direk taşınma olfaktör sinir aracılığıyla gerçekleşir. Nanopartikülün boyutu ve yüzey yükünün de etkisiyle olfaktör sinirlerde endositoz yoluyla hücre içine alınır. Sonrasında nöronal akson boyunca olfaktör soğancığa

doğru taşınır ve ekzositoz yoluyla beynin farklı bölgelerine salınır. Çeşitli faktörlerden etkilenmesine rağmen taşıma genellikle saatler veya günler sürdüğünden bu yol yavaş taşınma mekanizması olarak bilinir. Ekstranöronal yolda ise ilaç olfaktör epitel yoluyla parasellüler boşluklardan subaraknoid alana geçer. Bu taşınma yaklaşık 30 dk sürmektedir. Olfaktör bölgede olfaktör sinirler trigeminal sinirlerden daha kısa olduğundan ve BOS'a daha yakın olduğundan trigeminal sinir yolağı ikincil yolak olarak tercih edilmektedir. İndirekt yol ise respiratör bölgeden sistemik dolaşıma emilimi ifade etmektedir (Correia ve ark., 2022). Transnöronal yol çok yavaştır. İlaç, uygulamadan yaklaşık 24 saat kadar sonra MSS'ye ulaşır (Rassu ve ark., 2016).

Bir de BOS-interstisyel sıvı (ISF) değişiminden sorumlu glenfatik sistem vardır. Çözünen maddelerin taşınması ve birikmiş metabolitlerin yanı sıra çözünenlerin de temizlenmesini sağlamaktadır. Glenfatik sistemde bozulma olduğunda, ISF çıkışında artış olmadan BOS girişinde artış olur. Bu da hücre dışı çözünen maddelerin birikmesi sonucunda bilişsel zayıflamaya yol açar. BOS-ISF değişimini düzenlemek, çözünen madde ve metabolit klerensini artırır ve bu MSS ile ilgili hastalıkların yönetiminde önemli olabilir (Patel ve ark., 2019a).

1.3.1.5. Burundan Beyne İlaç Hedeflendirmede Önemli Faktörler

İlacın fizikokimyasal özellikleri ve burnun fizyolojisi burundan beyne ulaşımı etkilemektedir. Burundan beyne iletimde karşılaşılan fizyolojik bariyerler: KBB, mukosiliyer klerens, epitelyal sıkı bağlantılar, nazal valf, nazal vestibül, ilaca özel hedef reseptörlerin/taşıyıcıların varlığı, dışaakış taşıyıcılar, olfaktör bölgenin yüzey alanı, nazal metabolizma şeklinde sıralanabilir (Trevino ve ark., 2020).

1.3.1.5.1. İlacın/Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri

Nazal ilaç dağıtımını etkileyen temel fizikokimyasal özellikler aşağıda verilmiştir (Behl ve ark., 1998; Patel ve ark., 2019a).

- Partikül büyüklüğü
- Moleküler ağırlık
- Polimorfizm
- Çözünürlük ve çözünme hızı
- Kimyasal form
- Kimyasal durum: Ön ilaç
- pKa ve partiyon katsayısı

Nazal epitelde parasellüler ilaç taşınması için en büyük moleküler ağırlığın 1000 Da olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte sıkı bağlantılar genellikle hidrodinamik yarı çapı 4-8 Å'ndan (epitelyumun sızdırma özelliğine bağlı olarak) büyük olan moleküller için geçirimsizdir ve bundan daha büyük olan moleküllerin komşu hücreler arasında geçişini kısıtlamaktadır (Sharma ve ark., 2014). 1000 Da moleküler ağırlığın üzerindeki moleküller %0,5-5 arasında bir biyoyararlanım ile oldukça yavaş absorbe edilir. 400-1000 Da arasında moleküler ağırlığa sahip moleküllerde ise, epitelde pasif difüzyonu etkilediği için lipofiliklik özelliği önemli bir rol oynamaktadır (Grassin-Delye ve ark., 2012).

Nazal yol düşük moleküler ağırlıklı, lipofilik ilaçlar için uygundur. Düşük moleküler ağırlığa sahip olsalar da polar ilaçların bu yolla biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Polar ilaçların nazal absorpsiyonunu artırmak için kitosan, siklodekstrin, sodyum lauril sülfat gibi absorpsiyon artırıcılar kullanılabilir (Agrawal ve ark., 2020).

Proteinler gibi yüksek molekül ağırlıklı ve çoğu durumda fizyolojik pH'da sıfır olmayan bir net yüke sahip moleküller için biyolojik bariyerlerden geçişlerde difüzyon mekanizması uygun değildir (Grassin-Delye ve ark., 2012).

Etkin maddelerin stabiliteelerini ve permeabilitelerini artırmak amacıyla ön ilaç formları oluşturulabilir. Bu amaçla lipofilik bir maddeye hidrofilik gruplar ya da hidrofilik bir maddeye lipofilik gruplar eklenebilmektedir. Bu sayede biyolojik membranlardan geçiş miktarı artırılır (Grassin-Delye ve ark., 2012). Bhattacharya ve ark. (2015) 5X Ailesel Alzheimer hastalıklı fare modelleri üzerinde intranazal yol ile galantaminin ön ilacı olan memogain tedavisi uygulayarak bu tedavinin davranış ve beyindeki amiloid- β plak tutulumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Oral yolla verilen galantamine kıyasla daha düşük dozlarda intranazal memogain uygulamasının bilişsel gerileme başlamadan önce bile önemli ölçüde davranışsal semptomları iyileştirebildiğini ve plak birikimini etkili bir şekilde geciktirdiğini raporlamışlardır.

Partikül boyutuna ilişkin tahminler, aerodinamik çapları yaklaşık 5 μm olan damlacıkların veya partiküllerin tipik olarak üst solunum yollarında biriktiğini gösterse de; nazal cihazlara yönelik en son Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) kılavuzu (2002), akciğer inhalasyonunu önlemek için solunabilir partikül oranının 9 μm 'nin altında olmamasını önermektedir (Vasa ve ark., 2015).

Yapılan birçok çalışmada, nazal absorpsiyonun etken madde çözeltisinin pH'sına ve etkin maddenin pKa değerine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Örneğin benzoik asitin (pKa 4,19) pH 2,0 ile 7,1 arasında değişen pH'larda nazal absorpsiyonu incelenmiştir. Nazal absorpsiyonun pH'ya bağlı olduğu ve pKa değerinin altındaki pH'larda absorpsiyonun daha iyi olduğu bulunmuştur (Hasçiçek C, 1999).

1.3.1.5.2. Formülasyon Faktörleri

Nazal ilaç dağıtımını etkileyen formülasyon parametreleri aşağıda verilmiştir (Behl ve ark., 1998; Patel ve ark., 2019a; Xu ve ark., 2020).

- Dozaj formunun tipi (çözelti spreyleri, emülsiyonlar, nazal damlalar, süspansiyon spreyler, merhemler, jeller, tozlar, mikroküreler ve lipozomlar gibi özel sistemler)
- İlaç konsantrasyonu ve doz
- Uygulama hacmi
- Formülasyonun fiziksel formu
- Tampon kapasitesi, pH ve ozmolarite
- Mukozal irritasyon
- Yardımcı maddeler (çözündürücüler, tampon bileşenleri, antioksidanlar, koruyucular, tat ve koku vericiler, jelleştirici ajanlar, hümektanlar, absorpsiyon artırıcılar)
- Maruz kalan nazal alan
- Viskozite

Nazal uygulamalarda lipofilik iç kavite ve hidrofilik dış yüzeye sahip, lipofilik ilaçların çözünürlüğünü artırmada kullanılan siklodekstrinlerden yararlanılmaktadır. Halka şeklindeki bir olgisakkarit olan siklodekstrinler sadece çözünürlük değil stabiliteyi de iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Grassin-Delye ve ark., 2012).

In situ jel sistemler mukosiliyer klirens sorunun üstesinden gelmek, temas süresini artırmak ve böylece nazal absorpsiyon ve biyoyararlanımı artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Jelleşme mekanizması iki ana kategoriye ayrılır: fiziksel çapraz bağlanma ve kimyasal çapraz bağlanma. Fabrikasyonunun kolay olması ve güvenilirlik profili nedeniyle fiziksel çapraz bağlanma mekanizması daha çok tercih edilmektedir. Kimyasal çapraz bağlanmada uygulama bölgesinde yan etkiler ve toksisite gözlenebilmektedir (Agrawal ve ark., 2020). Multiple Skleroz, Parkinson,

Alzheimer, şizofreni, depresyon gibi pek çok nörolojik hastalığın tedavisi için burundan beyne hedeflenen *in situ* jel bazlı ilaç taşıma sistemleri üzerinde umut vaat eden çalışmalar bulunmaktadır (Aderibigbe, 2018).

In situ jelleşen sistemlerde ısıya duyarlı (poloksamer, kitosan, Etil(hidroksietil)selüloz-EHEC, ksiloglukan), pH duyarlı (karbopol) ve iyon duyarlı (gellan zımkı, pektin) olmak üzere üç farklı grup polimer kullanılmaktadır (Agrawal ve ark., 2020). Isıya duyarlı sistemlerde 25-37°C aralığında sıcaklıkta meydana gelen değişimlerle kullanılan polimerler çözelti ve jel formlar arasında geçiş göstermektedirler. Böylece mukoadhezif formülasyonlar elde edilmiş olur. İyon duyarlı sistemlerde ise örneğin; gellan zımkı nazal sıvılarda doğal olarak bulunan katyonlar özellikle de Ca^{+2} varlığında jelleşmektedir (Karavasili ve Fatouros, 2016).

Burundan beyne hedeflemede kullanılacak ideal ilaç taşıyıcı sistemlerin taşınması gereken temel özellikler aşağıda sıralanmıştır (Behl ve ark., 1998; Formica ve ark., 2022).

- Nazal irritasyona neden olmamalı
- Düşük dozda verilebilmeli (genellikle 25 mg'nin altında)
- Nazal absorpsiyon özelliklerine uygun olmalı
- Nazal metabolitleri toksik olmamalı
- Uygun stabilite özellikleri olmalı
- Biyouyumlu ve kokusuz yardımcı maddeler kullanılmalı
- Hızlı eliminasyondan kaçınabilmeli
- Fizyolojik tonisitesi ve viskozitesi uygun olmalı
- Nazal mukoza ile uyumlu pH'da olmalı

1.3.1.5.3. Fizyolojik Faktörler

Nazal ilaç dağıtımını etkileyen fizyolojik faktörler aşağıda verilmiştir (Patel ve ark., 2019a; Xu ve ark., 2020).

- Mukosiliyer klerens
- Nazal kan akışı
- Patolojik durum
- İlaç birikimi
- Enzimatik aktivite (nazal metabolizma)

Mikroorganizmalar, alerjenler, toksinler gibi yabancı partiküller burun boşluğunun mukusuna yapıştığında veya içinde çözündüğünde, nihai olarak gastrointestinal sisteme (GIS) boşalmak üzere nazofarenkse doğru taşınırlar. Teorik olarak mukus tabakası her 10-20 dakikada bir yenilenmektedir. Bu da intranazal uygulanan ilacın absorpsiyonunu azaltabilir. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için formülasyonun nazal mukoza ile temas süresi artırılmaktadır. Böylece absorpsiyon ve biyoyararlanım da artmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda siliyer hareketin formülasyonda kullanılan koruyucu, antioksidan gibi yardımcı maddeler ile pH faktörü nedeniyle azalabileceğini dolayısıyla temas süresinin artabileceğini göstermişlerdir. Özellikle mukoadhezif polimerlerin kullanımı oldukça avantaj sağlamaktadır. Polimer ile mukusun teması sonrası arada oluşan çapraz bağlar mukusun viskozitesini artırır ve mukosiliyer klerens azalır. Polimerin yüzey yükü, pH, iyonik kuvvet, yüzey pürüzlülüğü, çapraz bağlanma yoğunluğu, hidrasyon potansiyeli, moleküler ağırlığı mukoadhezyon derecesini etkilemektedir (Vasa ve ark., 2015).

Peptid ve protein ilaçların endotel hücrelerdeki enzimatik degradasyonunu azaltmak için proteaz ve peptidaz inhibitörler formülasyonda kullanılabilir (Patel ve ark., 2019a).

Nazal Birikim ve Mukosiliyer Klirensi Etkileyen Faktörler

Silialar epitel burun boşluğu boyunca eşit dağılım göstermemektedir. Respiratör bölgede arka nazal kaviteye ulaşan partiküller hızla mukosiliyer klirens uğrarken, ön bölgedeki partiküller daha yavaş klirens uğramaktadır. Olfaktör bölgede ise hareketli olmayan silialar bulunduğu için buradaki mukosiliyer klirensin insan kafasının dik pozisyonu sonucu yerçekimi etkisiyle olduğu düşünülmektedir. Bu da olfaktör bölgeyi burundan beyne direkt ilaç hedeflemek için daha cazip kılmaktadır. Ancak bu kronik kullanım noktasında nazal yolla verilmek istenen formülasyonun bileşenleri iyi değerlendirilmelidir (Vasa ve ark., 2015).

Nazal yolla uygulamadaki ana sorun mukosiliyer klirenstir. Nazal drenaj nedeniyle mukus tabakasında biriken partiküller 15-30 dk'da elimine edilirler (Grassin-Delye ve ark., 2012). Bu sorunun üstesinden gelmek için mukoadhezif polimerler kullanılabilir. Bu polimerler nazal mukoza ile daha yakın/sıkı bir temas sağlayarak daha yüksek konsantrasyon gradyanı ve bunu takiben absorpsiyon artışı sunmaktadır. Kaur ve ark. (2015) Tramadol HCl'nin mukoadhesif bir ajan olan kitosan ile nanopartiküler *in situ* jel formülasyonlarını hazırlamışlardır. Geliştirdikleri formülasyon ile KBB'yi aşarak beyni hedefleyebilmişler ve elde ettikleri düşük polidispersite indeksi (PDI) ile nanopartiküllerin dispersiyon içinde iyi dağıldığını, ilacın mükemmel enkapsülasyon kapasitesi olduğunu ve daha az agregasyon gösterdiğini kanıtlamışlardır. Formülasyonun daha fazla pozitif yükü (zeta potansiyeli) olması daha küçük boyutlarda dağılmasını, yüzey alanının artmasını ve müsin proteini ile daha çok etkileşmesini sağlamıştır.

Enzimatik Degredasyon

Nazal boşluktaki epitel bariyer ve lümen, çeşitli protein ve peptidlerin parçalanmasından sorumlu ekzopeptidaz ve endopeptidaz enzimleri içermektedir. Enzimatik degradasyondan kaçınmak için enzim inhibitörleri, ilaç taşıyıcı sistemler veya ön ilaç yaklaşımları kullanılmaktadır (Agrawal ve ark., 2020).

1.3.1.5.4. Burundan Beyne İlaç Verilmesinde Kullanılan Cihazlar

Nazal uygulama için hazırlanmış dozaj formları nazal boşlukta etkili absorbsiyona izin verecek sürede kalmalı ve bu absorbsiyon için yeterli dozda etken madde içermelidirler. Nazal kaviteye ilaçların uygulanabilmesi için dizayn edilen sistemler burun spreyleri, burun damlaları, ölçülü doz nebulizör ve ölçülü doz basınçlı aerosollerdir (Hasççek C, 1999).

Burundan beyne iletim için kullanılan ruhsatlanmış cihazlara örnek olarak; ViaNaseTM, Precision Olfactory Delivery[®], Aero Pump System, OptiMistTM, Sipnose verilebilir. Klinik çalışmalarda henüz kullanılmamış yeni cihazlara ise; NaltosTM, VP3, Aeroneb[®] Pro, Versidoser[®] örnek verilebilir (Trevino ve ark., 2020).

1.3.1.6. Burundan Beyne Hedeflemede Nanotaşıyıcı Sistemler

Yapılan klinik çalışmalar, İN yolla taşınan ilaç miktarının düşük konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir (%1'in oldukça altında). Olfaktör ve trigeminal sinirler aracılığıyla olfaktör epitelden geçiş miktarını artırmak için ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik adımlar atılmadığı sürece bu yol terapötik olarak sadece oldukça potent ilaçlar için kullanılabilir olacaktır (Mistry ve ark., 2015). Burundan beyne ulaşımın önündeki en büyük engel ilaçların sınırlı biyoyararlanımıdır. Lipofilik ilaçlar genellikle yüksek biyoyararlanım ile burun mukozasını kolayca geçebilmektedir (>%75). Bununla birlikte hidrofilik ilaçlar yaklaşık %10'luk bir biyoyararlanım ile zayıf absorbsiyon gösterir ve peptidler ve proteinler için değerler genellikle %1'den azdır (Liu ve Zhang, 2019).

Nanopartiküler sistemler, nanoboyutta olmaları, geniş yüzey alanları, yüksek reaktiviteleri ile benzersiz fizikokimyasal özelliğe sahiplerdir. Ayrıca nanopartiküller yayılma, kan dolaşımındaki yarılanma ömrü, ilaç salım karakteristikleri ve immünojenisite gibi temel özellikleri değiştirme olanağı sunmaktadır. Zayıf suda çözünürlük, permeabilite ve instabilite nedeniyle düşük oral biyoyararlanım ile

karakterize edilen moleküllerin hedeflendirilerek verilmesine olanak sağlamak ve daha uzun süreli ve kontrollü salım profilleri göstermektedir (Tartau ve ark., 2010).

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmalarının en önemli teknolojik avantajları aşağıda verilmiştir (Dabholkar ve ark., 2021; Tartau ve ark., 2010).

- Yüksek etkin madde taşıma kapasitesi
- İyileştirilmiş biyoyararlanım
- Kontrollü salım
- Yüksek stabilite
- Hem hidrofilik hem hidrofobik maddelerle uygulama yapmaya elverişli olması
- İlacı degradasyondan koruması
- Geliştirilmiş ilaç çözünürlüğü
- Çeşitli yollarla uygulamaya ve istenilen bölgeye hedeflemeye imkan tanınması

Nanoteknolojik sistemler etki bölgesini hedeflemek açısından umut vaat etmektedir. Yapılan pre-klinik çalışmalar *in vitro* / *in vivo* KBB modellerinde endositoz veya transitoz yoluyla moleküllerin etkili bir şekilde taşınabilir olduğunu göstermektedir. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılan nanotaşıyıcı sistemler ve onlar üzerinde yapılan modifikasyonlar ile ilacın absorpsiyonu, penetrasyonu, biyoyararlanımı, terapötik etkinliği, potensi artırılabilir (Patel ve ark., 2019a). Bu sistemlerde ilacın nöral ya da transepitelyal yollarla nanopartikül içinde enkapsüle edilmiş olarak mı beyne taşındığı yoksa ilacın nazal epitel yüzeyinde veya doku içinde salınıp ardından membran boyunca mı taşındığı büyük önem taşıdığı için, ilacın salım yerine bağlı olarak nanopartiküllerin optimizasyonu sağlanır (Mistry ve ark., 2015).

Yapılan alışmalar, basit bir ilaç çözeltisine kıyasla nanopartiküler sistemlerin nazal uygulama sonrası beyindeki ilaç konsantrasyonunda önemli miktarda artış olduğunu göstermiştir (Mistry ve ark., 2015). Doku geçişi zayıf olan moleküllerin biyoyararlanımını artırmak için polimerik nanopartiküller, lipid bazlı nanopartiküller, mikro/nano emülsiyonlar, lipozomlar gibi formülasyonlar umut vaad etmektedir (Hosny ve Hassan, 2014).

Nanopartiküler formülasyonlar ilaç molekülünde herhangi bir modifikasyon yapmayı gerektirmediği için ilaçların iletimi için umut verici bir stratejidir. Beyin tarafından hızlı bir şekilde alınmaları, biyolojik olarak parçalanabilir ve kabul edilebilir olmaları nedeniyle beyne hedeflemede etkili ilaç iletim sistemleridir. Ayrıca patlama etkisi (*burst effect*) yokluğu da avantajları arasındadır (Kaur ve ark., 2015).

Araştırmacılar tarafından farmasötik ürünün potensini ve etkinliğini artırmak için parametreler belirlenmiştir. Bu bağlamda ilaç ne burun tahrişine neden olmalıdır ne de toksik metabolitler üretmelidir. Herhangi bir koku içermemeli ve yeterli çözünürlükte (100 mg/ml' den az olmayan), kabul edilen nazal absorbsiyonda ve düşük dozda (25 mg/dozun altında) etkili olarak daha uzun süre stabil olmalıdır (Patel ve ark., 2019a).

Genel olarak nanopartiküllerin hücresel alımının konsantrasyon, partikül boyutu, yüzey yükü ve lipofilisite gibi diğerk yüzey özelliklerine bağılı olduğu ileri sürülmektedir (Mistry ve ark., 2015). İntranazal yolla nanopartikül uygulamasında dikkat edilmesi gereken en önemli parametre partikül boyutudur. Partikül boyutu, ilaç yüklenmesi, stabilite ve salımı etkilemektedir. Partikül boyutu dağılımı, absorbsiyon, biyodağılım ve sirkülasyon süresi de dahil olmak üzere nanotaşıyıcıların farmakokinetiğini de etkileyebilir. Daha küçük partikül boyutu ve dolayısıyla sunduğı geniş yüzey alanı ilaç çözünürlüğünün artmasını, mukoza ile daha kuvvetli etkileşimleri ve permeasyon yeteneğinin artmasını sağlamaktadır. Bunun yanı sıra nanopartikülün pozitif yüzey yüküne sahip olması negatif yüklü münin ile de etkileşimini artıracaktır (Formica ve ark., 2022).

Gabal ve ark. (2014), nazal yolla beyne hidrofilik bir molekül verilmesinde kullanılan nanotaşıyıcıların yüzey yükünün etkisini araştırmışlardır. Poloksamer kullanarak *in situ* jel oluşturmuşlar ve 200 nm'nin altındaki partükül boyutunda yaklaşık mutlak 34 mV zeta potansiyele sahip nanoyapılı lipid taşıyıcılar elde etmişlerdir. İlaç yüklü anyonik ve katyonik nanoyapılı lipid taşıyıcıların biyoyararlanımları, ilacın intranazal çözeltisi ile karşılaştırıldığında sırasıyla çözeltiden %44 ve %77,3 yüksek bulunmuştur. Katyonik olanın anyonik olana göre daha yüksek biyoyararlanıma sahip olmasının nedenleri; nazal mukozadaki anyonik sialik gruplarla elektrostatik etkileşiminin nazal mukoza ile temas süresini artırması, sıkı bağlantıların açılmasını sağlaması ve nazal membrandan penetre olması olarak açıklanmıştır.

Nanopartiküllerin sundukları benzersiz özelliklerin yanı sıra kitosan gibi mukoadhezif özellik gösteren bir polimer ile formüle edilerek hazırlanan nanopartiküllerin nazal mukozada temas süresi artmaktadır. Kitosan, doğal olarak oluşan kitinin, polimeri katyonik hale getirmekten sorumlu olan açıkta kalmış amino grubun deasetilasyonu yoluyla türetilen bir lineer polisakkarittir (Sharma ve ark., 2014). Polikasyonik, biyobozunur ve biyouyumlu bir polimerdir. Düşük immünojenisite gösterir, toksik değildir, mukoadhesif ve permeasyon artırıcı özelliktedir. Kitosan nanopartiküller asidik-nötral pH'larda pozitif yükle karakterizedir (pKa 6,5). Fizyolojik pH'da mukus tabakasındaki güçlü negatif yüklü sialik asit ve ester sülfatar ile kitosan naopartiküller arasında güçlü elektrostatik etkileşimler oluşmaktadır (Van Woensel ve ark., 2013). Kitosan, biyoparçalanabilir polimer grubundaki tek pozitif yüklü polisakkarittir (Alkholief, 2019).

Kitosan, asidik ortamda çözünebilen, stabil, kristalli bir polimerik yapıya sahip maddedir (Alkholief, 2019; Agrawal ve ark., 2020). Alkali ve nötral pH değerlerinde çözünmez. Nazal mukoza ile temas ettiğinde mukozadaki suyu absorbe ederek şişer ve jel benzeri bir tabaka oluşturur. Ayrıca sıkı bağlantıların geri dönüşümlü bir şekilde açılmasını sağlamaktadır. Kitosanın deasetilasyon derecesi, saflığı ve moleküler ağırlığı formülasyon geliştirme aşamasında dikkat edilmesi gereken parametrelerdir. Deasetilasyon derecesi katyonik davranış üzerinde etkilidir.

Deasetilasyon derecesi %35'in üzerinde iken düşük toksisite gösterirken, %35'in altında doza bağı toksisite gösterir. Kitosanın moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesi arttıkça sıkı bağlantıları açma yeteneği de artmaktadır. Dehidrate olan epitel hücreler arasındaki bağlantılar açılır ve paraselüler absorpsiyon artar (Rassu ve ark., 2016).

Mistry ve ark. (2015) farklı yüzey özellikleri ve boyutlara sahip nanopartiküllerin olfaktör epitelden beyne taşınmadaki rolünü araştırmışlar ve bu amaçla; 20-200 nm partikül boyutu aralığındaki nanopartikülleri seçmişlerdir. Modifiye edilmemiş polistiren lateks nanopartiküllere oldukça negatif bir yüzey yükü ve hidrofobik yüzey sağlarken, kitosan kaplama daha yüksek yüzey hidrofiliğine sahip pozitif yüklü nanopartiküller yaratmış ve polisorbata 80 kaplı nanopartiküller ise neredeyse nötral yüke sahip hidrofilik nanopartiküller olmuştur. Kitosanın pKa'sı yaklaşık 6,5 olduğu için, SNS pH 7,4 tamponunda kitosan ile kaplama sonucunda nanopartiküllerde kayda değer bir agregasyon görülmüş ve bu nedenle sitrat tamponu pH 6,0 kullanılmıştır. İçlerinden kitosan kaplı olan nanopartiküller mukus ile iyonik etkileşiminden dolayı doku ile en yüksek ilişkiyi gösteren formülasyon olmuştur. Ancak, eksize edilen olfaktör epitelin biyoelektrik özellikleri, metabolik aktivitesi ve histolojisinin değerlendirilmesi ile nanopartiküllerin partikül boyutunun azalması sonucunda önemli doku hasarı gözlenmiştir.

Doğal lipidlerden ve polimerlerden hazırlanan nanopartiküller beyin tarafından hızlı alım, biyolojik olarak kabul edilebilir ve parçalanabilir olmaları ve polimerik nanopartiküllere kıyasla daha az toksisite göstermeleri nedeniyle beyin hedeflemeye ilginç adaylardır (Sharma ve ark., 2014). Nanolipid taşıyıcılar ilaç yükleme kapasitesini artırmakta ve depolama sırasında ilaç salımını en aza indirmekte veya önlemetedir. Nanolipid taşıyıcılar, fizyolojik ve biyodegradabl lipidlerden üretilirler ve lipofilik yapılarından dolayı terapötik maddeleri beyne taşımaları beklenmektedir. Düşük toksisite gösterirler. Işığa, oksidasyona ve hidrolize duyarlı maddelerin kimyasal stabilitesini artırabilirler (Alam ve ark., 2014).

Sonvico ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada lesitin ve kitosan oranlarının üretilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Kullanılan lesitin ve kitosan miktarı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığını, kitosanın katyonik doğasının lesitin anyonik doğasına baskın gelmesi nedeniyle kitosan miktarı arttıkça zeta potansiyelinin de arttığını bulmuşlardır.

1.3.1.6.1. Polimerik Nanopartiküller

Burundan beyne hedefleme amacıyla polimerik nanopartiküller biyopolimerler ve sentetik polimerler kullanılarak hazırlanmaktadır. Kullanılan polimerler biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır. Sıklıkla kullanılan sentetik polimerler arasında; PLGA [poli(laktik-ko-glikolik asit)], PCL (polikaprolakton), PLA (polilaktik asit) doğal polimerler arasında ise; kitosan ve pektin bulunmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin polietilen glikol (PEG) veya Polisorbat 80 ile kaplanarak mukusa nüfuz etme özellikleri artırılabilir. Kitosan nanopartiküller ile ise mukoadhezyon özelliği artırılabilir. Hücreye nüfuz eden polimerik nanopartiküller arjinin ve lizin bakımından zengin pozitif yüklü oligopeptidlerdir ve biyolojik membranlarla olağanüstü etkileşim kapasitesine sahiptirler (Formica ve ark., 2022).

PLGA nanopartiküller çok çeşitli terapötik ajanların enkapsüle edilmesinde optimal özellikler gösterdiklerinden yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Düşük miktarda ilaç yüklemesi ve yüksek ilaç salımı gibi dezavantajları vardır. Avrupa İlaç Ajansı (European Medicine Agency, EMA) ve FDA tarafından onaylanmış intravenöz uygulamalarda kullanılan biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bazı PLGA-nanopartiküller bulunmaktadır (Gosselet ve ark., 2021).

Arısoy ve ark. (2020) tarafından parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ve %30 civarında düşük oral biyoyararlanıma sahip bir bileşik olan levodopa için burundan beyne ulaştırılmak üzere PLGA bazlı bir nanopartikül formülasyonu geliştirilmiştir. Ayrıca bu nanopartikül üzerine buğday tohumu aglutinin grefti ile bir

modifikasyon yapılmıştır. Çalışmalar neticesinde etkin maddenin salım süresi uzatılmış, beyne ulaşan konsantrasyonunda artış elde edilmiştir. *In vivo* deneyler göstermiştir ki; intranazal yoldan verilen levodopa yüklü buğday tohumu aglutunun ile modifiye edilmiş PLGA nanopartiküller lokomotor ve spontan aktivite testlerinde oldukça hızlı etki etmekte ve uzun süreli semptomatik iyileşme sağlamaktadır. Geliştirilen formülasyon Parkinson tedavisi için gelecek vaad etmektedir.

1.3.1.6.2. Lipid Bazlı Nanotaşıyıcılar

Temelde lipid ve sulu bir fazdan oluşan biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir sistemlerdir. Biyolojik membranlardan yüksek oranda geçme, ilacı kimyasal ve enzimatik parçalanmadan koruma, iyi bir stabilite ve yüksek ilaç yükleme kapasitesi, sürekli ilaç salımı, beyin tarafından hızlı alım, maliyetinin ucuz olması, düşük toksisite göstermesi gibi avantajları vardır (Dabholkar ve ark., 2021; Formica ve ark., 2022; Singh ve ark., 2016). Lipid nanopartiküllerin yüzeyi KBB reseptörleri ya da taşıyıcılara spesifik olarak bağlanacak hedefleyici moleküllerle kaplanabilmektedir (Formica ve ark., 2022).

Lipid bazlı nanokapsüller, lipofilik bir sürfaktan, non-iyonik sürfaktan ve yağlar olmak üzere temelde üç bileşenden oluşmaktadır. Katı lipidler ve emülsifiye edici maddelerden yapılmış bir dış kabuk tarafından çevrelenen yağlı çekirdekten oluşan, lipozomlar ile polimerik nanopartiküller arasında bir yapıya sahip sistemlerdir. Orta zincirli gliseritler, fofolipidler, uzun zincirli yağ asitlerinden oluşmaktadır (Dabholkar ve ark., 2021). Yaklaşık olarak 20-100 nm partikül büyüklüğüne sahiplerdir. Biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir, üretimi kolay, küçük partikül büyüklüğüne, yüksek ilaç enkapsülasyon etkinliğine (hidrofobik veya amfifilik maddeler) ve uzun raf ömrüne (18 aya kadar sürebilen) sahip, aynı anda iki ya da daha fazla ilaç yüklenebilen sistemlerdir (Dabholkar ve ark., 2021; Moura ve ark., 2020).

Subaraknoid kanamanın neden olduğu vazospazm tedavisinde endike nimodipinin oral biyoyararlanımı %5-13 arasındadır. İlacın oral yoldan biyoyararlanımını artırmak çok yüksek dozlar (360 mg/gün) gerektirmektedir. Arzu edilen terapötik doza IV yol ile ulaşmak istenildiğinde ise; aritmi, hipotansiyon, bradikardi ve hatta ölüme varabilen yan etkiler ortaya çıkmakta hem de ticari 0.2 mg/ml nimodipin çözeltisinin uygulanmasının uzman sağlık personeli ve ekipman gerektirmesi, enjeksiyon çözeltisinin dilüsyonu sırasında kristallenme görülebilmesi, içerdiği etanol dolayısıyla enjeksiyonun flebit, ağrı ve inflamasyona neden olabilmesi ve yavaş infüzyon gerektirmesi dolayısıyla hastaya yeterli dozun verilebilmesi için uygulamanın 10 saat kadar sürebilmesi gibi pek çok sorunla karşılaşmaktadır. Bu sorunlar karşısında İN uygulama bir çıkış yolu sunmaktadır. Mohsen ve ark. (2020) ilaçların beyne İN yolla verilmesinde henüz yeterince araştırma yapılmamış bir alan olan lipid nanokapsülleri kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişler ve sonuçları IV nimodipin çözeltisi uygulaması ile karşılaştırmışlardır. İN nimodipin lipid nanokapsüller olfaktör yol aracılığıyla değil, nazal membran ve KBB'den permeasyonu artırarak sistemik yolla beyne iletimi sağlamıştır. *In vivo* farmakokinetik özelliklere göre, IV nimodipin uygulamasına kıyasla %97 beyin hedefleme verimliliğine ulaşmışlardır.

Şizofreni tedavisinde kullanılan asenapin çok düşük (<%2) oral biyoyararlanım göstermektedir. Günde 2 kez dozlama gerektiren dilaltı kullanımı ise hem uygulama sonrası yeme-içme kısıtlaması gerektirmekte hem de ekstrapiramidal yan etkilerin yanı sıra yaklaşık %35 biyoyararlanım göstermektedir. Asenapin maleatın biyoyararlanımını artırmak ve yan etkileri azaltmak amacıyla nanoyapılı lipid taşıyıcı sistemler ile intranazal yol aracılığıyla beyne ulaştırılması hedeflenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda intranazal uygulanan saf asenapine kıyasla intranazal uygulanan asenapin yüklü nanoyapılı lipid taşıyıcılar ile daha yüksek C_{max} ve AUC değerleri elde edilmiştir. Ayrıca uzun süreli kullanımda antipsikotik etkilerde artış, yan etkilerde ise azalma gözlenmiştir (Singh ve ark., 2016).

1.3.1.6.2.1. Katı lipid nanopartiküller

Katı lipid nanopartiküller, tek tabakalı sürfaktanlarla kaplı katı lipid çekirdekten oluşan kolloidal sistemlerdir (Formica ve ark., 2022). Uzun zincirli trigliseritler, fosfolipidler, yağ asitleri ve sürfaktanlardan oluşmaktadırlar (Dabholkar ve ark., 2021). Düşük toksisite göstermeleri, beyin tarafından hızla alınmaları, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olmaları nedeniyle beyne hedeflemede tercih edilirler (Van Woensel ve ark., 2013). Geliştirilmiş ilaç yükleme kapasitesine sahip, üretim ve sterilizasyon kolaylığı sunan, ilacın stabilitesini artıran sistemlerdir. Partikül büyüklüğü 50-1000 nm aralığında değişmektedir (Dabholkar ve ark., 2021).

