



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**PULMONER YOL İLE UYGULANACAK NANOPARTİKÜLER
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİ İÇEREN KURU TOZ
İNHALASYON FORMÜLASYONLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gizem Rüya ÇAMCA

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Asuman BOZKIR

2014- ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PULMONER YOL İLE UYGULANACAK NANOPARTİKÜLER
İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİ İÇEREN KURU TOZ
İNHALASYON FORMÜLASYONLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Gizem Rüya ÇAMCA

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR**

2014- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma, aşğıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma tarihi: 22.08.2014

Prof. Dr. Nilüfer TARIMCI
Ankara Üniversitesi Eczacılık Faköltesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Asuman BOZKIR
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. İmran VURAL
Hacettepe Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Ayşegöl KARATAŞ
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Yard. Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Akciğerlerin Yapısı ve Anatomisi	2
1.1.1. Fizyoloji	2
1.1.2. Partiküllerin Akciğerlerde Birikimine Etki Eden Faktörler	6
1.2. Pulmoner Yolla İlaç Uygulamasının Avantaj ve Dezavantajları	11
1.3. Pulmoner Yolla Uygulanan İlaç Şekilleri	12
1.3.1. Nebulizatörler	12
1.3.2. Ölçülü Doz İnhalerler (ÖDİ)	13
1.3.3. Kuru Toz İnhalerler (KTİ)	14
1.4. Nanopartiküler Sistemler	15
1.4.1. Nanopartiküllerin Avantajları	17
1.4.2. Nanopartiküllerin Dezavantajları	18
1.4.3. Pulmoner Yolla Uygulanan Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri	18
1.4.3.1. Top-Down Metotlar	21
1.4.3.1.1. Yaş Öğütme	21
1.4.3.1.2. Yüksek Basınç Homojenizasyonu	22
1.4.3.2. Bottom-Up Metotlar	23
1.4.3.2.1. Çözücü Buharlaştırma Metotları	23
1.4.3.2.1.1. Püskürterek Kurutma	23
1.4.3.2.1.2. Dondurucu Çözücü Buharlaştırma	23
1.4.3.2.1.3. Sulu Bir Çözelti İçerisinde Buharlaştırıcı Presipitasyon (EPAS)	24
1.4.3.2.1.4. Mikroemülsiyon	24
1.4.3.2.1.5. Yoğunlaşmış Aerosol Oluşumu	25
1.4.3.2.1.6. Süperkritik Çözeltilerin Hızlı Genleşmesi (RESS)	25
1.4.3.2.2. Antiçözücü Metotlar	25
1.5. Nanopartiküllerin Pulmoner Yolla Uygulanması	26
1.6. Siprofloksasin Hidroklorür	27
1.6.1. Kimyasal Özellikleri	28
1.6.2. Fizikokimyasal Özellikleri	28
1.6.3. Analiz Yöntemleri	29
1.6.4. Etki Mekanizması	29
1.6.5. Direnç Mekanizması	29
1.6.6. Antimikrobiyal Aktivite	30
1.6.7. Farmakokinetik Özellikleri	31

1.7. Polimerler	32
1.7.1. Poli- ϵ -kaprolakton (ϵ -PCL)	32
1.7.2. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	33
1.7.3. Kitozan	34
1.8. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller	35
1.8.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	35
1.8.2. Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	36
1.8.3. Zeta Potansiyeli Ölçümü	37
1.8.4. Çözünme Hızı	38
1.9. Nanokompozit Mikropartiküllerin Hazırlanması	39
1.10. Nanokompozit Mikropartiküllerde Aerodinamik Özelliklerin Belirlenmesi	40
 2. GEREÇ VE YÖNTEM	 41
2.1. Gereçler	41
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	42
2.1.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasında ve Etkin Madde Salım Hızı Deneylerinde Kullanılan Ortamlar	43
2.2. Yöntemler	44
2.2.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	44
2.2.1.1. Etkin Maddenin FTIR (Fourier Transform İnfrared) Spektrumu	44
2.2.1.2. Etkin Maddenin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi	45
2.2.1.3. Etkin Maddenin Ultra Viyole (UV) Spektrumu	45
2.2.1.4. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması	45
2.2.1.5. Kalibrasyon Doğrusunun İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu	46
2.2.1.5.1. Doğrusallık ve Aralığı	46
2.2.1.5.2. Doğruluk ve Geri Elde	46
2.2.1.5.3. Kesinlik	47
2.2.1.5.3.1. Tekrarlanabilirlik	47
2.2.1.5.3.2. Ara Kesinlik	48
2.2.1.5.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	48
2.2.1.5.5. Seçicilik	49
2.2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması	50
2.2.3. Nanopartikül Formülasyonları	52
2.2.3.1. Ön formülasyon çalışmaları	52
2.2.4. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller	58
2.2.4.1. FTIR (Fourier Transform İnfrared) Spektrumu	58
2.2.4.2. DSC Analizi	58
2.2.4.3. Partikül Büyüklüğünün Saptanması	58
2.2.4.4. Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	59

2.2.4.5. Miktar Tayini	59
2.2.4.6. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	59
2.2.4.7. Ürün Verimi Tayini	60
2.2.4.8. Zeta Potansiyel Ölçümü	60
2.2.4.9. Çözünme Hızı Deneyi	60
2.2.4.10. İnhalasyon İçin Nanokompozit Mikropartiküler Kuru Toz Karışımlarının Hazırlanması	61
2.2.4.11. Nanokompozit Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi	61
2.2.4.11.1. Sıkıştırılmış Dansite Tayini	61
2.2.4.12. Teorik Kütlesel Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇt) Tayini	62
2.2.4.13. Nanokompozit Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	63
2.2.4.14. Antimikrobiyal Etkinlik Testi	63

3. BULGULAR **64**

3.1. Etkin Madde Özelliklerinin Belirlenmesine Dair Bulgular	64
3.1.1. Etkin Maddenin FTIR Spektrumuna Ait Bulgular	64
3.1.2. Etkin Maddenin DSC Analizine Dair Bulgular	65
3.1.3. Etkin Maddenin UV Spektrumuna Dair Bulgular	66
3.1.4. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular	67
3.1.5. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular	68
3.1.5.1. Doğrusallık ve Aralığı	68
3.1.5.2. Doğruluk ve Geri Elde	70
3.1.5.3. Kesinlik	72
3.1.5.3.1. Tekrarlanabilirlik	72
3.1.5.3.2. Ara Kesinlik	73
3.1.5.4. Teşhis ve Tayin Sınırları	74
3.1.5.5. Seçicilik	74
3.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	76
3.2.1. Nanopartiküllerde Etkin Madde-Polimer Etkileşimi Tayini	76
3.2.1.1. FTIR Spektrumları	76
3.2.1.2. DSC Termogramları	77
3.2.2. Partikül Büyüklüğünün Saptanması	78
3.2.3. Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi	83
3.2.4. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini	85
3.2.5. Ürün Verimi Tayini	89
3.2.6. Zeta Potansiyel Ölçümü	90
3.2.7. Çözünme Hızı Deneyi	91
3.2.8. Nanokompozit Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi	97
3.2.8.1. Sıkıştırılmış Dansite Tayini Bulguları	97

3.2.9. Teorik Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇt) Tayinine Ait Bulgular	98
3.2.10. Nanokompozit Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi	101
3.2.11. Antimikrobiyal Etkinlik Çalışmasına Ait Bulgular	103
4. TARTIŞMA	105
4.1. Etkin Maddenin Özellikleri Üzerine İncelemeler	105
4.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerinin Değerlendirilmesi	107
4.2.1. Nanopartikül Üretim Yönteminin Seçilmesi ve Yönteme Ait Teknolojik Parametrelerin Geliştirilmesi	107
4.2.2. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller	111
4.2.2.1. Etkin Madde-Polimer Etkileşimi	111
4.2.2.1.1. FTIR Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	111
4.2.2.1.2. DSC Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	112
4.2.2.2. Partikül Büyüklüğü ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi	112
4.2.2.3. AFM Görüntülerinin Değerlendirilmesi	117
4.2.2.4. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini Sonuçlarının Değerlendirilmesi	117
4.2.2.5. Ürün Verimi Tayini Verilerinin Değerlendirilmesi	122
4.2.2.6. Zeta Potansiyel Ölçümü Verilerinin Değerlendirilmesi	122
4.2.2.7. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi	123
4.2.3. Nanokompozit Mikropartiküller İçin Uygun Nanopartikül Formülasyonlarının Seçimi	126
4.3. Nanokompozit Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	126
4.4. Nanokompozit Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	127
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Testi Değerlendirmesi	128
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	130
ÖZET	133
SUMMARY	134
KAYNAKLAR	135
ÖZGEÇMİŞ	145

ÖNSÖZ

Bu çalışmada pulmoner yol ile uygulanacak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri içeren kuru toz inhalasyon formülasyonları geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmamı yöneten, deneysel çalışmalarında, bütün imkanlardan faydalanmamı sağlayan ve araştırmalarım bana yol göstermekten çekinmeyerek bilgisini, tecrübesini benimle paylaşıp bana her zaman her konuda destek olan danışmanım Prof. Dr. Sayın Asuman BOZKIR'a,

Çalışmalarımı aksatmadan devam ettirebilmem için bana yardımcı olan A.Ü. Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Nilüfer TARIMCI'ya,

Bu tez çalışmamda bana yol gösteren, karşılaştığım zorlukların aşılmasında bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen, her zaman her konuda destek ve yardımlarıyla bana güç veren Yrd. Doç. Dr. Sayın Burcu DEVRİM'e,

Çalışmamızda kullandığımız siprofloksasin hidroklorür'ün temin edilmesini sağlayan ZENTİVA ilaç firmasına,

FTIR analizlerinin yapılmasında yardımcı olan NOBEL ilaç firmasına,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel katkıları ve desteklerinden dolayı Anabilim Dalımızın değerli öğretim görevlilerine,

DSC analizimlerimde yardımcı olan Sayın Yrd. Doç. Dr. Özge İNAL'a,

Deneylerim sırasında yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Yrd. Doç Dr. Ongun SAKA ve Sayın Dr. Ecz. Zerrin SEZGİN BAYINDIR'a,

Antimikrobiyal aktivite testlerinin yapılmasında yardımcı olan Sayın Yrd. Doç Dr. Müjde ERYILMAZ'a

Çalışmalarım sırasında güler yüzlerini, manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Uzm. Ecz. Berrin BAŞARAN, Uzm. Ecz. Gülin AMASYA, Uzm. Ecz. Eda AYDIN, Uzm. Ecz. Umut Can ÖZ ve Ecz. Seda YÜZÜKIRMIZI'ya,

Tüm hayatım süresince yanımda olan, yüksek lisansa başlamam ve bitirmem konusunda her zaman bana destek olan babam Mustafa ÇAMCA, annem Necla ÇAMCA ve ağabeyim Uğur ÇAMCA'ya sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

AC	Aseton
AFM	Atomik Kuvvet Mikrokospu (Atomic Force Microscope)
AKO	Artık kareler ortalaması
BSS	Bağıl Standart Sapma
DCM	Diklorometan
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
EA	Etil Asetat
EP	European Pharmacopeia
EPAS	Sulu bir çözelti içerisinde buharlaştırıcı presipitasyon
FDA	Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FTIR	Fourier transform infrared spektroskopisi
GSS	Geometrik standart sapma
HPH	Yüksek basınçlı homojenizasyon
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
KOAÇ	Kütlesel ortalama aerodinamik çap
KTİ	Kuru toz inhaler
K/Y/S	Katı/ yağ /su
m	Kalibrasyon doğrusunun eğimi
MBK	Minimal bakterisid konsantrasyonu
MİK	Minimal inhibitör konsantrasyonu
n	Kesişim
ÖDİ	Ölçülü doz inhaler
PDR	Physicians' Desk Reference
PCL	Poli- ε –kaprolakton
PDLA	Poli-D-laktik-asit
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLLA	Poli-L-laktik-asit
PVA	Poli(vinil alkol)
r	Korelasyon katsayısı
r ²	Determinasyon katsayısı
RES	Retiküloendotel sistem
RESS	Süperkritik çözeltilerin hızlı genleşmesi
S/Y	Su/yağ
S/Y/S	Su/yağ/su
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SFL	Sıvı içine püskürterek dondurma
SH	Standart Hata

SLN	Katı lipid nanopartikül
SS	Standart Sapma
Sy.x	Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart sapması
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviyole
ρ	Sıkıştırılmış dansite
ρ_0	Referans dansite (1 g/ml)
X	Dinamik şekil faktörü

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1.** Weibel tarafından tanımlanan havayolu morfoloji modeli
- Şekil 1.2.** Akciğer fizyolojisinin hücre ve hücre dışı düzeyde şematik gösterimi
- Şekil 1.3.** Akciğerlerdeki birikim mekanizmaları
- Şekil 1.4.** a) Nebülizatör örneği b) ÖDİ örneği c) KTİ örneği
- Şekil 1.5.** Nanopartikül oluşum prosesleri
- Şekil 1.6.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün açık formülü
- Şekil 1.7.** Poli(ε-kaprolakton)'un kimyasal formülü
- Şekil 1.8.** PLGA'nın yapısı
- Şekil 1.9.** Kitozanın yapısal formülü
- Şekil 1.10.** Nanopartiküllerin görüntülenmesinde kullanılan AFM cihazı
- Şekil 2.1.** Nanopartikül imalat akış şeması
- Şekil 3.1.** a) Sipprofloksasin hidroklorür'ün FTIR spektrumu
b) Sipprofloksasin hidroklorür'ün çalışmamızda elde edilen FTIR spektrumu
- Şekil 3.2.** a) Sipprofloksasin hidroklorür referans DSC termogramı
b) Çalışmamızda elde edilen Sipprofloksasin hidroklorür'ün DSC termogramı.
- Şekil 3.3.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile su içindeki UV spektrumu
- Şekil 3.4.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu içindeki UV spektrumu
- Şekil 3.5.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki UV kalibrasyon grafiği.
- Şekil 3.6.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu içindeki UV kalibrasyon grafiği.
- Şekil 3.7.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki doğrusallık grafiği
- Şekil 3.8.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki doğrusallık grafiği
- Şekil 3.9.** Boş nanopartiküllerin distile sudaki spektrumu.

- Şekil 3.10.** Boş nanopartiküllerin %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki spektrumu.
- Şekil 3.11.** PCL'a ait FTIR spektrumu.
- Şekil 3.12.** Nanopartiküle ait FTIR spektrumu.
- Şekil 3.13.** PCL'a ait DSC termogramı.
- Şekil 3.14.** F30 kodlu formüle ait DSC termogramı
- Şekil 3.15.** 5x5 µm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait topografi ve faz görüntüleri
- Şekil 3.16.** 5x5 µm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait kesit analizi
- Şekil 3.17.** 1x1 µm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait topografi ve faz görüntüleri
- Şekil 3.18.** 1x1 µm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait kesit analizi
- Şekil 3.19.** F18 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.20.** F21 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.21.** F22 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.22.** F23 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.23.** F26 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.24.** F28 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.25.** F29 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.26.** F30 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.27.** F35 kodlu formülün salım hızı grafiği
- Şekil 3.28.** Farklı molekül ağırlığına sahip 50:50 PLGA'lar ile PCL (1:1) karışımı içeren formüllerde PLGA molekül ağırlıklarının nanopartikül formülasyonlarından etkin madde salım profilleri üzerine etkisi
- Şekil 3.29.** Dış su fazındaki farklı kitozan konsantrasyonlarının nanopartikül formülasyonlarından etkin madde salım profilleri üzerine etkisi
- Şekil 3.30.** NKM1 kodlu formül için elek üstünde kalan miktarları gösteren sütun grafiği

- Şekil 3.31.** NKM1 kodlu formüle ait yığılmalı dağılım eğrisi
- Şekil 3.32.** NKM1 kodlu formül için, % yığılmalı miktar olasılık skalasında, partikül çapları logaritmik skalada olacak şekilde Origin Lab 9.1 programı kullanılarak çizilmiş grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.33.** NKM2 kodlu formül için elek üstünde kalan miktarları gösteren sütun grafiği
- Şekil 3.34.** NKM2 kodlu formüle ait yığılmalı dağılım eğrisi
- Şekil 3.35.** NKM2 kodlu formül için, % yığılmalı miktar olasılık skalasında, partikül çapları logaritmik skalada olacak şekilde Origin Lab 9.1 programı kullanılarak çizilmiş grafik ve geometrik ortalama çap değeri
- Şekil 3.36.** F30 kodlu formülasyonun mikropartikül haline gelmesinde kullanılan Pearlitol 50 C'ye ait $\times 40$ ile çekilmiş mikroskop görüntüsü
- Şekil 3.37.** F30 kodlu formülasyonun Pearlitol 50 C ile 1:10 a/a oranında hazırlanan karışımına ait $\times 40$ ile çekilmiş mikroskop görüntüsü
- Şekil 3.38.** F30 kodlu formülasyonun Pearlitol 50 C ile 1:5 a/a oranında hazırlanan karışımına ait $\times 40$ ile çekilmiş mikroskop görüntüsü

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Aerosol birikim mekanizmaları
Çizelge 1.2.	İlaç otoriteleri tarafından ruhsatlandırılan bazı nanopartiküler ürünlere örnekler
Çizelge 1.3.	Piyasada bu etkin maddeyi içeren farmasötik formlar ve dozları
Çizelge 2.1.	Farklı iç faz ve organik faz oranları ile hazırlanan formüller
Çizelge 2.2.	Farklı cihazlar ile hazırlanan formülasyonlar
Çizelge 2.3.	İç fazda farklı yardımcı maddeler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar
Çizelge 2.4.	PEG 4000 içeren ve içermeyen formüller
Çizelge 2.5.	Çeşitli PVA konsantrasyonları ile çalışılan formüller
Çizelge 2.6.	Farklı molekül ağırlığına sahip PVA ile hazırlanan formüller
Çizelge 2.7.	Çeşitli kriyoprotektan maddeler kullanılarak liyofilize edilen formüller
Çizelge 2.8.	Siprofloksasin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonları
Çizelge 2.9.	ezAFM görüntü parametreleri
Çizelge 2.10.	Nanokompozit mikropartikül formülasyonu bileşimi
Çizelge 3.1.	Siprofloksasin hidroklorür'ün UV kalibrasyon doğrularına ait parametreler.
Çizelge 3.2.	Siprofloksasin hidroklorür'ün distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki doğrusallık parametreleri
Çizelge 3.3.	Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki doğruluk ve geri elde bulguları.

- Çizelge 3.4.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları.
- Çizelge 3.5.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki tekrarlanabilirlik bulguları.
- Çizelge 3.6.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları.
- Çizelge 3.7.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki ara kesinlik bulguları.
- Çizelge 3.8.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 tamponundaki ara kesinlik bulguları.
- Çizelge 3.9.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki miktar tayininin teşhis ve tayin sınırları
- Çizelge 3.10.** Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayininin teşhis ve tayin sınırları
- Çizelge 3.11.** ÖF4 ve ÖF5 kodlu formüllere ait partikül büyüklükleri
- Çizelge 3.12.** ÖF8 ve ÖF9 kodlu formüllere ait partikül büyüklükleri
- Çizelge 3.13.** Çeşitli PVA konsantrasyonları ile üretilmiş formüllere ait partikül büyüklükleri
- Çizelge 3.14.** Farklı molekül ağırlığındaki PVA konsantrasyonları ile çalışılan formüllere ait partikül büyüklükleri
- Çizelge 3.15** Çeşitli kriyoprotektan maddeler kullanılarak liyofilize edilen formüllere ait partikül büyüklükleri
- Çizelge 3.16.** Etkin maddenin iç su fazında çözöldüğü ve katı toz olarak eklendiğı nanopartiköllerde partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.17.** Farklı sipprofloksasin hidroklorür miktarlarıyla hazırlanan formölasyonlarda partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.18.** Dış faza yapılan eklemeler sonucu elde edilen nanopartiköllerin partikül büyüklüğü verileri

- Çizelge 3.19.** Dış fazın pH'sı değiştirilerek üretilen edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.20.** Farklı organik çözücüler ile hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.21.** Değişik PCL miktarları kullanılarak üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.22.** Değişik PEG 4000 miktarları kullanılarak üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.23.** 50:50 laktik asit:glolik asit oranına sahip farklı molekül ağırlığındaki PLGA'lar ile PCL (1:1) kullanılarak yapılan formüllere ait partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.24.** Değişik polimer ve polimer karışımları kullanılarak üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.25.** Dış fazına değişik konsantrasyonlarda kitozan eklenerek üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.26.** Diğer yapılan değişik modifikasyonlar ile hazırlanan nanopartiküllerde partikül büyüklüğü verileri
- Çizelge 3.27.** Etkin maddenin iç su fazında çözüldüğü ve katı toz olarak eklendiği nanopartiküllerde enkapsülasyon etkinliği
- Çizelge 3.28.** Farklı siprofloksasin hidroklorür miktarlarıyla hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliği
- Çizelge 3.29.** Dış faza yapılan eklemeler sonucu elde edilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği
- Çizelge 3.30.** Dış fazın pH'sı değiştirilerek üretilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği
- Çizelge 3.31.** Farklı organik çözücüler ile hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliği
- Çizelge 3.32.** Değişik PCL miktarları kullanılarak üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri
- Çizelge 3.33.** Değişik PEG 4000 miktarları kullanılarak üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri

- Çizelge 3.34.** 50:50 laktik asit:glikolik asit oranına sahip farklı molekül ağırlığındaki PLGA'lar ile PCL (1:1) kullanılarak yapılan formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri
- Çizelge 3.35.** Değişik polimer ve polimer karışımları kullanılarak üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri
- Çizelge 3.36.** Dış fazına değişik konsantrasyonlarda kitozan eklenerek üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri
- Çizelge 3.37.** Diğer yapılan değişik modifikasyonlar ile hazırlanan nanopartiküllerde enkapsülasyon etkinliği verileri
- Çizelge 3.38.** Hazırlanan nanopartiküllerde ürün verimi verileri
- Çizelge 3.39.** Hazırlanan nanopartiküllerde zeta potansiyeli ölçüm verileri
- Çizelge 3.40.** Hazırlanan nanokompozit mikropartiküllerde sıkıştırılmış dansite verileri
- Çizelge 3.41.** Denklem 2.5'e göre hesaplanan KOAÇt değerleri
- Çizelge 3.42.** F30 formüle ait başlangıç ve 6.ay antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları
- Çizelge 3.43.** F30 kodlu nanopartikül ve NMK1 kodlu nanokompozit mikropartikül formülasyonlara ait antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları

1. GİRİŞ

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak potansiyel kullanımı son yıllarda oldukça dikkat çekmiştir. Nanopartiküller büyüklükleri 10-100 nm arasında değişen katı kolloidal partiküllerdir. Nanopartiküllerin en önemli avantajı küçük boyutlu olmaları ve bu sayede çeşitli bariyerleri geçebilmeleri, doku ile temas yüzeyini arttırmaları ve taşıdıkları etkin maddeyi dış etkenlere karşı korumalarıdır. Nanopartiküller bir çok yolla vücuda uygulanabilirler. Uygulama yolunun seçimi hastalığa ve amaçlanan sonuca göre değişmektedir. Akciğerlerin geniş yüzey alanı, ince epitel tabakası, yüksek damarlanma ağı ve ilk geçiş etkisinin elimine edilmesi gibi avantajları göz önünde bulundurulduğunda intra ve ekstra pulmoner hastalıkların tedavisinde ilacın pulmoner yol ile uygulanması önem kazanmaktadır.