1.3.1.6.3. Nanoemülsiyonlar

Nanoemülsiyonlar; su, yağ, sürfaktan (yüzey aktif madde) ve kosürfaktanların karışımından oluşan, 20-200 nm boyut, yüksek çözücü kapasitesi ve mükemmel termodinamik stabilite gibi çeşitli avantajlara sahip sistemlerdir. Genellikle lipofilik ilaçların burundan beyne taşınmasında kullanılmaktadırlar. Küçük parçacık boyutları sayesinde biyolojik membranlardan geçişi dolayısıyla biyoyararlanımı arttırmaktadır (Xu ve ark., 2020). Örneğin; Hosny ve Hassan (2014) sakınavir mesilat için İN uygulama amacıyla nanoboyutta bir mikroemülsiyon geliştirmiş ve böylece ilacın ticari tablet formuna göre biyoyararlanımını 12 kattan fazla artırdıklarını göstermişlerdir. Nanoemülsiyonlar hazırlanırken gerekli miktarda ilacı çözecek en az miktarda yağ kullanılması hedeflenir. Çünkü yağ miktarı arttıkça, yağda çözünmeyi artırmak için yüzey aktif madde konsantrasyonu da artırılacak, dolayısıyla toksisite problemleri ortaya çıkacaktır. Sürfaktanlar ise nanoemülsiyonların stabilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Yağ ve su fazları arasındaki arayüzey gerilimini azaltıp çözünürlüğü artırır, etkin maddenin ıslanmasını sağlar ve çökmesine engel olmaktadır. Sürfaktanların emülsifikasyon gücünü artırmak amacıyla kosürfaktanların kullanımı da yaygındır. Kosürfaktanlar arayüzey akışkanlığını arttırırlar. Pandey ve ark. (2016) depresyon ve anksiyete tedavisinde kullanılan paroksetinin yoğun bir şekilde ilk geçiş metabolizmasına uğraması dolayısıyla zayıf

oral biyoyararlanım göstermesi nedeniyle burundan beyne doğrudan ulaştırmak amacıyla nanoemülsiyon formülasyonunu geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bu amaçla; yağ fazı olarak Capmul MCM (mono & di-gliserit - emülgatör), sürfaktan olarak Solutol HS 15, kosürfaktan olarak ise propilen glikol seçmişlerdir. Kontrol grubu, depresif, oral paroksetin süspansiyonu uygulanan ve intranazal paroksetin nanoemülsiyonu uygulanan 4 fare grubu üzerinde gerçekleştirdikleri zorla yüzmeye, tırmanma davranışı ve hareketsizlik profili testlerinden elde edilen sonuçlar, intranazal yolla paroksetin nanoemülsiyonu uygulaması sonucunda önemli miktarda ilacın beynin hipokampus bölgesine ulaştığını, presinaptik nöronda serotonin geri alımının engellendiğini ve davranışlarda iyileşme olduğunu göstermiş.

1.4. Depresyon

Dünya çapında engelliliğin önde gelen nedeni ve en yaygın görülen mental bozukluk olan depresyon, yaşam kalitesi ve bilişsel işlevi olumsuz yönde etkileyip mortalite/morbiditeyi artıran bir psikiyatrik hastalıktır (Kaur ve ark., 2015; Trevino ve ark., 2020). İlgi kaybı, huzursuz uykular, üzüntü, düşük ruh hali ve hatta intihar düşünceleri ile karakterize, her yaşta insanı etkileyen yaygın bir ruhsal bozukluktur (Sharma ve Dang, 2020; Vitorino ve ark., 2019). DSÖ'nün raporuna göre 2019'da dünyadaki ergenlerin %14'ü de dahil olmak üzere yaklaşık 1 milyar insan ruhsal bozukluk yaşamaktadır. Sadece pandeminin ilk yılında depresyon ve anksiyetenin %25'ten fazla arttığını da göz önünde bulundurduğumuzda depresyonun sağlık hizmetleri üzerindeki yükünün ne kadar büyük olduğunu görmekteyiz (DSÖ, 2022; Trevino ve ark., 2020). DSÖ sekizinci Genel Direktörü Dr. T. Adhanom Ghebreyesus'un da ifade ettiği üzere; "Akıl sağlığına yapılan yatırım herkes için daha iyi bir yaşam ve geleceğe yapılan bir yatırımdır".

Depresyon; dünyada en çok yeti kaybına neden olan hastalıklar arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Aynı zamanda depresyon iyi tedavi edilmezse başka ruhsal hastalıklara, alkol ve madde kullanım sorunlarına da zemin hazırlamaktadır. En kötü tablo ise, intihara neden olabilmesidir. Her sene yaklaşık 800.000 insan

intihar sebebiyle ölmektedir. 15-29 yaş grubunun önde gelen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, iyi tedavi edilmemiş ve uzamış depresyon kalp hastalıkları ve diyabet gibi bazı bedensel hastalıklara da zemin hazırlamakta ve hastalıkların seyrini kötüleştirip ölüm riskini bile arttırmaktadır (DSÖ, 2017). Multipl Skleroz, epilepsi, Parkinson, Alzheimer gibi nörolojik bozuklukların büyük bölümünde ruhsal durumdaki değişiklikler hastalığın klinik tablosunun bir parçasıdır. Depresyon, nörolojik hastalıklardan önce, hastalık ile birlikte ya da nörolojik hastalığın ardından olmak üzere üç farklı şekilde ortaya çıkarak hastalığın seyrini değiştirmektedir.

Hastalık ile ilgili araştırmalar 20. yy'nin ikinci bölümünde ileri derecede artmıştır. Bugün depresyonun etiyolojisi henüz bütünüyle ortaya çıkarılamamış olsa da meydana gelme sebepleri genetik, çevresel, psikolojik, yaşamsal olaylar, tıbbi durumlar (kanser, kronik kalp hastalıkları v.b) ve biyolojik faktörlere bağlanmaktadır. Depresyonun meydana gelme nedenleri genetik görüşler ve biyolojik görüşler olarak temelde iki başlık altında toplanabilmektedir (Balcıoğlu, 1999; Yemez ve Alptekin, 1998).

Depresyonun biyolojik etiyolojisi ile ilgili ilk teori 1970'lerde geliştirilen monoamin hipotezidir. Bu hipotez depresyonun üç monoamin nörotransmitterinin (noradrenalin, dopamin ve serotonin) yetersizliğinden kaynaklandığını göstermektedir. Monoamin hipotezi, bu üç biyogenik aminin bir veya daha fazlasındaki eksikliğin ve dolayısıyla bunların işlevlerinin azaltılması veya bu resöptörlerin sayısındaki ve duyarlılığındaki artışın depresyonunun etyopatogenezini oluşturduğu fikrini savunmaktadır. Hipotez sırasında depresyonun tedavisinde kullanılan antidepresanlar bu nörotransmitterleri güçlendiren farmakolojik etkilere sahiptir (Belmaker ve Agam, 2008; Kaur ve ark., 2015; Kessler ve ark., 2005; Sharma ve Dang, 2020). Gama-aminobütirik asit ve glutamat sistemleri gibi bazı nörotransmitter sistemlerdeki değişiklikler de depresyonu olan bireylerde raporlanan faktörler arasındadır (Sharma ve Dang, 2020). İkinci hipotez; ise beyinde duygudurum ile ilgili yapılardaki fonksiyonel ve yapısal değişiklikler ile ilgilidir. Depresyonlu bireylerde hipokamsal hacim azalması, hipotalamik-hipofiz adrenal

ekseninin (HPA) bozulması gibi faktörler rol oynamaktadır (Rothschild, 1993). Üçüncü hipotez; ise nörotrofin hipotezidir. Hipokampus ve prefrontal korteks gibi yapılarda beyin kökenli nörotrofik faktörün (BDNF) azalması ve glutamat miktarının artması sırasıyla nöroenezin azalmasına ve eksitotoksitenin artmasına yol açarak depresyona sebep olmaktadır. En son ileri sürülen hipotezlerden biri de inflamatuvar ve oksidatif stres hipotezidir. Bu hipoteze göre depresyonlu hastalarda periferik kanda ve MSS’de artmış olan sitokinlerin, duygu durum ile ilgili yapılardan nöroendokrin fonksiyonları ve nöroplastitiyi etkileyerek depresyona yol açtığı ileri sürülmektedir (Tadayonnejad ve Ajilore, 2014). Aşırı glutamat uyarımına maruz kalan iyonotropik NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörlerinin hücre ölümüne neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu durum sadece depresyon değil diğer pek çok nörodejeneratif rahatsızlığın da patogeneğinde yatmaktadır (Yüksel, 2007).

Antidepresan moleküllerin genel çalışma prensibi sinapslarda nörotransmitter maddelerin aksonlar tarafından geri emilimini engellemektir. Geri emilimi önlenen nörotransmitterler hücre dışında kalmaya devam etmektedir. Üretimin az olduğu süre boyunca sinapslarda geri emilimin durdurulması kişinin kendini iyi hissetmesini sağlamaktadır.

Tedavinin temellerini, sinapslardaki monoaminlerin konsantrasyonlarını arttırmak oluşturmaktadır. Antidepresan tedavilerinin çoğu “norepinefrin”, “serotonin” ve “dopamin”in sinapslarda bulunan miktarının ayarlanmasını amaçlamaktadır. Günümüzde tedavide kullanılan ilaçların büyük bir kısmı bu nörotransmitterlerin miktarlarının ayarlanması baz alınarak oluşturulmuştur. Ancak tedavilerin monoamin hipotezine dayanılarak gerçekleştirilmesi depresyon belirtilerinin tamamını sağaltmaya yetmediğinden, yeni alternatif sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu görülmüştür.

Antidepresan ilaçları aşağıda gösterildiği gibi sınıflandırabiliriz:

1. Dopamin ve norepinefrin geri alım inhibitörleri (NDRI)

2. Lityum
3. Siklik veya Trisiklik antidepresanlar (TCA)
4. Selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI)
5. Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI)
6. Selektif norepinefrin ve serotonin geri alım inhibitörleri (SNRI)
7. Melatonin agonistleri olarak sınıflandırılabilir.

Yukarıda belirtilen antidepresan sınıflarından, SSRI'lar, diğerlerine göre tolere edilebilirlikleri nedeniyle en çok tercih edilenlerdir. Dahası, kontrollü SSRI çalışmaları, hastaların intihar eğilimini şiddetlendirmedeğini göstermiştir (Hasçiçek ve ark., 2014; Şengel-Türk ve ark., 2017).

Antidepresan ilaçlarla etkin bir tedavi sağlama, etki bölgesi olan beyinde uzun bir süre boyunca yeterli konsatrasyonda bulunmalarına bağlıdır. KBB'nin varlığı oral ve IV uygulamalarla antidepresanların beyne ulaşmasını önemli ölçüde kısıtlamakta ve tedavinin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. İntranazal ilaç uygulaması ile burundan beyne doğrudan hedefleme yapılarak hem gerekli doz miktarı ve dolayısıyla yan etkiler azaltılmakta hem de hedef bölgedeki ilaç konsantrasyonu artırılmaktadır (Alam ve ark., 2014; Kaur ve ark., 2015; Vitorino ve ark., 2019). Partikül boyutu 10-300 nm aralığında olan çeşitli nanotaşıyıcılar burundan beyne antidepresan ilaçların verilmesi amacıyla tasarlanmış ve çok sayıda hayvan çalışmalarıyla intranazal olarak verilen nanosistemlerin konvansiyonel sistemlerle karşılaştırıldığında beyne geçiş miktarının ve terapötik etkinliğinin arttığı, sistemik yan etkilerin azaldığı gösterilmiştir (Vitorino ve ark., 2019).

Yakın zamanda bu alanda yapılan bir çalışma sonuç vermiş ve Spravato® isimli ilaç FDA tarafından onaylanarak depresyon tedavisine intranazal olarak kontrollü bir şekilde kullanıma sunulmuştur.

Spravato[®], S-ketamin içermektedir ve depresyonda kullanılan FDA onaylı ilk İN farmasötik ürün olarak karşımıza çıkmaktadır (Mart 2019). Oral yolla alınan bir antidepresanla birlikte, tedaviye dirençli depresyonu olan yetişkinlerde ve intihar düşünceleri veya eylemleri olan majör depresif bozukluğu olan yetişkinlerdeki depresif belirtilerde kullanılmaktadır. Bu ilaç yan etkileri ve suistimal edilebilme problemleri nedeniyle yalnızca SPRAVATO[®] REMS Programı'nda onaylanan sağlık kuruluşlarında uygulanabilmektedir. Sağlık uzmanı tarafından ne zaman, hangi dozda alınacağı ve cihazın kullanım şekli tarif edilmektedir. İlaç kullanıldıktan sonra hastanın sağlık kuruluşundan ne zaman ayrılacağına bir sağlık uzmanı karar vermektedir. Bulantı ve kusmaya neden olabileceği için en az 2 saat öncesinde yeme, en az 30 dakika öncesinde de içme kesilmelidir. Nazal dekonjestan veya kortikosteroid kullanılıyorsa, bu ilaçlar Spravato[®] alınmadan en az 1 saat önce kullanılmalıdır (Gıda ve İlaç İdaresi, 2022; Spravato, 2022).

1.5. Etkin Madde Hakkında Bilgiler

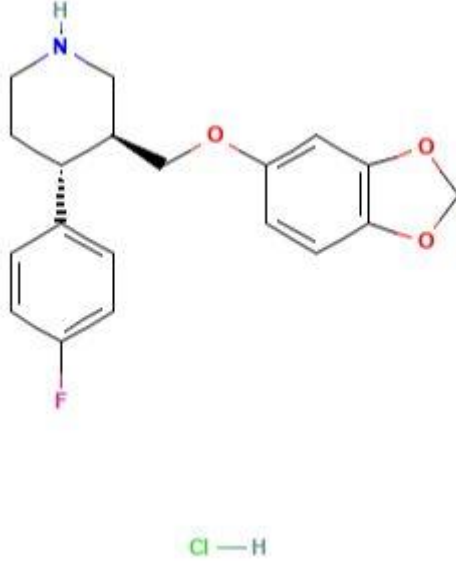
Tez çalışmamızda model bir etkin madde olarak paroksetin hidroklorür seçilmiştir. FDA tarafından yetişkinlerde majör depresyon, sosyal anksiyete, panik atak, obsesif-kompulsif bozukluk ve jeneralize anksiyete bozukluğu tedavisinde endike olarak onaylanmış bir etkin maddedir (RxMediaPharma, 2022). Paroksetin, fenilpiperidin yapısında olan seçici bir 5-hidroksitriptamin serotonin (5-HT) geri alım inhibitörü grubundan bir antidepresan moleküldür. Son derece seçici ve güçlü bir nöronal serotonin geri alım inhibitörüdür. Serotonin geri alım potensi; venlafaksinden 190, fluoksetinden 23, klomipraminden 6,7, sertralinden 6,6, fluvoksaminden 5,6, sitalopramdan 2,3 kat daha güçlü olan paroksetin antidepresanlar içinde serotonin geri alım potensi açısından en güçlü etkin maddedir. Ayrıca muskarinik α_1 , α_2 , β -adrenerjik, 5-HT₁, 5-HT₂, dopamin (D₂) ve histamin (H₁) reseptörlerine düşük afiniteye sahiptir. Paroksetin, görünüşte bir nöronal membranda bir serotoninin geri alımını engeller ve bir nörotransmitter üretimini azaltarak serotonerjik nöro-iletimi artırır. Sinaptik reseptör üzerindeki etkinliğini bu şekilde artırır ve merkezi sinir sisteminde, 5-HT'yi yükseltir. Norepinefrin

üzerindeki etkisi düşük olmakla beraber doz arttıkça etkisi de artmaktadır. Serotonin geri alımı üzerindeki etkisi doza bağımlıdır. SSRI'lerin uzun süreli kullanımı serotonerjik nöronlarda zamanla terminal 1B/1D ve somatodendritik 1A reseptörlerinde aşağı regüle edilmeye ve dolayısıyla duyarsızlaşmaya neden olmaktadır (RxMediaPharma, 2022; Thakkar ve ark., 2021; Yüksel, 2007). Paroksetinde de bu inhibisyonlar gözlenirken; çoğu antidepresanın aksine uzun süreli kullanımlarda paroksetin β reseptörlerde sayı azalmasına ve duyarsızlığa neden olmaz. Psikoz, panik atak, obsesyon, varsanı ile 5-HT₂ reseptörleri arasında bağlantı vardır. Depresyonu olan vakalarda sabahları verilen paroksetinin yavaş dalga uykusunu artırabildiği görülmüştür. Uykuya dalma süresini de kısaltmaktadır. Kardiyovasküler etkileri klinik kullanım dozlarında trisiklik antidepresanlardan belirgin olarak az olmakla birlikte kinidin benzeri etki göstermektedir. Depresyonu olan hastalarda yüksek miktarda bulunan P maddesi düzeyini de azaltmaktadır (Yüksel, 2007). Diğer tüm SSRI'ler gibi paroksetin de TCA'lardan daha az kardiyovasküler, antikolinerjik ve sedatif etki göstermektedir (RxMediaPharma, 2022).

Monoamin oksidaz inhibitörleri ve lityumla kombinasyonu sonucunda serotonin sendromu gelişebilir. Bu nedenle kombinasyon halinde kullanılmamalıdır. Bir antidepresan ilaç sınıfından diğerine geçileceği zaman arada en az iki hafta ara verilmelidir (Yüksel, 2007).

Paroksetin hidroklorür içeren ülkemizde bulunan ticari preparatlar; Paxera film tablet 10-20-30-40 mg, Paxil film tablet 20 mg, Xetanor film tablet 20-30 mg'dır.

1.5.1. Fizikokimyasal Özellikler



Şekil 1.7. Paroksetin hidroklorürün yapısal formülü (PubChem, 2022).

Adı: Paroksetin hidroklorür

IUPAC Adı: (3S,4R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yloxymethyl)-4-(4-fluorophenyl)piperidine;hydrochloride

Molekül Formülü: C₁₉H₂₁ClFNO₃

Molekül Ağırlığı: 365,8 g/mol

Şekil 1.7’de yapısal formülü verilen paroksetin hidroklorür kokusuz, beyaz veya neredeyse beyaz, kristal bir tozdur. Susuz formu higroskopiktir. Suda çok az, metilen klorür ve etanolde (%96) eser miktarda, metanolde kolayca çözünür. Farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri Çizelge 1.3’te verilmiştir. Partisyon katsayısı (logP) 3,95. Polimorfizm ve psödopolimorfizm nedeniyle farklı erime dereceleri raporlanmıştır. Paroksetin hidroklorür için erime derecesi The Merck Index’te 129-131°C, Remington’da ise 120-134°C olarak verilmektedir. 235-295 nm arasında $\lambda_{\max}$ vermektedir (Germann ve ark., 2013; RxMediaPharma, 2022). Lipofilik amin yapıda bir moleküldür (Germann ve ark., 2013; Yüksel, 2007). Yüksek nem (14 gün boyunca 40°C/%75 bağıl nem), termal stres (14 gün boyunca 40, 50, 60, 70 ve 80°C)

ve ışığa maruziyet (16 saat boyunca 750 W/m² yoğunlukla 310-800 nm, yaklaşık 2,4 milyon lüks saat) gibi stres koşulları altında herhangi bir bozunma ürünü üretmemektedir (Germann ve ark., 2013). Formal yükü sıfırdır (PubChem, 2022).

Çizelge 1.3. Paroksetin hidroklorürün farklı ortamlardaki çözünürlüğüne ait bilgiler (Germann ve ark., 2013).

Ortam*	İlk pH	Son pH	Çözünürlük (mg/mL)
Su	-	7.1	7.11
0.1 N HCl	1.2	7.2	1.35
0.01 N HCl	2.1	1.7	5.11
SGF	1.2	1.3	1.31
pH 2.5 tampon	2.5	2.1	7.52
pH 3.5 tampon	3.5	3.1	7.87
pH 4.5 tampon	4.5	4.0	7.88
pH 5.5 tampon	5.5	4.4	6.72
pH 6.0 tampon	6.0	4.8	5.79
pH 6.8 tampon	6.8	6.3	2.17
pH 7.2 tampon	7.2	6.9	1.71
pH 7.5 tampon	7.5	7.2	1.47

*Tamponlu çözeltilerin pH'sı, belirtilen pH okumasını elde etmek için fosforik asit veya potasyum hidroksit çözeltisi ile ayarlandı. SGF: temsili mide sıvısı

1.5.2. Farmakokinetik Özellikler

Paroksetin saf enantiyomer olduğu için farmakokinetiği diğer bazı antidepresanlara göre daha tekdüzedir. Karaciğerde yüksek oranda ilk geçiş eliminasyonuna uğramaktadır. Vücut yineleyen uygulamalar ile daha fazla yüke maruz kaldıkça ilk geçiş metabolizması etkisi doyumluğa ulaşmaktadır. Yarılanma ömrü 9-30 saat arasında değişmekle birlikte yaklaşık 24 saattir. Bireysel faktörler etkisiyle yarılanma ömrü 7-65 saat aralığında değişmektedir. Plazmada kararlı durum konsantrasyonuna konvansiyonel ve enterik kaplı formülasyonlarıyla tedavi başlangıcından itibaren 7.-14. günde ulaşılmaktadır. Ancak etkinin başlaması 1-4 haftalık tedavi ile mümkün olmaktadır. Bireyler arasında oldukça değişkenlik göstererek 3,1-28,0 L/kg arasında geniş bir dağılım hacmine sahiptir. Vücuttaki paroksetinin yalnızca %1'i sistemik dolaşımda bulunur. Plazmada terapötik konsantrasyonlarda bulunan paroksetinin %93-95'i plazma proteinlerine bağlı haldedir. Plazma konsantrasyonuyla, terapötik etki arasında bir bağ bulunmamıştır.

Metabolitlerinin kayda değer bir farmakolojik aktivitesi yoktur. Dozun yaklaşık %62'si böbreklerden çoğunlukla da metabolitleri olarak vücuttan atılmaktadır. İdrarla değişmemiş halde atılan paroksetin oranı yaklaşık olarak %2'dir. Dozun %36'sı ise feçesle atılmaktadır ve bunun neredeyse tamamını safradan gelen metabolitler oluşturmaktadır. Yani eliminasyonun neredeyse tamamı metabolizma ile olur. Metabolitlerin eliminasyonu bifaziktir. Farmakokinetik parametreleri sabit değildir ve nonlinear kinetik gösterir. Tek dozda %50'nin altında biyoyararlanım gözlenmektedir. Tekrarlanan uygulamalarda bu oranda artış gözlenmektedir (Germann ve ark., 2013; RxMediaPharma, 2022; Yüksel, 2007). Plazma yarı ömrü yaklaşık 21 saattir, ancak CYP2D6 yoluyla majör hepatik metabolizması nedeniyle düşük oral biyoyararlanıma (% 50 veya daha az) sahiptir. Paroksetinin oral dozu günde bir kez 10-60 mg'dır (Thakkar ve ark., 2021). 20 ve 40 mg/gün konsantrasyonları karşılaştırıldığında 20 mg/gün optimal olarak değerlendirilmiştir (Yüksel, 2007). Paroksetinin maksimum dozu ise; yetişkinlerde hemen salımlı formülasyonlarda 60 mg/gün, kontrollü salım formülasyonlarda 75 mg/gün olarak belirlenmiştir (RxMediaPharma, 2022).

İlacın hepatik metabolizmasını baypas etmek ve biyoyararlanımı artırmak için alternatif bir ilaç verme sistemine ihtiyaç duyulmaktadır. Merkezi olarak etki eden ilaçlar için, ağızdan biyoyararlanımdaki salt artış yeterli değildir. İlaç kan beyin bariyerini geçemediği için merkezi sinir sistemine ulaşamazsa farmakolojik etki elde edilemez. Karaciğerden ilk geçiş etkisi paranteral, transdermal ve nazal yol gibi alternatif bir yolla uygulanması ile aşılabılır. Merkezi etkili bir ilaç olan paroksetin, intranazal yolla verilmeye uygun ajanlar arasında sınıflandırılmaktadır (Pandey ve ark., 2015; Sharma ve Dang, 2020; Yüksel, 2007).

Tez çalışmamızda dünya genelinde engelliliğin önde gelen nedenlerinden biri olan depresyon tedavisinde kullanılmak üzere burundan beyne ulaştırmak için paroksetin hidroklorür yüklü nanopartiküler formülasyonların tasarlanması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalkalayıcı inkübatör	Jeio Tech SI-300
Çoklu manyetik karıştırıcı	Daihan Scientific MS-MP8
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC 60
Dikey akımlı hava kabini	Thermo-Electron
Diyaliz membran (12000-14000 Da)	Sigma-Aldrich
Etüv	Heraeus
Filtre kağıdı (Whatman 42)	Whatman
Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	FEI Tecnai, G ² Spirit Biotwin
Hassas terazi	Mettler Toledo
Hücre kültürü plakları (altı kuyulu)	Costar [®] , Corning
Liyofilizatör	Zirbus, VaCo 5
Mikropipet	Boeco, Eppendorf
Mikroplaka okuyucu	Biotek
Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer Nano-ZS
pH - metre	Mettler Toledo
Rotaevaporatör	Büchi R II
Santrifüj	IEC Centra
Soğutmalı santrifüj cihazı	Sigma Laboratory Centrifuge 3-30KS
Tekstür Analiz cihazı	Stable Micro Systems TA.XT.plus Texture Analyser
Transwell insert	Corning
Ultrasonik su banyosu	Jeio Tech SI-300
Ultrasonik prob	Bandelin Sonopuls HD 2070

UV-Görünür Spektrofotometre

ThermoFisher Scientific Evolution
201

Vorteks

IKA® VORTEX 4 digital

Cam malzemeler (en alta yaz)

Hazer, Isolab

2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik asit	Sigma-Aldrich
Diklorometan	Sigma-Aldrich
Disodyum hidrojen fosfat	Merck
Düşük molekül ağırlıklı (DMA) kitosan	Sigma-Aldrich
Etanol %96	J.T.Baker
Fosfat salin tamponu (PBS)	Sigma-Aldrich
Fötal Sığır Serum (FBS)	Lonza
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich
L-glutamin	Biochrom
Lesitin	Sigma-Aldrich
Müsin	Sigma-Aldrich
Paroksetin hidroklorür	Ali Raif İlaç
Penisilin/Streptomisin	Biochrom
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (M.A.:40000-75000 Da, 50:50)	Sigma-Aldrich
Polivinil alkol	Sigma-Aldrich
Rodamin B	Sigma
RPMI 1640 hücre kültürü büyüme ortamı	Biological Industries
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	Molchem
Tween 80	Sigma-Aldrich
Yüksek molekül ağırlıklı (YMA) kitosan	Fluka

2.2. Yöntem

2.2.1. Nanopartiküllerin Üretimi ve Analizlerde Kullanılacak Tampon Çözeltinin Hazırlanışı

Fosfat Tamponu pH 6,4 (Phosphate Buffer Solution, PBS 6,4, EP 6.0)

Disodyum hidrojen fosfat R.....2,5 g

Sodyum dihidrojen fosfat R.....2,5 g

Sodyum klorür R.....8,2 g

Arıtılmış su.....y.m.....1000 mL

Yukarıda verilen formülasyonda yer alan maddeler belirtilen miktarlarda tartılıp bir balon içerisinde yaklaşık 950 mL arıtılmış suda çözülüp ardından arıtılmış su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin pH'sı ölçülüp pH 6,4'ten farklı bulunursa 1M sodyum hidroksit ya da 1M hidroklorik asit ile pH 6,4'e ayarlanmıştır.

2.2.2. Paroksetin Hidroklorürün Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması

Etkin maddemiz olan paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu içerisinde bilinen konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin 200 - 400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumları alınarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) değeri saptanmıştır. Ölçüm 3 kez tekrar edilmiştir.

2.2.3. Paroksetin Hidroklorür Kalibrasyon Denkleminin Belirlenmesi

Paroksetin hidroklorürün kalibrasyon doğru ve denklemlerinin belirlenebilmesi amacıyla, ilk olarak saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu içerisinde 20 mg/ 200 mL

konsantrasyonda (100 µg/mL) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Ardından stok çözeltiler üzerinde planlanan seyreltmeler yapılarak 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µg/mL konsantrasyonlarda bir seri çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan bu çözeltilerin absorbensları Bölüm 2.2.2.'de tayin edilen $\lambda_{\max}$ değerinde okunarak kaydedilmiştir. Her konsantrasyon için ölçümler 3 kez tekrarlanarak ortalaması alınmıştır. Belirlenen tüm konsantrasyonlar ve onların her birine karşılık gelen absorbens değerleri grafiğe geçirilmiştir. Kalibrasyon doğru denklemleri en küçük kareler yöntemi ile belirlenmiş ve çalışmaların devamında bu denklemler kullanılmıştır.

2.2.4. Paroksetin Hidroklorür için Analitik Validasyon Çalışmaları

Analitik yöntem validasyonu, bir analitik yöntemin tasarlanan uygulama amacı doğrultusunda uygunluğunu, tekrarlanabilirliğini ve güvenilirliğini doğrulamak amacıyla yapılmaktadır. Tez çalışmamızda kullandığımız etkin maddenin hem hazırlanan çeşitli formülasyonların içindeki hem de yürütülen *in vitro* çözünme hızı deneylerinde çözünme ortamında bulunan miktarının belirlenmesi için seçilen analiz yönteminin validasyonu ICH Q2(R1) (2005) kılavuzundaki aşağıda yer alan parametreler doğrultusunda yapılmıştır.

- Doğrusallık ve aralığı
- Doğruluk ve geri elde
- Kesinlik
- Seçicilik (Özgünlük)
- Teşhis ve tayin sınırları

2.2.4.1. Doğrusallık ve Aralığı

Analitik bir prosedürün doğrusallığı, belirli bir aralık içerisinde, analizi yapılacak bir numunedeki analitin konsantrasyonu (miktarı) ile elde edilen test sonuçları arasında doğru orantı olmasıdır (ICH Q2(R1)).

Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu içerisinde ayrı ayrı 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 µg/mL olacak şekilde 9' ar farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanıp ölçümler yapılmıştır. Konsantrasyona karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir.

2.2.4.2. Doğruluk ve Geri Elde

Analitik bir prosedürün doğruluğu, seçilen prosedür ile o prosedürden elde edilen verilerin gerçek/teorik verilere yakınlığıdır. Yüzde geri elde değerleri ile ifade edilmektedir. En az üçer kez, üç farklı konsantrasyonda numuneler hazırlanarak bunların % geri elde (% GE) değerlerinin ortalaması alınır. Doğruluk, bu ortalamaların bağıl standart sapma (BSS), % bağıl standart sapma (% BSS) ve standart sapma (SS) değerleri ile ifade edilir (ICH Q2(R1)).

Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu içerisinde 10, 50 ve 90 µg/mL konsantrasyonlarda 3 farklı çözeltilisi hazırlanıp UV spektrofotometrede 6'şar defa okunmuştur. Okunan değerlerin kalibrasyon denklemlerinde yerine konulmasıyla % geri elde verileri bulunmuştur. Ortalama, % geri elde, bağıl standart sapma, % bağıl standart sapma ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

2.2.4.3. Kesinlik

Analitik bir prosedürün kesinliği, belirlenen koşullar altında aynı homojen stoktan alınan çoklu örneklerin ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığıyla ilgilidir. Kesinlik; ara kesinlik, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile değerlendirilir. Kesinlik genellikle bir dizi ölçümün varyansı, standart sapma ve varyasyon katsayısı olarak ifade edilir (ICH Q2(R1)).

2.2.4.3.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik; kısa bir zaman aralığında, aynı kişi tarafından, aynı koşullar altında yapılan ölçümlerin kesinliğini ifade etmektedir (ICH Q2(R1)).

Paroksetin hidroklorürün 10, 50 ve 90 µg/mL olarak seçilen 3 farklı konsantrasyonu kullanılarak ölçümler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalama, bağıl standart sapma, % bağıl standart sapma ve standart sapma değerleri bulunmuştur.

2.2.4.3.2. Ara Kesinlik

Ara kesinlik; değişik günler, değişik insanlar ve değişik ekipman gibi laboratuvar içi varyasyonların incelenmesini ifade etmektedir (ICH Q2(R1)).

3 farklı günde 10, 50 ve 90 µg/mL konsantrasyonlarda ölçümler yapılarak absorbans değerlerinin karşılık geldiği konsantrasyonlar hesaplanmış ve ortalama, bağıl standart sapma, % bağıl standart sapma ve standart sapma verileri bulunmuştur.

2.2.4.3.3. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik, çalışmaların yürütüldüğü laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade etmektedir (işbirliğiyle yapılan çalışmalar, çoğunlukla metodolojinin standardize edilmesi için uygulanmaktadır) (ICH Q2(R1)).

2.2.4.4. Seçicilik (Özgünlük)

Seçicilik, analizi yapılacak maddenin matris, safsızlıklar ve çalışmada kullanılan diğer maddelerden ayırt edilebilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. (ICH Q2(R1)) Kullanılan etkin madde pikinin diğer maddelerin pikleri ile etkileşip etkileşmediği kontrol edilmiştir.

2.2.4.5. Teşhis ve Tayin Sınırları

Teşhis sınırı (Limit of Detection, LOD), bir numune içerisinde etkin maddenin teşhis edilebilen fakat kantitatif olarak kesin bir değer ile belirlenmeye gerek duyulmayan en düşük miktarıdır. Tayin sınırı (Limit of Quantification, LOQ) ise, bir numunedeki etkin maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile nicel olarak tayin edilebilen en düşük miktarıdır. Aşağıda verilen eşitlikler ile hesaplanmaktadır.

$$LOD = 3.3 \times (\sigma / S)$$

$$LOQ = 10 \times (\sigma / S)$$

σ : Regresyon doğrusunun y eksenini kestiği noktanın standart sapması

S : Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu içerisinde 9 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve 3 paralel şeklinde analiz edilerek

kalibrasyon denklemleri bulunmuştur. Bu kalibrasyon denklemlerinden yukarıda verilen eşitlikler yardımıyla LOD ve LOQ miktarları hesaplanmıştır.

2.2.5. Paroksetin Hidroklorürün Diferansiyel Taramalı Kalorimetre ile Analizi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) yöntemi, maddelerin molekül yapısının, termodinamik özelliklerinin ve stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Paroksetin hidroklorürün termal davranışının belirlenmesi amacıyla DSC analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz için standart alüminyum örnek kaplarına hassas terazi ile tam tartım yapılarak numune hazırlanmış ve 5-300 °C arasında 10 °C/dakika sıcaklık artışı ile termal analiz gerçekleştirilmiştir.

2.2.6. Formülasyonların Hazırlanması

Bu proje kapsamında; model etkin madde olarak seçilen selektif serotonin gerilim inhibitörü olan paroksetin hidroklorürü burundan direkt beyne ulaştırmak, hem de hedef bölgeye ulaşana kadar etkin maddeyi korumak, partiküler sistemin nazal mukozada kalış süresini uzatmak ve mukozadan geçişini artırmayı hedefleyen nanopartiküler sistemlerin tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla paroksetin hidroklorür yüklü lipit-kitosan bazlı ve PLGA bazlı (PLGA, lipit kaplı PLGA ve kitosan ile lipit kaplı PLGA) nanopartikül formülasyonları geliştirilmiştir.

2.2.6.1. Kitosan Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması

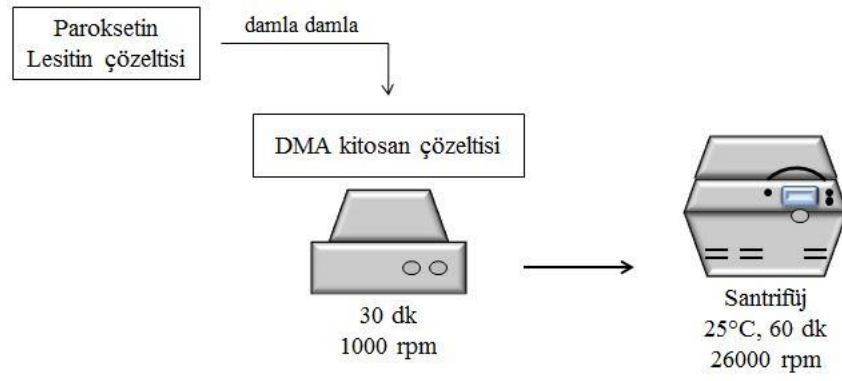
Çalışmamızda, lipit-kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlarının üretiminde literatürlerde belirtilen iyonik jelleşme yöntemi kullanılmıştır (Sonvico ve ark., 2006). Lipit bazlı nanopartiküler sistemler biyolojik bariyerler boyunca gelişmiş geçirgenlik sağlaması gibi üstünlükleri nedeniyle tercih edilmiştir (Saini ve ark., 2021). Üretim sırasında nanopartiküller biyoyumlu, mukoadhezif, biyoaktif ve non-

toksik olması sebebiyle sıkça tercih edilen doğal bir polimer olan kitosan kullanılmıştır.

Son yıllarda, pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü lesitin (fosfolipitler) arasındaki elektrostatik etkileşimler yoluyla elde edilen lesitin bazlı kitosan nanopartiküller, hidrofilik ve hidrofobik moleküller için başarılı ilaç taşıyıcı sistemler olarak tanımlandığı için lipid bazlı nanopartiküller hazırlanmıştır (Valencia ve ark., 2021b).

Çalışmamızda, 25 mg lesitin tartılıp 1 mL %96 etanolde çözülmüştür (25 mg/mL) (manyetik karıştırıcı üzerinde). 500 mg düşük molekül ağırlıklı (DMA) kitosan tartılıp 100 mL %1 asetik asit içerisinde bir gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak çözülmüştür (5 mg/mL). Ertesi sabah kullanıma hazır hale getirmek için süzölmüştür. Hazırlanan 5 mg/mL derişimindeki DMA kitosan çözeltisinden 0,25 mL alınarak saf su ile 11,5 mL'ye tamamlanmıştır. Belirli miktarda tartılan paroksetin hidroklorür ilk olarak DMA kitosan çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırma işlemi devam ederken paroksetin hidroklorür içeren DMA kitosan çözeltisi üzerine insülin enjektörü yardımıyla lesitin çözeltisi damla damla ilave edilir ve ağzı parafilmle kapatılarak 1000 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. Ardından nanopartikül dispersiyonu 25°C, 26000 rpm'de 60 dk santrifüjlenerek nanopartiküllerin çökmesi sağlanmıştır. Elde edilen nanopartiküller süpernatandan ayrılmış ve saf su içinde disperse edilmiştir. Aynı işlem bir kez de paroksetin hidroklorür, DMA kitosan çözeltisi yerine, lesitin çözeltisinde çözümlenerek gerçekleştirilmiştir. Böylece hangi yöntemin daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Paroksetin yüklü kitosan-lesitin nanopartiküllerin üretim şeması Şekil 2.1'de ve üretim görüntüleri Şekil 2.2'de verilmiştir.

Üretim parametrelerinin hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisini incelemek amacıyla etkin madde miktarı, lesitin:kitosan (L:K) oranı, DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen çözelti bileşimi ve pH değeri değiştirilmiştir. Üretilen formülasyonlara ait bilgiler aşağıdaki Çizelge 2.1. – Çizelge 2.4'te sunulmuştur.



Şekil 2.1. Paroksetin yüklü kitosan-lesitin nanopartiküllerin üretim şeması.



Şekil 2.2. Paroksetin yüklü kitosan-lesitin nanopartiküllerin üretimi.

Çizelge 2.1. Farklı miktarda paroksetin hidroklorür (PRX) ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları.

Kod	PRX miktarı (mg)	L:K oranı	pH	DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen ortam
F1	5,0	20:1	3,82	Saf su
F2	5,0	20:1	3,82	Saf su
F3	2,0	20:1	3,82	Saf su
F8	1,0	20:1	3,82	Saf su

Çizelge 2.2. Farklı L:K oranı ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları.

Kod	PRX miktarı (mg)	L:K oranı	pH	DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen ortam
F3	2,0	20:1	3,82	Saf su
F4	2,0	40:1	3,82	Saf su
F5	2,0	10:1	3,82	Saf su
F12	2,0	5:1	3,82	Saf su

Çizelge 2.3. Farklı DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen ortam ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları.

Kod	PRX miktarı (mg)	L:K oranı	pH	DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen ortam
F6	2,0	20:1	6,37	pH 6,4 PBS
F7	2,0	20:1	6,34	Saf su

Çizelge 2.4. Farklı pH’da hazırlanan nanopartikül formülasyonları.

Kod	PRX miktarı (mg)	L:K oranı	pH	DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen ortam
F9	1,0	20:1	6,42	pH 6,4 PBS
F10	1,0	20:1	7,49	pH 6,4 PBS
F11	1,0	20:1	5,42	pH 6,4 PBS

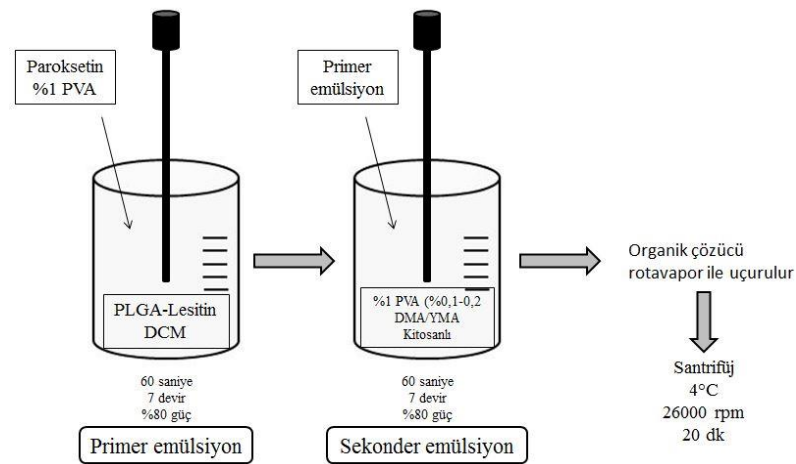
2.2.6.2. PLGA Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması

Çalışmamızda kitosan-lipit bazlı nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda paroksetin hidroklorür için hedeflenen düzeyde enkapsülasyon etkinliğine ulaşılamamış ve ayrıca üretimde tekrarlanabilirlik sağlanamamıştır. Çalışmamızın ikinci aşamasında biyoparçalanabilen özellikteki sentetik bir polimer olan, FDA tarafından onaylı, nontoksik, biyolojik olarak geçimli PLGA’nın laktik:glisolik oranı 50:50 olan formu (Molekül ağırlığı: 30-60 kDa) ile çalışılmıştır. PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlarını üretmek amacıyla çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. S/Y/S tipi emülsiyon oluşturularak nanopartiküller elde edilmiştir. Stabilizan olarak polivinil alkol (PVA) seçilmiştir.

90 mg PLGA, 3 mL diklorometanda çözündürülerek yağ fazı, 1 mg paroksetin hidroklorürün (Paroksetin HCl) 300 µl %1 PVA (a/h) içerisinde çözünmesi sağlanarak iç su fazı hazırlanmıştır. Yağ fazı, buz banyosunda ultrasonik prob yardımıyla 1 dk boyunca 80 W enerji ile sonike edilerek primer emülsiyon oluşturulmuştur. Oluşan primer emülsiyon, 10 mL %1 PVA (a/h) çözeltisinden oluşan dış su fazında buz banyosunda ultrasonik prob yardımıyla 1 dk boyunca 80 W enerji ile sonike edilerek sekonder emülsiyon oluşturulmuştur. Diklorometan, rotavapor yardımıyla uçurulduktan sonra elde edilen nanopartikül dispersiyonu 4°C’de 26000 rpm’de 20 dk boyunca satrifüjlenmiş ve ultrasaf su ile yıkanarak saflaştırılmıştır. Sonrasında ultrasaf su içinde disperse edilerek 1 gece boyunca -20 °C’de dondurulmuş olan nanopartiküller liyofilizasyon ile kurutulmuştur.

Lesitin kaplı PLGA hibrit nanopartikül formülasyonları da aynı yöntem kullanılarak üretilmiştir. Üretim aşamasında lesitin, yağ fazında PLGA polimeri ile birlikte çözülmüştür.

Kitosan kaplı lesitin-PLGA hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında da aynı yöntem kullanılmıştır. Üretim aşamasında düşük (DMA) ya da yüksek (YMA) molekül ağırlıklı kitosan kullanılmış ve dış su fazına belirlenen oranlarda eklenerek çözünmesi sağlanmıştır (Pandit ve ark., 2021). Şekil 2.3’te üretim şematize edilmiştir. Şekil 2.4’te sekonder emülsiyon oluşumu sunulmuştur.



Şekil 2.3. Paroksetin yüklü PLGA nanopartiküllerin üretim şeması.



Şekil 2.4. Ultrasonik prob ile PLGA nanopartikül üretimi.

Tez çalışmasında, PLGA polimeri ile birlikte lesitin ilavesi, sekonder emülsiyonda kullanılan dış su fazı pH'sının değiştirilmesi, sekonder emülsiyon dış su fazına farklı oranlarda kitosan (DMA ve YMA) ilavesi gibi formülasyon parametrelerinde değişiklik yapılmıştır. Yapılan bu değişikliklerin, etkin madde enkapsülasyon etkinliği gibi nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Üretilen nanopartiküllere ait bilgiler Çizelge 2.5 – Çizelge 2.7’de yer almaktadır.

Çizelge 2.5. Farklı primer emülsiyon yağ fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonları.

Kod	PRX miktarı (mg)	Son pH	Primer emülsiyon yağ fazı		Sekonder emülsiyon dış su fazı	
			PLGA miktarı (mg)	Lesitin miktarı (mg)	PVA	Kitosan
S1	1,0	7,2	90	-	%1	-
S3	1,0	7,5	90	30	%1	-

Çizelge 2.6. Farklı dış su fazı pH değerlerinde hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonları.

Kod	PRX miktarı (mg)	pH	Primer emülsiyon yağ fazı		Sekonder emülsiyon dış su fazı	
			PLGA miktarı (mg)	Lesitin miktarı (mg)	PVA	Kitosan
S2	1,0	6,0	90	30	%1	-
S3	1,0	7,5	90	30	%1	-
S4	1,0	10,0	90	30	%1	-

Çizelge 2.7. Farklı sekonder emülsiyon dış su fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonları.

Kod	PRX miktarı (mg)	Son pH	Primer emülsiyon yağ fazı		Sekonder emülsiyon dış su fazı	
			PLGA miktarı (mg)	Lesitin miktarı (mg)	PVA	Kitosan
S5	1,0	5,94	90	30	%1	%0,1 DMA
S6	1,0	6,06	90	30	%1	%0,2 DMA
S7	1,0	5,93	90	30	%1	%0,1 YMA
S8	1,0	5,90	90	30	%1	%0,2 YMA

2.2.7. Hazırlanan Nanopartiküler Sistemlerin Karakterizasyonu

Üretim parametrelerinin formülasyon üzerindeki etkileri aşağıda yer alan başlıklar altında değerlendirilmiştir.

2.2.7.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliği

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının etkin madde miktar tayini indirekt yöntem kullanılarak yapılmıştır. Nanopartiküllerin üretimi sırasında santrifüj işleminden elde edilen süpernatant saf su ile seyreltilmiş ve miktar tayini için geliştirilen UV spektrofotometrik yöntem ile analiz edilmiştir. Nanopartiküllerin etkin madde (em) yüzde enkapsülasyon etkinliği (% EE) aşağıda verilen Eşitlik 1.1 ile hesaplanmıştır (n=6).

$$\%EE = \left[\frac{(\text{Toplam em miktarı} - \text{Serbest em miktarı})}{\text{Toplam em miktarı}} \right] \times 100$$

Eşitlik 1.1

2.2.7.2. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) değerinin (partikül büyüklüğü dağılımını ifade eder) belirlenmesinde Malvern Zetasizer Nano-ZS (UK) cihazı kullanılmıştır. Nanopartiküller ultrasafsu içinde süspande edildikten sonra, oda sıcaklığında her bir numune için ardışık 6 ölçüm yapılmıştır.

2.2.7.3. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Ölçümü

Nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer Nano-ZS (UK) cihazı kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Cihaz tarafından ölçülen zeta potansiyeli değeri, nanopartiküllerin yüzey yükü ve hücresel alımı ile ilgili bilgi vermesi açısından büyük önem taşımaktadır. Nanopartiküller ultrasafsu içinde disperse edildikten sonra ardışık altı ölçüm şeklinde ölçümler yapılmıştır.

2.2.7.4. Nanopartiküllerin Geçirimli Elektron Mikroskop (TEM) Analizi

Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla TEM (FEI marka Tecnai, G2 Spirit Biotwin model) ile görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, çok sayıda formülasyon çalışması içerisinde, enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı gibi fizikokimyasal özelliklerin hedeflenen temel düzeyinin PLGA polimer bazlı

nanopartiküller ile elde edilmesi nedeniyle, sadece bu grup nanopartiküllerin TEM analizi gerçekleştirilmiştir.

Analiz için, saf su içerisinde disperse edilen nanopartiküller karbon kaplı grid üzerine damlatıldıktan sonra kuruması için oda sıcaklığında bırakılmıştır. Görüntülerin daha net olabilmesi, kaplama tabakasının ve kalınlığının daha net görüntülenebilmesi için nanopartiküller %2 uranil asetat çözeltisi ile boyandıktan sonra yeniden kurutulmuş ve analiz gerçekleştirilmiştir.

2.2.7.5. Nanopartiküllerin Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi

Paroksetin yüklü nanopartiküllerin diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) (Shimadzu DSC-60, Japon) analizi yapılmıştır. Böylece etkin madde ile yardımcı maddeler arasında geçimsizlik olup olmadığı, enkapsüle edilen paroksetinin nanopartiküller içerisindeki fizikokimyasal durumu belirlenmiştir. Analiz için standart alüminyum örnek kaplarına hassas terazi ile 2 mg numune tartım yapılarak numune hazırlanmış ve 25-300°C arasında 10°C/dakika sıcaklık artışı ile termal analiz gerçekleştirilmiştir.

2.2.7.6. Nanopartiküllerin *in vitro* Çözünme Hızı Tayini

Nanopartikül formülasyonlarında *in vitro* etkin madde çözünme hızı analizi diyaliz membran yöntemiyle yapılmıştır. Çalışmalar kitosan bazlı ve PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlarında gerçekleştirilmiştir. Çözünme hızı ortamı olarak nazal mukoza ortamının simüle edilebilmesi amacıyla pH 6,4 fosfat tamponu kullanılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller, %0,1 Tween 80 içeren fosfat tamponundan (pH 6,4) oluşan 2 mL çözünme ortamında disperse edildikten sonra diyaliz membran tüplere (Sigma, 12000 Da MWCO) her iki ucu da sıkıca kapatılarak yerleştirilmiştir. Membran tüpler, 28 mL çözünme ortamı içine yerleştirilerek (toplam hacim 30 mL) çalkalayıcılı inkübatör (Jeio Tech SI-300 Jeio Tech Co. Ltd,

Güney Kore) $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ ' de, 75 rpm çalkalama hızında çalışılmıştır. Önceden belirlenen zamanlarda çözünme ortamından 3 mL örnek alınmış ve eşit hacimde taze çözünme ortamı eklenmiştir. Alınan örneklerin gerekliyse ultrasaf su ile seyreltildikten sonra 293 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede absorbansı okunmuştur. Nanopartikül formülasyonlarının her biri için çalışmalar üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Zamana karşı formülasyonlardan açığa çıkan paroksetin HCl % miktarları grafiğe aktarılarak salım profilleri elde edilmiştir. Elde edilen etkin madde salım profilleri; sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Korsmeyer Peppas, Hixson Crowell ve Weibull kinetik modeller açısından değerlendirilmiştir.

2.2.8. Nanopartiküllerin *in vitro* Adhezyon Testi

Hazırlanan paroksetin yüklü kitosan bazlı ve PLGA polimer bazlı nanopartiküllerin *in vitro* adhezyon özellikleri Tekstrü Analiz Cihazı kullanılarak ve formülasyonların zeta potansiyeli değerleri belirlenerek değerlendirilmiştir.

2.2.8.1. Tekstür Analiz Cihazı ile Ölçümü

Paroksetin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonlarının mukoadhezif özellikleri bilgisayar kontrollü penetrometre (Ta-XT Plus Texture Analyzer-stable mikro sistem, İngiltere) cihazı ile yapılmıştır. *In vitro* adhezyon test rig'inin (A/MUC) üst tarafında bulunan P/10 probunun ucuna Whatman 42 filtre kağıdı çift taraflı bant ile yapıştırılmış ve üzerine 50 μL %10 konsantrasyonda müsin tip II (domuz kaynaklı) (pH 6,4 PBS içinde) çözeltisi uygulanmıştır. Alt tablada bulunan boşluğa Whatman 42 filtre kağıdı çift taraflı bant ile yapıştırılmış ve üzerine 10 mg liyofilize toz haldeki nanopartiküller eşit şekilde dağıtılarak yerleştirilmiştir. Sonra partiküller 70 μL pH 6,4 PBS ile ıslatılmıştır. Sistemin sıcaklığı test süresince 37°C 'de tutularak, prob numunelere 0,98 N'luk temas kuvveti ile 180 saniye boyunca temas ettirilmiştir. Daha sonra prob 0,1 mm.s^{-1} hızla yukarı yöne doğru hareket ettirilerek maksimum ayrılma kuvveti belirlenmiştir. Tüm analizler en az üç kez

tekrarlanmıştır. Tekstür analiz cihazı ile *in vitro* adhezyon ölçümü Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. TA.XT Plus Tekstür Analiz Cihazı ile *in vitro* adhezyon ölçümü

2.2.8.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Paroksetin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonların mukoadhezif özelliklerini belirlemek için zeta potansiyeli değeri değişiminden yararlanılmıştır. 125 mg müsin tartılıp 250 mL pH 6,4 PBS tampon içinde bir gece boyunca karışmaya bırakılmıştır. 10 mg liyofilize toz haldeki nanopartikül 10 mL müsin çözeltisinde disperse edilmiş ve çalkalayıcı inkübatörde $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ 'de 100 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. 2., 4. ve 6. saatlerde alınan örneklerin zeta potansiyelleri okunmuştur. Elde edilen veriler doğrultusunda formülasyonların mukoadhezif özelliği değerlendirilmiştir.

2.2.9. Stabilit e alışmaları

En iyi sonuç alınan formülasyonlar buzdolabında 4°C’de 6 ay bekletilmiştir. Altıncı ay sonunda partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerlerindeki değişimler incelenerek form lsayonların stabilitesi hakkında sonuca varılmıştır. Stabilit e testleri devam etmektedir.

2.2.10. Hücre Kültürü alışmaları

Çalışmamızda saf etkin madde ve etkin madde içeren PLGA polimer bazlı nanopartiküllerin sitotoksik etkileri ve permeabilitelerin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar yürütülmüştür.

2.2.10.1. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü Koşulları

In vitro hücre kültürü çalışmaları nazal absorpsiyonun değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan Caco-2 (insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma) hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Caco-2 aslında insan kolon adenokarsinomundan elde edilse de normal kültür koşullarında enterositlere farklılaşır ve bu farklılaşmadan sonra nazal absorpsiyonun değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır (Costa ve ark., 2021a) ve ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmesinde göreceli olarak daha kolay ve iyi karakterize edilmiş bir *in vitro* model sunmaktadır (Cros ve ark., 2011; Hafner ve ark., 2009). Caco-2 hücre hattı, kültür ortamında nazal epitel hücrelerini konfluent tek tabaka halinde yetiştirmek oldukça zor olduğu için (Artursson ve ark., 1994) pek çok çalışmada nazal geçişin değerlendirilmesi için model olarak kullanılmıştır (Esim ve ark., 2020; Jia ve ark., 2021).

Caco-2 hücreleri 25 cm² hücre kültürü kabı içinde, %10’ luk fetal sığır serumu (FBS), %1 antibiyotik (Penisilin/Streptomisin) ve %1-2 L-glutamin tam besiyeri ortamında 37°C’de %5 CO₂’lik etüvde çoğaltılmıştır.

2.2.10.2. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Caco-2 hücre hattı kullanılarak yapılacak olan permeabilite çalışmalarından önce geliştirilen nanopartikül formülasyonlarının sitotoksik özellikleri MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolyumbromit) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. MTT yönteminde, çözünür özellikteki metil-tiyazol-tetrazolyum tuzu canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi aracılığıyla çözünmeyen formazan kristaline dönüştürülmektedir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılarak formazon kristali suda çözünür hale getirilir ve oluşan rengin şiddeti kolorimetrik olarak ölçülmektedir.

MTT testi için, 96 kuyulu plaklara Caco-2 hücreleri her bir kuyuda 50 µL besiyeri içinde 2.5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiş ve bir gece boyunca hücrelerin kuyulara tutunması için beklenmiştir. Sonraki gün, farklı konsantrasyonlarda 100 µL serbest paroksetin HCl çözeltisi, paroksetin yüklü PLGA, PLGA-lesitin hibrit ve kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül dispersiyonları ve bu formülasyonların boş eşdeğerleri hücrelerin üzerine eklenerek 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Paroksetinin 0,01-10 µg/mL doz aralığında farklı konsantrasyonları ile çalışılmıştır. Herhangi bir tedaviye maruz bırakılmadan inkübe edilen hücreler ise kontrol olarak kullanılmıştır. 24, 48 ve 72. saatin sonunda, kuyulara 20 µl MTT eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası kuyulardaki besiyeri aspire edilip kuyulara 100 µl isopropil alkol eklenmiş ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonra 570 nm'de ekstraksiyon tamponuna karşı canlı hücrelerde oluşan formazon kristalinin absorbans değerleri (OD) spektrofotometrik olarak okunmuştur. Her bir ilaç konsantrasyonu 4 farklı kuyuda çalışılmış ve ortalama OD değeri ölçülmüştür. Sitotoksosite aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirilmiştir.

$$[1- (\text{Ortalama OD ilaçlı kuyu} / \text{Ortalama OD kontrol kuyu}) \times 100 = \% \text{ hücre ölümü}]$$

2.2.10.3. Permeabilite Çalışmaları

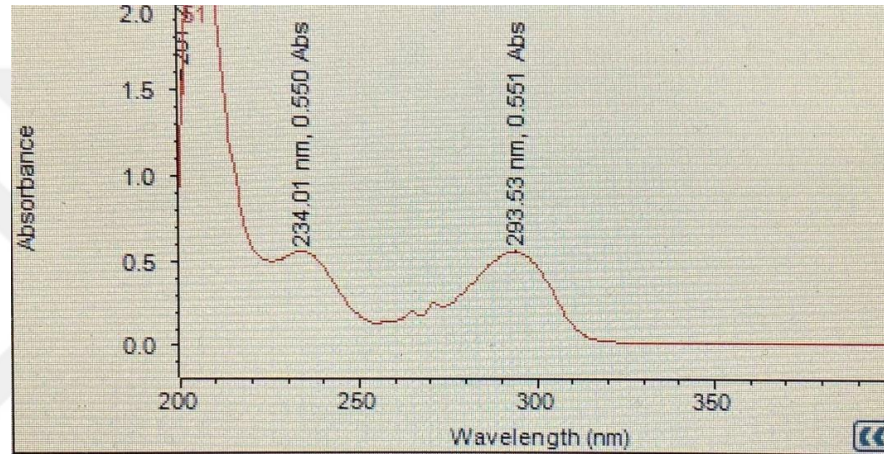
Permeabilite çalışmaları için etkin madde yerine floresan boya yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu amaçla floresan boya yüklü PLGA, PLGA-lesitin hibrit ve kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için Bölüm 2.2.6.2’de belirtilen üretim proseslerinde paroksetin hidroklorür yerine rodamin B kullanılmıştır.

Caco-2 hücreleri 12-kuyucuklu Transwell® insertlere (0,4µm por çaplı PTFE membran insert, Corning Costar, New York, ABD) ekilmiş ve konfluent tek tabaka elde edilene kadar inkübe edilmiştir. Tek tabaka oluşup oluşmadığı transepitelyal elektrik direnci ölçülerek belirlenmiştir. Tek tabaka elde edildikten sonra hücreler PBS ile yıkanarak, kuyucukların altına yani akseptör bölmeye 1,5 mL serumsuz DMEM eklenmiştir. Transwell® insertler yerleştirildikten sonra donör bölmeye 0,5 mL floresan boya yüklü PLGA, PLGA-lesitin hibrit ve kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül dispersiyonu eklenerek, belirlenen zaman aralıklarında (0,5-1-2-4-6 saat) 200 µL örnek çekilip aynı hacimde ve önceden ısıtılmış taze besiyeri eklenmiştir. Numuneler plaka okuyucuda okunarak kuyucuklardaki floresan madde içeriği tespit edilmiştir. Deneyler dörder tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

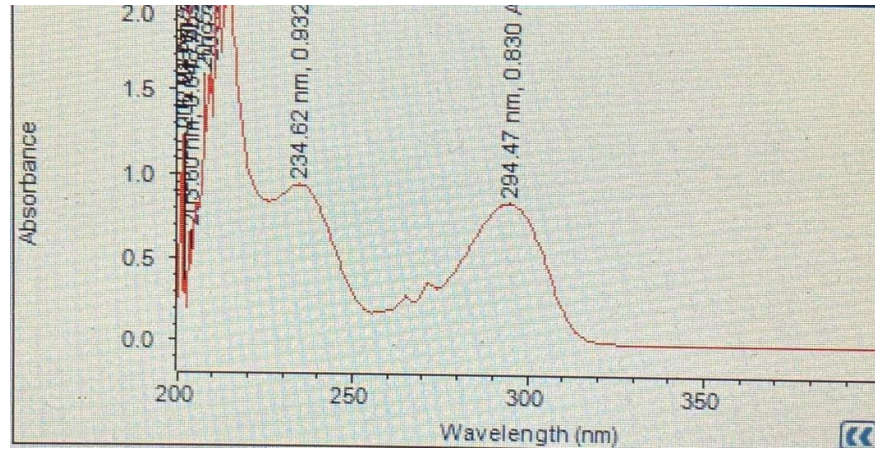
3. BULGULAR

3.1. Paroksetin Hidroklorürün Ultraviyole (UV) Spektrumunun Alınması

Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 PBS’ deki çözeltilerinin 200-400 nm arasında alınan spektrumlarına göre maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu sırasıyla Şekil 3.1’ de 293,53 nm ve Şekil 3.2’ de 294,47 nm bulunmuştur.



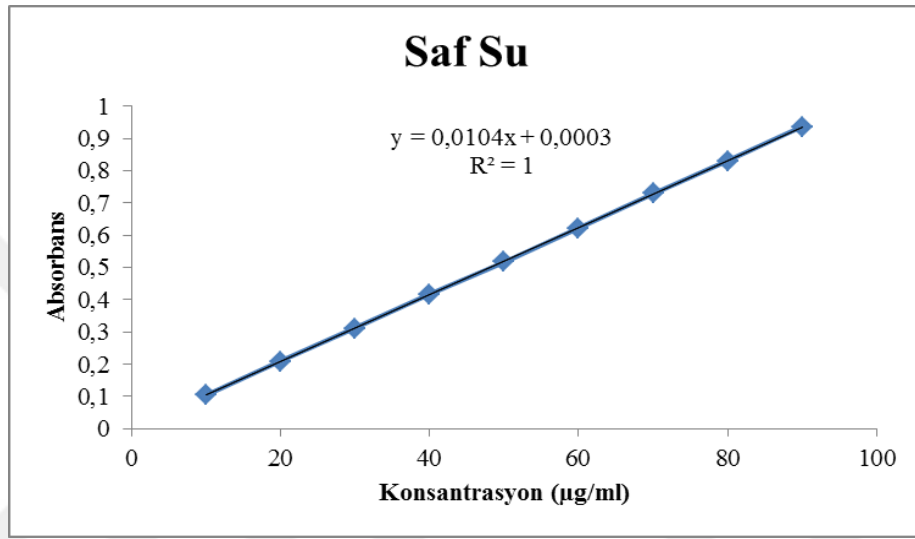
Şekil 3.1. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamındaki UV spektrumu.



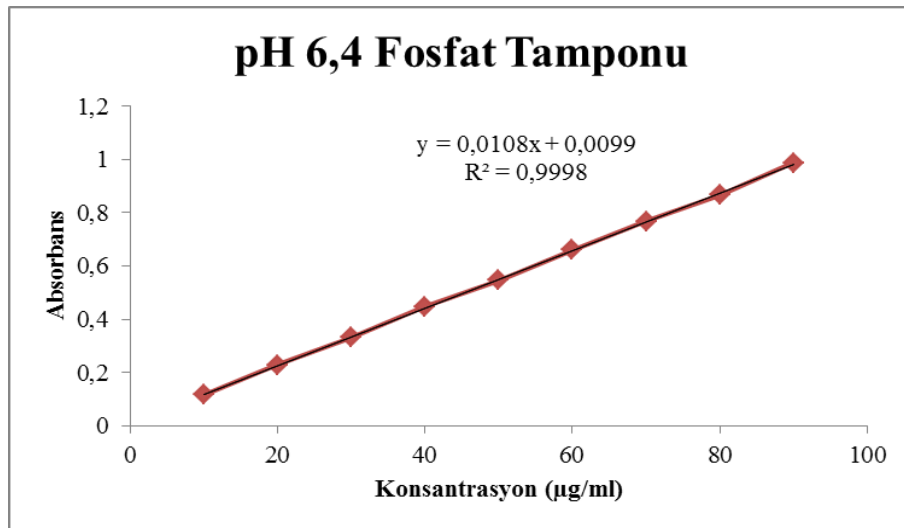
Şekil 3.2. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki UV spektrumu.

3.2. Paroksetin Hidroklorür Kalibrasyon Denkleminin Belirlenmesi

Paroksetin hidroklorürün saf su ve PBS (pH 6,4) içerisinde 10-90 µg/mL konsantrasyon aralığında elde edilen kalibrasyon doğru ve denklemleri Şekil 3.3 ve Şekli 3.4'te, kalibrasyon denklemlerine ait veriler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Her bir örnek üç defa okunmuş ve her nokta için 6 değerin ortalaması alınmıştır.



Şekil 3.3. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamındaki kalibrasyon doğrusu.



Şekil 3.4. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki kalibrasyon doğrusu.

Çizelge 3.1. Farklı ortamlarda paroksetin hidroklorür kalibrasyon denklemlerine ait veriler.

	Saf su	pH 6,4 PBS
Eğim	0,0104	0,0108
Kesişim	0,0003	0,0099
Determinasyon katsayısı (r^2)	1	0,9998
Kalibrasyon denklemi	$y = 0,0104x + 0,0003$	$y = 0,0108x + 0,0099$

3.3. Paroksetin Hidroklorür için Analitik Validasyon Çalışmaları

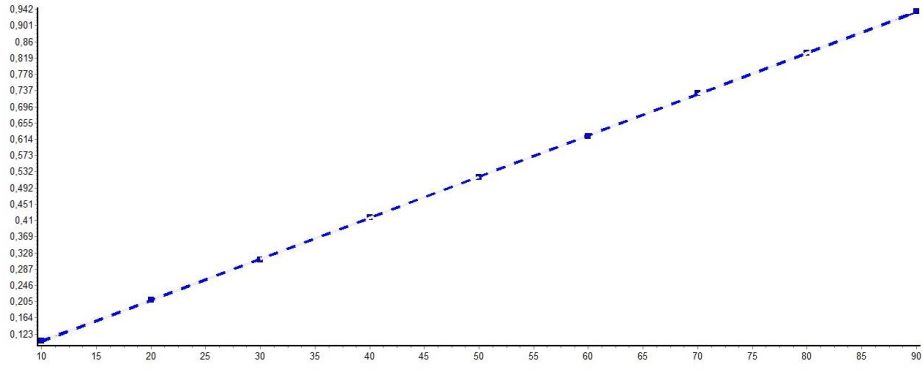
Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 PBS ortamlarında geliştirilen miktar tayini yöntemine ait validasyon sonuçları aşağıda ICH Q2(R1) kılavuzu doğrultusunda hazırlanan başlıklar altında yer almaktadır.

3.3.1. Doğrusallık ve Aralığı

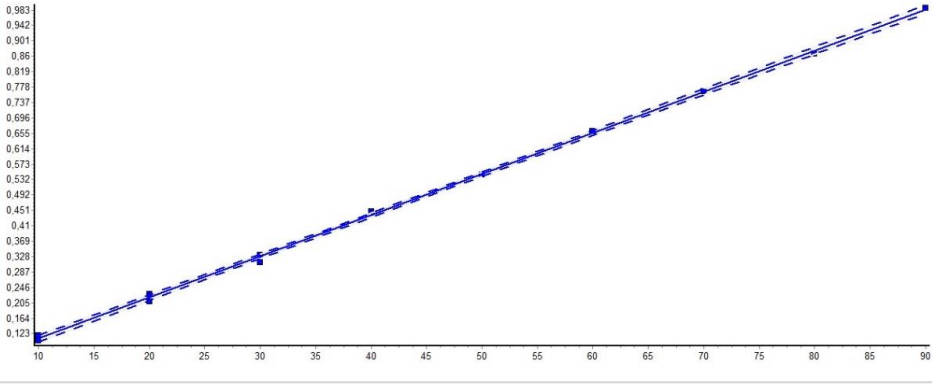
Paroksetin hidroklorürün 10-90 µg/mL konsantrasyon aralığındaki çözeltilerinin saf su ve PBS (pH 6,4) ortamlarında UV spektrofotometre ile miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri Çizelge 3.2.'de doğrusallık grafikleri Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.2. Paroksetin hidroklorürün farklı ortamlardaki doğrusallık parametreleri (n=6).