Siprofloksasin hidroklorür çeşitli bakteriyel enfeksiyonların ve özellikle de akciğer enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olan geniş spektrumlu florokinolon grubu bir antibiyotiktir. Akciğer enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan ilaçlarda en önemli engellerden biri, tedavi edici dozların yüksek olmasıdır. Çoğunlukla oral olarak kullanılan ilaçlar yüksek doz ve sık uygulamayı gerektirmektedir. Yüksek dozlu ilaç uygulamanın en önemli dezavantajı ise istenmeyen sistemik yan etki görülme potansiyelinin artmasıdır. Lokal olarak uygulanan etkin maddelerin akciğerlerde etki göstererek etkinliklerinin düzeltilmesi ve istenmeyen sistemik yan etkilerin azaltılmasının sağlanması nedeniyle sistemik ve lokal hastalıkların tedavisi için pulmoner yolla ilaç verilmesi diğer uygulama yolları ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir. Çeşitli akciğer hastalıklarının tedavisinde inhalasyon yolu ile direkt olarak akciğerlere uygulanan terapötiklerin yararını destekleyen bulgular günden güne artmaktadır.

Nanopartiküllerin geniş yüzey alanları nedeniyle yüksek kohezif özellik göstermeleri, inhalasyon formülasyonlarının hazırlanmasında karşılaşılan önemli bir sorundur. Nanopartiküllerin kohezif özellik göstermesi kontrolsüz aglomerasyon ile

sonuçlanabilmekte ve bu da formülasyon değişkenliğine ve dozlama etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir. Nanopartiküllerin kontrollü bir şekilde bir araya getirilmesiyle düşük dansiteli mikropartiküllerin hazırlanması, nanopartiküllerin büyüklüklerinin ve yüzey yüklerinin kontrol altında tutulmasını sağlarken oluşan mikron büyüklüğündeki aglomeratlar kolaylıkla aerosolize edilebilmektedir. Nanokompozit mikropartikül olarak da adlandırılan bu sistemler inhale edildiklerinde akciğerlerdeki sulu ortamda kolaylıkla nanopartiküllere ayrılacak şekilde tasarlanmaktadır.

Bu çalışmada, pulmoner yolun sistemik yolla uygulamaya göre avantajları göz önünde bulundurularak Siprofloksasin hidroklorür'ün, pulmoner yolla uygulanan nanopartiküler sistemlerini içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Araştırmamızda biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler kullanılarak Siprofloksasin hidroklorür'ün nano-boyuttaki formülasyonlarını içeren mikropartiküler sistemleri hazırlanarak, akciğerde alveolar bölgeye kadar partiküllerin geçişinin sağlanması ve kanda yeterli tedavi konsantrasyonlarına ulaşılması düşünülmüştür.

1.1. Akciğerlerin Yapısı ve Anatomisi

Lokal tedaviler ve sistemik tedavilerin uygulanması açısından akciğerler ilaç dağılımı için oldukça ilgi çekicidir. Akciğerler solunumla ilgili hastalıklarda (astım, kistik fibrozis, akciğer kanseri ve tüberküloz), sistemik tedavideki verimsizlikler ve istenmeyen etkiler olmadan, hastalık bölgesine direk ulaşımı sağlarlar (Labiris ve ark., 2006).

1.1.1. Fizyoloji

Pulmoner yol ile yapılacak olan tedavilerin özellikle solunum sırasında, akciğerlerin mekanik özellikleriyle ilişkili olmasından dolayı, akciğerlerin fonksiyonları ile ilgili bilgi sahibi olunmalıdır. Akciğerin fonksiyonu hava yollarının yapısal özellikleri ve

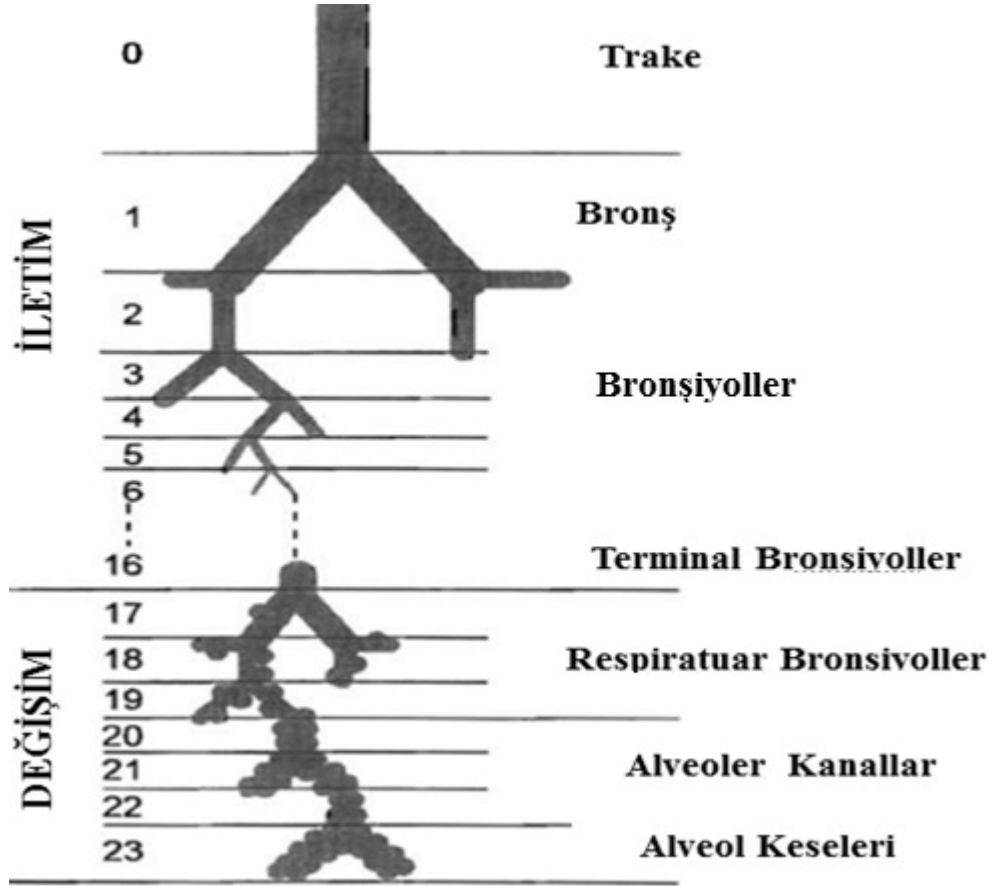
akciğer dokusu ile yakından bağlantılıdır. Yapısal özelliklerinin iyi bilinmesi, normal ve anormal fizyolojik koşullarda akciğer fonksiyonlarının anlaşılmasına ve ilaçların aerosol inhalasyonla dağılımı ile ilgili fırsatlar ve zorlukları anlamak için bir temel sağlar. Akciğerlerin hava yolları, normalde direnci düşük olan yığının (bulk) hava akışı içine girişi ve gaz değişiminin temel işlevinin yerine getirildiği alveollerinde bulunduğu akciğer periferinden çıkışına bir yol sağlar. Buna bağlı olarak akciğerler genel olarak iki kompartmana bölünmüştür. İletken bölge ve respiratuar bölge Şekil-1'de gösterilmektedir. İletken bölge, trakeyi de kapsayan, havayolunun ilk 16 dallanmasını içermektedir. Trake iki ana bronşa ayrılmaktadır. Bu iki ana bronş da dallanarak solda iki ve sağda üç akciğer lobuna giren bronşları oluşturmaktadır. İntrapulmoner bronşlar giderek dallanarak daha küçük çapta bronşlar ve bronşiyollerini oluşturmaktadır. İletken bölge alveollerden yoksun olan terminal bronşiyoller ile son bulmaktadır. İletken bölgenin işlevi, her nefes sırasında bulk akışı ile havanın içeri ve akciğerlerin dışına taşınmasını sağlamaktır. Respiratuar bölge gaz değişimi ile ilgili bütün yapıları içermektedir ve alveol içeren respiratuar bronşiyoller ile başlamaktadır. Bu bronşiyoller alt kollara ayrılarak ek respiratuar bronşiyollerini oluşturur ve neticede alveoler kanalın oluşmasını sağlar ve sonunda alveol kesesini oluşturur. Asinöz birincil respiratuar bronşiyol, alveoler kanal ve alveol keselerini içeren bir birim olarak tanımlanmaktadır (Sung ve ark., 2007). Respiratuar bronşiyoller, alveoler kanallar ve alveol keseleri hava boşluğu ile kan kapilleri arasındaki gaz değişimini sağlayan respiratuar bölgeyi (17-23 dallanma) oluşturur (Weibel, 1963). Respiratuar bölgenin uzunluğu sadece birkaç milimetredir; ancak akciğerlerin total hacminin 2,5-3 litresini oluşturmaktadır (West, 2007).

Akciğerin farklı bölgelerinde farklı epitelyum hatları bulunmaktadır (Şekil 1.2). Bir insan bronşunda epitel sütun bazal, silialı, fırça ve goblet hücrelerden meydana gelir (Patton and Byron, 2007). Hücrelerin yüzeyinde sulu-jel bir tabaka hattı bulunmaktadır. Bu tabaka luminal mukus tabakasından ve bu tabakanın altında, düşük viskoziteli, siliaların çarpışmasını kolaylaştıran perisiliar katmandan oluşur (Yang ve ark., 2008). Mukus tabakası %95 su, %2 müsin, çeşitli tuzlar, proteinler ve yağlar içerir. Siliaların çarpışması ve dışarıya çıkan hava akımı ile ağıza doğru mukusun transportunun koordinasyonu tozların, mikroorganizmaların ve

çözünmeyen partiküllerin akciğerden temizlenmesini sağlar ve bu durum mukosilier klirens olarak adlandırılır (Todoroff ve Vanbever, 2011). Mukus hareket hızı hava yollarının farklı bölgelerinde farklılık gösterir. Mukus trakede 20 mm/dk ilerleyebilirken, küçük periferel hava yollarında 1 mm/dk kadar yavaş olabilir (Olsson ve ark., 2011). Bronşiyollere ve terminal bronşiyollere ulaşıldığında, epitelde aynı tip hücreler bulunmaktadır; ancak bunlar oldukça küçüktür (yaklaşık 10 μ m yüksekliğindedir). Kompleks sulu-jel tabaka bütün iletken bölgede bulunur ve trakeden (100 μ m'ye kadar) bronşa (8 μ m civarı) ve sonra terminal bronşiyollere (3 μ m civarı) doğru giderek inceler (Patton and Byron, 2007; Ungaro ve ark., 2012). Alveoler bölgede pulmoner sürfaktan film ve sulu alt fazdan oluşan ince sıvı tabaka (< 0,1 μ m) sulu-jel tabakanın yerini almaktadır. Pulmoner sürfaktan %80 fosfolipidleri, %5-10 proteinleri ve %5-10 diğer lipitleri içermektedir (Ungaro ve ark., 2012). Uzun sütunlu epitel hücrelerinin yerini ince ve geniş alveoler tip-I hücre ve alveoler tip-II hücreler (< 0,1 μ m) alır. Alveoler tip-I hücreleri alveol yüzeyinin %95'inden fazlasını oluşturmaktadır ve alveollerin içerisine sıvı girmesini engeller ve gaz değişimini sağlarlar. Alveoler tip-II hücreleri tip-I hücrelerin ve sürfaktan üretimini; ayrıca solunum işini ve yüzey gerilimini azaltarak alveolün düşük basınçta şişkin kalmasını sağlar. Alveoler bölgede bulunan başka bir hücre tipi de alveoler makrofajlardır. Alveoler bölgede mukus bulunmamaktadır ki bu durum mukosilier klirensin aktif olmadığını işaret etmektedir; bu nedenle alveollerde ana klirens mekanizması makrofaj fagositozudur. Alveoler makrofajlar akciğer sıvı sürfaktan tabakasının altında bulunmaktadır (Todoroff ve Vanbever, 2011). Bunlar amoeboid hareketleri nedeniyle alveolün yüzeyindeki tüm sindirilemez parçacıkları temizleme yeteneğine sahiptir (Geiser, 2010).

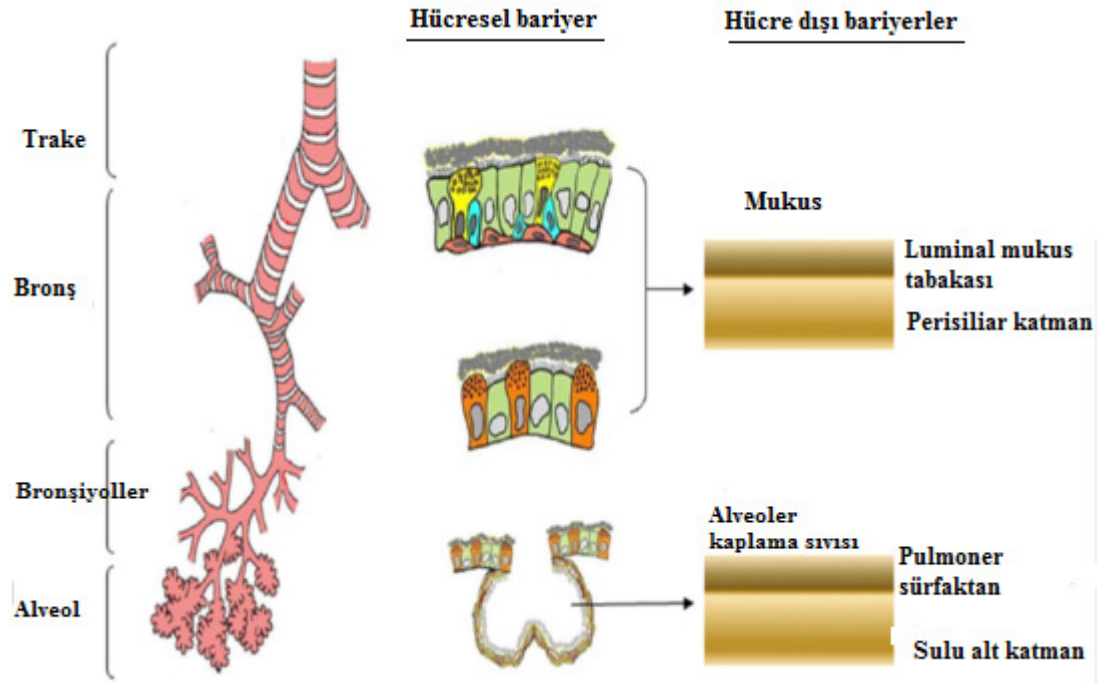
Soluk alma sürecinde, akciğerler sürekli olarak çeşitli kaynaklardan ve çeşitli büyüklükte örneğin polen (20-90 μ m), bakteri (0,2-200 μ m) ve tütün (0,01-1 μ m) gibi maddelere maruz kalmaktadır (Hinds, 1999). Bu uçan partiküller, respiratuar yolda iletken bölgeden (orofarinks, trake, ana bronş, terminal bronşiyoller) daha aşağıdaki respiratuar bölgeye (respiratuar bronşiyoller ve alveol keseleri) doğru birikmektedir (Weibel ve Gomez, 1962). Üst solunum yolunda partiküller hızlı bir

şekilde, yutuldukları ve metabolize edildikleri epitelden boğaza kadar olan hatta mukus tabakalı silialar tarafından temizlenmektedirler.



Şekil 1.1. Weibel tarafından tanımlanan havayolu morfoloji modeli (Wang ve ark., 2014)

Trakedeki pulmoner epitelyum kalındır (50-60 μm) ve absorpsiyon için bir bariyer oluşturmaktadır. Hava yolunun alt taraflarına doğru, akciğer epitelyumunun kalınlığı alveollerde 0,2 μm 'ye kadar inmektedir (Weibel, 1973). Bu bölgede gaz değişimi meydana gelmektedir ve alveollerin geniş yüzey alanı (erişkin bir insanda 43-102 m^2), tüm sistemik dolaşıma erişimi sağlayan yüksek damarlanmış bir ağ sağlar (Stone ve ark., 1992). Alveoller, partiküller çok büyük ya da fagositozdan kaçabilecek kadar küçük olsa bile, akciğer yüzeyindeki yabancı materyalleri temizleyen immün sistem hücreleri olan alveoler makrofajlar tarafından korunmaktadır. Dendritik hücreler gibi diğer immün hücreleri de basit patojenlerin ve yabancı maddelerin temizlenmesi için havayolunda görülebilmektedir (Sung ve ark., 2007).



Şekil 1.2. Akciğer fizyolojisinin hücre ve hücre dışı düzeyde şematik gösterimi (Ungaro ve ark., 2012)

1.1.2. Partiküllerin Akciğerlerde Birikimine Etki Eden Faktörler

Akciğerlerde ilaçların bölgesel olarak birikmesi değişik fizyolojik parametrelere bağlıdır:

- Aerodinamik partikül davranışı (boyut, yoğunluk, higroskopisite, şekil, elektrostatik özellikler)
- Hastanın nefes alma modeli (akış hızı, soluk alma hacmi, soluk tutma)
- Hastanın havayolu anatomisi ve morfolojisi
- Nefes alma siklusu içinde aerosol uygulama süresi.

Aerodinamik partikül çapı, partikül ile aynı aerodinamik davranışa sahip 1g/cm^3 yoğunluğundaki küresel partikülün çapı olarak karakterize edilmektedir. Farklı yoğunluktaki ve şekildeki partiküller böylece aerodinamik özelliklerine göre karakterize edilebilirler (Scheuch ve ark., 2006).

a) Aerodinamik Partikül Özellikleri

Partiküllerin şekli ve boyutu akciğerdeki birikimi etkileyen ilk faktörlerden biridir. Boyut, kütsel ortalama aerodinamik ap (KOA) veya popölasyonun ortalama partikül çapına efit olan partikül kütselinin çapı olarak tanımlanır (Tena ve Clara, 2012). Bu değere göre aerosol kütselinin %50'sinin kütsesi daha küçük, %50'sinin kütsesi daha büyüktür. KOA aerosolün aerodinamik çap dağılımı ile ilgili fikir vermektedir (Banerjee, 2007). Partikül boyutu ve şekline göre partiküller dört mekanizma aracılığıyla birikebilmektedir:

1) Durağan arpma: Aerosol partikülleri hava yolunda ilerlerken respiratuar bölgedeki uygun kıvrımlarını izlemek yerine sahip oldukları yörüngede yollarına devam eder. Yeterli ivmesi olan partiküller hava akışının hava yolu duvarına çarparak aniden yön değiftirdiğı noktalarda merkezkaç kuvvetleri tarafından etkilenirler. Bu genellikle hava hızının yüksek ve akışın türbölanslı olduğı ilk 10 dallanmada meydana gelir. Bu olay çoğunlukla orofarengeal bölgede kalan, genellikle de ilaç kuru toz inhaler (KTİ) veya ölçölü doz inhaler (ÖDİ) ile uygulandıında, 10µm ve daha büyük parçacıkları etkilemektedir (Tena ve Clara, 2012). Durağan arpma ile partikül birikimi; partikölün hareketsizliğinin artması, hava yolundaki hava akış hızının artması, hava yolu dallanma açısı, hava yolu çapının küölmesi ve partikölün geçmek zorunda olduğı hava yolu dallanması sayısının artması ile artmaktadır (Scheuch ve ark., 2006).

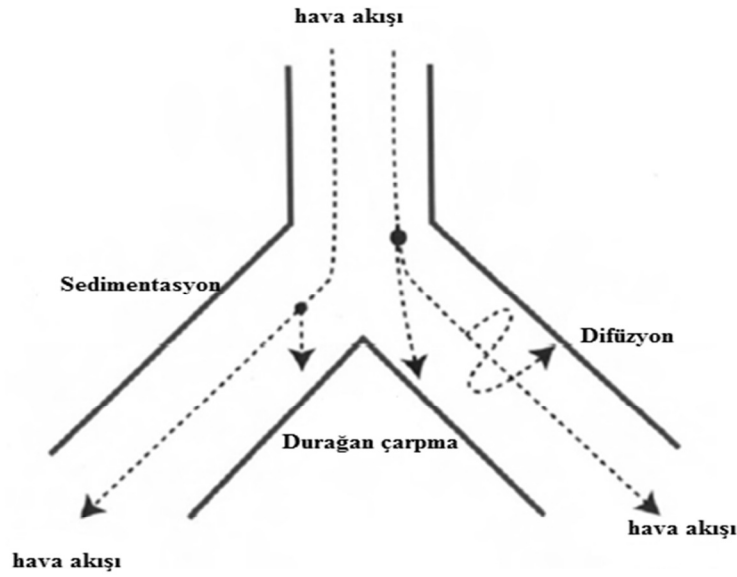
2) Sedimentasyon: Sedimentasyon ile birikim dünyanın yer çekimi kuvveti nedeniyle olmaktadır (Scheuch ve ark., 2006). Bu fiziksel olgu, yeterli kütleyle sahip partiküllerin hava yolunda yeterli süre kaldığı zaman yer çekimi kuvveti nedeniyle çökmesidir. Bu durum genellikle hava hızının yavaş olduğı ve kalış süresinin daha uzun olduğı, bronşların son 5 dallanmasında gerçekleşir (Lourenco ve Cotromanes, 1982). Başka bir deyişle sedimantasyon olasılığı partiköl boyutu ve partikölün akciğerdeki kalış süresi artıkça; hava boşluklarının boyutu azaldıkça artmaktadır. apı <1 µm olan partiküller için sedimentasyon hızı ihmal edilebilir düzeydedir (Scheuch ve ark., 2006).

3) Brown hareketi ile difüzyon: Bu fiziksel olay aerosoldeki bir partikülün hava yolunda düzensizce bir yerden başka bir yere taşınmasıdır. 0,5 μm 'den küçük partiküller için, partiküller hava hızı pratik olarak sıfır olan alveoler boşluklara ulaştığında Brown hareketinin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Bu partiküller genellikle birikmezler ve soluk verme ile tekrar atılırlar (Tena ve Clara, 2012). Partiküllerin difüzyon ile birikim olasılığı partikül büyüklüğünün azalmasıyla artar. Bu durum gaz molekülü ve aerosol parçacığının çarpışmasının artmış partikül büyüklüğündeki partiküle sadece küçük bir hareket sağlaması ile açıklanabilir. Ayrıca yine kalış zamanının uzaması difüzyon olasılığını artırmaktadır. Daha uzun kalış süresinde gaz molekülleri arasındaki çarpışma daha fazla olacaktır.

Difüzyon ile birikim $<0,5 \mu\text{m}$ çaptaki partiküllerde uygun olduğundan, yaygın kullanılan ilaçların birikimi için çok uygun değildir. Çünkü bu ilaçlar genellikle 1-10 μm boyutu aralığındaki partikülleri içermektedir (Scheuch ve ark., 2006).

4) Tutma (interception): Bu durum genellikle lifli partiküllerde olmaktadır. Uzun şekillerinden dolayı hava yolu duvarına temas eder etmez birikirler.

Aerolize ilaçların partikülleri genellikle düzgün bir şekle sahiptir ve çeşitli düzlemlerde simetriktir. Bu partiküller çok nadir 1 μm 'den daha küçük olurlar; bundan dolayı sedimentasyon ve durağan çarpma mekanizmaları birikimde daha etkilidir (Tena ve Clara, 2012). Bu iki mekanizma solunum sisteminde ayrıca partikül birikimi hesaplanmasında kullanılır ve buna genellikle bölgesel tutulum denir. (Banerjee, 2007). Aerosol birikim mekanizmaları Çizelge 1.1'de verilmektedir.



Şekil 1.3. Akciğerlerdeki birikim mekanizmaları (Taylor ve Kelleway, 2001)

Genellikle KOAÇ 10 μm 'den yüksek olan partiküller orofarinkste, 5-10 μm arasında olanlar merkezi solunum yollarında ve 0,5-5 μm arasında olanlar küçük hava yollarında ve alveollerde birikirler. Bu nedenle topikal solunum tedavisi için en iyisi 0,5-5 μm arasında KOAÇ değeri olanları kullanmaktır. Bu aerosolün solunabilirlik fraksiyonu olarak bilinir (Tena ve Clara, 2012).

Çizelge 1.1. Aerosol birikim mekanizmaları (Courrier ve ark., 2002)

Bölge	Boyut (μm)	Mekanizma
Geniş havayolları	5-9 (yavaş inhalasyon), 3-6 (hızlı inhalasyon)	Durağan çarpma
Küçük havayolları	1-5	Sedimentasyon
Respiratuar bronşiyoller	1-3	Sedimentasyon
Alveoller	$\leq 0,5$	Brown hareketi ile difüzyon

b) Hastanın Nefes Alma Modeli (akış hızı, soluk alma hacmi, soluk tutma)

Partiküllerin hava akımı ile taşınması sırasında yörüngeleri, partiküllerin özelliklerinden etkilenmektedir. Akciğerlerdeki akış hızı tidal hacim ve solunum hızından etkilenmektedir (Tena ve Clara, 2012). Hızlı nefes alma partiküllerin larinks

ve buruna çarparak tutulmasını sağlamakta ve böylece partiküllerin akciğerlere penetrasyonu önlenmiş olmaktadır. Hızlı bir inhalasyon ortalama 3 μm partikül büyüklüğüne sahip partiküllerin akciğerlerde tutulmasını azaltırken, diğer taraftan yavaş bir inhalasyon 10 μm 'e kadar büyük partiküllerin akciğerlere girmesine izin vermektedir. Bu ekstratorasik tutulma etkinliği, ağız ve boğazın biyolojik ve anatomik farklılıkları nedeniyle bireyler arasında büyük değişkenliğe sahiptir. Aynı partikül büyüklüğüne sahip partikülleri inhale eden hasta gruplarından birinde boğazda tutulma olmazken, diğer hasta grubunda bu bölgede % 75 tutulum görülmüştür. Bireyler arasındaki bu değişkenlik oldukça yavaş inhale ederek ve küçük partiküller (1-3 μm) kullanarak azaltılabilmektedir. Yavaş respiratuar akış ve küçük partiküllerin kombinasyonu partikül çarpmasının azalmasına ve minimal ekstratorasik tutuluma neden olur. Buna karşın partiküller çok küçük olmamalıdır çünkü küçük partiküller nefes verme sırasında atılırlar ve akciğerde tutulmazlar (Scheuch ve ark., 2006).

c) Higroskopisite Derecesi:

Aerolize partiküller daha büyük ya da daha küçük ölçüde higroskopik olabilirler. Higroskopik özelliğe sahip maddeler bulundukları ortamdaki nemi çekerler. Bu durum, partiküllerde büyüme ya da küçülme olabileceği ve bu modifikasyondan ötürü başlangıçta beklenen tutulum modelinden farklı bir birikim olabileceği anlamına gelmektedir. Partikülün higroskopik büyümeden sonra ulaşacağı partikül çapı, başlangıç çapına, partikülün içsel özelliklerine ve hava yolunun çevresel koşullarına bağlıdır. Hava yolunun içerdiği su buharı mol fraksiyonunun partikülün KOAÇ değerinin artmasında önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir. Genel olarak higroskopik büyümenin 0,1 μm altında KOAÇ değeri olan partiküllerde çok etkili olmadığı görülmüştür, 0,5 μm 'den daha büyük KOAÇ değeri olan partiküller bu duruma daha hassastırlar (Tena ve Clara, 2012).

1.2. Pulmoner Yolla İlaç Uygulamasının Avantaj ve Dezavantajları

Pulmoner yolun, oral ve pulmoner yollara göre birçok avantajı bulunmaktadır. Akciğerler yüksek solüt geçirgenliğine sahiptir, absorpsiyon için geniş bir yüzey alanı vardır (Zhang ve ark., 2011). Akciğerlerin yüzey alanı 80 m^2 ile 140 m^2 arasındadır ki bu alan bir tenis kortunun yarısına denk gelmektedir (Scheuch ve ark., 2006). Ayrıca proteolitik aktivitesi sınırlıdır. Düşük enzimatik aktivite biyoyararlanımın yüksek olmasını sağlamaktadır (Patton ve Byron., 2007). Bunun yanında pulmoner yol non-invazivdir. Pulmoner yolun non-invaziv olması hasta uyumunu artırmaktadır. (Mansour ve ark., 2009) Pulmoner yol ile astım, kistik fibrozis gibi solunum yolu hastalıklarında, etkin madde akciğerlerde lokal olarak taşınarak etki sağlanabilmektedir. Bu hedeflendirme, yüksek düzeyde sistemik ilaca maruz kalma sonucu, potansiyel olarak oluşabilecek yan etkilerin azalmasına neden olabilir. Alternatif olarak, sistemik ilaç uygulamasında alveoler bölgeye hedeflendirme yapılarak, ilacın ince epitel hücrelerden absorbe olup, sistemik dolaşıma geçmesi sağlanabilir (Park ve ark., 2007). Pulmoner bölgelerin birçoğunda alveoler epitel kalınlığı $0,1 \mu\text{m}$ - $0,2 \mu\text{m}$ arasındadır. Alveoler bölgede epitel alanı ile kan arasındaki toplam mesafe $0,5 \mu\text{m}$ - $1 \mu\text{m}$ arasındadır. Bu özellik ilaçların akciğerlerin periferik bölgesinden hızlıca absorbe olabilmesini sağlamaktadır (Scheuch ve ark., 2006). Bu durum hızlı bir etki sağlamak için, ilk geçiş etkisinden kaçınmak için ve oral olarak verilemeyen bu nedenle parenteral uygulama gerektiren biyoterapötikler için arzu edilen bir durumdur. İnce epitel tabakası ve buradaki zengin kan akımı ilacın hızlı absorpsiyonuna ve ilacın etkisinin hızlı başlangıcına olanak verir. (Park ve ark., 2007) Ayrıca, akciğerlerde örneğin tüberküloz gibi hastalıkların tedavisi için alveoler makrofajlar gibi belirli akciğer hücrelerine, hedeflendirme yapılabilir (Sung ve ark., 2007) .

Pulmoner yolla ilaç verilisinin yukarıda sayılan avantajlarının yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Lokal etkili ilaçlarda orofaringeal depozisyon lokal yan etkiler doğurabilir. Hasta aparatları doğru şekilde kullanmakta zorlanabilir. Sistemik etkili ilaçlarda ise karşılaşılabilecek sorunlar şu şekildedir: akciğerler ilaç dağılımı için ulaşılması kolay bir alan değildir. Hava yoluna ilacın verilmesi için kompleks

aparatların kullanımını gerektirir ve aparatlar yeterli olmayabilir. Aerosol aparatlarının kullanımı zordur. Dikkatli bir eğitimin ardından bile yetişkin hastaların %50'si ya da daha fazlasının geleneksel ölçülü doz inhaleleri kullanmakta zorlandığı görülmüştür. Kullanım, ayrıca çok genç ve çok yaşlı hastalarda olmayan beceri gerektirmektedir. Çeşitli fizyolojik (solunum manevrası gibi) ve farmasötik (aparata ve formülasyona ait) faktörler ilacın akciğerdeki dağılımı tekrarlanabilirliğini etkileyebilmektedir. Dar bir terapötik indeksi olan sistemik ilaçlar için bu değişkenlik kabul edilebilir değildir. Fizyolojik bir bariyer olan mukus tabakası ve ilacın mukus ile etkileşimi ilaç absorpsiyonunu sınırlayabilir. Mukosilier klirens ilacın akciğerlerdeki tutulum zamanını azaltmaktadır. Yavaş absorbe olan ilaçların etkili bir şekilde dağılımı için akciğerlerin mukosilier transport yeteneğini yenmesi gerekmektedir (Taylor ve Kelleway, 2001)

1.3. Pulmoner Yolla Uygulanan İlaç Şekilleri

Pulmoner yol uygulamasında antibiyotikler, akciğer surfaktanları, kemoterapi ilaçları, peptit/proteinler, bronkodilatörler, aşılar, antiproteazlar ve gen tedavisinde kullanılan etkin maddeleri içeren ilaç taşıyıcı sistemler gibi geniş bir aralıkta uygulama yapılabilmektedir. Bu ilaçlar çeşitli cihazlar ile uygulanmaktadır (Labiris ve ark., 2006).

Piyasada ticari olarak 3 tip pulmoner uygulama cihazı mevcuttur: Basıncılı ölçülü doz inhaleler, nebulizatörler ve kuru toz inhaleler (Labiris ve Dolovich, 2003) .

1.3.1. Nebulizatörler

Nebulizatörler ilacın sulu çözeltisini veya mikronize süspansiyonunu inhalasyon için aerosole çeviren aparatlardır (Taylor ve Kelleway, 2001). Nebulizatörler, ölçülü doz inhaleler ve kuru toz inhaleler gibi sistemlerle verilemeyen büyük hacimdeki sıvıların ve süspansiyonların verilmesi için uygun sistemlerdir. Nebulizatörlerde

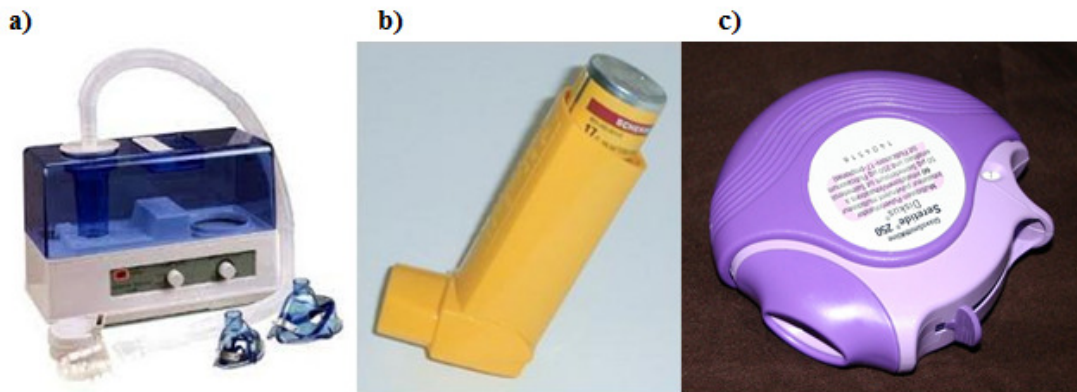
kullanılacak formülasyonlar, su, yardımcı çözücü (etanol, gliserin, propilen glikol gibi) ve yüzey etkin madde içermektedir. Özellikle yüksek terapötik dozda kullanılan proteinler için uygun veriliş sistemleridir (Shoyele ve Slowey, 2006). En eski aerosol sistemi olan nebulizatörler jet nebulizatörlerden ultrasonik nebulizatörlere doğru gelişme göstermiştir. Genel olarak nebulizatörler sıkıştırılmış hava ya da ultrasonik güçten faydalanarak, formülasyonda bulunan etkin maddeyi parçalayarak inhale aerosol damlacıkları haline getirmektedir. Nebulizatörler daha küçük çap ve daha etkin aerosol performansı sunmaktadırlar. Ancak ölçülü doz inhaleler (ÖDİ) ve kuru toz inhaleler (KTİ) ile karşılaştırıldığında nebulizatörler genellikle daha hacimlidir, daha uzun uygulama zamanı gerektirmektedir ve daha düşük verimlidirler (Yeo ve ark., 2010; Labiris ve Dolovich, 2001) .

1.3.2. Ölçülü Doz İnhalerler (ÖDİ)

Ölçülü doz inhaleler (ÖDİ) oral veya nazal kullanım için tasarlanan farmasötik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Genellikle bir ÖDİ sistemi, aktive edici kısım (aktüatör), ölçülü valf, süspansiyon veya çözeltiyi içeren basınçlı bir taşıyıcı kap ve itici gaz içermektedir. Bir ÖDİ sistemi yüzlerce kez püskürtme yapabilir ve her püskürtmede 25-100 µl çözücü içinde 10-100 µg disperse edilmiş etkin madde bulunmaktadır. (Takka, 2009) İlaç bir valfe monte edilmiş metal kutuda bulunan itici gaz formülasyonu içerisinde süspande veya çözünmüş halde bulunabilir. Ölçülü valfin aktivasyonu itici gazın hızlıca genişlemesine neden olur ve bu durum aerosol damlacıklarının oluşumunu sağlar. Ölçülü doz inhaleler genellikle küçük ve portatiftir; çoklu dozludur ve verilen dozlar eşit ve tekrarlanabilir; ancak ÖDİ teknolojisinin kullanımı nefes koordinasyonu gerekliliği, ağızda yüksek birikim ve her bir aerosol damlacığında sınırlı doz olması gibi nedenlerden dolayı sınırlıdır (Yeo ve ark., 2010).

1.3.3. Kuru Toz İnhalerler (KTİ)

Kuru toz inhalerler (KTİ) ÖDİ'lerin uygulaması sırasındaki koordinasyon zorluklarını gidermek amacı ile dizayn edilmiştir (Labiris ve Dolovich, 2001). Bu sistemler özellikle de kloroflorokarbon gazlarının ozon tabakasına vermiş olduğu zarardan dolayı bu gazı içeren ÖDİ sistemlere alternatif olarak ortaya çıkmıştır (Smith ve Billings, 2003). ÖDİ'lerde %90 hatalı kullanıma neden olan nefes koordinasyonu gerekliliği KTİ'lerde bulunmamaktadır. KTİ'lerde ise güçlü partiküllerarası çekim nedeniyle ilaç dağılımı büyük ölçüde solunumsal akış hızına bağlıdır. (Daniher ve Zhu, 2008). Ayrıca nem girişi stabilite problemlerine neden olabilmektedir (Labiris ve Dolovich, 2003). KTİ sistemler yalnızca toz etkin madde veya etkin madde ile yardımcı maddenin karıştırılmasıyla hazırlanır. Yardımcı madde olarak genelde laktoz kullanılır. KTİ sistemlerinin hazırlanmasında, etkin maddenin özellikleri, tozun formülasyonu, tozun üretim işlemi ve ambalajlama gibi pekçok faktör etkilidir. KTİ sistemlerde partikül boyutunun 1-5 μm arasında olması istenir (Newman ve Busse, 2002). Çok küçük partikül boyutuna sahip tozlarda akış ve içerik tek düzeliliği problemi görülmektedir. Formülasyonların hazırlanmasında yardımcı madde kullanılması bu problemleri ortadan kaldırmaktadır (Campen ve Venthoey, 2002).



Şekil 1.4. a) Nebülizatör örneği b) ÖDİ örneği c) KTİ örneği

1.4. Nanopartiküler Sistemler

Nanoteknoloji son yıllarda çok farklı uygulama alanlarında hızlı bir şekilde gelişmektedir. Eczacılık alanında nanoteknolojinin uygulama alanı ise, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Gülsün ve ark., 2009).

Eczacılık alanında en sık karşılaşılan problemlerden birisi, özelliklede içeriklerinin çözünürlükleri hem suda, hem de organik çözücülerde zayıf olan ilaçlardır. Çalışmaları süren ilaçların yaklaşık %40'ı çözünürlük problemi ve buna bağlı olarak da düşük biyoyararlanım göstermektedirler. Bu problemi geleneksel formülasyon yaklaşımları ile çözmek oldukça zordur. (Gao ve ark., 2008) Yıllar boyunca bu problemi aşmak için pek çok yöntem denenmiştir. Bunlara örnek olarak;

- Sürfaktanlar
- Kompleks oluşturma (siklodekstrinler, makromoleküller)
- Self-emulsifiye ilaç taşıyıcı sistemler
- Mikroemülsiyonlar
- Özellikle oral uygulama için mikronize edilmiş tozların kullanımı verilebilir (Keck ve ark., 2008).

Bu yöntemler genellikle düşük dozlarda yüksek etkiye sahip ilaçlar için kullanılan metotlardır. Yani bütün etkin maddeler için uygun yöntemler değildir. Uygulanabilmesi için yeterli iyonize olabilme yeteneği, yağlarda veya diğer hidrofob ortamlarda yeterli çözünürlük, siklodekstrin halkasına bağlanması için uygun partikül büyüklüğü ve şekline sahip olmasının gerekmesi gibi özel gereklilikler şarttır (Gao ve ark., 2008).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin gelişimi 1960'larda başlamıştır (Kreuter, 2007). Nanopartiküller boyutları 1-1000 nm (daha geniş bir tanımla mikron altı boyutlarda) arasında değişen, doğal veya sentetik polimerlerden, seramik veya inorganik elementlerden hazırlanan katı kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemlerle taşınması amaçlanan ilaç nanopartikül içinde çözünmüş ya da tutulmuş

olabileceği gibi yüzeyine adsorbe edilmiş ya da kovalan olarak bağlanmış olabilir (Soppimath ve ark., 2001; Mansour ve ark., 2009).

Terapötik olarak kullanılan polimerik nanopartiküller, vücutta biyolojik olarak uyumlu polimerlere dönüşebilen ve doğal yollardan reabsorbe olabilen sentetik biyobozunabilir materyaller içermektedir (Anderson ve Shive, 1997). Bu polimerlerin parçalanmalarının manipülasyonu ile ilaç salım hızı etkilenebilmektedir.