Parametreler	Saf su	pH 6,4 PBS
Eğim (m) ± SS	0,0104±2,06155E-05	0,0108±5,84692E-05
Eğimin güven aralığı (%95)	0,010346252 – 0,010443748	0,010670076 – 0,010946591
Kesişim (n) ± SS	0,0003±0,00116	0,0099±0,003290247
Kesişimin güven aralığı (%95)	-0,002493202 – 0,002993202	0,002136468 – 0,017696865
r^2	1	0,9998
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	0,001596872	0,004529007
Lineer regresyon kareler toplamı	0,64833615	0,700920417
Artık kareler toplamı	0,648354	0,701064
Ortalamanın artık kareler toplamı	0,64833615	0,700920417



Şekil 3.5. Paroksetin hidroklorürün saf sudaki doğrusallık grafiği.



Şekil 3.6. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki doğrusallık grafiği.

3.3.2. Doğruluk ve Geri Elde

Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 PBS ortamlarındaki 10, 50 ve 90 µg/mL konsantrasyondaki çözeltilerinin UV spektrofotometrede okunması sonucu elde edilen değerlerin kalibrasyon denkleminde yerine konulmasıyla hesaplanan % geri elde verileri Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’te sunulmuştur. Ölçümler 6 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 3.3. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamında UV spektrofometre ile doğruluk ve geri elde değerleri.

Kons		1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	6. ölçüm	Ort	SS	BSS	%BSS
10 µg/mL	Abs	0,105	0,105	0,105	0,104	0,105	0,106	0,105	0,001	0,006	0,602
	C	10,067	10,067	10,067	9,971	10,067	10,163	10,067	0,061	0,006	0,603
	% GE	100,67	100,67	100,67	99,712	100,67	101,64	100,67	0,608	0,006	0,604
50 µg/mL	Abs	0,518	0,514	0,514	0,521	0,519	0,521	0,518	0,003	0,006	0,615
	C	49,779	49,394	49,394	50,067	49,875	50,067	49,763	0,307	0,006	0,616
	% GE	99,558	98,789	98,789	100,135	99,75	100,14	99,526	0,613	0,006	0,616
90 µg/mL	Abs	0,936	0,936	0,938	0,938	0,936	0,936	0,937	0,001	0,001	0,110
	C	89,971	89,971	90,164	90,164	89,971	89,971	90,035	0,100	0,001	0,110
	% GE	99,968	99,968	100,18	100,18	99,968	99,968	100,04	0,111	0,001	0,110

Abs: Absorbans, Kons (C): Konsantrasyon (µg/mL), Ort: Ortalama

Çizelge 3.4. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamında UV spektrofometre ile doğruluk ve geri elde değerleri.

Kons		1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	6. ölçüm	Ort	SS	BSS	% BSS
10 µg/mL	Abs	0,117	0,117	0,117	0,117	0,116	0,116	0,117	0,001	0,004	0,442
	C	9,917	9,917	9,917	9,917	9,824	9,824	9,886	0,048	0,005	0,485
	% GE	99,17	99,17	99,17	99,17	98,24	98,24	98,86	0,478	0,005	0,483
50 µg/mL	Abs	0,548	0,547	0,544	0,544	0,546	0,547	0,546	0,002	0,003	0,306
	C	49,82	49,73	49,45	49,45	49,64	49,73	49,64	0,155	0,003	0,312
	% GE	99,65	99,46	98,91	98,91	99,28	99,46	99,28	0,310	0,003	0,312
90 µg/mL	Abs	0,987	0,988	0,988	0,988	0,987	0,988	0,988	0,001	0,001	0,052
	C	90,47	90,57	90,57	90,57	90,43	90,57	90,53	0,061	0,001	0,067
	% GE	100,5	100,6	100,6	100,6	100,5	100,6	100,6	0,053	0,001	0,052

3.3.3. Kesinlik

Paroksetin hidroklorürün saf su ve PBS (pH 6,4) ortamlarında miktar tayini yönteminin kesinliğini tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri ile incelenmiştir.

3.3.3.1. Tekrarlanabilirlik

Paroksetin hidroklorürün saf su ve PBS (pH 6,4) ortamlarında 10, 50 ve 90 µg/mL olmak üzere 3 farklı konsantrasyondaki çözeltileri ard arda 6 defa okunarak ölçümler yapılmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin bağıl standart sapma, % bağıl standart sapma, ortalama ve standart sapma verileri Çizelge 3.5 ve 3.6’da sunulmuştur.

Çizege 3.5. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamında UV spektrofometre ile tekrarlanabilirlik değerleri.

Kons		1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	6. ölçüm	Ort	SS	BSS	%BSS
10 µg/mL	Abs	0,105	0,105	0,105	0,104	0,105	0,106	0,105	0,0006	0,006	0,602
	C	10,067	10,067	10,067	9,971	10,067	10,163	10,067	0,0607	0,006	0,603
50 µg/mL	Abs	0,518	0,514	0,514	0,521	0,519	0,521	0,518	0,0031	0,006	0,615
	C	49,779	49,394	49,394	50,067	49,875	50,067	49,763	0,3065	0,006	0,616
90 µg/mL	Abs	0,936	0,936	0,938	0,938	0,936	0,936	0,937	0,0010	0,001	0,110
	C	89,971	89,971	90,164	90,164	89,971	89,971	90,035	0,0996	0,001	0,110

Çizelge 3.6. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamında UV spektrofometre ile tekrarlanabilirlik değerleri.

Kons		1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	6. ölçüm	Ort	SS	BSS	% BSS
10 µg/mL	Abs	0,117	0,117	0,117	0,117	0,116	0,116	0,117	0,001	0,004	0,442
	C	9,917	9,917	9,917	9,917	9,824	9,824	9,886	0,048	0,005	0,485
50 µg/mL	Abs	0,548	0,547	0,544	0,544	0,546	0,547	0,546	0,002	0,003	0,306
	C	49,82	49,73	49,45	49,45	49,63	49,73	49,64	0,155	0,003	0,312
90 µg/mL	Abs	0,987	0,988	0,988	0,988	0,987	0,988	0,988	0,001	0,001	0,052
	C	90,47	90,57	90,57	90,57	90,43	90,57	90,53	0,061	0,001	0,067

3.3.3.2. Ara Kesinlik

Paroksetin hidroklorürün saf su ve PBS (pH 6,4) ortamlarında 10, 50 ve 90 µg/mL olmak üzere 3 farklı konsantrasyondaki çözeltileri farklı 3 gün ard arda 6 defa okunarak ölçümler yapılmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalama, standart sapma, bağıl standart sapma ve % bağıl standart sapma değerleri Çizelge 3.7 ve 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Paroksetin hidroklorürün saf su ortamında UV spektrofometre ile ara kesinik değerleri.

Kons.	10 µg/mL		50 µg/mL		90 µg/mL	
	Abs.	C	Abs.	C	Abs.	C
1. gün	0,105	10,067	0,518	49,779	0,936	89,971
	0,105	10,067	0,514	49,394	0,936	89,917
	0,105	10,067	0,514	49,394	0,938	90,164
	0,104	9,971	0,521	50,067	0,938	90,164
	0,105	10,067	0,519	49,875	0,936	89,971
	0,106	10,163	0,521	50,067	0,936	89,971
2. gün	0,104	9,971	0,519	49,875	0,940	90,356
	0,104	9,971	0,518	49,779	0,936	89,971
	0,104	9,971	0,518	49,779	0,936	89,971
	0,104	9,971	0,514	49,394	0,936	89,971
	0,105	10,067	0,519	49,875	0,934	89,779
	0,106	10,163	0,519	49,875	0,936	89,971
3. gün	0,105	10,067	0,518	49,779	0,933	89,638
	0,105	10,067	0,518	49,779	0,934	89,779
	0,104	9,971	0,519	49,875	0,936	89,971
	0,105	10,067	0,518	49,779	0,936	89,971
	0,106	10,163	0,518	49,779	0,939	90,260
	0,105	10,067	0,519	49,875	0,936	89,971
Ort		10,051		49,779		89,987
SS		0,0678		0,1979		0,1696
BSS		0,0067		0,0039		0,0018
%BSS		0,675		0,397		0,188

Çizelge 3.8. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamında UV spektrofometre ile ara kesinlik değerleri.

Kons.	10 µg/mL		50 µg/mL		90 µg/mL	
	Abs.	C	Abs.	C	Abs.	C
1. gün	0,117	9,917	0,548	49,824	0,987	90,472
	0,117	9,917	0,547	49,732	0,988	90,565
	0,117	9,917	0,544	49,454	0,988	90,565
	0,117	9,917	0,544	49,454	0,988	90,565
	0,116	9,824	0,546	49,639	0,987	90,472
	0,116	9,824	0,547	49,732	0,988	90,565
2. gün	0,118	10,009	0,548	49,824	0,986	90,380
	0,117	9,917	0,547	49,732	0,985	90,287
	0,117	9,917	0,548	49,824	0,985	90,287
	0,116	9,824	0,547	49,732	0,987	90,472
	0,117	9,917	0,547	49,732	0,986	90,380
	0,117	9,917	0,547	49,732	0,988	90,565
3. gün	0,117	9,917	0,544	49,454	0,988	90,565
	0,116	9,824	0,543	49,361	0,990	90,750
	0,116	9,824	0,544	49,454	0,991	90,843
	0,116	9,824	0,546	49,639	0,988	90,565
	0,117	9,917	0,546	49,639	0,988	90,565
	0,116	9,824	0,546	49,639	0,990	90,750
Ort		9,886		49,644		90,534
SS		0,0551		0,1471		0,1490
BSS		0,0055		0,0029		0,0016
%BSS		0,557		0,296		0,164

3.3.4. Seçicilik (Özgünlük)

Formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin tek başlarına ve etkin maddemiz paroksetin hidroklorür ile saf su ve pH 6,4 PBS ortamlarındaki karışımları UV spektrofotometrede incelenmiştir. Herhangi bir çakışma olmamıştır.

3.3.5. Teşhis ve Tayin Sınırları

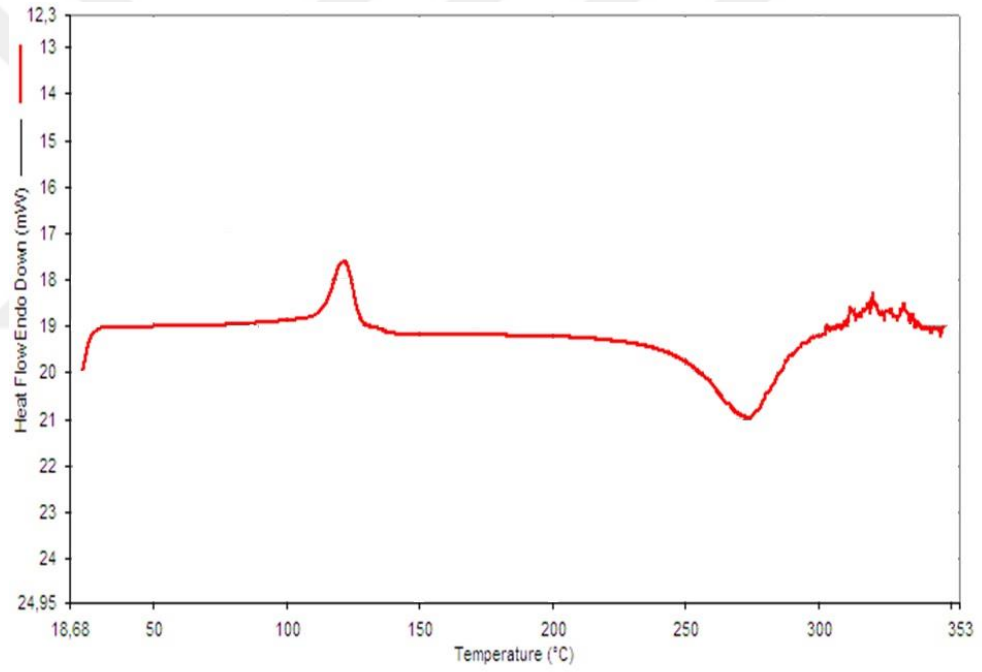
Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 PBS ortamlarındaki UV spektrofotometre ile miktar tayini yöntemine ait tayin ve teşhis sınırları Bölüm 2.2.4.5'teki eşitlikler kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 3.9'da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. Paroksetin hidroklorürün farklı ortamlardaki teşhis ve tayin sınırları.

Ortam	Saf su	pH 6,4 PBS
Teşhis sınırı (LOD) (µg/mL)	0,36807	1,00535
Tayin sınırı (LOQ) (µg/mL)	1,11538	3,04652

3.4. Paroksetin Hidroklorürün Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi

Paroksetin hidroklorürün DSC analizine ait termogram Şekil 3.7’de verilmiştir.



Şekil 3.7. Paroksetin hidroklorürün DSC termogramı.

3.5. Formülasyonların Karakterizasyonu

3.5.1. Kitosan Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Karakterizasyonu

Etkin Madde Miktarının Etkisi:

Kullanılan etkin madde miktarının formülasyonlar üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla 1, 2 ve 5 mg paroksetin kullanılarak yapılan üretime ait nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.10'da yer almaktadır.

Çizelge 3.10. Farklı miktarda paroksetin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu.

Kod	PRX (mg)	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS	EE (%) $\pm$ SS
F2	5,0	108,9 $\pm$ 0,6028	0,202 $\pm$ 0,016	33,6 $\pm$ 2,040	24,669 $\pm$ 0,017
F3	2,0	127,6 $\pm$ 1,9970	0,193 $\pm$ 0,013	27,4 $\pm$ 0,458	22,015 $\pm$ 0,025
F8	1,0	150,6 $\pm$ 0,4933	0,203 $\pm$ 0,026	10,9 $\pm$ 0,252	31,811 $\pm$ 0,014

PRX: Paroksetin hidroklorür miktarı, EE: Enkapsülasyon etkinliği, PB: Partikül büyüklüğü, SS: Standart sapma, PDI: Polidispersite indeksi, ZP: Zeta potansiyeli

Lesitin:Kitosan Oranının Etkisi:

Paroksetin yüklü kitosan bazlı nanopartiküllerin üretiminde kullanılan lesitin ve kitosan oranlarındaki değişimin fizikokimyasal özellikler üzerine etkisi Çizelge 3.11.'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Farklı L:K oranlarıyla hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu.

Kod	L:K	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS	EE (%) $\pm$ SS
F3	20:1	127,6 $\pm$ 1,997	0,193 $\pm$ 0,013	27,4 $\pm$ 0,458	22,015 $\pm$ 0,025
F4	40:1	195,2 $\pm$ 3,659	0,280 $\pm$ 0,006	24,0 $\pm$ 0,306	14,571 $\pm$ 0,061
F5	10:1	105,1 $\pm$ 1,258	0,199 $\pm$ 0,008	27,4 $\pm$ 0,964	25,677 $\pm$ 0,021
F12	5:1	-	-	-	-

L:K: Lesitin:Kitosan oranı

DMA Kitosan Çözeltisi Üzerine Farklı Sıvı Ortam İlavesinin Etkisi:

DMA kitosan çözeltisi üzerine saf su ve pH 6,4 PBS ilave edilmesinin nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi Çizelge 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.12. DMA kitosan çözeltisi üzerine farklı ortamların ilavesiyle hazırlanan nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu.

Kod	Disp. Ort.	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS	EE (%) $\pm$ SS
F6	pH 6,4 PBS	122,0 $\pm$ 1,940	0,219 $\pm$ 0,012	-7,49 $\pm$ 7,08	73,686 $\pm$ 0,011
F7	Saf su	337,7 $\pm$ 9,569	0,225 $\pm$ 0,036	24,8 $\pm$ 1,20	2 $\pm$ 0,068

Disp. Ort.: Dispersiyon ortamı

Paroksetin Hidroklorür İçeren Lesitin Çözeltisinin İlave Edildiği Ortam pH’sının Etkisi:

Paroksetin hidroklorür içeren lesitin çözeltisinin damla damla ilave edildiği pH 6,4 PBS ortamındaki DMA kitosan çözelti pH’sı değişiminin nanopartikülün fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiş ve Çizelge 3.13’te verilmiştir.

Çizelge 3.13. pH değeri farklı ortamlarda hazırlanan nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu.

Kod	pH	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS	EE (%) $\pm$ SS
F9	6,42	2000	-	-28,9 $\pm$ 0,721	55,535 $\pm$ 0,028
F10	7,49	117,2 $\pm$ 3,403	0,157 $\pm$ 0,010	-33,0 $\pm$ 1,950	41,277 $\pm$ 0,033
F11	5,42	2000	-	-18,7 $\pm$ 1,330	1,044 $\pm$ 0,009

3.5.2. PLGA Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Karakterizasyonu

Primer Emülsiyon Yağ Fazı Bileşimi ve pH’ daki Değişikliğin Etkisi:

Primer emülsiyon yağ fazı bileşimi ve sekonder emülsiyonu oluşturmakta kullandığımız %1 PVA dış su fazı pH’sındaki değişimin elde edilen

nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi Çizelde 3.14’te verilmiştir.

Çizelge 3.14. Farklı primer emülsiyon yağ fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu.

Kod	pH	Primer emülsiyon yağ fazı		PB (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS	% EE ± SS
		PLGA (mg)	Lesitin (mg)				
S1	7,2	90	-	275,5 ± 3,400	0,156 ± 0,022	-3,95 ± 0,225	59,669 ± 0,015
S3	7,5	90	30	248,9 ± 2,237	0,097 ± 0,010	-27,0 ± 1,810	80,850 ± 0,023

Farklı pH Değerlerinin Etkisi:

Sekonder emülsiyon oluşturmada kullanılan %1 PVA dış su fazı pH’sındaki değişimin elde edilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi Çizelde 3.15’te sunulmuştur.

Çizelge 3.15. Farklı dış su fazı pH değerlerinde hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu.

Kod	pH	PB (nm) ±SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS	EE (%)± SS
S2	6,0	262,0 ± 0,651	0,230 ± 0,004	-33,5 ± 3,440	88,486 ± 0,012
S3	7,5	248,9 ± 2,237	0,097 ± 0,010	-27,0 ± 1,810	80,850 ± 0,023
S4	10,0	252,7 ± 1,706	0,170 ± 0,005	-28,0 ± 0,693	75,006 ± 0,074

Sekonder Emülsiyon Dış Fazı Bileşimindeki Değişimin Etkisi:

Sekonder emülsiyon oluşumunda kullanılan dış fazın bileşimindeki değişimin elde edilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi Çizelge 3.16’da sunulmuştur.

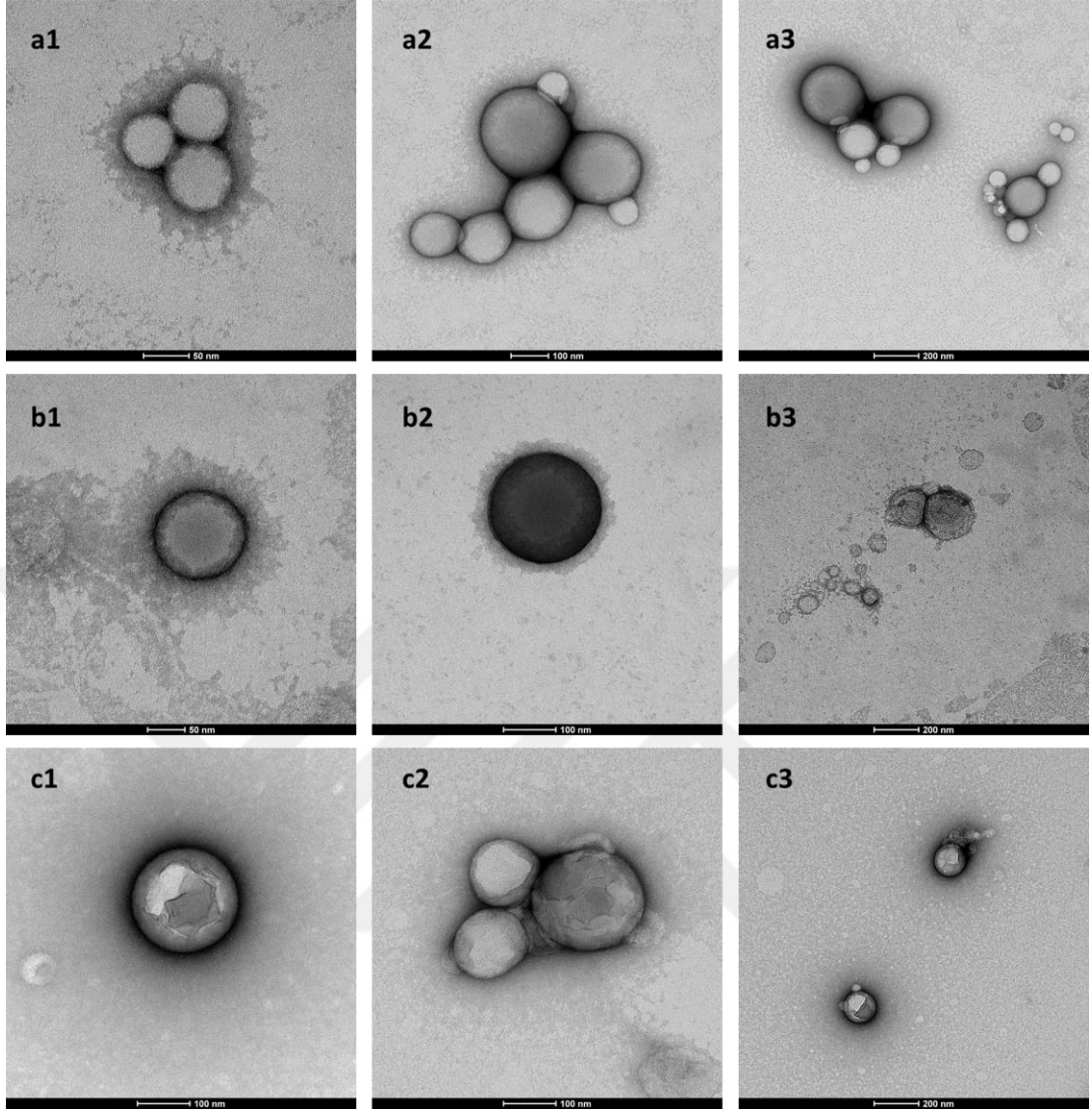
Çizelge 3.16. Farklı sekonder emülsiyon dış su fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonların karakterizasyonu.

Kod	Sekonder emülsiyon su fazı		PB (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS	EE (%)± SS
	PVA	Kitosan				
S5	%1	%0,1 DMA	283,2 ± 2,801	0,195 ± 0,009	21,8 ± 1,190	71,07 ± 0,018
S6	%1	%0,2 DMA	336,2 ± 2,600	0,238 ± 0,005	23,4 ± 0,071	77,144 ± 0,023
S7	%1	%0,1 YMA	354,5 ± 3,503	0,254 ± 0,012	24,7 ± 1,080	64,354 ± 0,017
S8	%1	%0,2 YMA	474,7 ± 9,914	0,387 ± 0,065	29,4 ± 1,200	67,503 ± 0,020

DMA: Düşük molekül ağırlıklı kitosan, YMA: Yüksek molekül ağırlıklı kitosan

3.5.3. Formülasyonların Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Özelliklerinin İncelenmesi

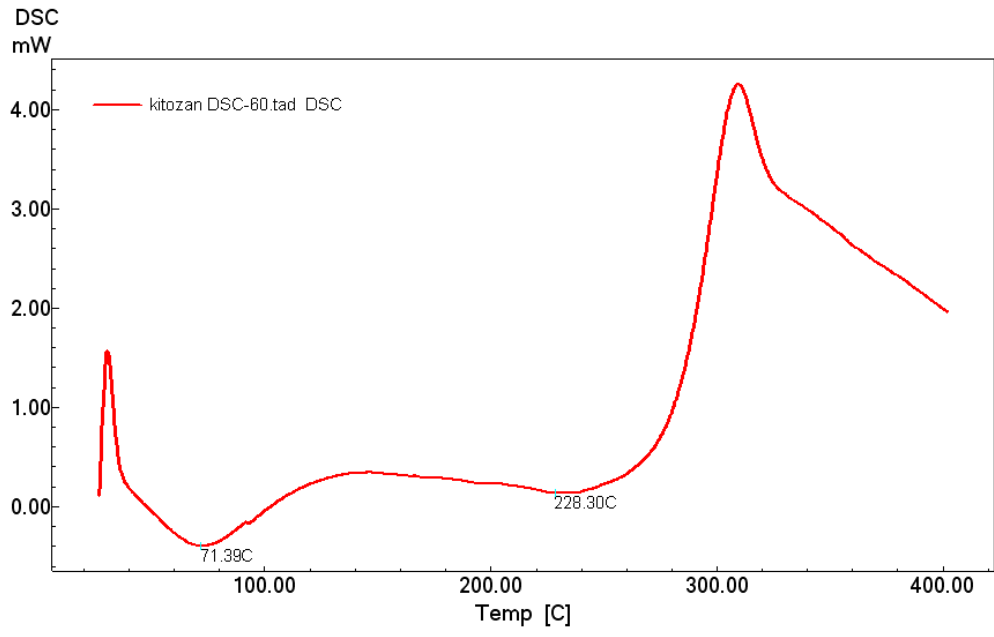
Hazırlanan paroksetin hidroklorür yüklü kitosan bazlı ve PLGA nanopartiküllere ait yüzey morfolojilerini gösteren TEM görüntüleri Şekil 3.8’de gösterilmektedir.



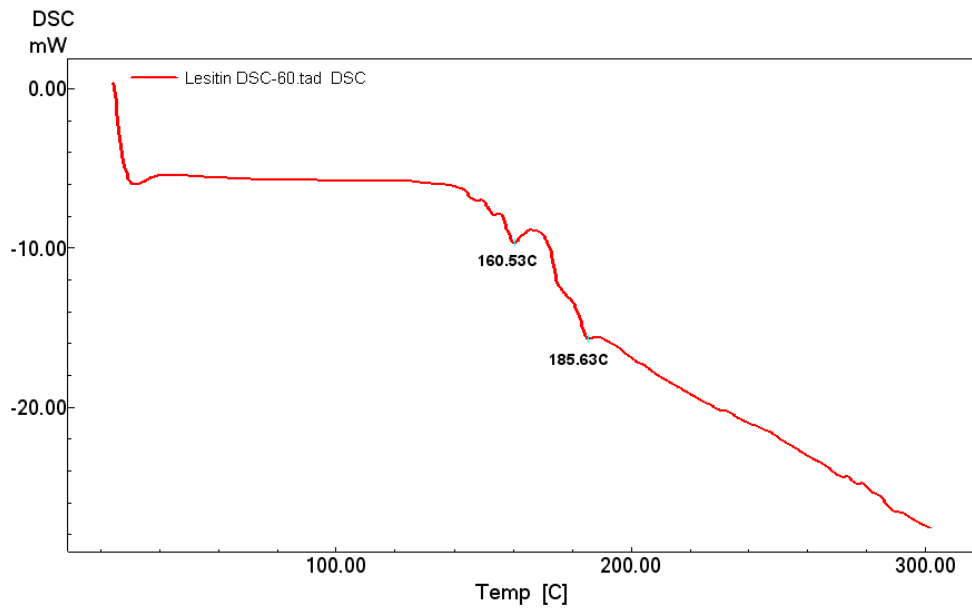
Şekil 3.8. Paroksetin hidroklorür yüklü (a) S1, (b) S2 ve (c) S6 formülasyonlarına ait TEM görüntüleri.

3.5.4. Formülasyonların Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Analizi

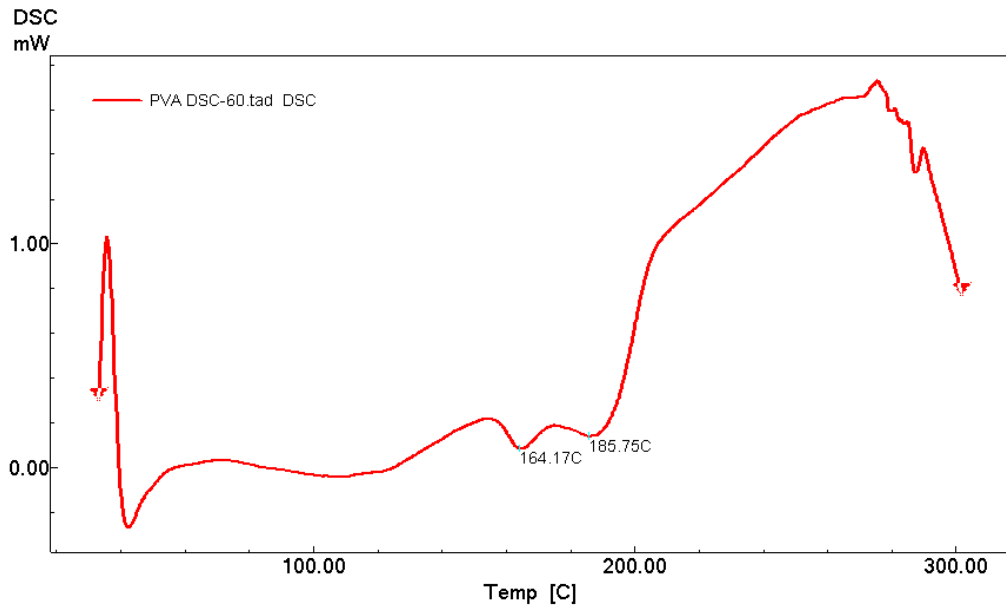
Bölüm 2.2.7.5'te açıklandığı biçimde yapılan DSC analizinden elde edilen termogramlar Şekil 3.9 – Şekil 3.13'te gösterilmiştir.



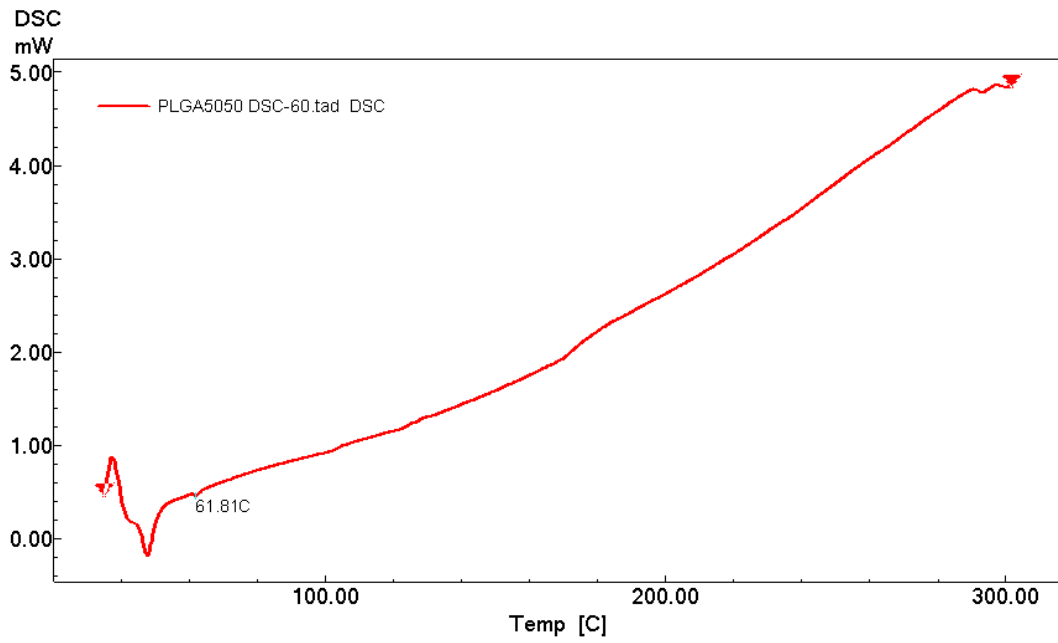
Şekil 3.9. Kitozanın DSC termogramı.



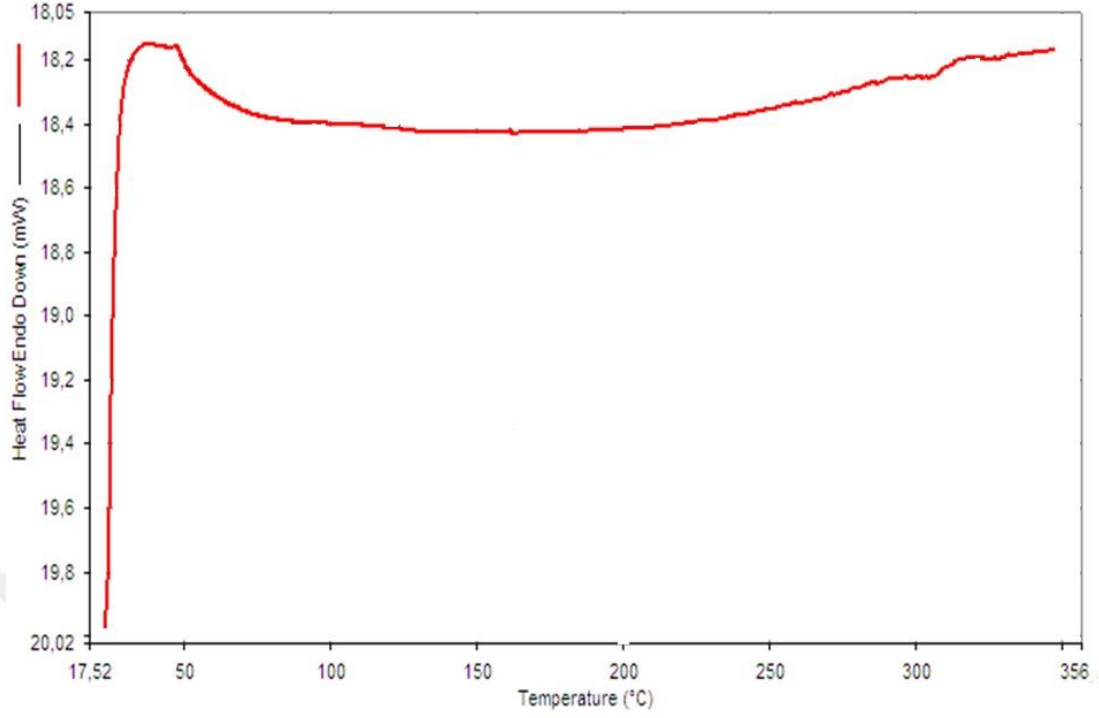
Şekil 3.10. Lesitinin DSC termogramı.



Şekil 3.11. PVA'nın DSC termogramı.



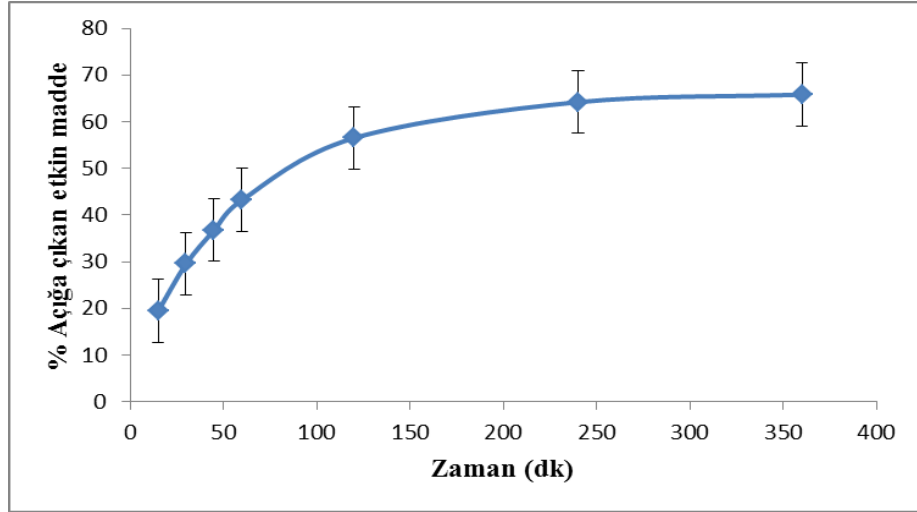
Şekil 3.12. PLGA'nın (50:50) DSC termogramı.



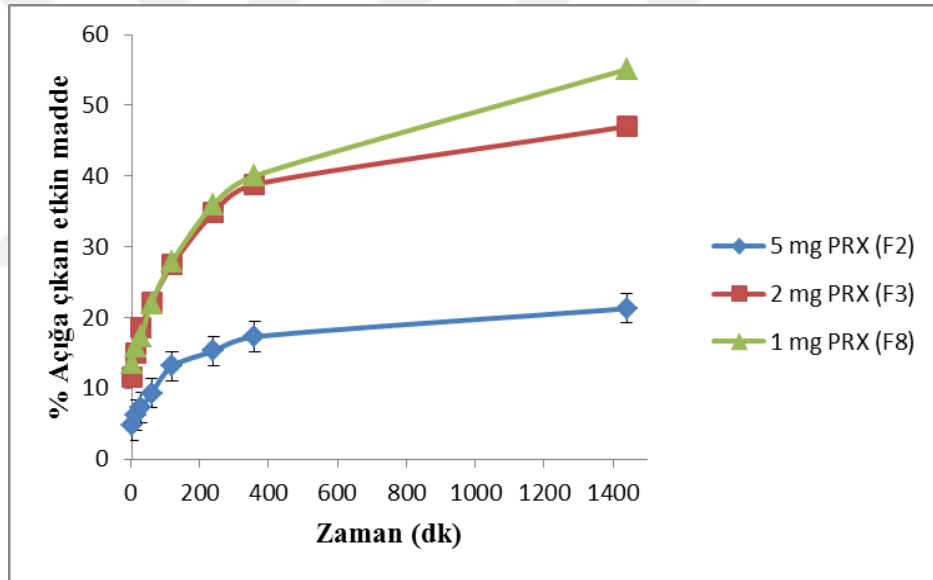
Şekil 3.13. S6 kodlu kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopatikül formülasyonun DSC termogramı.

3.5.5. Nanopartiküllerin *in vitro* Çözünme Hızı

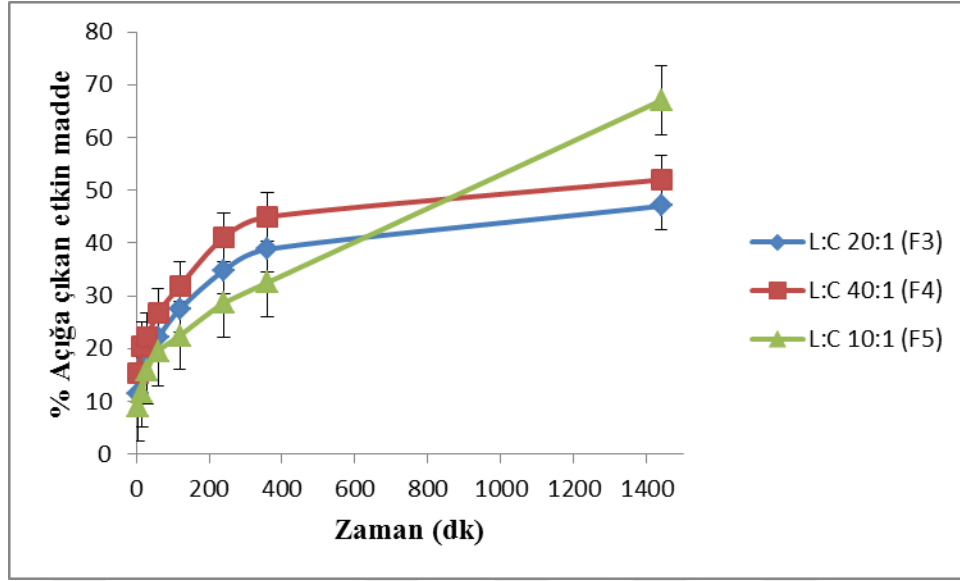
Hazırlanan paroksetin yüklü kitosan bazlı ve PLGA nanopatikül formülasyonları ve saf etkin madde için çözünme hızı analizi Bölüm 2.2.7.6’da belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Sonuçta zamana karşı açığa çıkan etkin madde (AÇEM) miktarı (% olarak) grafiğe geçirilmiş ve elde edilen profiller Şekil 3.14 – 3.20’de ve kinetik sonuçları Çizelge 3.17 ve Çizelge 3.18’de gösterilmiştir.



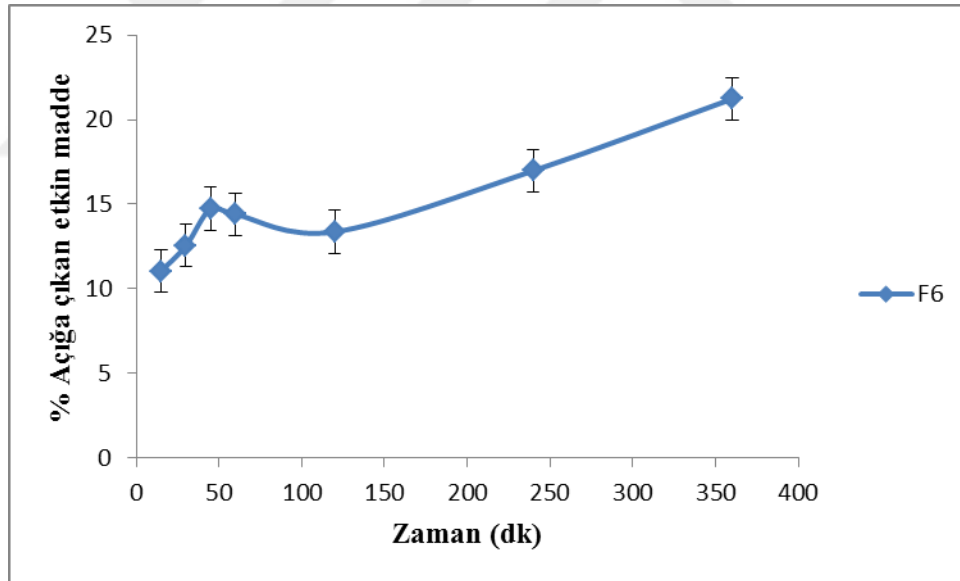
Şekil 3.14. Paroksetin hidroklorürün pH 6,4 PBS ortamındaki çözünme hızı grafiği.



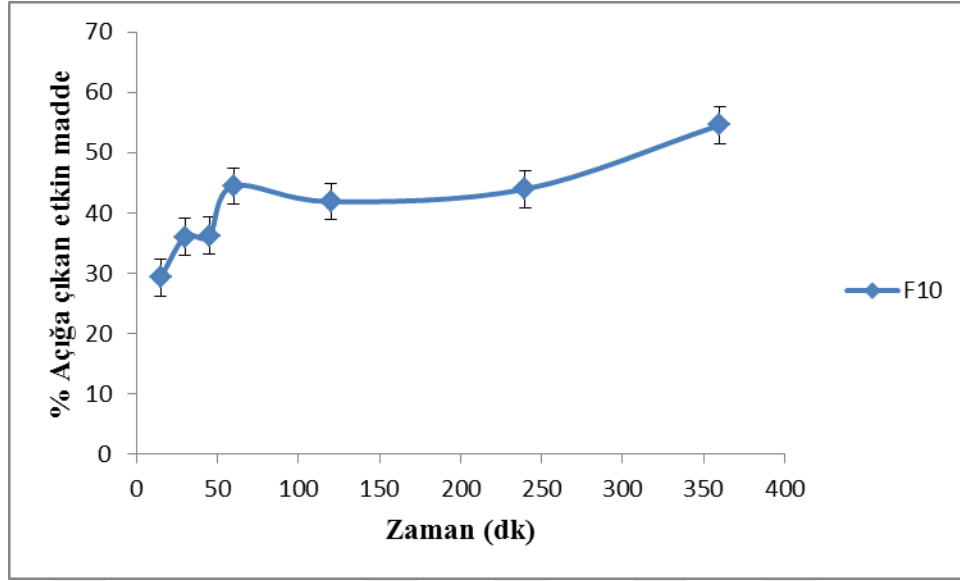
Şekil 3.15. Farklı miktarda etkin madde içeren kitosan bazlı nanopartiküllerden paroksetin hidroklorür çıkış grafiği.



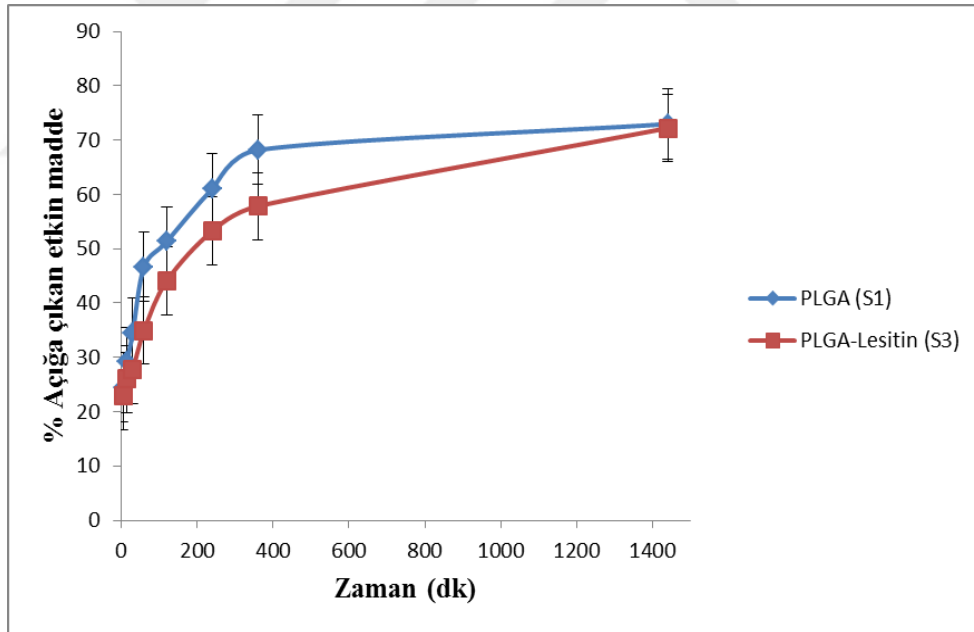
Şekil 3.16. Farklı L:K oranına sahip kitosan bazlı nanopartiküllerden paroksetin hidroklorür çıkış grafiği.



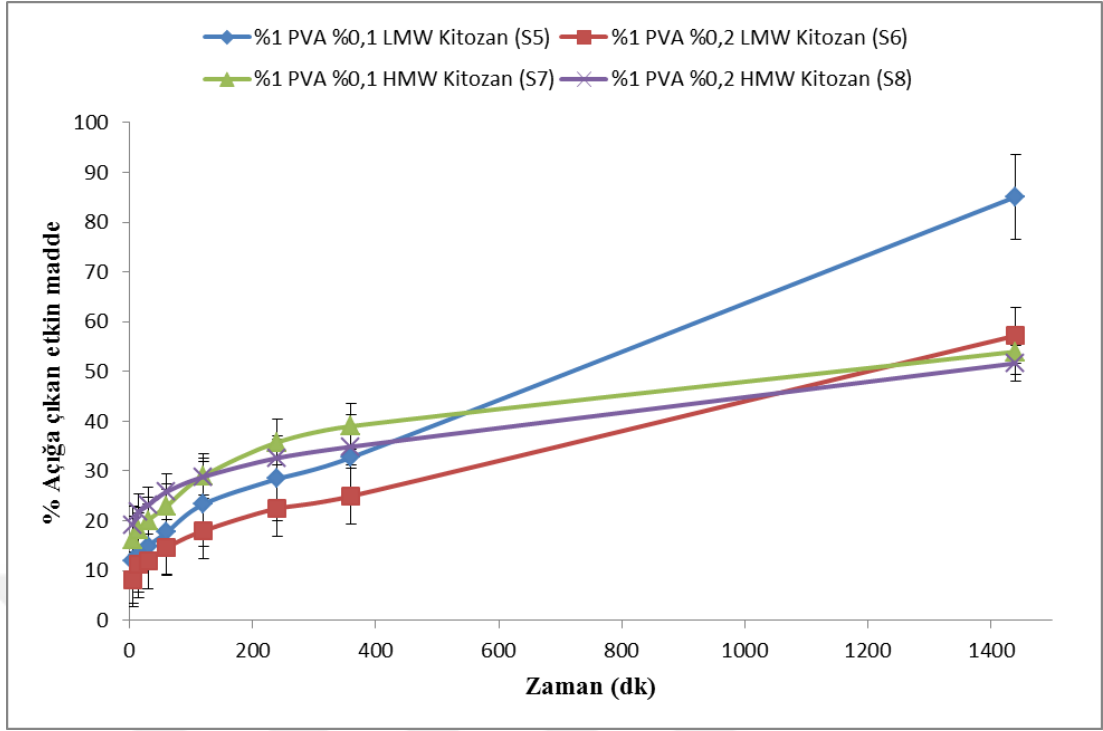
Şekil 3.17. DMA kitosan çözeltisi üzerine pH 6,4 PBS ortamının ilavesi ile hazırlanan F6 kodlu nanopartikül formülasyonundan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği.



Şekil 3.18. pH 6,4 PBS ortamındaki DMA kitosan çözelti pH'sının 7,5'e ayarlanması ile hazırlanan F10 kodlu nanopartikül formülasyonundan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği.



Şekil 3.19. Farklı primer emülsiyon yağ fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonlardan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği.



Şekil 3.20. Farklı sekonder emülsiyon dış su fazı bileşeni ile hazırlanan PLGA nanopartikül formülasyonlardan paroksetin hidroklorür çıkış grafiği.

Çizelge 3.17. PLGA nanopartikül formülasyonlara ait salım kinetik parametreleri.

		S1	S3	S5	S6	S7	S8
Sıfırıncı Derece	r²	0,529	0,709	0,993	0,980	0,816	0,909
	k	0,068	0,064	0,064	0,044	0,047	0,044
	RMS	38,969	31,936	13,097	11,0262	21,158	21,892
Birinci Derece	r²	0,779	0,903	0,970	0,992	0,917	0,966
	k	0,002	0,002	0,001	0,0006	0,001	0,001
	RMS	29,379	23,605	9,063	9,2642	17,794	19,342
Weibull	r²	0,965	0,982	0,862	0,907	0,980	0,936
	α	6,022	7,390	28,925	25,8817	10,289	7,323
	β	0,304	0,306	0,490	0,3721	0,273	0,206
	RMS	3,684	2,659	10,159	6,0246	2,174	2,959
Higuchi	r²	0,776	0,908	0,960	0,979	0,967	0,996
	k	2,77	2,520	2,133	1,5105	1,786	1,716
	RMS	23,068	17,382	5,125	3,5574	10,930	12,713
Hixson-Crowell	r²	0,722	0,860	0,990	0,990	0,891	0,952
	k	0,0004	0,001	0,0003	0,0001	0,0003	0,0003
	RMS	31,62	25,710	10,167	9,8477	19,216	20,531
Korsmeyer Peppas	r²	0,920	0,977	0,899	0,929	0,989	0,952
	k	17,518	14,585	5,285	4,2750	9,629	13,521
	n	0,2156	0,225	0,333	0,3208	0,240	0,168
	RMS	5,860	2,863	10,981	5,721	1,745	2,673

Çizelge 3.18. Kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlara ait salım kinetik parametreleri.

		F2	F3	F4	F5	F6	F8	F11
Sıfırıncı Derece	r²	0,662	0,670	0,638	0,954	0,8718	0,790	0,758
	k	0,019	0,042	0,047	0,053	0,0738	0,047	0,197
	RMS	8,826	20,262	24,591	14,368	8,9915	20,095	25,894
Birinci Derece	r²	0,690	0,783	0,776	0,985	0,8637	0,901	0,769
	k	0,0002	0,001	0,001	0,001	0,0008	0,001	0,004
	RMS	8,515	17,558	20,809	10,843	8,6682	16,401	21,949
Weibull	r²	0,964	0,982	0,974	0,945	0,8022	0,988	0,827
	α	34,719	13,669	9,549	28,509	13,9157	13,592	4,780
	β	0,307	0,309	0,279	0,460	0,1831	0,321	0,211
	RMS	1,280	1,820	2,281	5,142	1,6415	1,878	3,676
Higuchi	r²	0,878	0,885	0,861	0,992	0,8434	0,955	0,803
	k	0,732	1,638	1,874	1,830	1,3039	1,793	3,532
	RMS	4,463	10,560	13,728	4,216	4,8855	9,497	14,440
Hixson-Crowell	r²	0,681	0,751	0,737	0,984	0,8664	0,871	0,764
	k	0,0001	0,0002	0,0003	0,0004	0,0002	0,0003	0,001
	RMS	8,616	18,839	22,248	12,444	8,7727	17,945	23,892
Korsmeyer Peppas	r²	0,968	0,968	0,960	0,967	0,8047	0,989	0,826
	k	3,700	7,603	10,742	4,786	7,0773	7,840	20,186
	n	0,240	0,264	0,229	0,341	0,1681	0,268	0,160
	RMS	1,401	2,550	2,895	4,441	1,6327	1,695	3,688

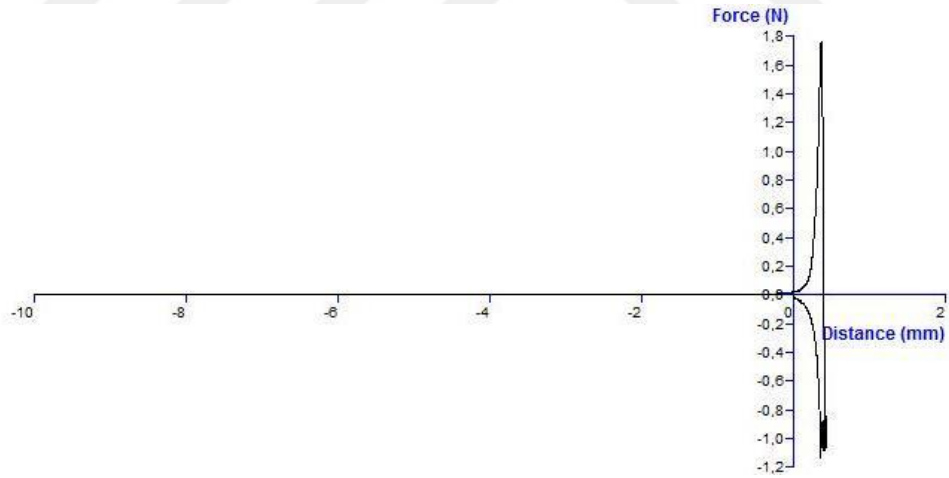
3.5.6. Formülasyonların *in vitro* Adhezyon Özelliklerinin Değerlendirilmesi

3.5.6.1. Tekstür Analiz Cihazı ile Ölçümü

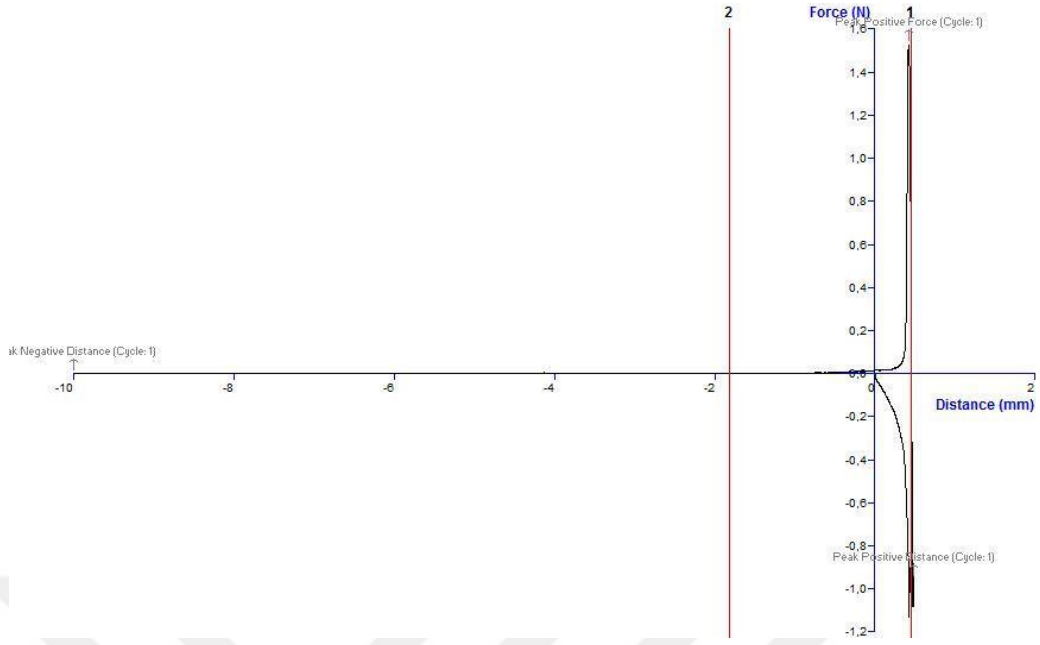
En iyi sonuçları elde ettiğimiz formülasyonlar üzerinde Bölüm 2.2.8.1’de anlatıldığı şekliyle gerçekleştirilen tekstür analizinin verileri Çizelge 3.19’da, formülasyonlara ait adhezyon grafikleri Şekil 3.21 – Şekil 3.24’te sunulmuştur.

Çizelge 3.19. Tekstür Analiz cihazından elde edilen sonuçlar.

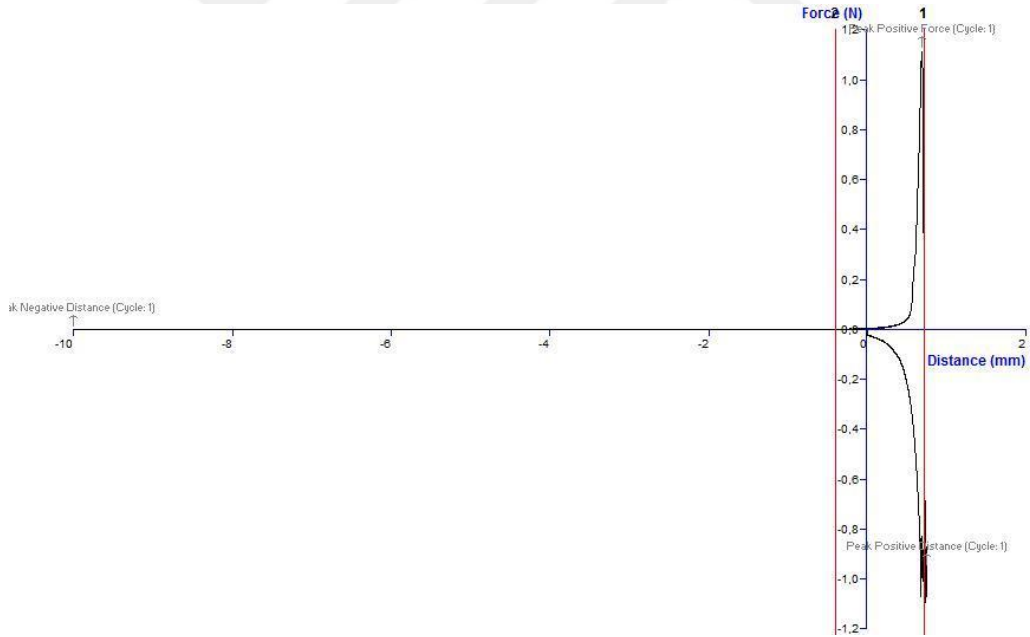
Kod	Formül İçeriği	F (N)	AUC (N.mm)
S1	PLGA	1,477	0,071
S2	PLGA-Lesitin	1,264	0,098
S6	PLGA-Lesitin-%0,2 DMA Kitosan	0,969	0,093
F6	Lesitin-Kitosan (20:1)	1,761	0,124



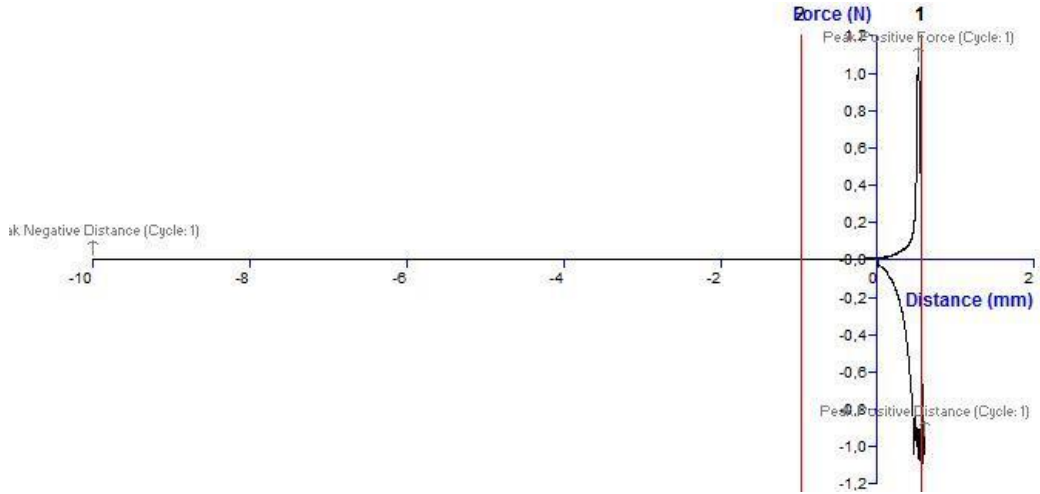
Şekil 3.21. F6 formülasyonuna ait adhezyon grafiği.



Şekil 3.22. S1 formülasyonuna ait adhezyon grafiği.



Şekil 3.23. S2 formülasyonuna ait adhezyon grafiği.



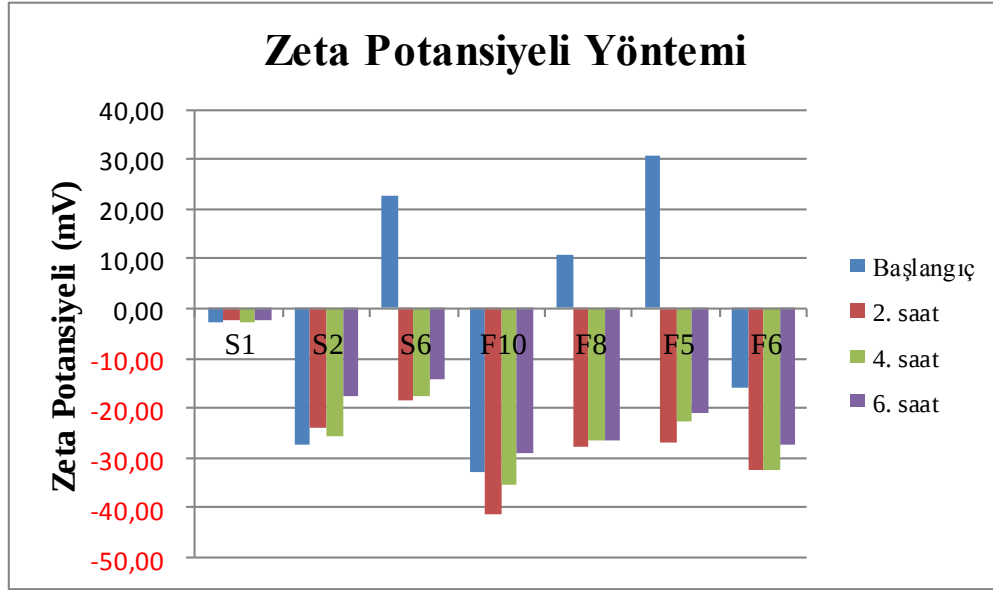
Şekil 3.24. S6 formülasyonuna ait adhezyon grafiği.

3.5.6.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü

En iyi sonuçları elde ettiğimiz formülasyonlar üzerinde Bölüm 2.2.8.2’de anlatıldığı şekliyle gerçekleştirilen *in vitro* adhezyon analiz sonuçları Çizelge 3.20 ve Şekil 3.25’te sunulmuştur.

Çizelge 3.20. *In vitro* adhezyon özelliğın tayini için zeta potansiyeli değeri.

Kod	ZP (mV)			
	Başlangıç	2. saat	4. saat	6. saat
S1	-2,78±0,176	-2,15±0,05	-2,68±0,244	-2,14±0,44
S2	-27,6±1,35	-23,9±2,81	-25,5±2,17	-17,5±1,22
S6	+22,6±0,0577	-18,5±1,72	-17,5±0,64	-14,3±0,81
F10	-33,0±1,95	-41,3±1,51	-35,6±0,42	-29,2±3,70
F8	+10,9±0,252	-28,0±0,81	-26,4±1,60	-26,6±0,51
F5T	+30,7±0,200	-27,0±2,02	-22,6±1,72	-20,9±2,31
F6T2	-15,8±1,08	-32,7±1,01	-32,7±0,29	-27,6±1,54



Şekil 3.25. *In vitro* adhezyon özelliğın tayini için zeta potansiyelindeki değışimin grafiksel gösterimi.

3.6. Formülasyonların Stabılite Verilerinin İncelenmesi

Bölüm 2.2.9’da belirtilen koşullar altında gerçekleştirilen stabılite testlerinde polidispersite indeksi, partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri sonucunda elde edilen değerler Çizelge 3.21’de yer almaktadır.

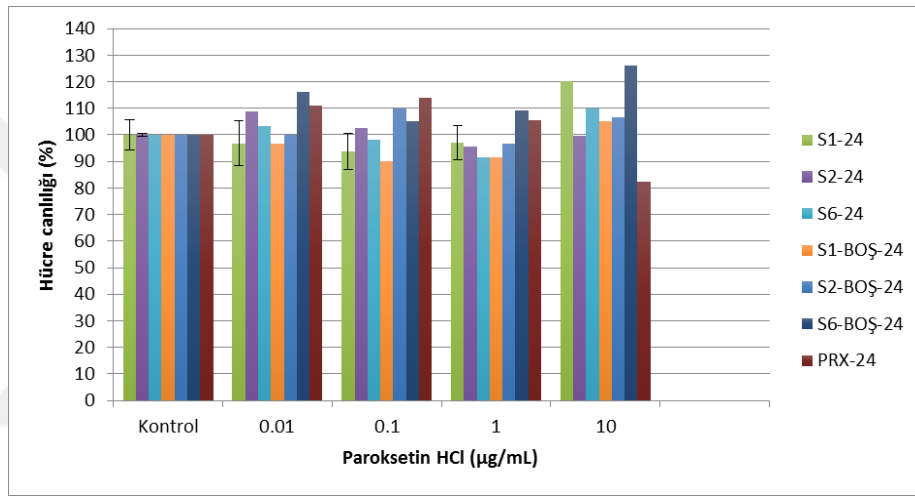
Çizelge 3.21. S1, S2, S6 kodlu formülasyonlara ait 6 aylık stabılite verileri.

Kod		PB (nm) ± SS	PDI ± SS	ZP (mV) ± SS
S1	Başlangıç	348,4 ± 5,237	0,276 ± 0,030	-5,61 ± 0,679
	4°C (6. Ay)	309,1 ± 2,333	0,291 ± 0,006	-10,7 ± 0,252
S2	Başlangıç	216,5 ± 1,249	0,153 ± 0,012	-31,4 ± 1,450
	4°C (6. Ay)	312,9 ± 20,76	0,665 ± 0,053	-37,9 ± 1,430
S6	Başlangıç	384,0 ± 4,700	0,280 ± 0,003	24,3 ± 0,849
	4°C (6. Ay)	409,0 ± 4,279	0,427 ± 0,013	28,3 ± 1,480

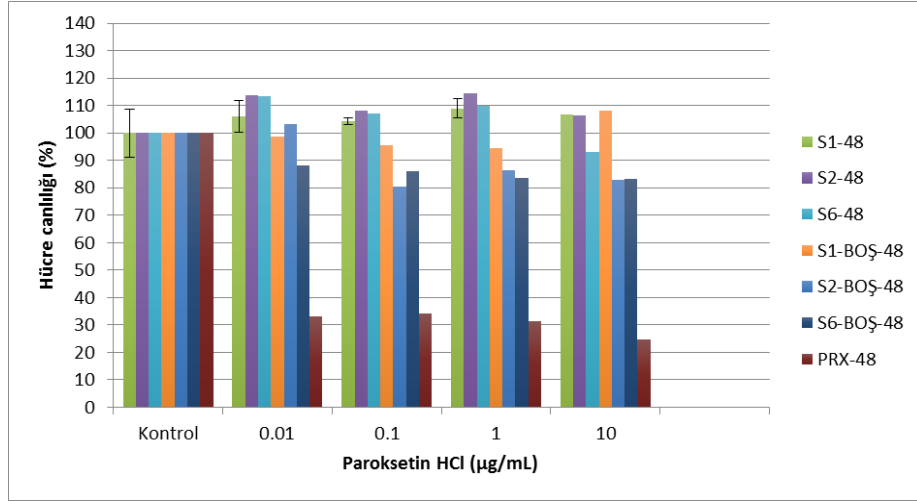
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.7.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

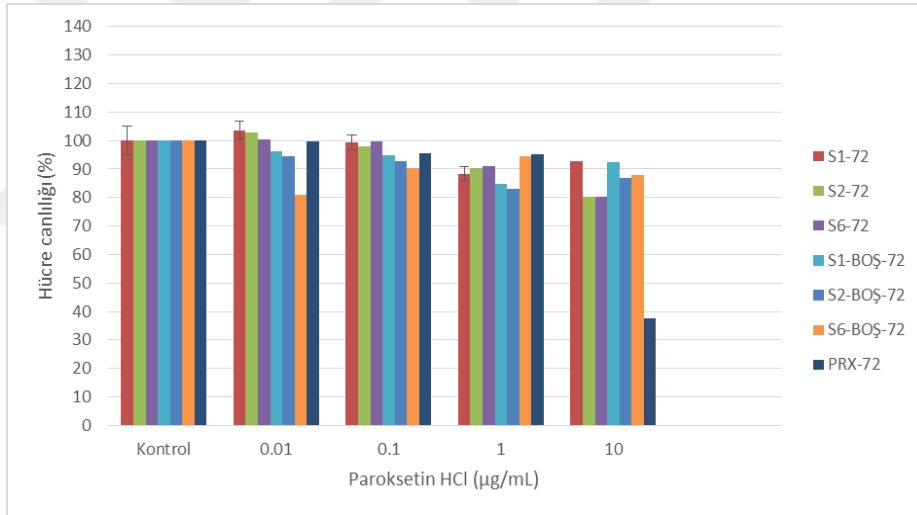
Bölüm 2.2.10.2’de anlatıldığı şekilde hücre canlılığının belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite üzerine yapılan çalışmaların sonuçları Şekil 3.26 - Şekil 3.28’de verilmiştir.