Nanopartiküller kanserden tüberküloza kadar bir çok hastalık için ilaç taşıyıcı sistemler olarak geliştirilmiştir (Pandey ve Khuller, 2005; Gelperina ve ark., 2005). Partiküllerin yüzeyinde ve boyutunda yapılacak olan değişiklikler partiküllerin dolaşımdaki kalış süresini artırır. Partikül yüzeyinde ve boyutunda yapılan değişiklikler partiküllerin klirensten korunarak dolaşımda kalış süresini artırmak, fiziksel bariyerler (ör. kan-beyin yada mukozal) üzerinden taşınmasını sağlamak ya da absorpsiyon yerinde kalma süresini uzatmak için kullanılmıştır. Nanopartiküller ayrıca kanser tedavisinde tümör hücrelerine ve enflamasyonda merkezi rol oynayan ve bulaşıcı hastalıklara neden olan mikroorganizmaları barındıran makrofajlara hedeflendirme amacıyla modifiye edilebilir (Sung ve ark., 2007).

Günümüzde ilaç otoriteleri tarafından ruhsatlandırılan bazı nanopartikül ürünlerin listesi Çizelge 1.2’de verilmektedir.

Çizelge 1.2. İlaç otoriteleri tarafından ruhsatlandırılan bazı nanopartiküler ürünlere örnekler (Kesisoglou ve ark., 2007; Chen ve ark., 2011)

Ürün	Üretici firma	Etkin madde	Uygulama Alanı	FDA Onayı
Rapamune	Elan/Merck&Co, King of Prussia, PA	Sirolimus	İmmünosupresan	2000
Emend	Elan/Merck&Co, King of Prussia, PA	Aprepitant	Antiemetik	2003
Tricor	Elan/Abbot	Fenofibrat	Kolestrol düşürücü	2004
Triglide	SkyPharma/First Horizon Pharmaceuticals	Fenofibrat	Kolestrol düşürücü	2005

Çizelge 1.2. Devamı.

Megace ES	Elan/Par Pharm	Megestrol asetat	Yeme Bozukluklarında	2005
Abraxane	American Bioscience, Santa Monica, CA	Paklitaksel	Kanser tedavisi	2005
Invega	Elan/Johnson & Johnson	Paliperidon palmitat	Şizofreni tedavisi	2009

1.4.1. Nanopartiküllerin Avantajları

Nanopartiküllerin boyutlarının küçük olması ve istenilen büyüklükte sentezlenebilmeleri ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmalarının temel nedenidir. Bununla birlikte yüzey yüklerinin değiştirilebilmesi ve yüzeylerinin modifiye edilebilmeleri nanopartiküllerin dolaşımında daha uzun süre kalmalarına olanak sağlar.

Nanopartiküller küçük boyutlarından dolayı ince kapiler membranları aşarak hücrelere ulaşip hedef bölgede birikme yapabilirler. Bu sebeple, istenmeyen yan etki ve terapötik maddenin toksisitesi azaltılmış; terapötik etki de artırılmış olur. Özellikle 200 nm altında partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller, retiküloendotel sistem (RES) etkisinden yararlanarak tümörlü bölgede birikmektedir. Pasif hedeflendirme yanında nanopartiküllerin yüzeylerinin ligant, monoklonal antikor gibi moleküllerle modifiye edilmesi sonucu istenilen bölgeye hücresel boyutta aktif hedeflendirme sağlanabilir. Nanopartiküllerin hedeflendirmesi sonucu ilacın neden olduğu sistemik toksisitenin önüne geçilerek, düşük ilaç konsantrasyonu ile terapötik doz sağlanmış olur. Bununla birlikte terapötik ajanlar için konvansiyonel yöntemlerin sunamadığı ilaç stabilitesi ve yüksek biyoyararlanım gibi yeni terapötik fırsatlar sunmaktadır (Bilensoy, 2014).

Çok geniş yüzey alanına sahip nanopartiküller doyumluk çözünürlüğünü artırır; ayrıca çözünme kinetiklerini de hızlandırmaktadır. Geniş yüzey alanı daha hızlı ilaç salımına izin verir ve bundan dolayı absorpsiyon bölgesinde daha kısa zamanda, daha yüksek etkin madde konsantrasyonuna ulaşılır. Bu etki özellikle düşük çözünürlüğü olan ilaçlarda öne çıkmaktadır (Müller ve ark., 2001).

1.4.2. Nanopartiküllerin Dezavantajları

Nanopartiküllerin toksisitesi ile ilgili çalışmalar, son zamanlarda ortaya çıkan literatürlere rağmen hala nadirdir (SCENIHR/002/05; 2006). Biyolojik olarak parçalanamayan birçok nanopartikül toksiktir ve vücut hücrelerini etkilemektedir. Biyolojik olarak uyumlu olan polimerler ile nanopartiküllerin kaplanması veya üretimi, nanopartiküllerin performanslarını geliştirir, toksisitelerini düşürür ve uygulamalar hücreler üzerine negatif etki ile sonuçlanmaz. Biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen PLGA, PCL gibi sentetik materyaller ya da kollojen, kitozan gibi doğal materyaller nanopartiküllerin medikal uygulamalarında kullanılabilir (Ai ve ark., 2011).

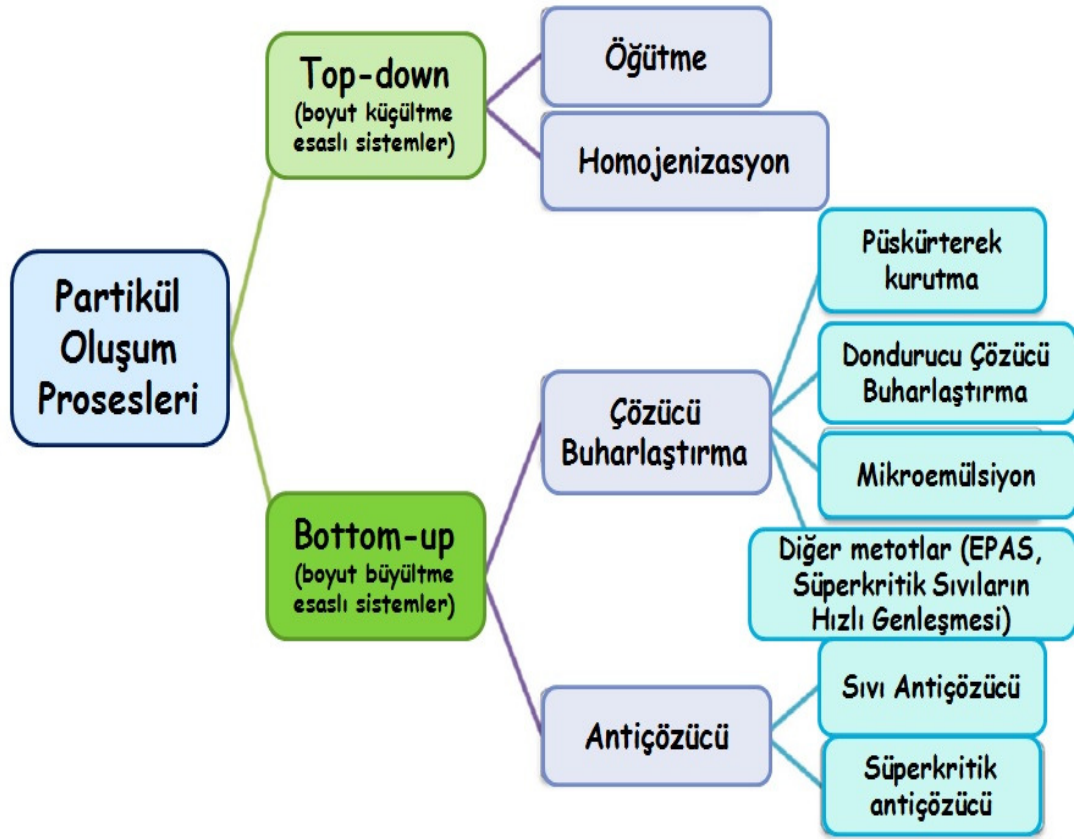
1.4.3. Pulmoner Yolla Uygulanan Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri

Şekil 1.5’de değişik inhaler terapötik nanopartiküllerinin üretimi için kullanılan üretim yöntemleri özetlenmiştir. Genel olarak proses, başlangıç materyaline göre bottom-up (boyut büyültme esaslı sistemler) ve top-down (boyut küçültme esaslı sistemler) olmak üzere 2 gruba ayrılabilir (Bailey ve Berkland, 2009). Top-down metotlar hedeflenen nanopartikülden daha büyük olan bir katı partikül ile başlamaktadır. Bu büyük partikül mekanik olarak kırılarak daha küçük boyuta getirilmektedir. Yaş ve jet öğütme gibi öğütme metotları ve rotor stator ya da yüksek basınçlı homojenizasyon gibi homojenizasyon metotları top-down proseslere örnektir. Yaş öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH) ilaç nanopartikülü üretiminde kullanılan en gelişmiş proseslerdir (Keck ve Müller, 2006). İkisi de ölçeklenebilir, güvenilir ve dar bir nanopartikül çap dağılımı sağlayan metotlardır; ancak bu metotlarda uygulanan mekanik prosedürden dolayı genellikle çok fazla zaman harcanmaktadır ve çok fazla enerji girdisi gerekmektedir. Ayrıca potansiyel olarak amorf kısmı artırabilir ve ortamdaki öğütücüden ya da homojenizasyon odasından dolayı kontaminasyona yol açabilir (Zhang ve ark., 2011).

Buna karşılık bottom-up metotlarda partiküller moleküler seviyeden itibaren oluşturulmaktadır. Bu nedenle partiküllerin boyut, morfoloji ve kristalite gibi

özelliklerinin kontrolü top-down prosese göre daha iyidir (Chow ve ark., 2007). Bottom-up proses ile nanopartikül üretimi kristalizasyon ve çözücü buharlaştırma ile olmaktadır. Genel olarak bottom-up prosesler top-down metotlara göre daha sofistike ve daha komplekslerdir. Bunlar kristalleşme ve çözücü uzaklaştırma için kullanılan yöntemlere bağlı olarak çözücü buharlaştırma ve antiçözücü metotlar olarak da kategorize edilebilir. Çözücü buharlaştırma metotunda, partiküller çözücünden ısıtma, dondurma ya da vakumlu kurutma sırasında kurtulurken oluşmaktadırlar. Antiçözücü metotta ise partikül üretimi antiçözücü olan bir çözelti ile karıştırarak olmaktadır. Bu durum çözünme enerjisini düşürür. Genellikle çözücü buharlaştırma metodu ÖDİ ve KTİ’de direk olarak kullanılabilecek kuru toz üretiminde ya da nebulizatörler için nanosüspansiyon üretiminde kullanılmaktadır. Antiçözücü metotlar ise çözücü ve antiçözücü karışımını içeren bir likit nanosüspansiyon eldesini sağlar. Nanosüspansiyonlar hem çözücüde hem antiçözücüde olası bir Ostwald olgunlaşması olayından dolayı nebulizatörlerde direkt kullanım için uygun değildir. Ayrıca ÖDİ ve KTİ’de de kurutma ve liyofilizasyon gibi ek bir proses olmadan da direkt olarak kullanımları uygun değildir.

Püskürterek kurutma metodu, en çok kullanılan ve çalışılan çözücü buharlaştırma metodudur. Bu metotta, atomize bir damlacık içindeki çözücü termal olarak püskürtme kurutma odasında uzaklaştırılmaktadır. Kuru toz üretiminde tek adımda yürüyen bir prosesdir ve morfoloji, yoğunluk ve alan kompozisyonu gibi partikül özelliklerinin kontrolüne olanak sağlar (Weers ve ark., 2007). Ancak bu tekniğin sıcağa hassas maddelerin degradasyon olasılığı ve verim yetersizliği gibi birkaç dezavantajı mevcuttur (Chow ve ark., 2007).



Şekil 1.5. Nanopartikül oluşum prosesleri (Zhang ve ark., 2011)

Bir sıvı içine püskürterek dondurma ile bu dezavantajların üstesinden gelinebilir. Kuru partiküller çözücü buharlaştırmanın yerine, dondurucu bir sıvı içine atomize damlacıklar şeklinde püskürtülüp ardından liyofilizasyon yapılarak donmuş damlalar elde edilerek de üretilebilir. Buna bağlı olarak, dondurucu operasyon koşulları sayesinde dekompozisyondan sakınılmış olunur ve proses verimi %95'e kadar yükselir. Ultra hızlı dondurma gibi bir seri dondurma metodu bu nedenle geliştirilmiştir. Süperkritik çözeltilerin hızlı genleşmesi partiküllerin bir püskürtücü yardımıyla genleşen bir süperkritik sıvı içinde üretilmesi için eşsiz bir prosestir. Bu proses dar bir çap dağılımında küçük partiküllerin üretilmesini sağlar ve hiçbir atık çözücü kalmamaktadır. Sulu bir çözelti içinde buharlaştırarak çöktürme ve mikroemülsiyon gibi diğer çözücü buharlaştırma metotları da inhaler ilaç nanopartikülleri için geliştirilmiştir (Dickinson ve ark., 2001).

Antiçözücü prosesi antiçözücü çeşidine (süperkritik sıvılar gibi) ve kristalizasyon için kullanılan aparata bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Süperkritik çözeltiler, çoğunlukla da süperkritik CO₂, antiçözücü olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni birçok organik çözücünde kabul edilebilir oranda çözünmesi ve çoğu ilaç etkin maddesinin de bu çözücülerde ihmal edilebilir bir çözünürlüğe sahip olmasıdır. İlaç gelişiminde süperkritik sıvı uygulamaları kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Sıvı antiçözücü prosesi yoğunlaştırma prosesinin farklı şekli olarak kullanılmıştır ve küçük partikül çapı eldesinde başarılı olunmuştur. Yüksek hızlı çarpan kristalizasyon ise yoğunlaştırma prosesinde yeni bir yaklaşımdır ve nanopartikül yapımında kullanılmıştır ancak inhale nanopartikül yapımı için henüz kullanılmamıştır (Kawashima ve York, 2008).

Nanopartikül oluşturma metotlarının çoğunda üretim verimi %80-%100 olarak rapor edilmiştir. Prosesin spesifik verimi sadece nanopartikülü meydana getirmede kullanılan metota bağlı değildir aynı zamanda operasyon koşullarına da bağlıdır. Bütün bunların sonucunda; proses ölçekleme yeteneğine, sonuç verime, etkin madde ve proses arasındaki uyuma, yatırıma operasyonel tutara bağlı olarak seçilmelidir (Zhang ve ark., 2011).

1.4.3.1. Top-Down Metotlar

Bu teknoloji homojenizasyon ve öğütme kullanılarak uygulanır. Top – down teknolojileri esasında bir disintegrasyon metotudur (Gülsün ve ark., 2009).

1.4.3.1.1. Yaş Öğütme

Bu metotta etkin madde, ve stabilizer bir dispersiyon ortamında (genellikle su) disperse edilir ve bu karışım daha sonra öğütme odacığına konulur (Gao ve ark., 2008). Ortam öğütücüsü genellikle cam, zirkonyum oksit ya da yüksek çapraz bağlı polistiren resinden yapılmaktadır (Zhang ve ark., 2011). Öğütme ortamı çok hızlı bir şekilde dönmeye başlar ve bu işlem partikül büyüklüğü nano boyuta gelinceye kadar devam eder (Gao ve ark., 2008). Öğütme ortamının hareketiyle partikül boyutu

küçülür. Yüksek enerji oluşturan parçalama gücü ve çarpışma süresince oluşan güç nanometre boyutunda partiküllerin meydana gelmesi için gereken enerjiyi sağlar (Shegokar ve Müller, 2010). Presipitasyon tekniğine (bottom-up) kıyasla daha fazla enerji girdisine ihtiyaç vardır (Gao ve ark., 2008).

Yaş öğütme üretim metodu, FDA tarafından onaylı birkaç ilaçta başarıyla uygulanmıştır (Van Eerdenbrugh ve ark., 2008). Genellikle 100-400 nm boyut aralığındaki NanoCrystal® yaş öğütme prosesine bir örnektir. Yaş öğütme prosesinde 100 mg'lık laboratuvar ölçeğinden, 500 kg'lık ticari ölçeğe kadar, seriler arasında partikül boyut aralığı dağılımında önemli bir varyasyon olmadan ölçek büyütmesi yapılabilmektedir (Date ve Patravale, 2004).

1.4.3.1.2. Yüksek Basınç Homojenizasyonu

Yaş öğütme prosesine benzer olarak, yüksek basınç homojenizasyonu da (HPH) ölçeklendirilebilir ve Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmış birkaç ticari örneği mevcuttur. Genellikle kaba etkin madde partikülü ve stabilizerden oluşan bir bulamaç besleme akışı güçlendirici bir pompa ile 100-2000 bara basınçlandırılmaktadır. Yüksek basınç akışı yüksek parçalama kuvveti, kavitasyon ve partiküller arasında çarpışmanın olduğu ince bir valfden geçmektedir (Jacobs ve Müller, 2002). HPH prosesi ayrıca α -laktoz ve sükroz nanopartikülleri gibi nanoboyutta bulk ajan üretiminde de kullanılmaktadır. Bu maddeler düşük dozlu ÖDİ formülasyonlarında aerosolün performansını artırmaktadır. Homojenizasyon basıncı çeşitli çalışmalarda 690 bardan 1724 bara kadar rapor edilmiştir. Yaş öğütme prosesi ile karşılaştırıldığında genellikle daha kısa proses zamanı (30 dk'dan birkaç saate kadar) gerektirmektedir. Proses zamanı homojenizasyon basıncına bağlıdır ki bunu da akış hızı, sirkülasyon sayısı, yüklenen katı ve işlenen miktar belirlemektedir. Bu parametreler etkin maddeye spesifiktir ve temel olarak partikül sertliğine göre belirlenmektedir (James ve ark., 2008).

1.4.3.2. Bottom-Up Metotlar

1.4.3.2.1. Çözücü Buharlaştırma Metotları

1.4.3.2.1.1. Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma, etkin bir biçimde katı halde solunabilir parçacıklar üretebilmek için kullanılan bir farmasötik üretim metotudur. Bu metotta besleme çözeltisi oda sıcaklığında çözeltiyi atomize hale getiren enjektöre pompalanır. Atomize çözelti daha önceden ısıtılmış içerisinde kurutucu gaz olan özel bir bölmede kurutulur ve böylece sistemden su ayrıştırılır. Böylece kuru partiküller oluşur. Hazırlanan bu partiküller siklon ayırma aleti ile toplanır (Mosén ve ark., 2004). Final partikül boyutu başlangıçtaki damlacık boyutuna ve başlangıç çözeltisinin konsantrasyonuna bağlıdır. Püskürterek kurutma ile elde edilen tipik bir farmasötik partikülün boyutu 0,5-50 μm arasındadır. Bu metot ilaç mikropartiküllerinin üretiminde ve katı lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında (SLNs) kullanılmasına rağmen, saf inhaler ilaç nanopartiküllerinin üretiminde geniş bir kullanımı yoktur. Püskürterek kurutma nanopartikül üretiminde ciddi sınırlamalar getirse de, kuru nanopartiküller elde etmek için üretim sonrası proseslerde sıklıkla kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2011).

1.4.3.2.1.2. Dondurucu Çözücü Buharlaştırma

Bir sıvı içine püskürterek dondurma (SFL) da dahil bir seri teknikte dondurucu sıvılarla çözücü buharlaştırma amaçlanmıştır ve dondurarak kurutma işlemi geniş aralıkta soğutma hızlarında (102-106 K/s) yapılmaktadır. Soğutma prosesi sırasında partikül büyümesini önlemek için soğutma hızı geleneksel liyofilizasyonda kullanılan hızdan yeteri kadar yüksekte (yaklaşık 1 K/s) tutulmaktadır. Bu dondurucu metotlar ile genellikle amorf partiküller elde edilmektedir (Engstrom ve ark., 2008).

1.4.3.2.1.3. Sulu Bir Çözelti İçerisinde Buharlaştırıcı Presipitasyon (EPAS)

EPAS, SFL tekniğine çok benzemektedir. Burada dondurucu sıvı yerine ısıtılmış su kullanılmaktadır. Etkin maddenin bir bobin ile ön ısıtmaya uğramış organik bir çözücüdeki çözeltisi, hidrofilik bir stabilizör içeren yine ısıtılmış sulu çözeltiye bir atomizer yardımı ile enjekte edilir ve sulu bir dispersiyon oluşturulur. Yoğun atomizasyon organik çözücü ile sulu çözücü arasında bir arayüz oluşmasını sağlar ve sulu çözelti içerisindeki organik damlacıkların hızlı bir şekilde buharlaşmasına neden olur. Bu hızlı buharlaşma yüksek bir doygunluk konsantrasyonu sağlar. Böylece etkin maddenin nükleasyonu ile amorf partiküller oluşur (Chen ve ark., 2002).

1.4.3.2.1.4. Mikroemülsiyon

Bu yöntem yağ/su emülsiyon hazırlanması ve daha sonra yağ fazının (genellikle uçucu organik çözücü) buharlaştırılarak ayrılması şeklindedir. Emülsiyonlar polimer ve etkin madde içeren organik fazın, emulsifiye edici ajan içeren sulu faz içinde emülsiyon haline getirilmesi ile hazırlanır. Organik çözücü polimer fazından çıkıp, sulu faz içine difüze olur, daha sonra buharlaştırılır ve etkin madde içeren polimerik nanopartiküller oluşur. Bu yöntemde polilaktik asit (PLA) , poliglikolik asit (PGA) ve polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) gibi biyolojik olarak parçalanabilir polimerler katı nanopartikül için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır (Mansour ve ark., 2009). Bu metotta partikül boyutu kontrolü aşağıdaki parametreler ile sağlanabilir:

- Sürfaktan/Ko-Sürfaktan tipi
- Çözücü tipi
- Su/Sürfaktan molar oranı
- Reaktiflerin konsantrasyonu gibi (Zielińska-Jurek ve ark., 2010).