Şekil 3.26. Caco-2 hücre hattında saf paroksetin, boş nanopartikül formülasyonları ve S1, S2, S6 kodlu nanopartikül formülasyonlarının 24 saatlik inkübasyonu sonundaki sitotoksik etkileri.



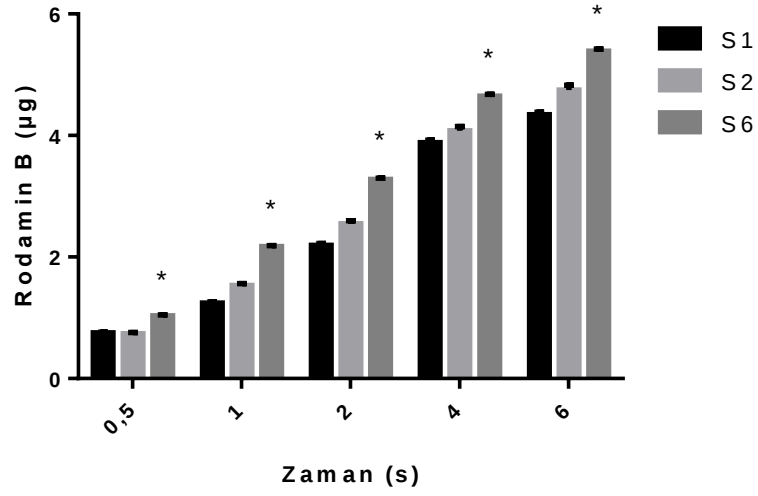
Şekil 3.27. Caco-2 hücre hattında saf paroksetin, boş nanopartikül formülasyonları ve S1, S2, S6 kodlu nanopartikül formülasyonlarının 48 saatlik inkübasyonu sonundaki sitotoksik etkileri.



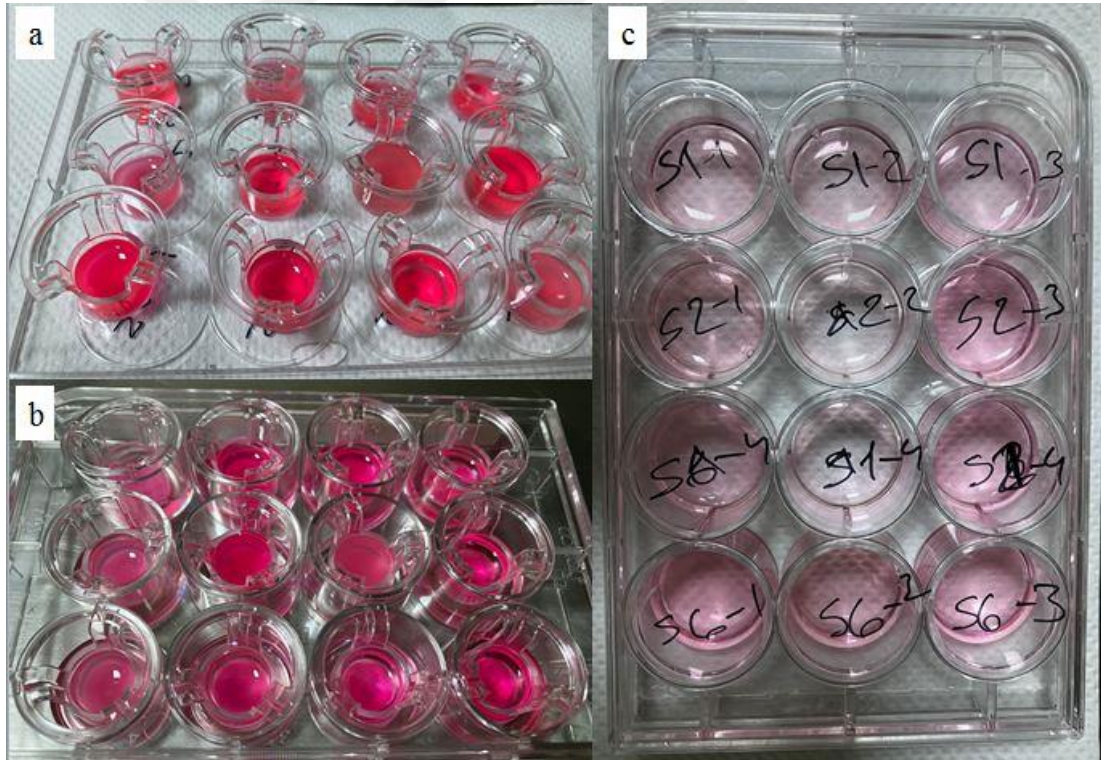
Şekil 3.28. Caco-2 hücre hattında saf paroksetin, boş nanopartikül formülasyonları ve S1, S2, S6 kodlu nanopartikül formülasyonlarının 72 saatlik inkübasyonu sonundaki sitotoksik etkileri.

3.7.2. Permeabilite Çalışmaları

Permeabilite çalışmaları Bölüm 2.2.10.3'te açıklandığı biçimde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.29'da, permeasyon çalışmasına ait görüntüler Şekil 3.30'da sunulmuştur.



Şekil 3.29. Rodamin B yüklü nanopartiküllerin Caco-2 hücre hattında permeasyon verilerine ait grafik.



Şekil 3.30. Rodamin B yüklü nanopartiküllerin Caco-2 hücre hattında permeasyon çalışmasına ait görüntüler (a:Rodamin B yüklü nanopartikül içeren Transwell® insert, b: Akseptör bölge üstünde Transwell® insert, c: permeabilite çalışma sonucunda alt bölgeye geçebilen Rodamin B yüklü nanopartikül).

4. TARTIŞMA

Tezin bu bölümünde, tez çalışması boyunca yürütülen deneylerin ve bu deneylerden elde edilen verilerin değerlendirmesi yapılacak ve sonuçlar literatür karşılaştırmalarıyla tartışılacaktır.

4.1. Paroksetin Hidroklorürün Özelliklerine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Saf paroksetin hidroklorürün DSC analiziyle elde edilen ve Şekil 3.5'te sunulan termogramında etkin maddemizin yaklaşık 120°C'de ekzotermik tepe noktası verdiği ve bu pikin paroksetinin erime noktası ile (Germann ve ark., 2013) ve literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Silva ve ark., 2021).

Bölüm 2.2.2'de açıklandığı gibi paroksetin hidroklorürün miktar tayini için uygun yöntem olarak UV-görünür Spektrofotometresi ile analiz yöntemi seçilmiştir. Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 PBS ortamlarında maksimum absorbands gösterdiği spesifik dalga boyu (λ_{max}) sırasıyla Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de gösterildiği gibi 293 nm ve 294 nm bulunmuştur. Elde edilen dalga boyları literatür ile uyumlu bulunmuştur (AlKandari, 2022; Parekh ve Mashru, 2020; Ravisankar ve ark., 2016; Syed ve ark., 2010). Paroksetin hidroklorürün stok çözeltileri 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerin her birinden gerekli seyreltmeler yapılarak 10-90 µg/mL aralığında konsantrasyonlarda 10'ar birimlik artışlarla 9 standart çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak yapılan analiz sonucu ölçülen absorbands değerleri kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak yapılan paralel analizlerle seçilen analitik (miktar tayini) prosedürün validasyonunun değerlendirilmesi amacıyla ICH Q2R1 kılavuzu doğrultusunda; seçicilik, doğrusallık ve aralığı, kesinlik, doğruluk ve geri elde, tayin ve teşhis sınırı değişkenleri incelenmiştir.

Doğrusallık ve aralığını belirlemek amacıyla; paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu ortamlarında elde edilen kalibrasyon denklemlerine ait bilgiler Çizelge 3.1’ de verilmiştir. Determinasyon katsayıları saf su ve pH 6,4 fosfat tamponlu ortamlar için sırasıyla 1 ve 0,9998 olarak bulunmuştur. Değerlerin 1’ e yakın olması konsantrasyon ile ölçülen absorbands arasında doğrusal bir ilişki olduğunu ve elde edilen verilerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

Doğruluk ve geri eldenin değerlendirilmesi için yapılan çalışmaların verileri Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’te sunulmuştur. % bağıl standart sapma değerleri saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu ortamlarının her ikisi için de %2’nin altında çıkmıştır. Bu da kalibrasyon denklemi ile hesaplanan sonuçların doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Kesinlik; tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik parametreleri ile değerlendirilmiştir. Saf su ve pH 6,4 fosfat tamponu ortamlarının her ikisi için de tekrarlanabilirlik (Çizelge 3.5 – Çizelge 3.6) ve ara kesinlik (Çizelge 3.7 - Çizelge 3.8) % bağıl standart sapma değerleri %2’nin altında bulunmuştur. Bu da yöntemin kesin sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Çalışmamızda kullanılan etkin madde ve yardımcı maddelerin her iki ortamdaki UV spektrumlarının çakışmaması analitik yöntemin etkin maddeye özgünlüğünü kanıtlamaktadır.

Son olarak teşhis ve tayin sınırları her iki ortam için de hesaplanmıştır. Bulunan değerlerin (Çizelge 3.9) kalibrasyon denklemini belirlemek amacıyla seçilen en düşük konsantrasyon değeri olan 10 µg/mL’nin altında çıkması kalibrasyon aralığının etkin madde tayininde uygun olduğunu göstermektedir.

Analitik yöntemin validasyon parametreleri değerlendirildiğinde seçilen yöntemin paroksetin hidroklorür için her iki ortamda da güvenilir, kesin ve doğru sonuçlar verdiği görülmüştür.

4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Dünyada en yaygın görülen mental hastalık olan ve en fazla yeti kaybına neden olan depresyon; sadece duygusal açıdan kişinin yaşam kalitesini düşürmekle kalmayıp, başka ruhsal hastalıklara, kalp ve diyabet gibi bedensel hastalıklara da zemin hazırlamakta ve hatta kişiyi intihara sürüklemektedir (DSÖ, 2017; Kaur ve ark.,2015; Trevino ve ark., 2020). Depresyonlu bireylerin tedavisi hem ikincil sağlık sorunlarının yaşanma olasılığını düşürmekte hem de bireylere daha iyi bir yaşam sunmakta, böylece sağlık sistemi üzerindeki yükü azaltmaktadır. Günümüzde antidepresan ilaçlarla tedavi oral olarak sürdürülmektedir. Ancak depresyonla mücadele eden hastaların, oral antidepresan tedavisinde geç yanıt almaları nedeniyle yaklaşık olarak %50'sinin tedavinin ilk üç ayında ilaçlarını bıraktıkları tahmin edilmektedir (Blair ve ark., 2009).

Depresyon tedavisini güç kılan ana etken KBB'nin varlığıdır. KBB, tek sıralı beyin endotel hücreleri ve bu hücreler arasındaki sıkı bağlantılardan meydana gelmektedir (Kuo ve Wang, 2016). KBB, pek çok molekül için mekanik ve fizyolojik bir engel teşkil ederek beyin homeostazını sağlamaktadır (Şengel-Türk ve ark., 2007, Serlin ve ark., 2015). Büyük molekül ağırlıklı ve hidrofilik moleküllerin beyne geçişi seçici geçirgen yapıdaki KBB nedeniyle oldukça düşükken (Patel ve ark., 2012), düşük molekül ağırlıklı ve lipofilik moleküller transmembran difüzyonla KBB'den geçebilmektedir (Zeiadeh ve ark., 2018). Büyük moleküllerin neredeyse tamamının, küçük moleküllerin ise %98'inden fazlasının KBB'den geçemediği tahmin edilmektedir (Zeiadeh ve ark., 2018). Bu da ilaçların beyne ulaşan miktarını düşürmektedir. Etkin bir tedavi sağlayabilmek amacıyla biyoyararlanımı artırmak gerekmektedir. Bu amaçla girişimsel ve girişimsel olmayan yöntemler uygulanmaktadır (Khan ve ark., 2017; Choudhari ve ark., 2021; Wilson, 2019). KBB varlığı nedeniyle beyne ilacın doğrudan ulaştırılabilmesi intraserebral veya intraparenkimal uygulama gibi girişimsel yöntemler gerektirmektedir. Ancak bu yöntemler oldukça pahalı ve riskli olduğundan tercih edilmemektedir. İntranazal uygulama ise; IV ve oral yollara kıyasla beyne doğrudan erişim sağlaması ile karşımıza çıkmakta, ayrıca girişimsel olmaması nedeniyle tercih edilmektedir (Boche

ve Pokharkar, 2017). Hızlı etki başlangıcı, sistemik yan etki riskinin düşük olması, karaciğerde ilk geçiş etkisinden kaçınması, biyoyararlanımın periferik uygulamaya göre daha yüksek olması, hasta uyuncu gibi avantajlar sunan intranasal uygulama nörolojik hastalıkların tedavisinde araştırmacılar için gelecek vaat eden bir çalışma konusu sunmaktadır (Aderibigbe, 2018; Patel ve ark., 2012).

Çalışmamızda model etkin madde olarak, antidepresan bir molekül olan bir selektif serotonin geri alım inhibitörü olan paroksetin hidroklorür seçilmiştir. Paroksetin hidroklorür, majör hepatik metabolizmaya uğraması nedeniyle düşük biyoyararlanıma sahip (tek dozda %50' nin altında), suda çözünürlüğü 5,4 mg/mL, partisyon katsayısı 3,95 olan, lipofilik amin yapıda bir moleküldür (Germann ve ark., 2013; Thakkar ve ark, 2021; Yüksel, 2007).

Burundan beyne ilaç taşınması için pek çok farklı yapıda ilaç taşıyıcı sistem kullanılmaktadır. Bunların içinde polimer ve lipit bazlı nanopartiküler sistemler sağladıkları pek çok avantaj nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda depresyon tedavisi için burundan beyne paroksetin hidroklorür taşınması amacıyla lesitin-kitosan ve PLGA/lesitin/kitosan bazlı nanopartiküler sistemler hazırlanması planlanmıştır.

Lipit kaplı polimerik nanopartiküler sistemlerin konvansiyonel partiküler sistemlere nazaran nazal boşlukta daha uzun süre kalmaları, daha yüksek penetrasyon ve daha iyi stabilite göstermeleri gibi avantajlar sunmalarından dolayı çalışmamızda lipit kaplı polimerik sistemlerle çalışılmıştır (Rassu ve ark., 2016).

Pozitif yüke sahip olduğunu bildiğimiz kitosan ile kaplanmış formülasyonlar nazal membrandaki negatif yüklü münin ile etkileşime geçerek mukozada kalış süresi uzadığı ve kitosanın sıkı bağlantıları geri dönüşümlü olarak geçici bir süreliğine açmasından dolayı çalışmamızda polimerik materyal olarak kitosan tercih edilmiştir.

Kitosan; biyobozunur, biyoyumlu, pozitif yüke sahip, toksik olmayan, mukoadhezif bir doğal polimerdir. Alkali ve nötral pH değerlerinde çözünmeyen kitosan, asidik pH'larda çözünmektedir (pKa 6,3) (Rassu ve ark., 2016). Mukusun içeriğindeki müsin (hayati polimerik, viskoelastik ve koruyucu bileşen) negatif yüklü olduğundan; pozitif yüklü nanopartiküller ile elektrostatik etkileşime girmektedir. Bu da lipid/kitosan nanopartiküllerin mukoadheziv özelliklerini ve dolayısıyla etkin madde salım süresini uzatabilmek için epitel yüzeyde kalma süresini artırmaktadır (Alkoholief, 2019). Ayrıca kitosan, nazal boşlukta bulunan suyu absorbe ederek jel benzeri bir yapı oluşturmakta, böylece mukozada kalış süresini artırmaktadır. Bu özelliklerinin yanı sıra sıkı bağlantıları geri dönüşümlü açarak ekstrasellüler taşınmayı artırmaktadır. Kitosanın molekül ağırlığındaki artış müsin tabakasına penetrasyonunu, deasetilasyon derecesindeki artış ise pozitif yük yoğunluğunu artırmaktadır. Bütün bunlar kitosanın mukoadhezif özelliğini artırmaktadır (Rassu ve ark., 2016). Böylece beyne ulaşan ilaç miktarında artış beklenmektedir (Tong ve ark., 2017).

Lesitin, biyoyumlu ve güvenilir, fosfolipid karışımından oluşan bir yardımcı maddedir. Pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü lesitin arasında iyonik jelleşme yöntemiyle kendiliğinden nanopartiküller oluşmaktadır (Uppuluri ve ark., 2021). Lesitin-kitosan nanopartiküller, enkapsüle edilen etkin maddenin dışarı sızmasının engellediği ve yüksek enkapsülasyon etkinliğinin sağlandığı başarılı sonuçlar vermektedir. Ayrıca kitosan ile kaplanan lesitin nanopartiküller etkin maddenin salımını kontrol etme ve daha iyi fizikokimyasal stabilite sunma avantajlarını sağlamaktadır (Valencia ve ark., 2021a). Bu nedenle çalışmamızda lesitin-kitosan nanopartiküller içerisinde etkin maddemizin enkapsüle edilmesi tercih edilmiştir.

4.2.1. Kitosan Bazlı Nanopartikül Formülasyonların Değerlendirilmesi

Polisakkarit ve lipid bazlı sistemler biyoyumlulukları, biyoparçalanabilirlikleri ve güvenli olmaları nedeniyle nanopartiküllerin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilmektedirler. Polisakkarit-lipid bazlı sistemlere iyi bir örnek oluşturan lesitin-

kitosan bazlı nanopartiküller aracılığı ile hem lipidik sistemlerin stabilitesi artırılmakta hem de katyonik yüklü kitosan varlığı sisteme mukoadhezif özellik kazandırmaktadır (Sonvico ve ark., 2006). Elde edilen bu özellik ise burundan beyne ilaç taşıma için önemli bir üstünlük oluşturmaktadır.

Literatürde, polimerik nanopartiküler sistemlerin üretimine yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde pekçok farklı yöntemin bulunduğu görülmektedir. Nazal yoldan beyne hedeflendirilen polimerik nanopartiküler sistemlerin üretiminde çoğunlukla iyonik jelleşme, emülsiyon/çözücü buharlaştırma, emülsiyon çapraz bağlama ve püskürterek kurutma yöntemleri kullanılmaktadır (Casettari ve Illum, 2014; Wang ve ark., 2008; Wilson ve ark., 2021). Çalışmamızda, lipit-kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlarının üretiminde literatürlerde belirtilen ve iyi bilinen iyonik jelleşme yöntemi kullanılmıştır. Nanopartiküllerin oluşumunda pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü lesitin çapraz bağlanması anahtar rol üstlenmiştir.

Önformülasyon çalışmalarında kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlarının üretiminde paroksetin hidroklorürün ilk olarak lesitin çözeltisinde mi yoksa DMA kitosan çözeltisinde mi çözünmesinin daha iyi sonuç vereceği araştırılmış ve paroksetin hidroklorürün lesitin çözeltisine karıştırıldıktan sonra DMA kitosan çözeltisine damla damla ilave edilmesi ile daha iyi sonuç elde edilmiştir. Formülasyonların üretimine bu şekilde devam edilmiş ve F1 kodlu formülasyon kıyaslamalarda kullanılmamıştır.

Çalışmada öncelikle kullanılan farklı etkin madde miktarlarının elde edilen nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla; 1, 2 ve 5 mg paroksetin hidroklorür yüklü nanopartiküller üretilmiş ve sonuçlar Çizelge 3.10'da verilmiştir. Artan paroksetin hidroklorür miktarının etkin maddenin pozitif yükü nedeniyle kitosan ve lesitin arasındaki çapraz bağlanmayı etkilediği ve partikül büyüklüğünün önemli ölçüde düşmesine neden olduğu görülmüştür. Bunun yanında 1 mg etkin madde kullanıldığında artan lesitin-kitosan etkileşimleri nedeniyle hem üretim verimi artmış hem de etkin maddenin enkapsülasyon etkinliği yükselmiştir.

Formülasyonların hazırlanması sırasında kullanılan L:K oranının nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla 5:1, 10:1, 20:1 ve 40:1 L:K oranlarında üretimler yapılmış, sonuçlar Çizelge 3.11’de sunulmuştur. L:K oranının enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisi incelendiğinde enkapsülasyon etkinliğinin %25,677 ile %14,571 arasında değiştiği ve lesitin oranı 10:1’den 40:1’e doğru arttıkça azaldığı görülmüştür. Hidrofilik özellikli paroksetin hidroklorürün enkapsülasyon etkinliğindeki bu azalmanın sistemin artan hidrofobisitesine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunun yanında kullanılan en düşük L:K oranı olan 5:1 oranında kitosanın (F12 kodlu formülasyon) yeteri kadar çapraz bağlanamaması sonucu nanopartikül oluşumu sağlanamamıştır. Diğer yandan artan lesitin oranına karşılık zeta potansiyel değerlerinde önemli bir değişiklik olmazken, çekirdekteki lesitin miktarının artışına bağlı olarak partikül büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur (Hafner ve ark., 2009; Sonvico ve ark., 2006).

Çalışmamızda, etkin madde ve L:K oranı sabit tutulup, DMA kitosan çözeltisi üzerine su ve pH 6,4 fosfat tamponu gibi farklı iki ortam ilave edilip ortamın final pH’sı 6,4’e ayarlandığında bulunan sonuçlar Çizelge 3.12’de yer almaktadır. pH 6,4 fosfat tamponlu ortamda %73,686 enkapsülasyon etkinliği elde edilirken, saf su ortam pH’sı değiştirildiğinde etkin maddenin neredeyse hiç (%2) enkapsüle edilmediği gözlenmiştir. Ayrıca pH 6,4 fosfat tamponlu ve saf su ortamlarında sırasıyla 122,0 ve 337,7 nm partikül büyüklüğünde nanopartiküller elde edilmiştir. Ortamın enkapsülasyon etkinliği ve partikül büyüklüğü üzerinde önemli derecede etkisi olduğu gözlenmiştir.

Paroksetin hidroklorürün sudaki çözünürlüğünün pH’ya bağımlı olduğu bilgisine dayalı olarak dispersiyon ortamı pH’sının paroksetin hidroklorür yüklü nanopartiküller üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla dispersiyon ortamının pH’sı 3 farklı değere ayarlanmıştır. Paroksetin hidroklorürün çözünürlüğünün pH arttıkça önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Germann ve ark., 2013; Yang ve ark., 2018). Bu nedenle 1 mg Paroksetin hidroklorür kullanılarak DMA kitosan çözeltisi üzerine

ilave edilen pH 6,4 fosfat tamponlu dispersiyon ortamının pH'sı 5,5, 6,5 ve 7,5'e ayarlanarak paroksetin hidroklorürün dispersiyon ortamındaki çözünürlüğünün azaltılması ve böylece enkapsülasyon etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır. Beklenildiği üzere paroksetin hidroklorürün enkapsülasyon etkinliği pH 5,5'ten 6,5'e kadar artırıldığında %1,044'den %55,535'e yükselmiş ancak pH'nın daha fazla artırılması enkapsülasyon etkinliğinde düşüşe yol açmıştır. Bunun yanında her üç nanopartikül formülasyonunun da zeta potansiyeli, kullanılan pH değerinin kitosanın izoelektrik noktasının üzerinde olması ve kitosanın azalan pozitif yükü nedeniyle negatif bulunmuştur.

Yapılan değerlendirmeler neticesinde hazırlanan kitosan bazlı nanopartikül formülasyonları içinde en iyi sonuçlar F6 kodlu formülasyona ait çıkmıştır. 2 mg etkin madde, 20:1 L:K oranı, pH 6,4 fosfat tamponlu dispersiyon ortamında %73,686 oranında enkapsülasyon etkinliğine sahip, $122,0 \pm 1,94$ nm büyüklüğünde nanopartiküller üretilmiştir. Formülasyonlarda dispersiyon ortamının pH'sı nedeniyle negatif yüzey yüküne sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Nazal mukozada münin ile etkileşime geçebilecek pozitif yüzey yüklü nanopartiküller üretebilmek için farklı bir polimer arayışına geçilmiştir.

4.2.2. PLGA Nanopartikül Formülasyonların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda hem enkapsülasyon etkinliğini artırmak hem de pozitif yüzey yüklü nanopartiküller elde edebilmek amacıyla sentetik bir polimer olan PLGA (M.A.:30-60 kDa, 50:50) ile nanopartiküllerin hazırlanmasına karar verilmiştir. PLGA, laktik ve glikolik asit bileşiminden oluşan hidrofobik bir sentetik polimerdir. FDA tarafından onaylanmış, biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, güvenilirliği kanıtlanmış olan bu polimer, polimerik nanopartikül üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Pinto ve ark., 2022). Farklı özellikteki etkin maddelerin enkapsülasyonuna izin veren, nispeten basit ve son ürün özelliklerinin modifiye edilebildiği üretim yolları ile nanopartiküler sistemlerin hazırlanması için farmasötik alanda sıklıkla araştırılmaktadır.

Toksik olmaması ve bozunma ürünleri olan laktik ve glikolik asit monomerlerinin vücutta Krebs döngüsü ile metabolize edilmesi de PLGA'yı nanopartikül üretiminde en çok tercih edilen polimerlerden biri yapmaktadır (Pola ve ark., 2019).

PLGA nanopartiküller çözücü yer değiştirmesi, emülsiyon buharlaştırma, nanopresipitasyon, emülsiyon difüzyonu, tuzla çökeltme gibi değişik yöntemlerle üretilmektedir (Gomes ve ark., 2011; Pinto ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2013). Çalışmamızda PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için Gomes ve ark. (2011) tarafından uygulanan çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. S/Y/S tipi çift emülsiyon oluşturup çözücü buharlaştırma metoduyla paroksetin hidroklorür yüklü PLGA bazlı nanopartiküller elde edilmiştir. Emülsiyon oluşturma sırasında yüzey aktif madde olarak PVA kullanımı stabilizan görevi görmektedir. Ayrıca koalesansı önleyerek partikül büyüklüğünü düşürmektedir. Partikül büyüklüğünü azaltmada önemli bir nokta da sekonder emülsiyon oluşturma süresidir. Sürenin uzatılması partikül büyüklüğünü ve PDI'yi azaltmaktadır (Zhang ve ark., 2013).

PLGA nanopartiküllerin yanı sıra PLGA/lesitin nanopartiküllerin üretiminde çift emülsiyonun yağ fazına PLGA ile birlikte lesitin, PLGA/lesitin/kitosan nanopartiküller üretilirken ise çift emülsiyonun dış su fazına belirli konsantrasyonda kitosan eklenmiştir. Kitosanın amino grubunun protonasyonu dolayısıyla katyonik doğası ve pH-duyarlı özelliğe sahip olması, PLGA nanopartiküllerin kitosan kaplama ile hem hücre alımının hem de stabilitesinin artırılmasını sağlamaktadır (Pola ve ark., 2019). PLGA nanopartiküller negatif yüzey yüküne sahip oldukları için (Liu ve ark., 2021a) partikülleri kitosan ile kaplama tercih edilmiştir.

Primer emülsiyon yağ fazı bileşenindeki değişikliğin etkisini incelemek amacıyla PLGA ve PLGA-lesitin hibrit nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.14'te yer almaktadır. S1 kodlu formülasyon ile %59,669 enkapsülasyon etkinliğine, -3,95 mV yüzey yüküne ve 0,156 PDI değerine sahip 275,5 nm partikül büyüklüğünde nanopartiküller elde edilmiştir. Üretim sonucu

ulaşılan partikül büyüklüğü AlKandari'nin (2022) yaptığı çalışma sonucu elde ettiği bulguya yakınlık göstermektedir. S3 kodlu formülasyon ile yapıya lesitin katıldığında ise; partikül büyüklüğünün 248,9 nm'ye düştüğü, zeta potansiyelin önemli ölçüde arttığı, enkapsülasyon etkinliğinin ise %59,669'dan %80,850'ye yükseldiği görülmüştür. Partikül büyüklüğündeki ufak düşüşün lesitin yüzey etkin madde özelliğinden kaynaklandığı düşünölmektedir.

PLGA-lesitin hibrit nanopartikül formülasyonlarda dış su fazı pH değerleri değiştirilerek bunun nanopartiküller üzerindeki etkisi araştırılmış ve bu amaçla pH 6,0, 7,5 ve 10,0'a ayarlanmıştır. pH'daki artışla birlikte enkapsülasyon etkinliği %88,486'dan %80,850 ve %75,006' ya düşmüştür. Bu sonuçlara göre formülasyon çalışmalarına enkapsülasyon etkinliği daha yüksek olan S2 formülasyonu üzerinden devam edilmiştir.

Negatif yüzey yüküne sahip PLGA-lesitin hibrit nanopartiküllerin müsin ile etkileşimini artırabilmek amacıyla nanopartiküllere pozitif yüzey yükü kazandırabilmek için kitosan ile kaplama yapılmak istenmiştir. Kullanılan kitosan konsantrasyonu ve molekül ağırlığının nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla düşük ve yüksek molekül ağırlıklı kitosanlar farklı konsantrasyonlarda (%0,1-0,2) sekonder emülsiyon dış su fazı bileşimine dahil edilerek kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül üretimleri yapılmıştır.

Kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartiküller ile PLGA ve PLGA-lesitin hibrit nanopartiküller karşılaştırıldığında partikül büyüklüğünün arttığı gözlenmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin yüzey yükünü ifade eden zeta potansiyeli de negatif değerlerden pozitive dönmüştür. Bu veriler başka çalışmalarda da ifade edildiği üzere kitosan ile kaplamanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (Alshetaili., 2021).

DMA kitosan kullanılan S5 ve S6 kodlu formülasyonlarda kitosan konsantrasyonunun %0,1'den %0,2'ye çıkarılması ile enkapsülasyon etkinliği %71,07'den %77,144'e, zeta potansiyeli 21,8 mV'tan 23,4 mV'a, partikül büyüklüğü

ise 283,2 nm'den 336,2 nm'ye çıkmıştır. YMA kitosan kullanılan S7 ve S8 kodlu formülasyonlarda kitosan konsantrasyonunun %0,1'den %0,2'ye çıkarılması sonucunda ise enkapsülasyon etkinliği %64,354'ten %67,503'e, zeta potansiyeli 24,7 mV'tan 29,4 mV'a, partikül büyüklüğü de 354,5 nm'den 474,7 nm'ye çıkmıştır. Kullanılan kitosanın molekül ağırlığı ve konsantrasyonundaki artışla birlikte partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli değerinde artış gözlenmesi, kitosanın pozitif yüklü amino grubu ile PLGA'nın negatif yüklü karboksil grubu arasında hidrojen bağı oluşumu sonucunda kitosanın PLGA nanopartiküller üzerine adsorbe olduğunu, yani literatürle uyumlu olarak kitosan ile kaplamanın başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir (Musumeci ve ark.,2014; Pitchika ve Sahoo, 2022; Suri ve ark., 2021). Kullanılan kitosan konsantrasyonundaki artış sadece zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğünde değil aynı zamanda PDI değerinde de artışa neden olmuştur. Bu durum Pandit ve ark. (2017) bulduğu sonuçlarla uyum göstermektedir. Ancak %0,2 konsantrasyonda kitosan kullanılan S6 (DMA) ve S8 (YMA) kodlu formülasyonlar karşılaştırıldığında enkapsülasyon etkinliğinin DMA kitosan kullanılan S6 kodlu formülasyonda YMA kitosan kullanılan S8 kodlu formülasyona kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. PLGA içeren organik fazın viskozitesi etkin maddenin sulu faza göçünü engelleyerek enkapsülasyon etkinliğini artırmaktadır. Sulu fazda PVA ile birlikte kitosanın da bulunması bu fazın viskozitesini artırmakta, bu da iki fazın ara yüzeyinde etkin madde yüklenmesini ortadan kaldırmaktadır. Böylece enkapsülasyon verimliliği artmaktadır (Alshememry ve ark., 2022). Formülasyonların PDI değerleri partikül büyüklüğü dağılımının uygun olduğunu göstermektedir. Bulunan sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir (Alshetali, 2021; Pitchika ve Sahoo, 2022). Kitosan içeren sulu fazın artan viskozitesi nedeniyle kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartiküllerin hidrodinamik çapı artmış olabilir (Alshememry ve ark., 2022). Enkapsülasyon etkinliği ve zeta potansiyel değerindeki artış istenen bir özellik olmakla birlikte, partikül büyüklüğündeki artış arzu edilmemektedir. Bütün bunlar göz önünde bulundurulduğunda S kodlu formülasyonlar içerisinde S1, S2 ve S6 kodlu formülasyonlar ideal formülasyonlar olarak öne çıkmaktadır.

S8 kodlu formülasyon hariç hazırlanan bütün kitosan bazlı ve PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlarında PDI değeri 0,3'ten düşük çıkmıştır. PDI değerinin 0,3'ten düşük olması formülasyonun monodispers boyut dağılımı gösterdiğinin kanıtıdır (Akel ve ark., 2021).

10-300 nm aralığında partikül büyüklüğündeki çeşitli nanotaşıyıcı sistemler olfaktör olarak aracılığıyla beyne çeşitli moleküllerin ulaştırılması amacıyla tasarlanmaktadır (Vitorino ve ark., 2019). Hazırladığımız nanopartikül formülasyonlarından ileriki çalışmalarda kullanılacak olan S1 ve S2 kodlu formülasyonların partikül büyüklükleri 300 nm'nin altında bulunmuştur. S6 formülasyonunun partikül büyüklüğü ise 336 nm'dir.

4.3. Morfolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda formülasyonların enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli ve partikül büyüklüğü gibi özellikleri göz önüne alındığında S1, S2 ve S6 kodlu formülasyonlar seçilmiş ve TEM analizleri bu formülasyonlarda yapılmıştır. Seçilen optimum formülasyonlara ait TEM görüntüleri incelendiğinde; pürüzsüz, küresel ve agregat olmamış partiküllerin elde edildiği görülmektedir (Şekil 3.8). Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı ile ölçülen partikül büyüklükleri ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

TEM görüntülerinde, S1 kodlu PLGA bazlı nanopartiküllerde daha küresel, pürüzsüz bir yüzey elde edilirken, monodispers denilebilecek bir partikül dağılımı gözlenmiştir. S2 kodlu lipid kaplı formülasyonlarda en dıştaki lipid tabaka koyu renkli çerper şeklinde görüntülenmiştir. S6 kodlu kitosan kaplı nanopartikül formülasyonların ise kitosan varlığına bağlı olarak daha heterojen bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir. TEM görüntülerinde kitosan varlığı koyu renkli bir çerper şeklinde görüntülenmiştir. Elde edilen sonuçlar literatürler ile uyumlu bulunmuştur (Joshi ve ark., 2016; Sahu ve ark., 2021).