1.4.3.2.1.5. Yoğunlaşmış Aerosol Oluşumu

Yoğunlaşmış aerosol oluşumu; vakumlanmış bir katı ya da sıvının yoğunlaştırılmasıyla nanopartikül üretme metotudur. Bu uygulamada, bir etkin madde çözeltisi ısıtılmış bir kapiler aracılığıyla, hassas bir şekilde kontrollü enerji girişi ile beslenir. Çözelti kapiller içinde vakumlanmıştır ve kapilleri bir sıcak jet buharı şeklinde terkeder. Sonuç partiküller daha sonra soğutulur ve inhalasyon için uygun partiküller oluşturmak amacıyla ortam havası ile yoğunlaştırılır (Gupta ve ark., 2003).

1.4.3.2.1.6. Süperkritik Çözeltilerin Hızlı Genleşmesi (RESS)

RESS en eski süperkritik partikül mühendisliği teknolojisidir ve süperkritik sıvıların ayarlanabilir çözünme gücünden yararlanmaktadır. Önceden ısıtılmış bir süperkritik ilaç çözeltisi bir enjektörden geçirilirken hızlıca soğutulur ve bu da yoğunlukta ve çözünme gücünde ani bir düşüşe yol açar ve çözeltinin çökmesine neden olur. Anlık homojen süpersaturasyonun oluşumu dar aralıkta küçük partiküllerin üretilmesine olanak sağlar. Organik çözücüler gerekli değildir ya da kosolvan olarak minimal düzeyde kullanılırlar. Yöntemin dezavantajı sadece süperkritik sıvılarda yüksek çözünürlüğü olan ilaçlar için uygulanabilir olmasıdır (Pasquali ve ark., 2008).

1.4.3.2.2. Antiçözücü Metotlar

Bir çözeltiyi bir antiçözücü ile karıştırmak süpersaturasyona neden olur ve bu durum nükleasyonu ve aynı zamanda kondensasyon ve koagülasyon ile büyümeyi indükler (Dalvi ve Dave, 2009). Etkin madde çözücü içinde çözünüyor olmalıdır; ancak pratik olarak antiçözücü içinde çözünmemelidir. Ayrıca çözücü ve antiçözücü operasyon koşullarında karışabiliyor olmalıdır. Bu metotta karıştırma işlemi final partikülün boyutunu ve çap dağılımını kontrol etme açısından kritik bir faktördür (Yang ve ark., 2005). Süpersaturasyon yeterince yüksek ve karıştırma homojen olduğunda hızlı nükleasyon çözeltinin büyük kısmını tüketir ve kristal büyümesi durdurulur. Böylece

partikül çapı ve çap dağılımı mükemmel bir şekilde kontrol edilebilir (Dalvi ve Dave, 2009). Presipitasyon sırasında ilaç yüzeyine absorbe olan sürfaktanlar, partikülü sterik ve elektrostatik stabilizasyon ile stabilize etmektedirler (Yang ve ark., 2005).

1.5. Nanopartiküllerin Pulmoner Yolla Uygulanması

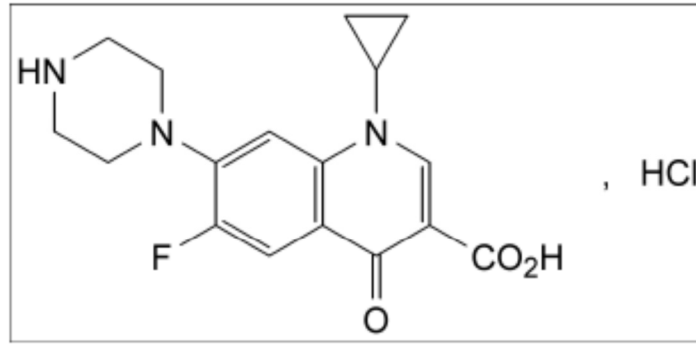
Nanotaşıyıcı sistemler pulmoner uygulamada pek çok avantaj sağlamaktadır (Mansour ve ark., 2009). Akciğerler ilaçların uygulanmasında non-invaziv bir yoldur. Nanopartiküller akciğer dokularında uzatılmış salım etkisi sağlamakta ve buradan da sistemik dolaşıma geçiş olmaktadır. Bu durum dozaj sıklığının azalmasını ve hasta uyumunun artmasını sağlamaktadır (Sung ve ark., 2007). Nanopartiküler sistemler ile ilaç dozunun alveoller içinde nispeten homojen bir dağılım göstermesi sağlanır. Nanopartiküller aynı zamanda makromoleküllerin uygulanması için uygun yapılardır. Nanopartiküller ile ilacın yan etki oluşturma potansiyeli azalırken, diğer taraftan hücresel alım potansiyeli artmaktadır (Mansour ve ark., 2009). Nanopartiküller pulmoner yol ile uygulanan ilaç partiküllerinin in-vitro ve in-vivo performansının gelişiminde önemli yararlar sağlamaktadır. ÖDİ ve nebulizatörlerde nanopartikül formülasyonlarının daha iyi doz tekdüzeliğini, daha yüksek dağıtım etkisini ve daha düşük doz gerekliliği gibi bazı klinik avantajlar sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca bunlara ek olarak çözelti formülasyonları ile karşılaştırıldığında süspansiyon nanopartikül formülasyonlarının formülasyondaki düşük çözücü içeriği ve in-vivo girişimi minimize etmesinden dolayı irritasyonu ve potansiyel toksik etkiyi azalttığı görülmüştür. KTİ’de nanopartikül aglomeratları aynı boyuttaki partiküllere göre daha düşük relatif yoğunluğa sahiptir; bu da daha küçük KOAÇ ile sonuçlanmaktadır. Bu durum akciğer depozisyonunu artırır. Ayrıca düşük yoğunlukları toz akışının gelişmesini sağlamaktadır, bu da kolay kullanımı sağlar. İnhal terapötiklerde nanopartiküller mukozal yüzeylere adhezifliği artırdığından kalış zamanının artmasını sağlar. Nanopartiküller çözünürlük ve çözünme hızını artırma eğilimlerinin yanında ayrıca makrofaj klirensini minimize etmektedirler (Zhang ve ark., 2011).

1.6. Siprofloksasin Hidroklorür

Siprofloksasin hidroklorür, stabilite açısından çok dayanıklı olmayan ve özellikle ışığa karşı stabilite problemi olduğu bilinen florokinolon türevi bir maddedir.

Siprofloksasin hidroklorür duyarlı patojenlerin neden olduğu komplike ve komplike olmayan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Endike olduğu durumlar şu şekilde sıralanabilir:

- Solunum enfeksiyonları: Klebsiella, Enterobacter spp, Proteus spp, E. Coli, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus spp, Moraxella catarrhalis, Legionella spp ve Staphylococcus'ların neden olduğu pnömonilerin tedavisinde endikedir. Özellikle Pseudomonas aeruginosa dahil gram negatif organizmaların ya da Stafilokokların neden olduğu orta kulak enfeksiyonları (otitis media) ve paranazal sinüslerin enfeksiyonlarında (sinüzit) endikedir.
- Göz enfeksiyonlarında (bakteriyel endoftalmit tedavisi ve profilaksisinde)
- Böbrek ve/veya idrar yolları enfeksiyonlarında
- Adneksit, prostatit dahil genital organların enfeksiyonlarında
- Gastrointestinal sistem, safra yolları enfeksiyonları, peritonit gibi karın boşluğu enfeksiyonlarında
- Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında
- Kemik ve eklem enfeksiyonlarında
- Septisemide
- İmmün sistemi zayıflamış hastaların enfeksiyonlarında (örneğin immünosupresiflerle tedavi gören veya nötropenik hastalarda) veya enfeksiyon riskinin yüksek olduğu durumlarda profilaktik olarak
- İmmün sistemi baskılanmış hastaların selektif intestinal dekontaminasyonunda
- Neisseria meningitidis'e bağlı invaziv enfeksiyonların profilaksisi (PDR, 2003).



Şekil 1.6. Siprofloksasin hidroklorür'ün açık formülü (European Pharmacopeia-6 (EP6))

Kimyasal adı: 1-siklopropil-6-floro-1,4-dihidro-4-okso-7-(1-piperazinil)-3-kinolon karboksilik asit, monohidroklorür, monohidrat.

Kapalı formülü: $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl \cdot H_2O$

Molekül ağırlığı: 385,8

1.6.1. Kimyasal Özellikleri

Siprofloksasinin diğer florokinolonlardan, kinolon halkasının 6. pozisyonunda flor atomu, 7. pozisyonunda piperazinil halkası ve 1. pozisyonunda siklopropil halkası ile ayrılmaktadır. (Şekil 1.6.) (PDR, 2007).

1.6.2. Fizikokimyasal Özellikleri

Soluk sarı renkli, kısmen higroskopik kristal bir tozudur. Suda çözünür, metanolde az, etanolde çok az çözünür; pratik olarak aseton, etil asetat ve metilen klorürde çözünmez (EP6). Sudaki % 2,5'luk çözeltisinin pH' sı 3 ve 4,5 arasındadır. Ağzı sıkıca kapatılmış kaplarda saklanmalıdır (Martindale, 2009). Siprofloksasinin ışıktan korunacak şekilde paketlenmemesi durumunda, güneş ışığının uzun dalga boylu ultraviyole ışınları (UVA) ile fotodegradasyona uğramaktadır. Siprofloksasin kullanan hastaların pencere camından geçen güneş ışığı ile (≥ 320 nm) ciltlerinde ışık hassasiyeti reaksiyonları görüldüğü bildirilmiştir. Ultraviyole ışığı ile

siprofloksasinin antibakteriyel aktivitesinde azalma görülmektedir. *Escherichia coli* ile yapılan bir çalışmada, 320 nm civarında siprofloksasin'in antibiyotik aktivitesini yaklaşık %50 oranında kaybettiği belirtilmiştir (Phillips ve ark., 1990).

1.6.3. Analiz Yöntemleri

Siprofloksasinin analiz yöntemi olarak UV spektrofotometresi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kullanılmıştır (EP6; Clarke's 2011).

1.6.4. Etki Mekanizması

Siprofloksasin sentetik, geniş spektrumlu bir kinolon antibakteriyel ajandır. Siprofloksasin, çok çeşitli gram negatif ve gram pozitif mikroorganizmalara karşı in vitro etkinliğe sahiptir. Siprofloksasinin bakterisid özelliği, bakteriyel DNA replikasyonu, transkripsiyonu, onarımı ve rekombinasyonu için gerekli enzimler olan tip II topoizomerez (DNA giraz) ve topoizomerez IV enzimlerinin inhibisyonunu içermektedir.

1.6.5. Direnç Mekanizması

Direnç mekanizması: In vitro siprofloksasin direnci yaygınlıkla çoklu adımlı mutasyonlar aracılığıyla topoizomerez-IV ve DNA giraz enzimindeki hedef bölge mutasyonlarına bağlıdır. Tekli mutasyonlar klinik dirençten çok duyarlılıkta azalmaya neden olabilir, ancak çoklu mutasyonlar genellikle klinik siprofloksasin direnci ve kinolon sınıfı arasında çapraz dirençle sonuçlanabilir.

Geçirgenlik bariyerleri (*Pseudomonas aeruginosa*'da yaygındır) ve efflux mekanizmaları gibi diğer antibiyotikleri inaktive eden direnç mekanizmaları siprofloksasine duyarlılığı etkileyebilir. QNR geni tarafından kodlanmış plazmid-aracılı direnç bildirilmiştir. Penisilinler, sefalosporinler, aminoglikozidler, makrolidler ve tetrasiklinleri etkisiz kılan direnç mekanizmaları siprofloksasin

antibakteriyel etkinliğini engellemeyebilirler, siprofloksasin ve diğer bir antimikrobiyal sınıf arasında bilinen bir çapraz direnç yoktur. Bu ilaçlara dirençli organizmalar, siprofloksasine duyarlı olabilir.

1.6.6. Antimikrobiyal Aktivite

Aşağıda sıralanan bakteri cins ve türlerinin in vitro koşullarda siprofloksasine yaygın biçimde duyarlı olduğu gösterilmiştir:

Aerobik Gram-pozitif mikroorganizmalar: *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus* spp. gibi.

Aerobik Gram-negatif mikroorganizmalar: *Brucella* spp., *Neisseria meningitidis*, *Citrobacter koseri* gibi.

Anaerobik mikroorganizmalar: *Mobiluncus*

Diğer mikroorganizmalar: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*.

Aşağıdaki mikroorganizmalar siprofloksasine değişken derecelerde duyarlılık sergiler: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginos* v.b.

İnsanlarda önerilen kullanım, birincil olarak in vitro duyarlılık ile insanlardan elde edilen sınırlı verilerle birlikte deneysel hayvan verilerine temellendirilmiştir. Erişkinlerde 500 mg bid (günde iki doz) dozda ağızdan uygulanan iki aylık siprofloksasin tedavisinin antraks enfeksiyonunun önlenmesinde etkili olduğu kabul edilmektedir.

1.6.7. Farmakokinetik Özellikleri

Siprofloksasinin farmakokinetiği insanlarda değişik popülasyonlarda değerlendirilmiştir. Her 12 saatte bir oral olarak 500 mg siprofloksasin alan yetişkinlerde, kararlı durumda ulaşılan ortalama pik serum konsantrasyonu 2.97 µg/ml'dir; her 12 saatte bir intravenöz 400 mg siprofloksasin uygulanmasını takiben kararlı durumda ulaşılan ortalama pik serum konsantrasyonu ise 4.56 µg/ml'dir. Her iki rejim için kararlı durumdaki ortalama vadi serum konsantrasyonu 0.2 mcg/ml'dir.

Emilim: İntravenöz infüzyondan sonra maksimum serum konsantrasyonuna infüzyonun sonunda ulaşılır. İntravenöz yoldan farmakokinetiği 400 mg doza kadar doğrusaldır.

Biyotransformasyon: Düşük konsantrasyonlu 4 metaboliti olduğu bildirilmiştir. Bu metabolitler desetilensiprofloksasin (M1), sulfosiprofloksasin (M2), oksosiprofloksasin (M3) ve formilsiprofloksasin (M4) olup; M1 ve M3'ün in vitro antimikrobiyal aktivitesi nalidiksik asitle karşılaştırılabilir niteliktedir. Daha az miktarda bulunan M4'ün in vitro antimikrobiyal aktivitesi ise norfloksasine eşdeğerdir.

Eliminasyon: Siprofloksasin büyük ölçüde renal yolla değişmemiş halde atılır. Daha küçük oranda ise renal yol dışından, özellikle feçesle itrah edilir (PDR, 2003).

Etkin maddenin oral, intravenöz infüzyon ve göz/kulak damlası şeklindeki formları piyasada mevcuttur (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Piyasada bu etkin maddeyi içeren farmasötik formlar ve dozları (Rx Media Pharma/2014)

Farmasötik form	Piyasadaki dozları
Film kaplı tablet	250 mg, 500 mg, 750 mg
Modifiye salım tableti	500 mg, 1000 mg
Göz damlası	%0,3
Kulak damlası	%0,3
İntravenöz infüzyon çözeltisi	200 mg/100 ml, 400 mg/200 ml, 100 mg/50 ml

Piyasada onaylı pulmoner yolla uygulanan bir formu mevcut değildir. Ancak Bayer'in non-kistik fibrozis bronşektazide kullanılmak üzere geliştirdiği siprofloksasin içeren kuru toz inhaler formundaki ürünü faz III aşamasındadır (clinicaltrials.gov).

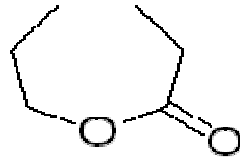
1.7. Polimerler

1.7.1. Poli- ϵ -kaprolakton (ϵ -PCL)

İlaç taşıyıcı polimer olarak ilk in vivo incelenen polimerlerden birisidir. Poli(ϵ -kaprolakton) biyolojik olarak geçimli ve yavaş parçalanan, kısmen kristal yapılı, yüksek molekül ağırlıklı ve oldukça hidrofobik bir polimerdir (Gürsoy, 2002). 2 - oksipanon homopolimeridir (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition, 2009).

Poli-kaprolakton erime sıcaklığı 58°C – 63°C arasında ve camsı geçiş sıcaklığı -65°C ile -60°C arasında olan beyaz renkli katı parçacıklar halinde bulunmaktadır. Kloroformda, diklorometanda, etil asetat, asetonda, dimetil formamitte, tetrahidrofuranda ve hekzafloroizopropanolde çözünmektedir (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition, 2009).

Poli(ϵ -kaprolakton)ların bozulması sırasında zincirlerin kopması sonucu molekül ağırlığı azalır ancak kristallik artar. Zincir kopması polimerin amorf bölgesinde olur ve büyük bir hareketlilik kazanan polimer zincirler sonuçta tekrar tekrar yönelip şekillenerek yeniden kristallenirler ve böylece kristallik artar. Poli(ϵ -kaprolakton)un aşınma süreci polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asite (PGA) benzer. Poli(ϵ -kaprolakton)'un diğer laktonlarla, örneğin DL-laktat ile kopolimerleri ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu kopolimerlerin parçalanması her iki polimerin ayrı ayrı parçalanma hızından daha fazladır. PLA'nın hızlı parçalanması ve poli(ϵ -kaprolakton)un permeabilitesinin fazla olmasından yararlanılarak istenilen özelliklerde kopolimerler sentezlenebilir (Gürsoy, 2002).



Şekil 1.7. Poli(ϵ -kaprolakton)'un kimyasal formülü (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th Edition, 2009).

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

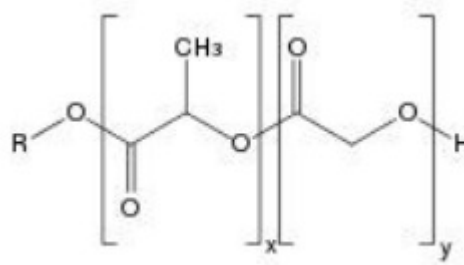
PLGA, mükemmel biyolojik uyumluluğu, biyolojik olarak parçalanması ve non-toksitesisi nedeniyle sürekli salım ürünleri hazırlanmasında kullanılmaktadır (Kaur ve ark., 2012).

Poliester PLGA, polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asitin (PGA) kopolimeridir. Polilaktik asit stereokimyasal olarak D ve L ile tanımlanan asimetric bir α -karbon içerir. PLA'nın enantiyomerik formları da poli-D-laktik-asit (PDLA) ve poli-L-laktik-asit (PLLA)'tir. PLGA ise genellikle D- ve L- laktik asit formlarını eşit olarak içeren poli-D,L-laktik-ko-glikolik-asit olarak kısaltılır (Makadia ve Siegel, 2011).

PLGA hemen hemen her şekil ve boyutta üretilebilir, ve hemen hemen her boyuttaki molekülü içine alabilir. Klorlu çözücüler, tetrahidrofur, etil asetat ve aseton gibi bir çok çözücüde çözünebilir. PLGA suda ester zincirlerine hidroliz olur. PLA'daki

metil gruplarının varlığı onu PGA'dan daha hidrofobik yapar; bu nedenle laktat bakımından zengin PLGA kopolimerleri daha az hidrofiliktir, daha az su absorbe ederler ve bundan dolayı da daha yavaş degrade olurlar. PLGA hidrolizinden dolayı, bir katı formülasyonda camsı geçiş sıcaklığı (T_g), nem içeriği ve molekül ağırlığı gibi tipik değişmez parametreler zamanla değişebilir. PLGA'nın fiziksel özellikleri başlangıç molekül ağırlığı, laktit:glükolid oranı, düzenek boyutu, saklama sıcaklığı, suya maruz kalması gibi birçok faktöre bağlıdır (Houchin ve Topp, 2009). Mekanik özellikleri de molekül ağırlığı ve polidispersite indeksinden etkilenmektedir. PLGA'nın bütün bu özellikleri formülasyonun salımını etkilemektedir (Siegel ve ark., 2006).

PLGA'nın biyodağılımı ve farmakokinetiği non-lineer ve doz bağımlı bir profil göstermektedir (Yang ve ark., 2001).



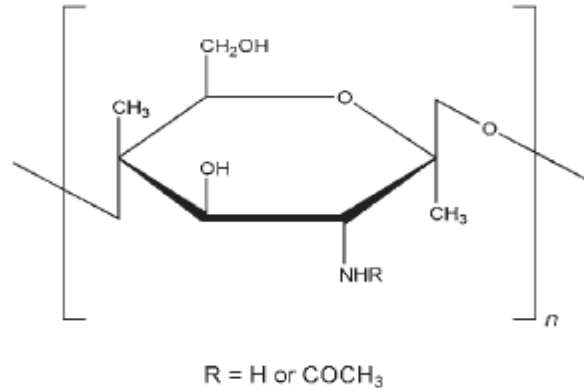
Şekil 1.8. PLGA'nın yapısı (X laktik asit ünite sayısı, y glükolik asit ünitesi sayısı) (Makadia ve Siegel , 2011).

1.7.3. Kitozan

Kitozan kitinin kısmi N-deasetilasyonu ile hazırlanan bir polisakkarittir. Biyolojik uyumluluk, biyolojik parçalanabilirlik ve non-toksik olması gibi bazı özelliklerinden dolayı nanopartikül hazırlanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca çok iyi biyoadeziv özelliklere sahiptir. Bu özelliği büyük moleküllerin mukozal yüzey boyunca penetrasyonun artmasını sağlar (Irache ve ark., 2011).

Kitozan camsı geçiş sıcaklığı 203°C olan kokusuz, beyaz yada beyazımsı renkli toz ya da katı parçacıklar halinde bulunmaktadır. Su içerisinde eser miktarda çözünür,

pratik olarak etanolde, diğer organik çözücülerde, nötral veya pH'sı 6,5 üzerinde olan alkali çözeltilerde çözünmez. Seyreltilmiş ve konsantre birçok organik asit çözeltilisinde çözünmektedir (Handbook of Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition, 2009).



Şekil 1.9. Kitozanın yapısal formülü (Handbook of Pharmaceutical Excipient 6th Edition, 2009)

1.8. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

1.8.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Nanopartiküllerin partikül boyutuna göre manyetik, mekanik, elektronik, kimyasal gibi özellikleri değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin boyut düştükçe nanopartiküllerin erime noktası da düşmektedir. Partikül büyüklüğü nanopartikülün özelliklerinin belirlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır; bu nedenle nanopartiküllerin karakterizasyonunda partikül boyutu önemli bir kontrol basamağıdır (Akbari ve ark., 2011). Ayrıca partikülün biyofarmasötik özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Küçük partiküller geniş bir yüzey alanına sahip olmalarından dolayı daha hızlı bir salıma yol açabilirler. Bu durum partikül büyüklüğü ile ilaç salımının birbiriyle olan ilişkisine bir örnektir (Dillen ve ark., 2004).

Partikül büyüklüğünün saptanmasında BET, TEM, X-RAY difraksiyon pik analizi, lazer ışını kırınımı gibi bir çok yöntem kullanılmaktadır. Nano ve submikron boyuttaki ölçümlerde en çok kullanılan yöntem lazer ışığı kırınımı yöntemidir. Bu yöntem ışık ile partikül arasındaki etkileşime bağlı olarak ölçüm yapmaktadır. Süspande haldeki nanopartiküllerden saçılan ışık zamanla dalgalanmaya neden olur ve bu durum parçacık çapı ile ilişkilidir (Bowen, 2002; Tinke ve ark., 2006).

1.8.2. Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM) ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

Atomik kuvvet mikroskopi (AFM) Binning ve arkadaşları (1986) tarafından nanoboyuttaki objeleri karakterize edebilmek amacı ile geliştirilen, çok yüksek çözünürlüklü bir taramalı tünelleme mikroskobudur. AFM basınçsal elektrikli seramiğin hareketiyle örneğin X, Y ve Z yönlerindeki nanoboyutundaki artıştan yararlanmaktadır. Bir dirsek üzerine monte edilmiş AFM ucu numune ile belli bir mesafede olacak şekilde ayarlanır. Bu mesafe numune yüzeyi ile uç arasındaki etkileşim kuvvetlerine ya da ucun geri itildiği nokta olarak ayarlanır. Mikroskopun ucu örnek üzerinde gezindiği sırada, dirsek numunede olan topografik değişimler nedeni ile eğilir. Bir lazer ışığı dirsekteki bu değişimi ışık detektörüne yansıtır. Detektör lazer ışığındaki kırınımı okur ve cihaz yazılımı 3 boyutlu olarak hesaplamaları yapıp görüntüyü verir (Hoo ve ark., 2008). AFM cihazı Şekil 1.10'da görülmektedir.



Şekil 1.10. Nanopartiküllerin görüntülenmesinde kullanılan AFM cihazı

1.8.3. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Kolloidal partiküller dispersiyon ortamında iyon adsorbe ederler. Pozitif ve negatif olarak yüklenirler. Her partikül pozitif ve negatif oluşuna göre aksi yöndeki iyonlarla çevrilebilirler. Tek tabakalı bir yapı oluşur. Bu tabakanın etrafında da partiküle bağlı olmayan, hareketli ikinci iyon tabakası yer almaktadır. Bu tabakaya hareketli difüze çift tabaka denir. Partikül yüzeyine yapışmış olan tabakanın potansiyeline elektrotermodinamik potansiyel veya Nernst potansiyeli, çift tabakanın dışındaki nötral alan ile partikül yüzeyi arasındaki potansiyel farkına zeta potansiyeli denir (Çelebi, 2009). Yani zeta potansiyeli, bir kolloidal sistemin elektrokinetik potansiyelinin özetidir. Nanopartiküllerin kendi aralarındaki etkileşimleri, nanopartikül hücre etkileşimi, hedeflendirmeyi zeta potansiyeli etkilemektedir. (Leary, 2011). Zeta potansiyeli kolloidal dağılımların stabilitesinin değerlendirilmesinde önemlidir. Ne kadar yüksek olursa kolloidal dağılımın stabilitesi o kadar iyidir (Çelebi, 2009).

Zeta potansiyeli ölçümü lazer doppler mikro-elektroforez tekniği kullanılarak ölçülmektedir. Moleküllerin çözeltisine ya da partiküllerin dispersiyonuna bir elektrik alan uygulanır ve partiküllerin hızla hareketi sağlanır ki bu hız zeta

potansiyeli ile ilişkilidir. Bu hız, M3-PALS (faz analiz ışık saçılımı) adı verilen bir patentli interferometrik lazer tekniği kullanılarak ölçülmektedir. Bu elektroforetik hareketlilik ve buradan hareketle zeta potansiyeli ve zeta potansiyel dağılımı hesaplanmasını sağlamaktadır. (<http://www.malvern.com/>, 2014)

1.8.4. Çözünme Hızı

Herhangi bir ilacın emilmesi için öncelikle çözünmesi gereklidir. Tamamen çözünmemiş olan ilaç mide barsak kanalından tam olarak emilmez. Bu nedenle herhangi bir etkin maddenin sudaki ve vücut sıvılarındaki çözünürlüğünün bilinmesi ve belirlenmesi formülasyon geliştirme çalışmalarında oldukça önemlidir. Çözünürlük, bir etkin maddenin bir çözücünde normal şartlarda, belli bir sıcaklık derecesinde, çözünebildiği en fazla miktarıdır. Buna doygunluk konsantrasyonu veya çözünürlüğü de denilmektedir. Eğer bu değer çözelti içine başka maddelerin ilavesi veya başka etmenlerle (sıcaklık gibi) artırılırsa, o zaman aşırı doygun çözelti hazırlanmış olur. Çözünme hızı ise belli bir zaman diliminde çözünen miktardır ve dinamik bir olaydır, genellikle Noyes-Whitney ve türevi denklemler ile ifade edilir (Takka ve ark., 2009).

İn vitro çözünme hızı testleri genellikle ilacın insanlarda in vivo ölçülen biyoyararlanımını ön görmeye yarayan testlerdir. İn vitro deneyler için en sık kullanılan yöntem çözünme hızı testidir. Katı farmasötik şekil içindeki ilacın yapay bir ortamda (tampon gibi), belirli deney koşulları altında çözünme hızı saptanır. Testin sonucunda belirli bir sürede farmasötik şekil içindeki ilacın çözünen yüzde miktarı değerlendirilir (İskit, 2008). Çözünme hızı, ilaç geliştirme sürecinde formülasyon faktörlerinin biyoyararlanıma etkisini tanımlamada kullanılan önemli bir ölçüttür. Genellikle klinik deneme formülasyonuna uygun formülasyon geliştirmede ve biyoyararlanım veya biyoeşdeğerlik (BE) çalışması yapılmış seriye uygun üretimin devamını sağlamak için in vitro çözünme hızı çalışmaları yapılmaktadır (Eryol ve Öner, 2005).

1.9. Nanokompozit Mikropartiküllerin Hazırlanması

1-5 μm geometrik çapı olan homojen yoğunluklu partiküller, akciğerlerdeki dağılım açısından en uygun partiküllerdir. Bu aralık orofarinks sıkışması ve nefes vermeden dolayı olan kaybı minimize etmektedir. Bu partiküller ayrıca iyi bir akış gösterir ve aerosolizasyon potansiyeli iyidir. Ancak bu partikül alveoler makrofajlar tarafından elimine olmaya meyillidir. Bununla birlikte, geometrik çapları birkaç yüz nanometreden küçük olan partiküller akciğerlerde güçlü bir şekilde kalmaya meyillidir. Fagositöz ve mukosilier klirens mekanizmalarından kolayca kaçabilmekte ve sadece akciğerin alveoler bölgesinde değil, bütün akciğer lümeni boyunca kontrollü salım yapabilmektedirler. Bu durum ilaç salımı açısından avantaj sağlamasına rağmen, hareket kabiliyetlerinin düşük olmasından dolayı salımı limitli yapabilmektedirler (Patel ve Vavia, 2007). Ayrıca kuru toz nanopartiküller yüksek yüzey enerjilerinden dolayı agregasyona meyillidirler ve bu durum aerosolize olamayan toz oluşumu ile sonuçlanır. Aerodinamik çapı 50 nm altındaki partiküller akciğerlerde tutulamadan solunum ile atılırlar. Nanopartiküllerin akciğerlerde etkili bir dağılımının sağlanması için inhale olabilecek mikro boyuttaki toz agregatları yapılmaktadır (Cheow ve Hadinoto, 2010).

Nanokompozit mikropartiküller ise geometrik çapları mikron boyutunda olan, akciğerlerdeki lokal ve sistemik uygulamalarda ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan yapılardır (Patel ve Vavia, 2007). Nanopartiküllerin depolama ve akciğerdeki dağılımları gibi sorunlarının üstesinden gelmek amacıyla bu sistemler geliştirilmiştir. Nanokompozit mikropartiküller, genel olarak nanopartiküllerin laktoz ya da mannitol gibi inert bir taşıyıcı çözeltisi içinde süspande edilmesi ve bu süspansiyondan dondurarak kurutma ya da püskürterek kurutma gibi yöntemler ile mikrometre boyutundaki gevşek aglomeratların elde edilmesi şeklinde hazırlanmaktadır. Bu yapılar hem nano hem de mikro partiküllerin özelliklerini taşımaktadır. Mikron boyutundaki bu yapıların akışları ve aerosolizasyon özellikleri nanopartiküllerden daha iyidir. Böylece kuru tozlar basit inhalerler ile akciğerlere uygulanabilmektedir (Sung ve ark.,2007). Nanokompozit mikropartiküller fizyolojik koşullarda çözünerek yapısındaki nanopartikülleri serbest bırakmaktadır (Patel ve Vavia, 2007).

1.10. Nanokompozit Mikropartiküllerde Aerodinamik Özelliklerin Belirlenmesi

Kuru toz inhaler sistemlerde görünüş, renk, nem içeriği, rezervuara dolan tozun ağırlık tayini, miktar tayini ve ürün performans testi gibi kalite kontrol testleri yapılmaktadır. Bir KTİ sisteminin performansı in vitro olarak iki şekilde incelenir. Bunlardan ilki taşınan ilacın içerik tekdüzeliği, ikincisi ise partikül büyüklüğü dağılımının aerodinamik tayinidir.

Taşınan ilacın içerik tekdüzeliği KTİ sistemlerden ilacın taşınmasını kontrol etmek için yapılan bir testtir. Püskürtülen doz bir filtrede tutularak ölçülür, inhaler sistemde kalan doz ayrıca ölçülerek gerekli doz ve gösterdiği değişkenlik hesaplanır (Takka, 2009).

İnhale edilen partiküllerin aerodinamik özellikleri akciğerlerde başarılı bir şekilde tutulmalarında önemli rol oynamaktadır (Devrim ve ark, 2011b). USP 27'ye göre büyüklük dağılımı kütle ortalama aerodinamik çap (KOAÇ) ve geometrik standart sapma (GSS) hesaplanarak bulunur. KOAÇ aerosollerin aerodinamik büyüklüğünün gösteren bir istatistiksel ölçümdür (Takka, 2009). Etkin maddenin kümülatif fraksiyonu sınır çapına karşı log-normal grafiği çizilmekte ve %50'e karşılık gelen çap kütleli ortalama aerodinamik çap (KOAÇ) olarak tanımlanmaktadır (EP 6, 2008).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Antimikrobiyal aktivite testi için	:Agar
Aseton	: Merck
Diklorometan	: Sigma-Aldrich
Escherichia coli	: ATCC 25922
Etil asetat	: Merck
Eudragit RS PM	: Röhm Pharma GmbH
Fosfotidilkolin	: Sigma Aldrich
Gliseril tripalmitat	: Sigma Aldrich
Glukoz	: Sigma Aldrich
Kitozan	: Nova Matrix
Klebsiella pneumoniae	: RSKK 574
Mannitol (Pearlitol 50 C)	: Roquette-Pharma, Almanya
PEG 2000	: Merck
PEG 4000	: Merck
PLA	: Sigma Aldrich
PLGA (MA: 24000-38000) 50:50	: Sigma Aldrich
PLGA (MA: 40000-75000) 50:50	: Sigma Aldrich
PLGA (MA: 66000-107000) 75:25	: Sigma Aldrich
Pluronic F127	: Sigma Aldrich
Potasyum dihidrojen fosfat	: Carlo Elba
Polikaprolakton (MA:14000)	: Sigma Aldrich
Polikaprolakton (MA:70000-90000)	: Sigma Aldrich
Potasyum klorür	: Merck

Pseudomonas aeruginosa	: ATCC 27853
PVA (MA: 30000-70000)	: Sigma Aldrich
Siprofloksasin hidroklorür	: Zentiva
Sodyum hidroksit	: Sigma Aldrich
Sodyum klorür	: Merck
Sorbitol	: Merck
Sükroz	: Merck
Tween 80	: Merck

2.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

AFM:	: ezAFM, Nanomagnetics Inst.
Cam malzeme	: Isolab, İldam
Çalkalayıcı su banyosu	: Memmert
Doğrusallık grafiği için paket program	: Graphpad Instat 3.1
DSC cihazı	: Shimadzu DSC 60
Elek analizi grafiği için paket program	: Origin Lab 9.1
Elektrikli terazi	: Sartorius BL 210 S/ Mettler Toledo
Etüv	: Heraeus T 5042
Filtre	: Sartorius, Whatman, Isolab
FTIR cihazı	: Shimadzu IRAffinity-1S
Homojenizatör	: IKA Ultraturrax T-25
Liyofilizatör	: Christ Gamma 2-16 LSC
Manyetik karıştırıcı	: IKA Werke RT 10 power
Mikropipet	: Biohit Proline Plus
Optik mikroskop	: Leica DM 4000B
Parafilm	: Bemis Flexible Packaging
Partikül büyüklüğü analizi cihazı	: Malvern Mastersizer ZS
pH metre	: İmolab WTWSeries pH720
Plastik enjektör	: Set inject
Santrifüj	: Sigma 2-16 P

Sonikatör	: Bandelin Sonoplus
Ultrasonik banyo	: Elma Ultrasonic LC30
UV/VIS spektrofotometre	: Thermo Scientific Evolution 201
Vorteks cihazı	: Heidolph REAX top
Zeta potansiyeli ölçüm cihazı	: Malvern Zetasizer NanoZS

2.1.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanmasında ve Etkin Madde

Salım Hızı Deneylerinde Kullanılan Ortamlar

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan 0,05M pH 4,5 fosfat tamponu ve pH 9 fosfat tamponu ile etkin maddenin üretilen formülasyonlardan çıkışının incelenmesinde kullanılan % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu Avrupa Farmakopesi 6'ya (EP6) göre hazırlanmıştır.

1) 0,05M pH 4,5 Fosfat Tamponu:

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) 6,80 g
Distile su.....ym..... 1000 mL

Hazırlanışı: 1000 mL'lik balon jojeye 6,80 g Potasyum dihidrojen fosfat konulup distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır.

2) % 0,05 (a/h) Tween 80 İçeren pH 7,4 Fosfat Tamponu

Tween 80..... 0,5 g
0,1 M NaOH çözeltisi..... 393,4 mL
0,2 M Monobazik potasyum fosfat (KH_2PO_4) çözeltisi..... 250 mL
Distile su.....ym..... 1000 mL

Hazırlanışı: 1000 mL'lik balon jojeye 250 mL Monobazik potasyum fosfat çözeltisi konulup üzerine 18 mL NaOH çözeltisi eklendikten sonra onra 0,5 g tween 80 konularak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanıp çözündürülür.

0,1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanışı: 2 g sodyum hidroksit (NaOH) tartılarak balon jojeye konur ve distile su ile 500 mL'ye tamamlanır.

0,2 M Monobazik Potasyum Fosfat (KH_2PO_4) Çözeltisinin Hazırlanışı : 27,22 g monobazik potasyum fosfat tartılıp 1000 mL'lik balon jojede distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

3) pH 9,0 Fosfat Tamponu:

Potasyum dihidrojen fosfat..... 1,74 g/80 mL
 1 M KOH y.m
 Distile su.....ym... 100 mL

Hazırlanışı: 100 mL'lik balon jojeye 1,74/80 mL konsantrasyondaki potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi konulup üzerine pH'ı 1M KOH çözeltisi ile ayarlandıktan sonra distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Etkin Maddenin FTIR (Fourier Transform İnfrared) Spektrumu

Siprofloksasin hidroklorür'ün FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında disk yöntemi kullanılmıştır. IR bandında spektrum vermeyen 200 mg potasyum bromür ile 4 mg siprofloksasin hidroklorür havanda homojen olacak şekilde karıştırılıp hidrolik pres ile 10000 kg/cm^3 'lük basınç altında disk haline getirilmiştir. Elde edilen disklerin $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyları arasındaki spektrumu alınmıştır.

2.2.1.2. Etkin Maddenin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizi

Etkin maddenin termal davranışını incelemek ve kristal formunu belirlemek için alüminyum pan içine konulan siprofloksasin hidroklorür preslenerek cihaza yerleştirilmiştir. 25 – 400°C sıcaklık aralığında 5 °C/dak. hızında termogramı alınmıştır.

2.2.1.3. Etkin Maddenin Ultra Viyole (UV) Spektrumu

Etkin maddenin distile su ve % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki konsantrasyonları bilinen çözeltilerinin 200-400 nm aralığında UV spektrumları alınmış ve maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları (λ_{max}) belirlenmiştir.

2.2.1.4. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

Siprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu ve distile sudaki belirli konsantrasyonlardaki stok çözeltilerinden hareket ile uygun seyreltmeler yapılarak her bir ortam için bir seri farklı konsantrasyondaki çözeltiler hazırlanmış ve absorbansları önceden belirlenmiş λ_{max} değerinde okunmuştur. Bu işlem her farklı ortam için üç paralel olarak uygulanmış ve her konsantrasyon için üç okuma yapılmıştır.

Her bir konsantrasyon ve buna karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiş ve doğru denklemleri hesaplanmıştır. Son olarak yapılan tüm analizlerde bu doğru denklemleri kullanılmıştır.

2.2.1.5. Kalibrasyon Doğrusunun İstatistiksel Verileri ve Analitik Validasyonu

2.2.1.5.1. Doğrusallık ve Aralığı

Herhangi bir analitik yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralıkta örnek içindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olan test sonuçlarının elde edilebilmesidir (ICH Q2(R1)).

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenmesi için, 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 8 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmış ve konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri Graphpad InStat 3.1 programı kullanılarak grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrunun % 95 olasılıklı güven sınırları gösterilmiştir.

Siprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenmesi için, 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 8 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmış ve konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri Graphpad InStat 3.1 programı kullanılarak grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen doğrunun % 95 olasılıklı güven sınırları gösterilmiştir.

2.2.1.5.2. Doğruluk ve Geri Elde

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Gerçek / teorik değerlerin, pratikte bulunan değerlere yakınlığının saptanmasını sağlar (USP 30).

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki miktar tayini yönteminin doğruluğunun belirlenmesi için, siprofloksasin hidroklorür'ün sudaki 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle hazırlanan 2; 5 ve 8 µg/mL konsantrasyondaki çözeltilerin 6 kez okunması ile elde edilen absorbans değerlerinden yola çıkılarak pratik konsantrasyonlar ve % geri elde

değerleri, % geri elde değerlerinin ortalama, standart sapma (SS) ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri hesaplanmıştır.

Siprofloksasin hidroklorür'ün % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin doğruluğunun belirlenmesi için, siprofloksasin hidroklorürün % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponunda 10 mg/100 ml konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle hazırlanan 2; 5 ve 8 µg/mL konsantrasyondaki çözeltilerin 6 kez okunması ile elde edilen absorbans değerlerinden yola çıkılarak pratik konsantrasyonlar ve % geri elde değerleri, % geri elde değerlerinin ortalama, SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır.

2.2.1.5.3. Kesinlik

2.2.1.5.3.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder (ICH Q2(R1)).

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğini belirlemek için, siprofloksasin hidroklorürün 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle hazırlanan 2; 5 ve 8 µg/mL konsantrasyondaki çözeltiler 6 kez okunmuştur. Absorbans değerlerinden hareketle konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Konsantrasyon değerlerinin ortalama, SS ve BSS değerleri bulunmuştur.

Siprofloksasin hidroklorür'ün % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin tekrarlanabilirliğini belirlemek için siprofloksasin hidroklorür'ün 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle hazırlanan 2; 5 ve 8 µg/mL konsantrasyondaki çözeltiler 6 kez okunmuştur. Absorbans değerlerinden

konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Konsantrasyon değerlerinin ortalama, SS ve BSS değerleri bulunmuştur.

2.2.1.5.3.2. Ara Kesinlik

Ara kesinlik; farklı günler, farklı analistler, farklı donanım gibi laboratuvar varyasyonlarının incelenmesini ifade eder (ICH Q2(R1)).