4.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Bulgularının Değerlendirilmesi

DSC sonuçlarının değerlendirmesi, nanotaşıyıcı bir sistemde her bir bileşenin endotermik ve ekzotermik mekanizmalarla fizikokimyasal kimliğinin oluşturulmasını sağlamaktadır. Nanotaşıyıcı sistem içerisinde yer alan her bir bileşenin ayrı ayrı ve nanotaşıyıcı sistemin bütününe termal analizi; ısı kapasitesi, erime, yeniden kristalleşme, gazdan arındırma ve ayrıştırma aşamalarını termal özelliklerdeki sapmalar ve benzerliklerle kıyaslayarak kalitatif tahmin yapabilmeyi sağlamaktadır (Sahu ve ark., 2021). Çalışmamızda kullanılan etkin maddemiz ile yardımcı maddeler arasında bir etkileşim varsa bunu tespit edebilmek için saf paroksetin hidroklorür, lesitin, kitosan, PVA, PLGA ve S6 kodlu kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül formülasyonunun DSC termogramları çekilmiş ve Bölüm 3.4 ve Bölüm 3.5.4’te verilmiştir. Kitosanın 71,39°C ve 228,30°C’de endotermik pik verdiği görülmektedir. Bu veri literatürle uyum göstermektedir (Sahu ve ark., 2021). PLGA’nın (50:50) 61,81°C’de endotermik pik verdiği görülmektedir. Çoğu biyopolimer gibi PLGA (50:50) da 31°C ve 53°C arasında camsı geçiş fazına sahiptir ve 200°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda bozunur. Raman ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada amorf PLGA polimerinin 37°C’de camsı geçiş sıcaklığı gösterdiğini belirtmişlerdir. Lesitin 160,53°C ve 185,63°C’de iki endotermik pik verdiği görülmektedir. Literatürlerde lesitin kesin bir erime noktası olmayan amorf bir madde olması nedeniyle belirgin bir endotermik veya ekzotermik pik vermediği söylenmektedir (Brad ve ark., 2017; Liu ve ark., 2009). PVA’nın 164,17°C ve 185,75°C’de iki endotermik pik verdiği görülmektedir. PVA’nın 185°C’de verdiği pik Chandrakala ve ark. (2012) verisi ile uyum göstermektedir. Kitosan ve PLGA’nın amin ve karboksil grupları arasındaki intermoleküler bağlar ve iyonik etkileşimleri güçlü olması nedeniyle üretilen nanopartiküllerde iki aşamalı bir bozunma beklenmektedir. Bu durum nanopartiküllerin optimum düzeyde termal stabilite ve enkapsülasyon sergilediğinin göstergesidir (Sahu ve ark., 2021). Paroksetin hidroklorüre ait erime pikinin S6 kodlu formülasyon termogramında görünmemesi, etkin madde ve yardımcı maddeler arasında bir etkileşim olmadığını, etkin maddenin matris bir yapı içerisinde homojen bir şekilde disperse edildiğini düşündürmektedir.

Bu durum diğer çalışmalarla uyum göstermektedir (Alshetaili, 2021; Joshi ve ark., 2016; Khater ve ark., 2021).

4.5. *İn Vitro* Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi

In vitro çözünme hızı analizi için diyaliz membran yöntemi seçilmiştir (Alshememry ve ark., 2022, Seju ve ark., 2011; Thakkar ve ark., 2021). *In vitro* çözünme hızı analizinde ilaç uygulama bölgesi olarak seçilen nazal boşluk pH'sına yakın olması için pH 6,4 fosfat tamponlu ortam seçilmiştir.

Hazırlanan paroksetin hidroklorür yüklü nanopartiküllerden salım hızı profilinin çalışmamızın amacına uygun olup olmadığını incelemek için saf paroksetin hidroklorür çözeltisi ile formülasyonlara ait çözünme hızı verileri karşılaştırılmıştır. Saf paroksetin hidroklorür çözeltisinin hızlı bir salım göstermesi beklenmektedir. Buna karşılık nanopartiküler sistemler içerisinde enkapsüle edilen etkin maddemizin ise daha yavaş ve uzun süreli bir salım profili çizmesi beklenmektedir.

Saf Paroksetin hidroklorür için pH 6,4 fosfat tamponlu ortamda *in vitro* çözünme hızı tayini yapıldığında, 2 saatte etkin maddemizin %56,5'inin, 6 saatte ise %65,8'inin çıktığı görülmüştür.

Kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlarında, formülasyonların fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkin madde miktarı, L:K oranı, dispersiyon ortamı pH'sı gibi incelenen faktörlerin değişiminin çözünme hızı üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Etkin madde miktarının etkisini değerlendirmek amacıyla üretilen F2, F3 ve F8 kodlu kitosan bazlı nanopartikül formülasyonlarından etkin madde çıkış hızı karşılaştırıldığında; 1 (F8) ve 2 (F3) mg paroksetin hidroklorür kullanıldığında çıkış hızı hemen hemen aynı ilerlerken (sırasıyla ilk 2 saatte %27,928 ve %27,489, 24. saatin sonunda %55,092 ve %47,021) 5 mg (F2) paroksetin hidroklorür kullanılan formülasyonda salım hızının oldukça düştüğü (ilk 2 saatte %13,111, 24. saatin sonunda %21,277) görülmektedir. L:K oranı değiştirilerek üretilen

nanopartiküllerin çözünme hızları karşılaştırıldığında 20:1 (F3) ve 40:1 (F4) L:K oranlarındaki formülasyonlar paralel bir şekilde sırasıyla ilk 2 saatte %27,489 ve %31,917 oranında, 24. saatin sonunda da %47,021 ve %52 oranında salım yaparken, 10:1 (F5) L:K oranında hazırlanan formülasyon ilk 2 saatte %22,501 oran ile diğerlerinde daha az salım yapmış sonrasında hızlanarak 24. saatin sonunda içerdiği etkin maddenin %67,035'ini salmıştır. pH 6,4 fosfat tamponlu dispersiyon ortamında hazırlanan F6 (pH 6,4) ve F10 (pH 7,5) kodlu nanopartikül formülasyonların çözünme hızı grafikleri ilk 1 saatte artış (sırasıyla %14,404 ve %44,448) ardından 2. saatte küçük bir düşüş (%13,372 ve %41,875) ve 6. saate doğru tekrar artış (%21,229 ve %54,572) göstermektedir. F6 ve F10 kodlu formülasyonların salım profilleri benzerlik göstermekle birlikte F6 kodlu formülasyonun salım oranı F10'a kıyasla oldukça düşüktür.

PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlarında, primer emülsiyon yağ fazı bileşeni ve sekonder emülsiyon dış su fazı bileşenindeki değişimlerin çözünme hızı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sadece PLGA (S1) ve PLGA ile birlikte lesitin içeren (S3) formülasyonlardan etkin madde salım profilleri benzerlik göstermektedir. PLGA ve PLGA-lesitin hibrit nanopartiküllerden paroksetin hidroklorür salım hızı sırasıyla ilk 6 saatte %68,187 ve %57,84, 24. saatin sonunda %72,968 ve %72,226 bulunmuştur. PLGA-lesitin hibrit nanopartiküllerde dıştaki lipid tabaka etkin maddenin açığa çıkmasında ilk 6 saatte bir bariyer etkisi yaratmış ve salım hızı PLGA bazlı nanopartiküllere göre ilk 6 saatte daha düşük bulunmuştur. İncelenen bir diğer parametre de kullanılan kitosanın molekül ağırlığı ve derişimi olmuştur. DMA kitosan içeren S5 (%0,1) ve S6 (%0,2) kodlu formülasyonlardan ilk 6 saatte sırasıyla %32,724 ve %24,956, 24. saatin sonuna doğru %85,078 ve %57,206 oranında paroksetin hidroklorür çıkışı gözlenmiştir. YMA kitosan içeren S7 (%0,1) ve S8 (%0,2) kodlu nanopartikül formülasyonlarında ise bu oranlar sırasıyla ilk 6 saatte %39,007 ve %34,875, 24. saatin sonunda %53,98 ve %51,647'dir. Formülasyonlarda kullanılan kitosan konsantrasyonundaki artışın etkin maddenin çıkış oranını azalttığı görülmüştür. Kitosan kaplı PLGA bazlı nanopartikül formülasyonları ile kaplanmamış nanopartikül formülasyonlarından paroksetin hidroklorür çözünme hızı grafikleri karşılaştırıldığında; kaplanmamış formülasyonlardan ilk 6 saatte hızlı bir

çıkış sonrası 24. saate doğru yavaşlama gözlenirken, kaplanmış formülasyonlardan çıkış hızı daha yavaş gerçekleşmekte ve 24. saatin sonuna doğru total salım oranı daha düşük seviyede kalmaktadır. Bu durum literatür ile uyum göstermektedir (Kaur ve ark., 2018). Kitosan ile kaplamanın, yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bir şekilde, formülasyonlardan başlangıçtaki hızlı salımı ortadan kaldırdığı; ek olarak kitosan kaplamanın varlığı ve formülasyondaki konsantrasyonunun artmasının 24 saatin sonunda total açığa çıkan etkin madde miktarını da düşürdüğü görülmektedir (Alshetali, 2021; Pandit ve ark., 2017).

Saf paroksetin hidroklorür ve PLGA / PLGA-lesitin hibrit nanopartikül salım profillerine kıyasla, kitosan içeren nanopartikül formülasyonlarından daha yavaş ve uzun süreli bir salım gerçekleşmektedir. De Lima ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada belirttikleri üzere kitosanın fiziksel bariyer görevi görmesi ve kitosan ile etkin madde arasında güçlü bir etkileşimin varlığı bu salım profilinin sergilenmesine neden olmaktadır.

Asidik ortamda kitosan amino grupları protonlanmış halde bulunduğu için genellikle kitosan kaplanmış nanopartiküllerde bu kitosan tabakası suda çözünmekte ve içte yer alan PLGA çekirdeğinden etkin maddenin difüzyonunu yavaşlatma yeteneğini kaybetmektedir (Chronopoulou ve ark., 2013; Liu ve ark., 2021a).

Salım kinetiklerinin değerlendirilmesi

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin kullanıldığı sistemlerde etkin madde salım mekanizmasında rol alan pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında polimer bileşimi, camsı geçiş sıcaklığı, ortalama molekül ağırlığı, pH, su absorpsiyonu, omurga hidrofilikliği yer almaktadır. Polimerden etkin madde çıkışı parçacık yüzeyinden desorpsiyon, polimerden difüzyon, polimer içerisindeki su dolu kanallardan geçiş ve polimerin erozyonu/bozunması/çözünmesi sonucu salınma gibi mekanizmalarla gerçekleşmektedir (AlKandari, 2022; Pandit ve ark., 2017).

Yaptığımız çalışmadan elde edilen çözünme hızı profilleri doğrusal olmadığından formülasyonları birbirleri ile kıyaslayabilmek için salım kinetikleri hesaplanmıştır. Hesaplanan kinetik verilerinden en yüksek r^2 ve en düşük RMS değerine sahip kinetik modelin formülasyon için en uygun model olduğu kabul edilmektedir. Çizelge 3.17 ve Çizelge 3.18’de yer alan veriler değerlendirilmiştir.

Kitosan bazlı nanopartiküllerin salım kinetiklerine ait r^2 değerleri incelenmiş, birbirine çok yakın r^2 değerleri elde edildiği için en düşük RMS değerine sahip kinetik model belirlenmiştir. “F” kodlu tüm formülasyonlarda Weibull kinetiğine uyum gözlenmiştir. Tüm formülasyonlarda şekil faktörü değerinin 0,75’ten küçük olması nedeniyle Fick difüzyon mekanizmasıyla salım gösterdikleri belirlenmiştir.

PLGA bazlı nanopartiküllerin salım kinetiklerine ait parametreler incelendiğinde; her bir formülasyonun farklı salım kinetiğine uyum gösterdiği belirlenmiştir. S1 ve S3 kodlu formülasyonlar Weibull kinetiğine, S5, S6 ve S8 kodlu formülasyonlar Higuchi kinetiğine, S7 kodlu formülasyonun Korsmeyer-Peppas kinetiğine uyum sağladığı belirlenmiştir.

Formülasyonlara kitosanın ilave edilmesi ile etkin maddenin difüzyonla çıkışını açıklayan kinetiklere uyum artmıştır.

Weibull kinetiğinde önemli bir parametre olan şekil faktörünün 1’den küçük olması başlangıçta hızlı bir salım sonrasında basit birinci derece eğri ile uyumlu hızda platoya ulaşıldığının bir kanıtı olabilir.

Higuchi kinetiğine uyum sağlayan formülasyonlar ise etkin maddenin matriks yapıdan salımının Fick difüzyon mekanizmasına uyduğunu göstermektedir.

4.6. *In vitro* Adhezyon Özelliğın Değerlendirilmesi

Tez çalışma konusu olarak burundan beyne ilaç uygulama amacıyla nanopartiküler formülasyonlar üretmek ve bunların analizlerini yapmak hedeflenmiştir. İlaç uygulama bölgesi olarak seçtiğimiz nazal boşlukta adhezif özelliğı sayesinde ilacın kalma süresinin artırılması dolayısıyla yüksek biyoyararlanım elde edilmek amaçlanmıştır. Üretilen formülasyonların amaçlanan hedefe ulaşp ulaşmadığının değerlendirilmesi için *in vitro* adhezyon analizleri yapılmıştır. Bu analizler iki yöntemle gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. Tekstür Analiz Cihazı ile Ölçüm

Tekstür Analiz cihazı ile adhezyon analizi mukoadhezyon özelliğın tayini için en sık kullanılan yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntemde temel prensip kopma kuvveti ve adhezyon işi olarak adlandırılan kuvvet-mesafe eğrisi altında kalan alanın ölçümüdür (Woetrz ve ark., 2013). Kopma kuvveti ve adhezyon işi ölçümü için en yaygın kullanılan cihazlar arasında yer alan Tekstür Analiz cihazı, diğer modifiye edilmiş yöntemlere kıyasla daha doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlamaktadır (Alaei ve Omidian, 2021). Bu nedenle formülasyonlarımızın adhezifliğinin tayininde bu yöntem seçilmiştir.

Çalışmamızda bu analiz gerçekleştirilirken mukoza yerine Whatman 42 filtre kağıdı kullanılmış ve çift taraflı bant yardımı ile mukoadhezyon rig'ine sabitlenmiştir. Alt tablaya yerleştirilip pH 6,4 fosfat tamponu ile ıslatılan liyofilize toz haldeki nanopartiküllere, cihazın üst kısmında yer alan müsin çözeltisi ile ıslatılmış Whatman 42 filtre kağıdı yapıştırılmış P/10 probu önceden belirlenmiş 0,98 N'luk kuvvet ile 180 saniye boyunca baskı uygulamış ve bu sürenin sonunda 1 mm/s hızla geri çekilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 3.19'da verilmiştir. Kopma kuvveti ve yapılan iş ne kadar büyükse formülasyonun adhezif özelliğı o kadar fazladır.

Beklendiği üzere kitosan miktarı F6 kodlu formülasyonda daha fazla olduğu için hem kopma kuvveti hem de adhezyon işi S kodlu formülasyonlardan daha yüksek çıkmıştır. PLGA bazlı nanopartikül fomülasyonlarında ise S1 en yüksek kopma kuvveti ile birlikte en düşük adhezyon işine sahipken, kitosan içeren S6 kodlu formülasyon adhezyon işi açısından kitosan içermeyen S2 kodlu formülasyona yakın bir sonuç vermiş; ancak kopma kuvveti daha düşük çıkmıştır. Bunun nedeninin liyofilizasyon sonucu agrege olan nanopartiküllerin homojen dağıtılamaması ve ıslatılamamasından kaynaklanan deneysel bir hata olduğu düşünülmektedir.

4.6.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Tekstür Analiz cihazı ile yapılan *in vitro* adhezif özellik tayinini desteklemek için yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem olan zeta potansiyeli ölçümü (indirekt metot) seçilmiştir. Takeuchi ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada hazırladıkları müsin süspansiyonlarını polimer çözeltileri (kitosan, karbopol) ile karıştırmış ve müsin partiküllerinin yüzey yükündeki değişimi ölçmüşlerdir. Kitosan ile muamele edilen müsin partiküllerin zeta potansiyelinde artış gözlenmiştir. Kitosanın konsantrasyon ve molekül ağırlığındaki artışın zeta potansiyeli artışını da beraberinde getirdiği gözlenmiştir.

Biz de çalışmamızda benzer bir yöntemle; belirli konsantrasyonda hazırlanan müsin çözeltisinde liyofilize toz haldeki nanopartikül formülasyonları disperse etmiş ve inkübatörde çalkalanmaya bırakılıp belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Çizelge 3.20’de verilmiştir. Kitosan kaplı PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlarında pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü müsin arasındaki adhesiv etkileşimler neticesinde kitosan kaplı nanopartiküllerin zeta potansiyelinde zamana bağlı olarak anlamlı bir değişim gerçekleşmesi beklenmiştir. Beklenen değişim S6 kodlu formülasyonda 2. saatin sonunda gerçekleşmiştir. Chatzitaki ve arkadaşları (2020) PLGA ve kitosan kaplı PLGA formülasyonlarının mukoadhezif özelliklerini tez çalışmamızda olduğu gibi partiküllerin müsin adsorpsiyon kapasitesi aracılığı ile değerlendirmişler ve

çalışmamıza paralel şekilde müsin varlığının kaplanmamış PLGA nanopartiküllerin zeta potansiyeli üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığını, buna karşılık kitosan kaplı PLGA nanopartiküllerin zeta potansiyelinde büyük bir değişiklik gerçekleştiğini göstermişlerdir. Bu durumu ise müsinin negatif yüklü sialik asit grupları ile kitosanın pozitif yüklü amin grupları arasındaki etkileşime bağlamışlardır.

Kitosan bazlı F kodlu formülasyonlarda da aynı şekilde zeta potansiyeli değerlerinde değişiklik gerçekleşmiştir. Akel ve ark. (2021) yaptıkları bir çalışmada indirekt metot ile zeta potansiyeli ölçümü yapmış ve pozitif yüzey yüküne sahip kitosan kaplı katı lipid nanopartiküllerin müsinin negatif yükünü pozitifize döndürdüğünü dolayısıyla etkileşimin varlığını kanıtlamışlardır. Negatif yüklü kaplanmamış katı lipid nanopartiküller ile PLGA nanopartiküllerin ise kitosan kaplı nanopartiküller kadar olmasa da müsin ile etkileşime geçtiğini ve yüzey yükünü azalttıklarını göstermişlerdir. Pozitif yüzey yüküne sahip kitosan kaplı nanopartiküllerle müsin arasında iyonik bağ oluşurken, negatif yüklü nanopartiküllerle müsin arasında elektrostatik etkileşimler gerçekleşmektedir. Elde ettiğimiz bulgular literatür ile uyum göstermektedir. Katı lipid nanopartiküllerin -46 mV luk zeta potansiyeli, PLGA nanopartiküllerin -16 mV'luk zeta potansiyelinden daha yüksek olduğundan müsin ile elektrostatik etkileşimleri PLGA nanopartiküllerden daha yüksek olması beklenmektedir ve önceki çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur (Akel ve ark., 2021).

4.7. Formülasyonların Stabilité Verilerinin İncelenmesi

Lesitin yapısı itibarıyla 25-40°C'de bozulduğu ve formülasyon oda sıcaklığında saklamaya uygun olmadığı için oda sıcaklığında stabilite çalışması yürütülmemiştir. 4°C' de yürütülen stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen zeta potansiyeli, PDI ve partikül büyüklüğü değerleri Çizelge 3.21'de verilmiştir. S1 kodlu formülasyonda partikül büyüklüğü azalırken, S2 ve S6 kodlu formülasyonlarda partikül büyüklüğü agregasyon nedeniyle artmıştır. Zeta potansiyeli değerinde S1 ve S2 kodlu formülasyonlarda düşme gözlenirken, S6 kodlu formülasyonda artış

gözlenmiştir. Kitosan kaplı nanopartiküllerde kitosanın biyoadheziv doğası, nem adsorbsiyonu ve şişme özelliği nedeniyle agregasyon sonucu partikül büyüklüğünde artış gözlenmiştir. Bulgular literatür ile uyum göstermektedir (Alshememry ve ark., 2022).

4.8. Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.8.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Bölüm 2.2.10.2’de anlatıldığı şekilde yürütülen sitotoksikite çalışmalarının bulguları Şekil 3.25 – Şekil 3.27’de sunulmuştur. MTT yöntemi ile saf etkin madde ve paroksetin yüklü nanopartikül formülasyonları ile bunların boş eşdeğerlerinin Caco-2 hücre hattındaki sitotoksik etkisi karşılaştırılmıştır. Daha uzun süreli etkinin tespit edilebilmesi için test süresi 72 saat olarak belirlenmiş ve 24., 48. ve 72. saatlerde hücre canlılıkları belirlenmiştir.

Paroksetin dozunun sitotoksikite üzerine etkisini belirlemek için 0,01-10 µg/mL aralığında farklı konsantrasyonlarda paroksetin hidroklorür ve buna eş değer miktarda nanopartiküller ile çalışılmıştır. Paroksetin hidroklorürün hücre canlılığını belirleme çalışmalarında 24. saatte doza bağlı bir sitotoksikite görülmemekle birlikte 48. ve 72. saatlerde doza bağlı sitotoksikite görülmüştür.

Analizde kullanılan tüm formülasyonların ve dozların test sonuçları 24., 48. ve 72. saatlerde hücre canlılığının %80’in altına inmediğini göstermiştir. Bu da belirlenen konsantrasyonlarda paroksetin içeren seçilen nanopartikül formülasyonlarının sitotoksik etkili olmadığını göstermektedir. Ayrıca boş nanopartikül formülasyonlarının uygulandığı hücrelerde canlılığın %80’in üzerinde sürdürülmesi formülasyonda kullanılan etkin madde dışındaki maddelerin toksik olmadığını göstermektedir (Joshi ve ark., 2016; Patel ve ark., 2019b). Elde edilen

veriler doğrultusunda geliştirilen formülasyonların paroksetin hidroklorürün nazal uygulaması için güvenli olduğu sonucuna varılmıştır (Karavasili ve ark., 2016).

4.8.2. Permeabilite Çalışmaları

Bölüm 2.2.10.3'te açıklandığı biçimde yürütülen permeabilite çalışmalarının bulguları Şekil 3.28 ve Şekil 3.29'da sunulmuştur. Nanopartiküllerin Caco-2 hücre hattından permeasyonunda zeta potansiyeli önemli bir parametredir. Pozitif yüzey yükü hücre zarı ile etkileşimi, dolayısıyla permeasyonu artırmaktadır. (de Lima ve ark., 2018; Shi ve ark., 2015).

Elde edilen bulgulara göre en yüksek permeasyonun S6 kodlu kitosan kaplı nanopartiküller aracılığıyla gerçekleştiği, bunu ise sırasıyla S2 kodlu lesitin kaplı ve S1 kodlu kaplanmamış formülasyonun takip ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar ise *in vitro* adezyon testleri ile paralellik göstermiştir.

PLGA nanopartiküllerin yüzeylerinin lipitlerle kaplanmasının, lipit kaplamanın hücresel membranlarla olan etkileşimi artırmasına bağlı olarak nanopartiküllerin hücresel alımını ve membranlardan geçişini artırdığı çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Bose ve ark., 2016). Çalışmamızda da daha önceki literatür verilerine uygun olarak lesitin kaplı S2 formülasyonunun kaplanmamış S1 formülasyonuna oranla daha fazla miktarda floresan maddenin Caco-2 hücre tabakasından geçişini sağladığı görülmüştür.

Diğer yandan incelenen tüm zaman noktalarında kitosan kaplı S6 kodlu nanopartiküllerin diğer formülasyonlar ile kıyaslandığında floresan maddenin permeasyonunu istatistiksel olarak anlamlı oranda artırdığı görülmüştür. Formülasyonun yüzeyinde bulunan pozitif yüklü kitosan kaplama, negatif yüklü hücre zarı ile etkileşime geçmektedir. Sonuçlar formülasyonlardan beklendiği şekilde gelmiştir. Bruinsmann ve ark. (2019) simvastatin yüklü kaplanmamış

nanokapsüller ile kitosan kaplanmış nanokapsüllerin permeabilite üzerindeki etkisini karşılaştırmış ve gerçekleştirdiğimiz çalışma ile benzer şekilde kitosan kaplamanın etkin maddenin nazal mukoza modelinden permeasyonunu önemli ölçüde artırdığını, aynı zamanda kitosanın mukoadhesiv özelliklerinin permeasyon artışına katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.

Formülasyonlardan beklendiği üzere, pozitif yüzey yüklü S6 kodlu kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül formülasyonu negatif yüklü hücre zarına yüksek adhezyon gösterirken; negatif yüzey yüküne sahip S1 kodlu PLGA nanopartikül formülasyonu ve S2 kodlu PLGA-lesitin hibrit nanopartikül formülasyonları ile negatif yüzeye sahip hücre zarı arasında elektrostatik itme kuvvetleri nedeniyle nanopartiküllerin hücre içine alımı engellendiği için daha zayıf bir renk değişimi gözlenmiştir (Bessone ve ark., 2020; Dyawanapelly ve ark., 2016; Eşim ve ark., 2022; Hamedinasab ve ark., 2020; Takeuchi ve ark., 2019). Pitchika ve Sahoo (2022) da kaplanmamış negatif yüklü nanopartiküllerle karşılaştırıldığında, nanopartiküllere yapılan kitosan ile yüzey kaplama modifikasyonunun negatif yüklü hücrelerle etkileşimi artırdığını göstermişlerdir.

Kitosanın pKa değerine yakın pH değerlerinde kitosan nanopartiküllerin tek tabakalı Caco-2 hücre hattında transepitelyal elektriksel dirençte meydana getirdikleri ani dramatik düşüş, sıkı bağlantıların açıldığını göstermektedir (Yu ve ark., 2013). Paraselüler yol aracılığıyla iyon ve su geçişi transepitelyal elektriksel direnci düşürmektedir (Lin ve ark., 2005). Böylece etkin maddenin paraselüler yol aracılığıyla pasif difüzyonu sonucu permeasyon artmaktadır. Zamanla direnç artsa da ortamda kitosan varlığına bağlı olarak ilk değerine ulaşmamaktadır (Lin ve ark., 2005). Bu bilgi kitosan kaplı S6 kodlu nanopartikül formülasyonunda neden daha yüksek permeasyon gözlemlendiğini açıklamaktadır. Negatif yüzey yüküne sahip nanopartiküller ise sıkı bağlantıların açılması üzerinde herhangi bir etkiye sahip değildir (Lin ve ark., 2005).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda dünya genelinde engelliliğin önde gelen nedenlerinden biri olan depresyon tedavisinde kullanılmak üzere burundan beyne ulaştırmak üzere paroksetin hidroklorür yüklü nanopartiküler formülasyonların tasarlanması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda yer almaktadır.

- Paroksetin hidroklorürün saf su ve pH 6,4 fosat tamponlu ortamlarda UV spektrofotometre ile miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin güvenilir, doğru ve kesin sonuçlar verdiği kanıtlanmıştır.
- İyonik jelleşme yöntemi ile lesitin-kitosan hibrit nanopartiküler formülasyonlar üretilmiş ve etkin madde miktarı, L:K oranı, DMA kitosan çözeltisi üzerine ilave edilen ortamın türü, final ortam pH'sı parametrelerinin nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği üzerinde etkisi olduğu bulunmuştur. Lesitin-kitosan hibrit nanopartikül formülasyonları içinde F6 kodlu formülasyon $122,0 \pm 1,94$ nm partikül büyüklüğü ve %73 enkapsülasyon etkinliği ile optimum formülasyon olarak seçilmiştir.
- Çift emülsiyon oluşturma – çözücü buharlaştırma yöntemi paroksetin yüklü PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlar başarılı bir şekilde üretilmiştir. Partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği üzerinde formülasyonlarda kullanılan lesitin ve kitosanın (DMA/YMA - %0,1-0,2 konsantrasyonlarda) etkili olduğu tespit edilmiştir. PLGA bazlı nanopartikül formülasyonlar içinde S1, S2 ve S6 kodlu formülasyonlar optimum formülasyonlar olarak belirlenmiştir.
- Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yürütülen stabilite çalışmaları sonucunda 4°C' de 6 ay stabil bir şekilde saklanabildikleri tespit edilmiştir.

- Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarından en iyi sonuçları sağlayan S1, S2 ve S6 kodlu formülasyonlar için hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Paroksetin hidroklorürün hücre canlılığını belirleme çalışmalarında 24. saatte doza bağlı bir sitotoksikite görülmemekle birlikte 48. ve 72. saatlerde doza bağlı sitotoksikite görülmüştür. Paroksetin hidroklorür yüklü nanopartikül formülasyonları ile bunların boş eşdeğerlerinin ise Caco-2 hücre hattında 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda sitotoksik etkisi olmadığı gözlenmiştir.
- Hücre kültürü permeabilite çalışmalarında kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartiküllerin diğer nanopartiküler formülasyonlara nazaran Caco-2 hücre hattında daha başarılı bir şekilde permeasyon gösterdiği tespit edilmiştir.
- Sonuç olarak, hazırlanan nanopartiküler formülasyonlar üzerinde yapılan tüm analizler sonucunda S6 kodlu kitosan kaplı PLGA-lesitin hibrit nanopartikül formülasyonu hedeflerimize uygun sonuçlar vermiştir. Çalışmamızın devamı olarak S6 kodlu formülasyonun kronik depresyonla uyarılmış hayvan modellerinde *in vivo* deneyleri yapılarak etkinliğinin değerlendirilmesi düşünülmektedir.

ÖZET

Burundan Beyne İlaç Uygulamaları İçin İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve *In vitro* Değerlendirilmesi

Bireyin hayat kalitesini düşüren, hem duygu ve düşünce hem de davranış bozukluklarına yol açan bir duygu bozukluğu olan depresyon dünya çapında yaklaşık 265 milyon insanı etkileyen bir hastalıktır. Depresyon tedavisine yönelik ilaçların çoğu, çeşitli mekanizmalarla sinapslarda monoaminlerin kullanılabilirliğini artırmaktadır. Bununla birlikte, antidepresanların terapötik etkinliği, beyindeki etki bölgesinde sürekli ve uzun süreli mevcudiyetlerine bağlıdır. Günümüzde antidepresanlar genellikle oral yol ile kullanılmaktadır. Ancak istenen etkiyi elde etme yolunda birçok engelle sahiptir. Bunlar; düşük emilim, karaciğerden ilk geçiş etkisine bağlı zayıf biyoyararlanım, ilaç toksisitesi ve doza bağlı yan etkileri içermektedir. Ayrıca depresyon hastalarının tedavi süreçlerinde başarısızlığın bir diğer sebebi de ilaçların merkezi sinir sistemine iletilmesini önleyen kan beyin bariyerinin varlığıdır.

İntranazal uygulamalar, tüm bu zorlukların aşılmasında etkili ve uygulanabilir bir alternatif olarak düşünülmektedir. Burundan beyne doğrudan hedeflendirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler etkin maddenin hedef bölgeye doğrudan hızlı bir şekilde iletilmesini ve dolayısıyla bu hastalıkların tedavisinde etkinliğin artırılmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında; model bir etkin madde olarak seçilen, selektif seratonin geri alım inhibitörü olan paroksetinin, lipid-polimer bazlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyonu, stabilitesi ve *in vitro* salım özellikleri tayin edilerek optimum formülasyonlar belirlenmiştir. Saf etkin madde ve seçilen paroksetin içeren nanopartiküllerin sitotoksik etkileri ve permeabiliteleri Caco-2 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Burundan beyne, Depresyon, Kitosan kaplı PLGA, Nanopartikül, Paroksetin hidroklorür

SUMMARY

Development and *in vitro* evaluation of drug delivery systems for nose-to-brain drug administration

Depression, a mood disorder, is an illness that affects approximately 265 million people worldwide, resulting in reduced quality of life, and behavioral disturbances as well as feelings and thoughts. Most drugs used to treat depression increase the availability of monoamines at synapses by various mechanisms. However, antidepressants' therapeutic efficacy depends on their sustained and prolonged presence at the site of action in the brain. Today, antidepressants are generally used orally. But there are many obstacles on the way to achieve the desired effect. These include poor absorption, poor first-pass hepatic bioavailability, drug toxicity and dose-related side effects. In addition, another reason for the failure of the treatment process on patients with depression is the presence of the blood-brain barrier, via preventing the transition of drugs to the central nervous system.

Intranasal applications are considered as an effective and feasible alternative to overcome all these difficulties. Nanoparticulate drug delivery systems that are directly targeted from the nose to the brain, ensure that the active substance is directly delivered to the target area and thus increase the effectiveness in the treatment of these diseases. In this thesis study; lipid-polymer-based nanoparticle drug carrier systems of paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, which selected as a model active substance were prepared. Optimum formulations were determined by determining the characterization, stability and *in vitro* release properties of the prepared formulations. The cytotoxic effects and permeability of pure active substance and selected paroxetine containing Nanoparticles were evaluated by cell culture studies performed on the Caco-2 cell line.