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki miktar tayini yönteminin ara kesinliğini belirlemek için, siprofloksasin hidroklorür'ün 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 2; 5 ve 8 µg/mL konsantrasyondaki 1 adet çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbens değerleri, iki farklı günde 6 kez okunarak kalibrasyon denkleminde yerine konulmuştur. Bulunan konsantrasyonların ortalama, SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır.

Siprofloksasin hidroklorür'ün % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 tamponundaki miktar tayini yönteminin ara kesinliğini belirlemek için, siprofloksasin hidroklorür'ün 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 2; 5 ve 8 µg/mL konsantrasyondaki 1 adet çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbens değerleri, iki farklı günde 6 kez okunarak kalibrasyon denkleminde yerine konulmuştur. Bulunan konsantrasyonların ortalama, SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır.

2.2.1.5.4. Teşhis ve Tayin Sınırları

Bir analitik yöntemin teşhis sınırı, belirli koşullar altında örnek içinde analiz edilen maddenin teşhis edilebilen fakat tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonudur (ICH Q2(R1)).

Bir analitik yöntemin tayin sınırı ise, örnekteki analiz edilen maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktardır (ICH Q2(R1)).

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırını belirlemek için, 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 6 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve SS değerleri bulunduğundan sonra aşağıdaki denklemler kullanılarak teşhis ve tayin sınırları hesaplanmıştır.

Siprofloksasin hidroklorür'ün % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırını belirlemek için, 10 mg/100 mL konsantrasyondaki stok çözeltisinden hareketle 6 farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve 3 paralel olacak şekilde konsantrasyonlara karşı elde edilen absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrularının eğim ve kesişim değerlerinin ortalama ve SS değerleri bulunduğundan sonra aşağıdaki denklemler kullanılarak teşhis ve tayin sınırları hesaplanmıştır (ICH Q2A, 1995).

$$LOQ = 3,3 \frac{\sigma}{s} \quad (\text{Denklem 2.1})$$

$$LOQ = 10 \frac{\sigma}{s} \quad (\text{Denklem 2.2})$$

σ : Regresyon doğrularının y eksenini kesen noktalarının standart sapması

s: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

2.2.1.5.5. Seçicilik

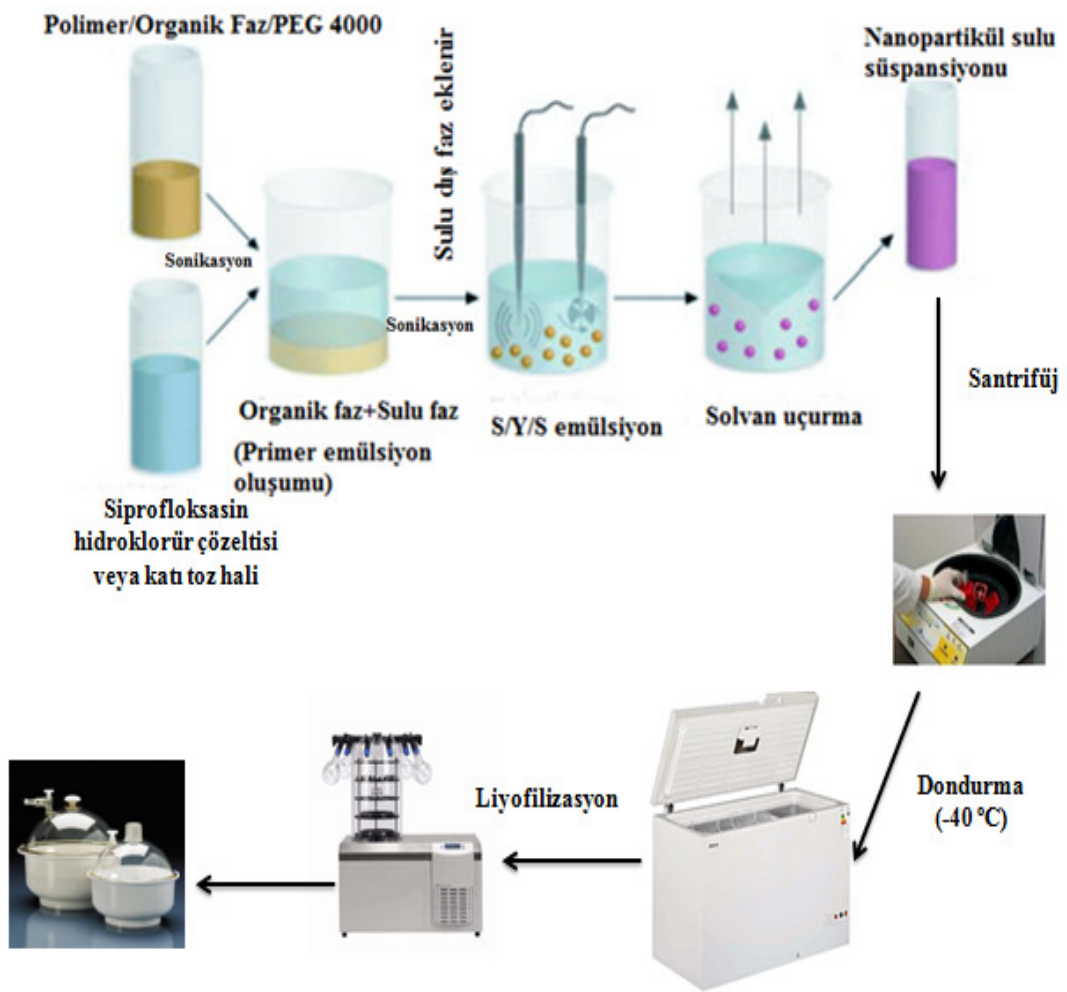
Seçicilik, analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir (ICH Q2(R1)).

Siprofloksasin hidroklorür miktar tayini yönteminin, bu madde için seçici olup olmadığının belirlenmesi için hazırlanan boş nanopartiküllerin distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH7,4 fosfat tamponunda ölçümlerin yapıldığı 270 nm’de spektrumu alınarak absorbans verip vermediğine bakılmıştır.

2.2.2. Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküller çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu kullanılarak hazırlanmıştır (Jeong ve ark., 2008; Tomar ve ark., 2012). Belirli miktarda tartılan polimer veya polimer karışımları belirli miktarda organik faz içerisinde çözülmüştür. Nanopartiküllerin hazırlanmasında polimer olarak PCL ve farklı molekül ağırlığına ve farklı laktik asit:glolik asit kopolimer oranına sahip PLGA ve bu polimerlerin birbirleri ile belirli oranlardaki karışımları kullanılmıştır. Organik çözücü olarak tek başına diklorometan, aseton, etil asetat veya bunların birbirleriyle belli oranlardaki karışımları kullanılmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında su/yağ/su (S/Y/S) ve katı/yağ/su (K/Y/S) tipi olmak üzere iki farklı çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu kullanılmıştır. Su/yağ/su (S/Y/S) tipi çoklu emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlanan formülasyonlarda siprofloksasin hidroklorürün sulu çözeltisi, primer su/yağ (S/Y) tipi emülsiyon oluşturulmak üzere polimerin organik çözücüdeki çözeltisinden oluşan organik faza eklenmiş ve sonikatör ile (Bandelin) 9 siklusda, % 80 güçte 10 dakika süreyle buz banyosu içerisinde sonike edilmiştir. Katı/yağ/su (K/Y/S) tipi emülsiyon çözücü buharlaştırma metodu ile hazırlanan formülasyonlarda ise siprofloksasin hidroklorür katı halde polimerin organik çözücüdeki çözeltisine eklenerek sonike edilmiştir. Formülasyonlarda organik faza primer emülsiyon stabilitesini artırmak için PEG 4000 eklenmiştir. Hazırlanan bu S/Y tipi emülsiyon ya da etkin maddenin organik faz içindeki dispersiyonu 40 mL hacimdeki sulu dış faza katılmış ve 10 dakika ultrasonik probda buz banyosu içerisinde sonike edilmiştir. Böylece S/Y/S ya da K/Y/S tipi emülsiyon oluşturulmuştur. Organik çözücünün buharlaşması için, hazırlanan emülsiyonlar 500 rpm’de bir gece boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sulu dış faz olarak formülasyonların bir bölümünde PVA bir bölümünde ise Pluronic F127 kullanılmıştır. Bazı formüllerde ise 40 mL hacimdeki sulu dış faza farklı

oranlarda kitozan gibi mukoadhezif bir polimer eklenmiştir (Devrim ve Bozkır, 2014a). Oluşan nanopartiküller 13500 rpm’de belirli bir süre santrifüj edilmiş ve distile su ile bir kere yıkanmıştır. Böylece nanopartikül yüzeyinde olması muhtemel kalıntı PVA uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküllerin distile su içerisindeki dispersiyonu -40°C’de dondurulduktan sonra -90°C’de 0,011 mmHg’de 24 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen nanopartiküller ağzı sıkıca kapalı cam kavanozlarda, desikatör içerisinde muhafaza edilmiştir. Yöntemin imalat akış şeması Şekil 2.1’deki gibidir.



Şekil 2.1. Nanopartikül imalat akış şeması

2.2.3. Nanopartikül Formülasyonları

2.2.3.1. Ön formülasyon çalışmaları

Ön incelemelerde, etkin madde olarak seçilen siprofloksasin hidroklorür ve çalışmamızda kullanılması tasarlanan polimerlerle üretim yöntemindeki çeşitli parametreler değiştirilerek nanopartiküller hazırlanmış ve böylece imalat parametreleri kontrol altına alınmaya çalışılmıştır.

Primer emülsiyon oluşturmak amacı ile değişik oranlarda organik faz ve sulu faz oranları denenmiştir. ÖF3 kodlu formülde kullanılan oranlar ile emülsiyon oluşumu sağlandığı için bu oranlar kullanılarak üretime devam edilmiştir. Çizelge 2.1’de bu oranlar gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Farklı iç faz ve organik faz oranları ile hazırlanan formüller

Formül kodu	İç sulu faz hacmi (ml)	Organik faz hacmi (ml)	Primer emülsiyon oluşumu
ÖF1	1	5	(-)
ÖF2	0,5	5	(-)
ÖF3	0,5	10	(+)

(-): Emülsiyon oluşmadı.

(+): Emülsiyon oluştu.

Üretim sırasında emülsiyon oluşumunu gerçekleştirmek amacıyla kullanacağımız cihazın seçimi için, aynı yöntem hem sonikatör ile hem de yüksek hızlı homojenizatör ile denenmiştir. Homojenizatör ile nano boyuta ulaşamamasından dolayı çalışmalara sonikatör ile devam edilmiştir. Çizelge 2.2’de yüksek hızlı homojenizatör ve sonikatör ile üretilen formüller verilmektedir.

Çizelge 2.2. Farklı cihazlar ile hazırlanan formülasyonlar

Formül kodu	Kullanılan cihaz
ÖF4	Homojenizatör
ÖF5	Sonikatör

Nanopartiküllerin üretimi için uygun cihaz belirlendikten sonra, iç sulu fazda stabilizer olarak kullanılacak madde seçimi için denemeler yapılmıştır. Bu yöntemle nanopartikül üretiminde sıklıkla kullanılan PVA ve Pluronik F127 denenmiştir. ÖF7 kodlu formülde kullanılan PVA ile emülsiyon oluşumu sağlandığı için iç sulu faz stabilizeri olarak PVA kullanılarak üretime devam edilmiştir. Üretilen formüller Çizelge 2.3’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3. İç fazda farklı yardımcı maddeler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar

Formül kodu	İç sulu fazda kullanılan yardımcı madde	Primer emülsiyon oluşumu
ÖF6	Pluronik F127	(-)
ÖF7	PVA	(+)

(-): Emülsiyon oluşmadı.

(+): Emülsiyon oluştu.

Daha sonraki üretimlerde, formülasyonlara primer emülsiyon stabilitesini artırmak için PEG 4000 eklenmiştir. Üretilen formüller Çizelge 2.4’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.4. PEG 4000 içeren ve içermeyen formüller

Formül kodu	Organik fazdaki PEG 4000 durumu	Primer emülsiyon oluşumu
ÖF8	var	(+)
ÖF9	yok	(+)

(-): Emülsiyon oluşmadı.

(+): Emülsiyon oluştu.

Dış fazda kullanılan PVA oranını belirlemek için PVA'nın çeşitli konsantrasyonları ile denemeler yapılmıştır. Üretilen formüller Çizelge 2.5'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.5. Çeşitli PVA konsantrasyonları ile çalışılan formüller

Formül kodu	Dış fazdaki PVA konsantrasyonu	Primer emülsiyon oluşumu
ÖF10	%1	(+)
ÖF11	%2	(+)
ÖF12	%5	(-)

(-): Emülsiyon oluşmadı.

(+): Emülsiyon oluştu.

Dış fazda kullanılacak PVA oranı belirlendikten sonra PVA'nın molekül ağırlığının emülsiyon oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla farklı molekül ağırlığına sahip PVA'lar kullanılarak denemeler yapılmıştır. Üretilen formüller Çizelge 2.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 2.6. Farklı molekül ağırlığına sahip PVA'lar ile hazırlanan formüller

Formül kodu	Kullanılan PVA molekül ağırlığı	Primer emülsiyon oluşumu
ÖF13	14000	(+)
ÖF14	30000-70000	(+)

(-): Emülsiyon oluşmadı.

(+): Emülsiyon oluştu.

Liyofilizasyon işlemi sırasında kriyoprotektan seçimi için, kriyoprotektan olarak kullanılan çeşitli maddeler denenmiştir. Bu formüllere ait veriler Çizelge 2.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7. Çeşitli kriyoprotektan maddeler kullanılarak liyofilize edilen formüller

Formül kodu	Kullanılan kryoprotektan
ÖF15	Glukoz
ÖF16	Sorbitol
ÖF17	Mannitol
ÖF18	PEG 2000

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda nanopartikül üretimi için optimum özelliklere sahip olduğu düşünülen ÖF13 kodlu formülден (iç su fazı:0,5 ml %1 a/h PVA (MA 14000) çözeltisi; etkin madde: 10 mg; PEG 4000: 10 mg; organik faz: 10 ml DCM; polimer: 100 mg PCL; Dış su fazı: 40 ml %2 a/h PVA (MA 14000) çözeltisi) hareketle Çizelge 2.8'de belirtilen formüller hazırlanmıştır.

Çizelge 2.8. Siprofloksasin hidroklorür içeren nanopartikül formülasyonları

Formül Kodu	Organik çözücü	Etken maddenin çözüldüğü iç faz	Dış faz	Polimer tipi ve miktarı	PEG 4000 miktarı	Siprofloksasin miktarı	Np oluşumu
F1	DCM	%1 a/h PVA çöz.	%2 a/h PVA çöz	PCL:100 mg	10 mg	5 mg	+
F2	DCM	----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:100 mg	10 mg	5 mg	+
F3	DCM	----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F4	DCM	----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:100 mg	10 mg	20mg	+
F5	DCM	----	%2 a/h PVA çöz.+ 100 ml %0,5 a/h PVA çöz.	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F6	DCM	----	%2 a/h PVA çöz.+0,4 ml DCM	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F7	DCM	----	%2 a/h PVA içeren pH 4,5 tamponu	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F8	DCM	%1 PVA çöz.	%2 a/h PVA içeren pH 7,4 tamponu	PCL:100 mg	10 mg	5 mg	+
F9	DCM	----	%2 a/h PVA içeren pH 9,0 tamponu	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F10	AC:DCM (1:1)	----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F11	EA:DCM (1:1)	----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F12	AC	----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:100 mg	10 mg	10 mg	+
F13	DCM	----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:150 mg	10 mg	10 mg	+
F14	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL: 200 mg	10 mg	10 mg	+
F15	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL: 300 mg	10 mg	10 mg	+
F16	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:200 mg	----	10 mg	+
F17	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:200 mg	20 mg	10 mg	+
F18	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:200 mg	40 mg	10 mg	+
F19	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL (MA. 70000-90000):200 mg	10 mg	10 mg	+
F20	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL (MA. 14000):PCL (MA. 70000) (1:1):200 mg	10 mg	10 mg	+
F21	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	50:50 PLGA(MA. 40000- 75000):PCL(1:1):200 mg	10 mg	10 mg	+

Np: Nanopartikül

+: Nanopartikül oluştu.

-: Nanopartikül oluşmadı.

Çizelge 2.8. Devamı.

F22	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	75:25 PLGA(MA. 66000- 107000):PCL(1:1):200 mg	10 mg	10 mg	+
F23	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	50:50 PLGA (MA 24000- 38000):PCL (1:1):200 mg	10 mg	10 mg	+
F24	DCM	-----	%2 PVA çöz.	PLA:PCL (1:1):200 mg	10 mg	10 mg	+
F25	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:Eudrogit ((1:1):200 mg	10 mg	10 mg	+
F26	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.	PCL:Lesitin (200 mg:20 mg)	10 mg	10 mg	+
F27	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.+%4 NaCl	PCL: 200 mg	10 mg	10 mg	+
F28	DCM	-----	%2 a/h PVA +%0,5 a/h kitozan	PCL: 200 mg	10 mg	10 mg	+
F29	DCM	-----	%2 PVA çöz.+%1 kitozan	PCL: 200 mg	10 mg	10 mg	+
F30	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.+%2 a/h kitozan	PCL: 200 mg	10 mg	10 mg	+
F31	DCM	-----	%2 a/h PVA çöz.+%4 a/h kitozan	PCL: 200 mg	10 mg	10 mg	-
F32	DCM	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Tween 80 (10 ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---	10 mg	-
F33	DCM	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---	10 mg	-
F34	DCM	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (40ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---	10 mg	-
F35	DCM:AC (1:3)	%5 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---	10 mg	+
F36	DCM:AC (1:3)	%5 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(200 mg)	---	10 mg	+
F37	DCM	%1 a/h PVA+ SDS	%2 a/h PVA çöz.	PCL: 200 mg	10 mg	10 mg	+

Np: Nanopartikül

+: Nanopartikül oluştu.

-: Nanopartikül oluşmadı.

2.2.4. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

2.2.4.1. FTIR (Fourier Transform İnfrared) Spektrumu

Etkin maddenin, nanopartikül formülasyonlarında kullanılan polimerin ve nanopartikül formülasyonunun FTIR spektroskopisi ile tanımlanmasında disk yöntemi kullanılmıştır. IR bandında spektrum vermeyen 200 mg potasyum bromür ile 4 mg örnek havanda homojen olacak şekilde karıştırılıp hidrolik pres ile 10000 kg/cm³'lük basınç altında disk haline getirilmiştir. Elde edilen disklerin 4000 - 400 cm⁻¹ dalga boyları arasındaki spektrumu alınmıştır.

2.2.4.2. DSC Analizi

Etkin maddenin, nanopartikül formülasyonlarında kullanılan polimerin ve nanopartikül formülasyonunun termal davranışını incelemek ve kristal formunu belirlemek için alüminyum pan içine konulan siprofloksasin hidroklorür, polimer ya da nanopartikül formülasyonu preslenerek cihaza yerleştirilmiştir. 25-400°C sıcaklık aralığında 5 °C/dk. hızında termogramı alınmıştır.

2.2.4.3. Partikül Büyüklüğünün Saptanması

Farklı formülasyonlarla elde edilmiş nanopartiküllerin partikül büyüklüğünü saptamak için lazer kırınımı yöntemi kullanılmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri lazer kırınımı granülometresi (Malvern Zetasizer NanoZS) ile saptanmıştır. Liyofilize toz halindeki nanopartiküller 50 ml distile su içinde, ultrasonik banyoda 15 dk disperse edildikten sonra, ölçüm küvetine 0,45µm filtreden süzülerek alınmış ve ölçümler gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.4. Atomik Kuvvet Mikroskopi (AFM) ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

Seçilen uygun formül Nanomagnetics Instruments ezAFM cihazı ile Çizelge 2.9.'da görülen parametreler kullanılarak görüntülenmiştir.

Çizelge 2.9. ezAFM görüntü parametreleri

Mod	Dinamik
Çözünürlük(pxl)	256x256
Yazılım	ezAFM3.23
Cantilever	PPP-NCLR
Serbest titreşim genliği	2 V _{RMS}
Titreşim genliği	1 V _{RMS}
Mikroskop	ezAFM

2.2.4.5. Miktar Tayini

Etkin madde içeriğini tespit etmek amacı ile 10 mg nanopartikül 5 ml diklorometan içerisinde çözünmüştür. Bu çözeltiye 5 ml distile su ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında 6 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Jeong ve ark., 2008). Bu süre sonunda kalan su fazı 0,45 µm filtreden süzildikten sonra UV spektrofotometresinde 270 nm’de absorbansı ölçülmüştür.

2.2.4.6. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Bölüm 2.2.4.5’de anlatılan miktar tayini metotuna göre ölçüm yapılmış ve aşağıdaki formüle göre enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = (A / B) \times 100 \quad (\text{Denklem 2.3})$$

A: Nanopartiküllere yüklenen siprofloksasin hidroklorür miktarı (mg)

B: Teorik siprofloksasin hidroklorür miktarı (mg)

2.2.4.7. Ürün Verimi Tayini

Ürün verimi, üretim tamamlandıktan sonra elde edilen nanopartikül miktarının üretim sırasında kullanılan toplam katı madde miktarına oranlanması ile hesaplanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

2.2.4.8. Zeta Potansiyel Ölçümü

Nanopartiküllerin yüzey yüklerindeki değişimi belirlemek için zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır. Çalışmalarda üretilen farklı nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyeli Malvern Zetasizer NanoZS cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.4.9. Çözünme Hızı Deneyi

Çözünme hızı tayininde statik yöntem kullanılmıştır. Deneylerde çözünme hızı ortamı olarak % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu kullanılmıştır.