Key Words: Chitosan coated PLGA, Depression, Nanoparticle, Nose-to-brain, Paroxetine hydrochloride

KAYNAKLAR

- ADERIBIGBE BA (2018). In Situ-Based Gels for Nose to Brain Delivery for the Treatment of Neurological Diseases. *Pharmaceutics*, **10**(2): 40.
- AGRAWAL M, SARAF S, SARAF S, DUBEY SK, PURI A, GUPTA U, KESHARWANI P, RAVICHANDIRAN V, KUMAR P, NAIDU VGM, MURTY US, AJAZUDDIN, ALEXANDER A (2020). Stimuli-responsive in situ Gelling System for Nose-to-brain Drug Delivery. *JCR*. **327**: 235–265.
- AKEL H, ISMAIL R, KATONA G, SABIR F, AMBRUS R, CSÓKA I (2021). A comparison study of lipid and polymeric nanoparticles in the nasal delivery of meloxicam: Formulation, characterization, and *in vitro* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, **604**, 120724.
- ALAEI S, OMIDIAN H (2021). Mucoadhesion and Mechanical Assessment of Oral Films. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **159**, 105727.
- ALAM MI, BABOOTA S, AHUJA A, ALI M, ALI J, SAHNI JK, BHATNAGAR A (2014). Pharmacoscintigraphic Evaluation of Potential of Lipid Nanocarriers for Nose-to-Brain Delivery of Antidepressant Drug. *Int. J. Pharm.*, **470**(1-2): 99-106.
- ALKANDARI S (2022). Synthesis And Encapsulation Of Antidepressants In Biodegradable Polymeric, Lipid Nanoparticles To Bypass The Blood Brain Barrier. Yüksek Lisans Tezi, Arizona Üniversitesi, Amerika Birleşik Devletleri.
- ALKHOLIEF M (2019). Optimisation of Lecithin-Chitosan nanoparticles for simultaneous encapsulation of doxorubicin and piperine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **52**:204–214.
- ALSHMEMRY A, KALAM MA, ALMOGHRABI A, ALZAHIRANI A, SHAHID M, KHAN AA, HAQUE A, ALI R, ALKHOLIEF M, BINKHATHLAN Z, ALSHAMSAN A (2022). Chitosan-coated poly (lactic-co-glycolide) nanoparticles for dual delivery of doxorubicin and naringin against MCF-7 cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **68**, 103036.
- ALSHETAILI AS (2021). Gefitinib loaded PLGA and chitosan coated PLGA nanoparticles with magnified cytotoxicity against A549 lung cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **28**: 5065–5073.
- ALY AEE, HARMON B, PADEGIMAS L, SESENOGLU-LAIRD O, COOPER MJ, YUREK DM, WASZCZAK BL (2019). Intranasal delivery of hGDNF plasmid DNA nanoparticles results in long-term and widespread transfection of perivascular cells in rat brain. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **16**: 20–33.
- ARISOY S, SAYINER O, COMOGLU T, ONAL D, ATALAY O, PEHLIVANOGLU B (2020). *In vitro* and *in vivo* evaluation of levodopa-loaded nanoparticles for nose to brain delivery. *Pharmaceutical Development And Technology*, **25**(6): 735–747.
- ARTURSSON P, LINDMARK T, DAVIS SS, ILLUM L (1994). Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical Research*, **11**:1358-1361.
- AWAD R, AVITAL A, SOSNIK A (2022). Polymeric Nanocarriers for Nose-to-brain Drug Delivery in Neurodegenerative Diseases and Neurodevelopmental Disorders. *Acta Pharm. Sin. B*. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.07.003
- BALCIĞOLU İ (1999). Depresyonun Etiyopatogenezi. *İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Depresyon, Somatizasyon ve Psikiyatrik Aciller Sempozyumu*, **1999**:19-28.

- BEGLEY DJ (2004). Delivery of Therapeutic Agents to the Central Nervous System: the Problems and the Possibilities. *Pharmacol. Ther.* **104**:29–45.
- BEHL CR, PIMPLASKAR HK, SILENO AP, DEMEIRELES J, ROMEO VD (1998). Effects of Physicochemical Properties and Other Factors on Systemic Nasal Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **29**(1-2): 89–116.
- BELMAKER RH, AGAM G (2008). Major Depressive Disorder. *NEJM.* **358**(1):55-68.
- BESSONE F, DIANZANI C, ARGENZIAN M, CANGEMI L, SPAGNOLO R, MAIONE F, GIRAUDO E, CAVALLI R (2020). Albumin Nanoformulations as an Innovative Solution to Overcome Doxorubicin Chemoresistance. *Cancer Drug Resistance*, **4**: 192-207.
- BHATTACHARYA S, MAELICKE A, MONTAG D (2015). Nasal Application of the Galantamine Pro-drug Memogain Slows Down Plaque Deposition and Ameliorates Behavior in 5X Familial Alzheimer's Disease Mice. *J. Alzheimer's Dis.*, **46**: 123-136.
- BLIER P, GOBBI G, TURCOTTE JE, DE MONTIGNY C, BOUCHER N, HÉBERT C, DEBONNEL G (2009). Mirtazapine and paroxetine in major depression: A comparison of monotherapy versus their combination from treatment initiation. *European Neuropsychopharmacology*, **19**:457–465.
- BOCHE M, POKHARKAR V (2017). Quetiapine Nanoemulsion for Intranasal Drug Delivery: Evaluation of Brain-Targeting Efficiency. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **18**(3):686-696.
- BOSE RJ, LEE SH, PARK H (2016). Lipid-based surface engineering of PLGA nanoparticles for drug and gene delivery applications. *Biomaterials research*, **20**(1): 1-9.
- BOURGANIS V, KAMMONA O, ALEXOPOULOS A, KIPARISSIDES C (2018). Recent Advances in Carrier Mediated Nose-to-brain Delivery of Pharmaceuticals. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **128**: 337-362.
- BRAD K, ZHANG Y, GAO J (2017). Extraction and purification of formononetin from *Trifolium pratense* L: Physicochemical properties of its complex with lecithin. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **16** (8): 1757-1763.
- BRUINSMANN FA, PIGANA S, AGUIRRE T, DADALT SOUTO G, GARRASTAZU PEREIRA G, BIANCHERA A, TIOZZO FASIOLO L, COLOMBO G, MARQUES M, RAFFIN POHLMANN A, STANISÇUASKI GUTERRES SS, SONVICO F (2019). Chitosan-coated nanoparticles: Effect of chitosan molecular weight on nasal transmucosal delivery. *Pharmaceutics*, **11**(2): 86.
- CASETTARI L, ILLUM L (2014). Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled Release*, **190**:189–200.
- CHANDRAKALA HN, RAMARAJ B, SHIVAKUMARAIAH, MADHU GM, SIDDARAMAIAH (2012). The influence of zinc oxide–cerium oxide Nanoparticles on the structural characteristics and electrical properties of polyvinyl alcohol films. *J Mater Sci*, **47**: 8076–8084.
- CHATZITAKI AT, JESUS S, KARAVASILIS C, ANDREADIS D, FATOUROS DG, BORGES O (2020). Chitosan-coated PLGA nanoparticles for the nasal delivery of ropinirole hydrochloride: In vitro and ex vivo evaluation of efficacy and safety. *International Journal of Pharmaceutics*, **589**, 119776.
- CHOUDHARI M, HEJMADY S, SAHA RN, DAMLE S, SINGHVI G, ALEXANDER A, KESHARWANI P, DUBEY SK (2021). Evolving new-age strategies to transport therapeutics across the blood-brain-barrier. *Int. J. Pharm.* **599**: 120351.
- CHRONOPOULOU L, MASSIMI M, GIARDI MF, CAMETTI C, DEVIRGILIIS LC, DENTINI M, PALOCCI C (2013). Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell cultures. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **103**: 310–317.

- CHUGH Y, KAPOOR P, KAPOOR AK (2009). Intranasal Drug Delivery: A Novel Approach. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **61**(2): 90-94.
- CORREIA AC, MONTEIRO AR, SILVA R, MOREIRA JN, SOUSA LOBO JM, SILVA AC (2022). Lipid Nanoparticles Strategies to Modify Pharmacokinetics of Central Nervous System Targeting Drugs: Crossing or Circumventing the Blood–Brain Barrier (BBB) to Manage Neurological Disorders. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **189**: 114485.
- COSTA C, MOREIRA JN, AMARAL MH, LOBO JMS, SILVA AC (2019). Nose-to-brain Delivery of Lipid-based Nanosystems for Epileptic Seizures and Anxiety Crisis. *JCR.* **295**: 187-200.
- COSTA CP, BARREIRO S, MOREIRA JN, SILVA R, ALMEIDA H, SOUSA LOBO JM, SILVA AC (2021a). In vitro studies on nasal formulations of nanostructured lipid carriers (NLC) and solid lipid nanoparticles (SLN). *Pharmaceuticals*, **14**, 711.
- COSTA CP, MOREIRA JN, LOBO JMS, SILVA AC (2021b). Intranasal delivery of nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and nanoemulsions: A current overview of in vivo studies. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **11**:925-940.
- CROS CD, TOTH I, BLANCHFIELD JT (2011). Lipophilic derivatives of leu-enkephalinamide: in vitro permeability, stability and in vivo nasal delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **19**:1528-1534.
- DABHOLKAR N, WAGHULE T, RAPALLI VK, GORANTLA S, ALEXANDER A, SAHA RN, SINGHVI G (2021). Lipid Shell Lipid Nanocapsules as Smart Generation Lipid Nanocarriers. *J. Mol. Liq.* **339**: 117145.
- DANEMAN R, ZHOU L, KEBEDE AA, BARRES BA (2010). Pericytes are Required for Blood–Brain Barrier Integrity During Embryogenesis. *Nature*. **468**(7323): 562–566.
- DE LIMA IA, KHALIL NM, TOMINAGA TT, LECHANTEUR A, SARMENTO B, MAINARDES RM (2018). Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, **46**(2): 993–1002.
- DING J, LI J, MAO S (2015). Development and Evaluation of Vinpocetine Inclusion Complex for Brain Targeting. *AJPS*. **10**: 114-120.
- Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (2017). “Depression: Let’s Talk” Says WHO, as Depression Tops List of Causes of Ill Health. Erişim adresi: <https://www.who.int/news/item/30-03-2017--depression-let-s-talk-says-who-as-depression-tops-list-of-causes-of-ill-health>. Son erişim tarihi: 11/09/2022
- Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (2022). Erişim adresi: <https://www.who.int/news/item/17-06-2022-who-highlights-urgent-need-to-transform-mental-health-and-mental-health-care> Son erişim tarihi: 15/10/2022
- DYAWANAPALLY S, KOLI U, DHARAMDASANI V, JAIN R, DANDEKAR P (2016). Improved mucoadhesion and cell uptake of chitosan and chitosan oligosaccharide surface-modified polymer nanoparticles for mucosal delivery of proteins. *Drug deliv. transl. res.* **6**(4):365–379.
- EMAD NA, AHMED B, ALHALMI A, ALZOBAYDI N, AL-KUBATI SS (2021). Recent progress in nanocarriers for direct nose to brain drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **64**, 102642.
- ESIM O, OZTUNA A, SARPER M, HASCICEK C (2022). Chitosan-coated bovine serum albumin nanocarriers mediate efficient delivery of methotrexate in breast cancer therapeutics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **77**:103906.
- ESIM O, SAVASER A, OZKAN CK, OZTUNA A, GOKSEL BA, OZLER M, TAS C, OZKAN, Y (2020). Nose to brain delivery of eletriptan hydrobromide nanoparticles: Preparation, in

- vitro/in vivo evaluation and effect on trigeminal activation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **59**, 101919.
- FORMICA ML, REAL DA, PICCHIO ML, CATLIN E, DONNELLY RF, PAREDES AJ (2022). On a Highway to the Brain: A review on Nose-to-brain Drug Delivery Using Nanoparticles. *Appl. Mater. Today*, **29**: 101631.
- GABAL YM, KAMEL AO, SAMMOUR OA, ELSHAFFEEY AH (2014). Effect of Surface Charge on the Brain Delivery of Nanostructured Lipid Carriers in situ gels via the Nasal Route. *Int. J. Pharm.* **473**: 442–457.
- GERMANN D, MA G, HAN F, TIKHOMIROVA A (2013). Paroxetine Hydrochloride. In: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Ed: Brittain HG, Elsevier, **38**: 367-406.
- Gıda ve İlaç İdaresi, Erişim adresi: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-nasal-spray-medication-treatment-resistant-depression-available-only-certified>. Erişim tarihi: 30/11/2022
- GIUNCHEDI P, GAVINI E, BONFERONI MC (2020). Nose-to-Brain Delivery. *Pharmaceutics*, **12**(2): 138.
- GOMES C, MOREIRA RG, CASTELL-PEREZ E (2011). Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. *Journal of Food Science*, **76**(2):N16-N24.
- GONZÁLEZ LF, ACUÑA E, ARELLANO G, MORALES P, SOTOMAYORP, OYARZUN-AMPUERO F, NAVES R (2021). Intranasal Delivery of Interferon- β -loaded Nanoparticles Induces Control of Neuroinflammation in a Preclinical Model of Multiple Sclerosis: A Promising Simple, Effective, Non-Invasive, and Low-cost Therapy. *JCR*. **331**: 443–459.
- GOSSELET F, LOIOLA RA, ROIG A, ROSELL A, CULOT M (2021). Central Nervous System Delivery of Molecules Across the Blood-Brain Barrier. *Neurochem. Int.* **144**: 104952.
- GRASSIN-DELYLE S, BUENESTADO A, NALINE E, FAISY C, BLOUQUIT-LAYE S, COUDERC LJ, le GUEN M, FISCHLER M, DEVILLIER P (2012). Intranasal Drug Delivery: An Efficient and non-Invasive Route for Systemic Administration: Focus on Opioids. *Pharmacol. Ther.* **134**(3): 366-379.
- GRATPAIN V, MWEMA A, LABRAK Y, MUCCIOLI GG, van PESCH V, des RIEUX A (2021). Extracellular Vesicles for the Treatment of Central Nervous System Diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **174**: 535-552.
- HAFNER A, LOVRIC J, VOINOVICH D, FILIPOVIC-GRCIC J (2009). Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, **381**(2): 205-213.
- HAMEDINASAB H, REZAYAN AH, MELLAT M, MASHREGHI M, JAAFARI MR (2020). Development of chitosan-coated liposome for pulmonary delivery of N-acetylcysteine, *Int. J. Biol. Macromol.* **156**:1455–1463.
- HASCICEK C (1999). İlaç taşıyıcı biyoadhezif mikrokürelerin nazal uygulamaları. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- HASCICEK C, SENDEL-TURK CT, GUMUSTAS M, OZKAN SA, BAKAR F, DAS-EVCİMEN N, SAVASER A, OZKAN Y (2014). Influence of Polymer Molecular Weight on in-vitro Characteristics and Anti-Tumor Activities of Fulvestrant Encapsulated PLGA Nanoparticles. *Curr. Drug Ther.* **9**(4): 239-249.
- HOSNY KM, HASSAN AH (2014). Intranasal *in situ* Gel Loaded with Saquinavir Mesylate Nanosized Microemulsion: Preparation, Characterization, and *in vivo* Evaluation. *Int. J. Pharm.* **475**(1-2): 191-197.
- JAISWAL M, KUMAR A, SHARMA S (2016). Nanoemulsions loaded Carbopol® 934 based gel for

- intranasal delivery of neuroprotective *Centella asiatica* extract: in-vitro and ex-vivo permeation study. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **46**:79-89.
- JIA L, NIE X, JI H, YUAN Z, LI R (2021). Multiple-Coated PLGA nanoparticles loading triptolide attenuate injury of a cellular model of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 8825640.
- KARAVASILIS C, BOUROPOULOS N, SYGELLOU L, AMANATIADOU EP, VIZIRIANAKIS IS, FATOUROS DG (2016). PLGA/DPPC/trimethylchitosan spray-dried microparticles for the nasal delivery of ropinirole hydrochloride: in vitro, ex vivo and cytocompatibility assessment. *Materials Science and Engineering: C*, **59**: 1053-1062.
- KARAVASILIS C, FATOUROS DG (2016). Smart Materials: in situ Gel-forming Systems for Nasal Delivery. *Drug Discov. Today*, **21**(1):157-166.
- KATARE YK, DAYA RP, GRAY CS, LUCKHAM RE, BHANDARI J, CHAUHAN AS, MISHRA RK (2015). Brain Targeting of a Water Insoluble Antipsychotic Drug Haloperidol via the Intranasal Route Using PAMAM Dendrimer. *Mol. Pharm.* **12**: 3380–3388.
- KATARE YK, PIAZZA JE, BHANDARI J, DAYA RP, AKILAN K, SIMPSON MJ, HOARE T, MISHRA RK (2017). Intranasal delivery of antipsychotic drugs. *Schizophrenia Research*, **184**: 2–13.
- KAUR P, GARG T, VAIDYA B, PRAKASH A, RATH G, GOYAL AK (2015). Brain Delivery of Intranasal in situ Gel of Nanoparticulated Polymeric Carriers Containing Antidepressant Drug: Behavioral and Biochemical Assessment. *J. Drug Target.* **23**(3): 275-286.
- KAUR S, MANHAS P, SWAMI A, BHANDARI R, SHARMA KK, JAIN R, KUMAR R, PANDEY SK, KUHAD A, SHARMA RK, WANGOO N (2018). Bioengineered PLGA-chitosan nanoparticles for brain targeted intranasal delivery of antiepileptic TRH analogues. *Chemical Engineering Journal*, **346**: 630–639.
- KENDLER KS, GATZ M, GARDNER CO, PEDERSEN NL (2006). A Swedish national twin study of lifetime major depression. *American Journal of Psychiatry*, **163**:109-114.
- KESSLER RC, BERGLUND P, DEMLER O, JIN R, MERIKANGAS KR, WALTERS EE (2005). Lifetime Prevalence and Age-of-onset Distributions of DSM-IV Disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry*. **62**(6):593- 602.
- KHAN AR, LIU M, KHAN MW, ZHAI G (2017). Progress in Brain Targeting Drug Delivery System by Nasal Route. *JCR*. **268**: 364-389.
- KHATER SE, EL-KHOULY A, ABDEL-BAR HM, AL-MAHALLAWI AM, GHORAB DM (2021). Fluoxetine hydrochloride loaded lipid polymer hybrid Nanoparticles showed possible efficiency against SARS-CoV-2 infection. *International Journal of Pharmaceutics*, **607**, 121023.
- KUO Y-C, WANG I-H (2016). Enhanced delivery of etoposide across the blood-brain barrier to restrain brain tumor growth using melanotransferrin antibody- and tamoxifen-conjugated solid lipid nanoparticles. *Journal Of Drug Targeting*, **24**(7): 645–654.
- JOSHI G, KUMAR A, SAWANT K (2016). Bioavailability enhancement, Caco-2 cells uptake and intestinal transport of orally administered lopinavir-loaded PLGA Nanoparticles. *Drug Delivery*, **23**(9): 3492–3504.
- LIN YH, CHUNG CK, CHEN CT, LIANG HF, CHEN SC, SUNG HW (2005). Preparation of Nanoparticles Composed of Chitosan/Poly-γ-glutamic Acid and Evaluation of Their Permeability through Caco-2 Cells. *Biomacromolecules*, **6**: 1104-1112.
- LIU B, DU J, ZENG J, CHEN C, NIU S (2009). Characterization and antioxidant activity of dihydromyricetin–lecithin complex. *Eur Food Res Technol*, **230**: 325–331.

- LIU E, ZHAO S, LI X, MENG X, LIU B (2021a). Preparation, characterization of PLGA/chitosan nanoparticles as a delivery system for controlled release of DHA. *International Journal of Biological Macromolecules*, **185**:782–791.
- LIU F, WANG C, SLIKKER JR W (2021b). Analysis of Biofluid Lipid Changes: Potential Biomarkers for Detecting Central Nervous System Diseases and Neurotoxicity. *Curr. Opin. Toxicol.* **28**: 15-19.
- LIU Q, ZHANG Q (2019). 10-Nanoparticle Systems for Nose-to-Brain Delivery. In: *Brain Targeted Drug Delivery System*, Ed.: Gao H, Gao X, Academic Press, 219-239.
- LYONS MJ, EISEN SA, GOLDBERG J, TRUE W, LIN N, MEYER JM, TOOMEY R, FARAONE SV, MERLA-RAMOS M, TSUANG MT (1998). A registry-based twin study of depression in men. *Archives of General Psychiatry*, **55**:468-472.
- MISTRY A, STOLNIK S, ILLUM L (2015). Nose-to-Brain Delivery: Investigation of the Transport of Nanoparticles with Different Surface Characteristics and Sizes in Excised Porcine Olfactory Epithelium. *Mol. Pharmaceutics*. **12**(8): 2755-2766.
- MOHSEN K, AZZAZY HME, ALLAM NK, BASALIOUS EB (2020). Intranasal Lipid Nanocapsules for Systemic Delivery of Nimodipine into the Brain: In vitro Optimization and in vivo Pharmacokinetic Study. *Mater. Sci. Eng. C*. **116**: 111236.
- MOURA RP, PACHECO C, PÊGO AP, RIEUX AD, SARMENTO B (2020). Lipid Nanocapsules to Enhance Drug Bioavailability to the Central Nervous System. *JCR*. **322**: 390–400.
- MUSUMECI T, PELLITTERI R, SPATUZZA M, PUGLISI G (2014). Nose-to-Brain Delivery: Evaluation of Polymeric Nanoparticles on Olfactory Ensheathing Cells Uptake. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, **103**:628–635.
- NOUR SA, ABDELMALAK NS, NAGUIB MJ, RASHED HM, IBRAHIM AB (2016). Intranasal Brain-targeted Clonazepam Polymeric Micelles for Immediate Control of Status Epilepticus: *in vitro* Optimization, *ex vivo* Determination of Cytotoxicity, *in vivo* Biodistribution and Pharmacodynamics Studies. *Drug Deliv.* **23**(9): 3681–3695.
- OZKAYA S, AYDEMİR E (2021). SSRI grubu antidepresanlar ve antikanser etkileri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **14**:37-46.
- ÖZSOY Y (2007). Nazal Yolla İlaçların Verilmesi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* **36**(4): 267-283.
- PANDEY RY, KUMAR S, GUPTA BK, ALI J, BABOOTA S (2015). Intranasal Delivery of Paroxetine Nanoemulsion via the Olfactory Region for the Management of Depression: Formulation, Behavioural and Biochemical Estimation. *Nanotechnology* **27**(2): 025102.
- PANDIT J, SULTANA Y, AQIL M (2021). Chitosan coated nanoparticles for efficient delivery of bevacizumab in the posterior ocular tissues via subconjunctival administration. *Carbohydrate Polymers*, **267**, 118217.
- PAREKH H, MASHRU R (2020). Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of paroxetine HCL and etizolam. *The Pharma Innovation Journal*; **9**(9):145-153.
- PATEL A, SURTI N, MAHAJAN A (2019a). Intranasal drug delivery: Novel delivery route for effective management of neurological disorders. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **52**: 130-137.
- PATEL M, MUNDADA V, SAWANT K (2019b). Enhanced intestinal absorption of asenapine maleate by fabricating solid lipid nanoparticles using TPGS: elucidation of transport mechanism, permeability across Caco-2 cell line and in vivo pharmacokinetic studies. *Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology*, **47**(1): 144–153.
- PATEL Z, PATEL B, PATEL S, PARDESHI C (2012). Nose to Brain Targeted Drug Delivery bypassing the Blood-Brain Barrier: An Overview. *Drug Invent. Today*. **4**(12): 610-615.

- PINTO M, SILVA V, BARREIRO S, SILVA R, REMIÃO F, BORGES F, FERNANDES C (2022). Brain drug delivery and neurodegenerative diseases: Polymeric PLGA-based nanoparticles as a forefront platform. *Ageing Research Reviews*, **79**, 101658.
- PITCHIKA S, SAHOO SK (2022). Paclitaxel and Lapatinib dual loaded chitosan-coated PLGA Nanoparticles enhance cytotoxicity by circumventing MDR1-mediated trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancers: In-vitro and in-vivo studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **73**, 103445.
- POLA CC, MORAES ARF, MEDEIROS EAA, TEÓFILO RF, SOARES NFF, GOMES CL (2019). Development and optimization of pH-responsive PLGA-chitosan nanoparticles for triggered release of antimicrobials. *Food Chemistry*, **295**: 671–679.
- PubChem, Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/62878#section=2D-Structure>.
Son erişim tarihi: 20.11.2022
- RAMAN S, KHAN AA, MAHMOOD S (2022). Nose to brain delivery of selegiline loaded PLGA/lipid nanoparticles: Synthesis, characterisation and brain pharmacokinetics evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **77**, 103923.
- RASSU G, SODDU E, COSSU M, GAVINI E, GIUNCHEDI P, DALPIAZ A (2016). Particulate Formulations Based on Chitosan for Nose-to-brain Delivery of Drugs. A Review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **32**: 77-87.
- RAVISANKAR P, ROJA C, BABU GK, RAHUL KS (2016). Validated UV spectrophotometric method for quantitative analysis of paroxetine in bulk and pharmaceutical dosage form. *Der Pharmacia Lettre*, **8(3)**:254-260.
- ROTHSCHILD AJ (1993). The Dexamethasone Suppression Test Psychiatric Disorders. *Psychiatr. Ann.* **23(12)**: 662-670.
- RxMediaPharma® Son erişim tarihi: 25/11/2022.
- SABIR F, RAHDAR A, YANG Z, BARANI M, BILAL M, BHALLA N (2022). Functionalized Nanoparticles in Drug Delivery: Strategies to Enhance Direct Nose-to-Brain Drug Delivery via Integrated Nerve Pathways. *Synthesis and Applications of Nanoparticles*:455-485.
- SAINI S, SHARMA T, JAIN A, KAUR H, KATARE OP, SINGH B (2021). Systematically designed chitosan-coated solid lipid nanoparticles of ferulic acid for effective management of Alzheimer's disease: A preclinical evidence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **205**, 111838.
- SEJU U, KUMAR A, SAWANT KK (2011). Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: In vitro and in vivo studies. *Acta Biomaterialia*, **7**: 4169–4176.
- SENGEL-TURK CT, HASCICEK C, BAKAR F, SIMSEK E (2017). Comparative Evaluation of Nimesilude Loaded Nanoparticles for Anticancer Activity Against Breast Cancer Cells. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **18(2)**: 393-403.
- SERLIN Y, SHELEF I, KNYAZER B, FRIEDMAN A (2015). Anatomy and the physiology of the blood-brain barrier. *Semin. Cell Dev. Biol.* **38**: 2-6.
- SHARMA S, DANG S (2020). Paroxetine Loaded PLGA Nanoparticles. *Mater. Today: Proc.* **28**: 205–210.
- SHARMA S, LOHAN S, MURTHY RSR (2014). Formulation and Characterization of Intranasal Mucoadhesive Nanoparticulates and Thermo-Reversible Gel of Levodopa for Brain Delivery. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **40(7)**: 869-878.

- SHI LL, CAO Y, ZHU XY, CUI JH, CAO QR (2015). Optimization of process variables of zanamivir-loaded solid lipid nanoparticles and the prediction of their cellular transport in Caco-2 cell model. *International Journal of Pharmaceutics*, **478**: 60–69.
- SILVA S, BICKER J, FONSECA C, FERREIRA NR, VITORINO C, ALVES G, FALCÃO A, FORTUNA A (2021). Encapsulated Escitalopram and Paroxetine Intranasal Co-Administration: In Vitro/In Vivo Evaluation. *Frontiers in Pharmacology*, **12**, 751321.
- SINGH SK, DADHANIA P, VUDDANDA PR, JAIN A, VELAGA S, SINGH S (2016). Intranasal Delivery of Asenapine Loaded Nanostructured Lipid Carriers: Formulation, Characterization, Pharmacokinetic and Behavioural Assessment. *RSC Adv.*, **6**: 2032-2045.
- SIPOS B, CSÓKA I, BUDAI-SZÜCS M, KOZMA G, BERKESI D, KÓNYA Z, BALOGH GT, KATONA G (2021). Development of dexamethasone-loaded mixed polymeric micelles for nasal delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **166**:105960.
- SONVICO F, CAGNANI A, ROSSI A, MOTTA S, DI BARI MT, CAVATORTA F, ALONSO MJ, DERIU A, COLOMBO P (2006). Formation of self-organized Nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. *International Journal of Pharmaceutics*, **324**: 67–73.
- Spravato, Erişim adresi: <https://www.spravato.com/>. Son erişim tarihi: 30/11/2022
- SURI R, NEUPANE YR, MEHRA N, NEMATULLAH M, KHAN F, ALAM O, IQUBAL A, JAIN GK, KOHLI K (2021). Sirolimus loaded chitosan functionalized poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for potential treatment of age-related macular degeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, **191**: 548–559.
- SYED MR, HASHMI S, NAIK JB (2010). Uv Spectrophotometric Method Development And Validation For Determination Of Paroxetine Hydrochloride In Pharmaceutical Dosage Form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2(2)**:43-45.
- ŞENGEL-TÜRK CT, HASÇİÇEK C, GÖNÜL N (2007). Beyne İlaç Hedeflendirilmesinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler. *J. Neurol. Sci. Turk.*, **24(3)**: 254-263.
- TADAYONNEJAD R, AJILORE O (2014). Brain Network Dysfunction in Late-life Depression: a Literature review. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* **27(1)**:5-12.
- TAKEUCHI I, ARIYAMA M, MAKINO K (2019). Chitosan coating effect on cellular uptake of PLGA nanoparticles for boron neutron capture therapy. *J. Oleo Sci.*, **68(4)**: 361-36.
- TAKEUCHI H, THONGBORISUTE J, MATSUI Y, SUGIHARA H, YAMAMOTO H, KAWASHIMA Y (2005). Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**:1583– 1594.
- TARTAU L, LUPUŞORU RV, MELNIG V (2010). Experimental researches on the effects of nano-vesicles encapsulating dexketoprofen in a visceral pain model in mice. *Ann. Romanian Soc. Cell Biol.*, **15(2)**: 202-206.
- THAKKAR H, VAGHELA D, PATEL BP (2021). Brain Targeted Intranasal in-situ Gelling Spray of Paroxetine: Formulation, Characterization and in-vivo Evaluation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **62**: 102317.
- THANGUDU S, CHENG F-Y, SU C-H (2020). Advancements in the Blood–Brain Barrier Penetrating Nanoplatforams for Brain Related Disease Diagnostics and Therapeutic Applications. *Polymers* **12**: 3055.
- The Respiratory System, Erişim adresi: <https://www.therespiratorysystem.com/nasal-cavity/>. Son erişim tarihi: 07.08.2022
- TIWARI G, TIWARI R, SRIWASTAWA B, BHATI L, PANDEY S, PANDEY P, BANNERJEE SK (2012). Drug Delivery Systems: An Updated Review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2(1)**: 2.

- TOKSOY MO, TIRNAKSIZ FF (2021). Katı lipid nanopartiküller ve beyne özgü ilaç taşıyıcı sistem olarak uygulamaları. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, **45(2)**:428-442.
- TONG G-F, QIN N, SUN L-W (2017). Development and evaluation of Desvenlafaxine loaded PLGA-chitosan nanoparticles for brain delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **25**:844–851.
- TREVINO JT, QUISPE RC, KHAN F, NOVAK V (2020). Non-invasive Strategies for Nose-to-Brain Drug Delivery. *J. Clin. Trials*. **10(7)**: 439.
- UPPULURI CT, RAVI PR, DALVI AV (2021). Design and evaluation of thermo responsive nasal *in situ* gelling system dispersed with piribedil loaded lecithin-chitosan hybrid nanoparticles for improved brain availability. *Neuropharmacology*, **201**, 108832.
- VALENCIA MS, DA SILVA JÚNIOR MF, XAVIER- JÚNIOR FH, DE OLIVEIRA VERAS B, DE ALBUQUERQUE PBS, DE OLIVEIRA BORBA EF, DE SILVA TG, XAVIER VL, DE SOUZA MP, CARNEIRO-DA-CUNHA MDG (2021a). Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, **2**, 100119.
- VALENCIA MS, DA SILVA JÚNIOR MF, XAVIER JÚNIOR FH, DE OLIVEIRA VERAS B, DE OLIVEIRA BORBA EF, DA SILVA TG, XAVIER VL, DE SOUZA MP, CARNEIRO-DA-CUNHA MDG (2021b). Bioactivity and cytotoxicity of quercetin-loaded, lecithin-chitosan nanoparticles. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **31**, 101879.
- van den BROEK SL, SHALGUNOV V, HERTH MM (2022). Transport of Nanomedicines Across the Blood-Brain Barrier: Challenges and Opportunities For Imaging and Therapy. *Biomater Adv* **141**: 213125.
- VAN WOENSEL M, WAUTHOZ N, ROSIÈRE R, AMIGHI K, MATHIEU V, LEFRANC F, VAN GOOL SW, DE VLEESCHOUWER S (2013). Formulations for Intranasal Delivery of Pharmacological Agents to Combat Brain Disease: A New Opportunity to Tackle GBM?. *Cancers*. **5(3)**:1020-1048.
- VASA DM, O'DONNELL LA, WILDFONG PL (2015). Influence of Dosage Form, Formulation and Delivery Device on Olfactory Deposition and Clearance: Enhancement of Nose-to-CNS Uptake. *J. Pharm. Innov.* **10(3)**: 200-210.
- VERREES M, SELMAN WR (2004). Management of Normal Pressure Hydrocephalus. *AFP*. **70(6)**: 1071-1090.
- VITORINO C, SILVA S, BICKER J, FALCÃO A, FORTUNA A (2019). Antidepressants and Nose-To-Brain Delivery: Drivers, Restraints, Opportunities and Challenges. *Drug Discov. Today* **24(9)**: 1911-1923.
- WANG X, CHI N, TANG X (2008). Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **70**: 735–740.
- WAVIKAR PR, VAVIA PR (2015). Rivastigmine-loaded in situ gelling nanostructured lipid carriers for nose to brain delivery. *Journal of Liposome Research*, **25**: 141-149.
- WILSON B (2019). Drug Targeting Strategies into the Brain for Treating Neurological Diseases. *J. Neurosci. Methods*. **311**: 133–146.
- WILSON B, ALOBAID BNM, GEETHA KM, JENITA JL (2021). Chitosan nanoparticles to enhance nasal absorption and brain targeting of sitagliptin to treat Alzheimer's disease. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **61**, 102176.

- WOERTZ C, PREIS M, BREITKREUTZ J, KLEINEBUDDE P (2013). Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **85**: 843–853.
- WOOLSEY TA, HANAWAY J, GADO MH (2017). The brain atlas: A visual guide to the human central nervous system. *John Wiley & Sons*.
- XU J, TAO J, WANG J (2020). Design and Application in Delivery System of Intranasal Antidepressants. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**: 626882.
- YANG Y, HUANG Z, ZHANG X, LI J, HUANG Y, CHEN W, PAN X, WU C (2018). Development of Paroxetine Hydrochloride Single Layer Controlled-Release Tablets Based on 3² Factorial Design. *Pharmaceutics*, **10**, 243.
- YEMEZ B, ALPTEKİN K (1998). Depresyon Etiyolojisi. *Pisikiyatri Dünyası*, **2**(1): 21-25.
- YU SH, TANG DW, HSIEH HY, WU WS, LIN BX, CHUANG EY, SUNG HW, MI FL (2013). Nanoparticle-induced tight-junction opening for the transport of an anti-angiogenic sulfated polysaccharide across Caco-2 cell monolayers. *Acta Biomaterialia*, **9**: 7449–7459.
- YÜCEL F, ŞEN K, DURAN O, ÖZCAN M, KÜÇÜKGEDİK G (2020). Nörogenez İnsanlarda Hayat Boyunca Devam Eder mi? *Türk Tıp Öğrencileri Araştırma Dergisi*, **2**(1): 1-4.
- YÜKSEL N (2007). Paroksetinin Nörofizyolojik Etkileri ve Klinik Farmakolojisi. *Klinik Psikiyatri* **10** (Ek 1): 9-16.
- ZEIADEH I, NAJJAR A, KARAMAN R (2018). Strategies for Enhancing the Permeation of CNS-Active Drugs through the Blood-Brain Barrier: A Review. *Molecules*. **23**(6): 1289.
- ZHANG Y, CHAN HF, LEONG KW (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the Future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **65**: 104–120.