Hassas olarak tartılan nanopartiküller 500 µl distile suda süspande edildikten sonra membranlara aktarılmış ve membranların iki tarafı bağlanmıştır. Membranlar kavanozlara yerleştirildikten sonra üzerlerine 20 ml % 0,05 (a/h) Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu eklenmiştir. Kavanozlar sıcaklığı $37 \pm 0,5$ °C'e ve hızı 100 rpm'e ayarlanmış olan çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında kavanozlardan 2 ml numune çekilmiş ve yerine taze tampon eklenmiştir. Alınan örnekler 0,45 µm filtreden süzülerek ependorf tüplere alınmış ve 270 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Absorbans verilerinden çıkan madde miktarları hesaplanarak çözünme hızı grafikleri hazırlanmıştır.

2.2.4.10. İnhalasyon İçin Nanokompozit Mikropartiküler Kuru Toz

Karışımlarının Hazırlanması

Seçilen nanopartikül formülasyonu taşıyıcı olarak kullanılan mannitol (Pearlitol 50 C) ile 1:5 (a/a) ve 1:10 (a/a) nanopartikül:Pearlitol 50 C oranlarında karıştırılması ile inhalasyon için kuru toz karışımları hazırlanmıştır. Nanopartikül üretimi sırasında santrifüj aşamasından liyofilizasyon aşamasına geçilirken, nanopartiküller distile su yerine 1:5 (a/a) ve 1:10 (a/a) nanopartikül:Pearlitol 50 C konsantrasyondaki mannitol çözeltileri ile alınarak liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.10. Nanokompozit mikropartikül formülasyonu bileşimi

Formül Kodu	Kullanılan Formül	Mannitol Oranı a/a
NMK1	F30	1:5
NMK2	F30	1:10

2.2.4.11. Nanokompozit Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.4.11.1. Sıkıştırılmış Dansite Tayini

Kuru toz inhalasyon formülasyonları için seçilen nanopartiküllerin Pearlitol 50 C ile 1:5 ve 1:10 (a/a) oranında hazırlanan karışımlarında sıkıştırılmış dansite ölçümleri USP 30'a göre yapılmıştır (2007). Ağırlığı önceden tespit edilen (100 mg) nanopartiküller 0,05 ml duyarlılıktaki 5 ml'lik pipete aktarılmış ve daha sonra hacim değişmeyinceye kadar vuruş işlemi uygulanmıştır. Örnek ağırlığının (g) vuruş sonrası okunan hacme (ml) bölünmesiyle nanopartiküllerin sıkıştırılmış dansitesi (ρ) hesaplanmıştır.

$$\text{Sıkıştırılmış dansite } (\rho) = \frac{\text{Ağırlık (g)}}{\text{Sıkıştırılmış hacim (V)}} \quad (\text{Denklem 2.4})$$

2.2.4.12. Teorik Kütlesel Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇt) Tayini

KOAÇt tayini için 1,00; 0,50; 0,25 ve 0,125 µm gözenek çapına sahip elekler içeren mikroelet takımı ile elek analizi yapılmıştır. Öncelikle her bir elek tartılıp ağırlıkları (g) kaydedilmiştir. Elekler en büyük gözenek çapına sahip elek en üstte, en küçük gözenek çapına sahip elek en altta olacak şekilde üst üste dizilmiştir. Daha sonra belirli miktarda tartılan örnekler en üstteki eleğe konulmuş ve belirli bir titreşim uygulanarak işlem gerçekleştirilmiştir. Elek üstünde kalan miktarlar her bir eleğin tekrar tartılmasıyla hesaplanmıştır. % elek üstü miktar ve % yığılmalı miktarlar hesaplanarak 3 adet grafik oluşturulmuştur. Partiküllerin çaplarına göre yüzde dağılımlarını gösteren sütun grafiği için X eksenine elek gözenek çapları, y eksenine % elek üstü miktar girilmiştir. Yığılmalı partikül dağılım eğrisi için x eksenine gözenek çapları aritmetik ortalaması, y eksenine ise % yığılmalı miktarlar girilmiştir. Bu grafikte %50 yığılmalı değere karşılık gelen partikül çapını dmedyan'dır. Geometrik ortalama çapı hesaplamak için ise % yığılmalı miktar olasılık skalasında, partikül çapları logaritmik skalada olacak şekilde bir grafik çizilmiştir. Bu grafikten geometrik ortalama çap ve standart sapma hesaplanmıştır.

Geometrik ortalama çap hesaplandıktan sonra aşağıda belirtilen denklem ile aerodinamik çap hesaplanmıştır.

$$Aerodinamik\ çap = \frac{d}{\sqrt{\rho/\rho_0 X}} \quad (Denklem\ 2.5)$$

d: Geometrik ortalama çap

ρ = Sıkıştırılmış dansite

ρ_0 = Referans dansite (1 g/ml)

X: Dinamik şekil faktörü (Küresel şekilli partiküller için, 1 olarak belirlenmiştir.)

2.2.4.13. Nanokompozit Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

Bölüm 2.2.4.10’da antılan şekilde hazırlanan NMK1 ve NMK2 kodlu nanokompozit mikropartikül formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için optik mikroskop kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir. Mikroskop ile yapılan incelemelerde, mikropartiküller lam üzerinde distile su ile disperse edilmiş ve dijital ortamda fotoğrafları çekilmiştir.

2.2.4.14. Antimikrobiyal Etkinlik Testi

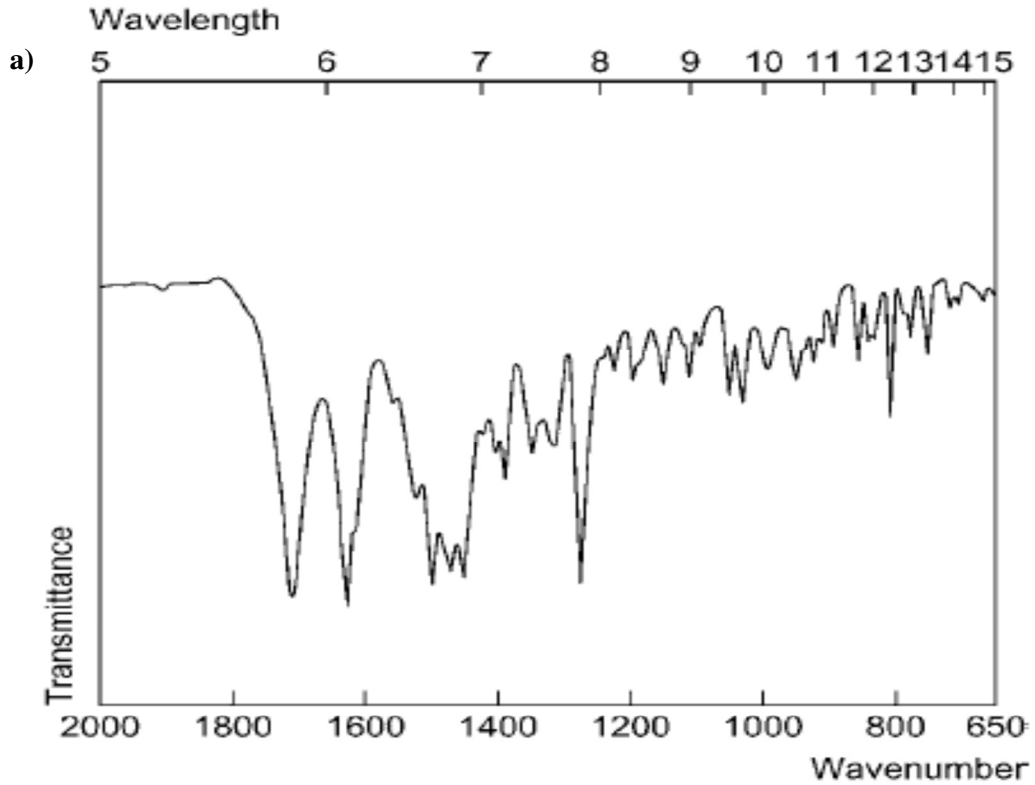
Formülasyonların antimikrobiyal etkinliğini belirlemek amacıyla agar difüzyon testi yapılmıştır (Başaran ve Bozkır, 2012). Siprofloksasinin distile suda 100 µg/ml konsantrasyondaki standart çözeltisi hazırlanmıştır. F30 kodlu nanopartikül formülasyonu, 6 ay boyunca 25°C’de desikatör içerisinde muhafaza edilen F30 kodlu nanopartikül formülasyonu ve NMK1 kodlu nanokompozit mikropartikül formülasyonu, aynı konsantrasyonda siprofloksasin hidroklorür içerecek şekilde distile su ile seyreltilmiştir. Çözeltiler petrilerdeki test organizmalarının (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) ekili bulunduğu steril agar besiyeri ortamına çukurlar açılarak uygulanmıştır. Petriler 37°C’de 16-20 saat inkübe edilmiş ve inhibisyon çapları ölçülmüştür.

3. BULGULAR

3.1. Etkin Madde Özelliklerinin Belirlenmesine Dair Bulgular

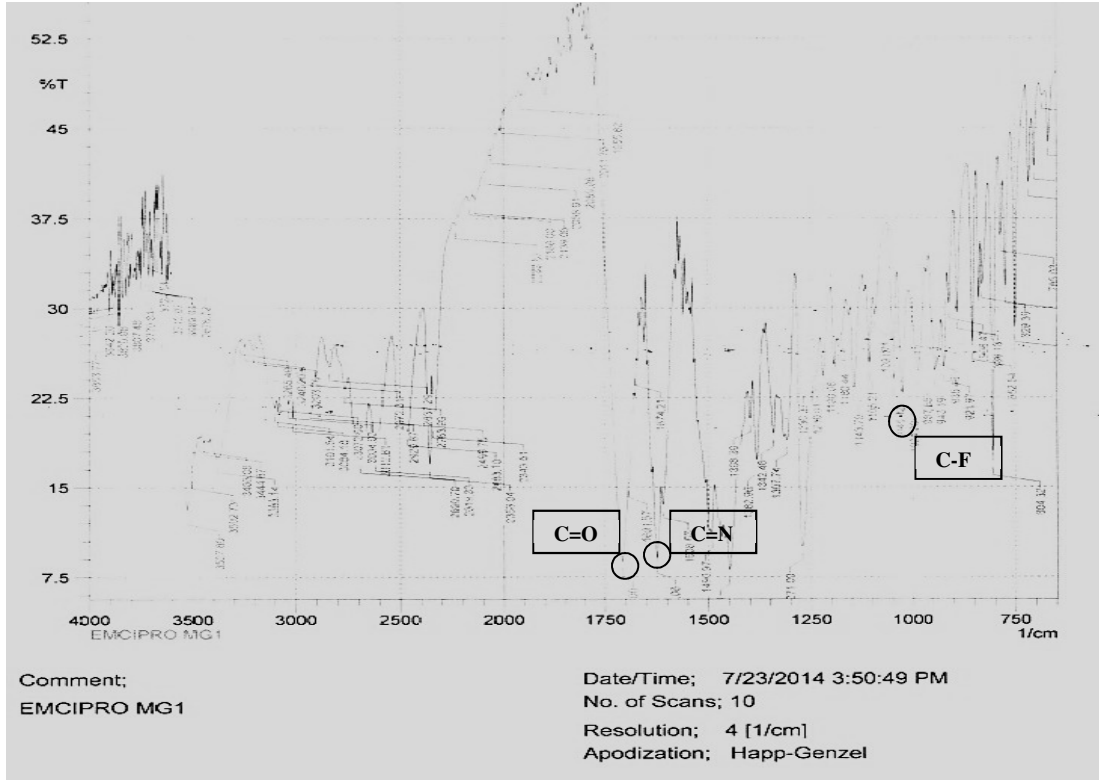
3.1.1. Etkin Maddenin FTIR Spektrumuna Ait Bulgular

Siprofloksasin hidroklorür'ün FTIR spektrumu Bölüm 2.2.1.1. de ifade edildiği üzere elde edilmiştir ve fonksiyonel grupların absorpsiyon bantları Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3. 1. a) Siprofloksasin hidroklorür'ün FTIR spektrumu (Clarke's Analysis of Drugs and Posions 4th Edition, 2009)
b) Siprofloksasin hidroklorür'ün çalışmamızda elde edilen FTIR spektrumu

b)

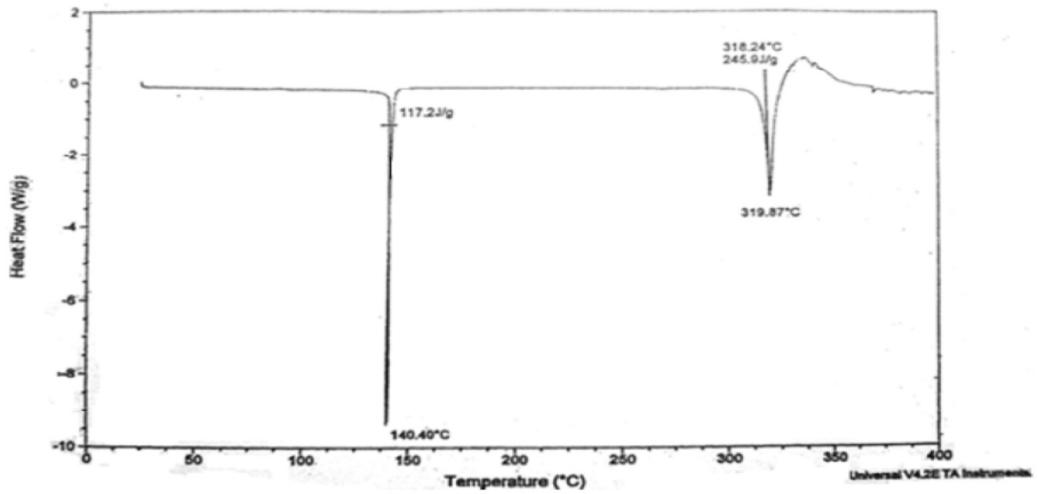


Şekil 3.1. Devamı.

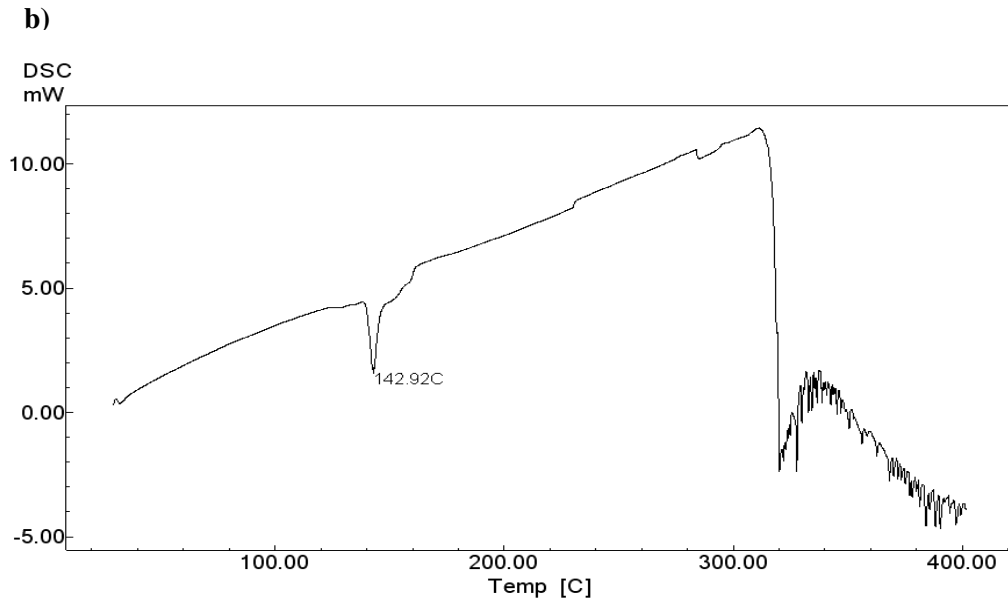
3.1.2. Etkin Maddenin DSC Analizine Dair Bulgular

Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) analizi Bölüm 2.2.1.2’de anlatıldığı şekilde yapılmış ve Şekil 3.2.b’deki termogram elde edilmiştir.

a)



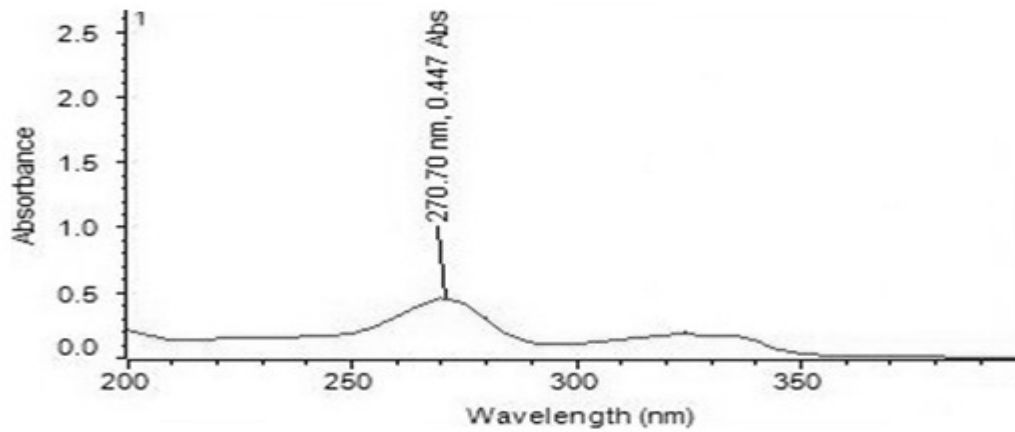
Şekil 3.2. a) Sipprofloksasin hidroklorür referans DSC termogramı (Başaran ve Bozkır, 2012)



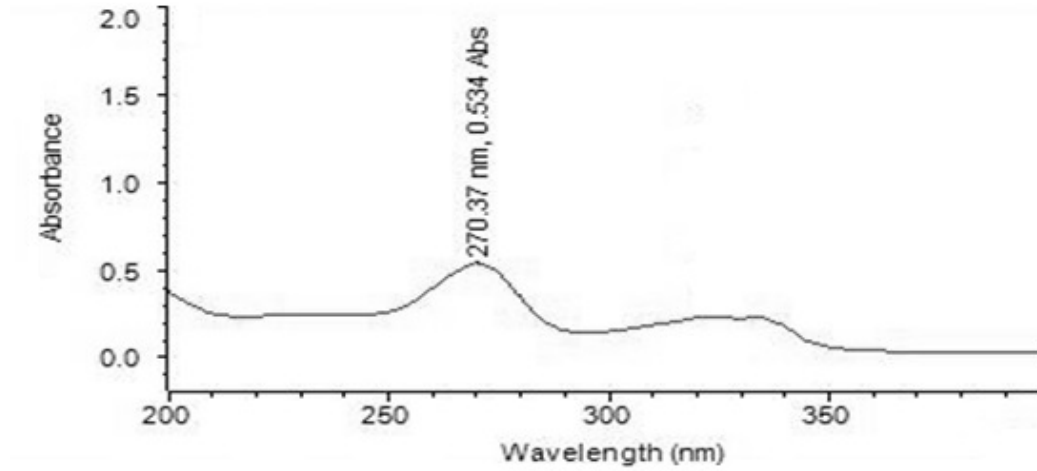
Şekil 3.2. Devamı. b) Çalışmamızda elde edilen Siprofloksasin hidroklorür'ün DSC termogramı.

3.1.3. Etkin Maddenin UV Spektrumuna Dair Bulgular

Siprofloksasin hidroklorür'ün UV spektrumu Bölüm 2.2.1.3'de anlatıldığı şekilde distile suda ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponunda alınmış ve maksimum pik noktası 270 nm'de gözlenmiştir. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



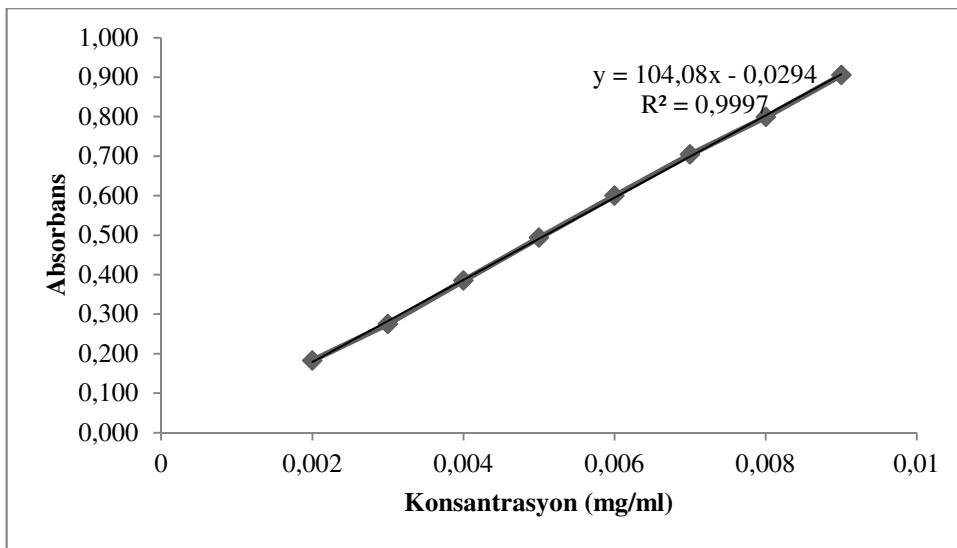
Şekil 3.3. Siprofloksasin hidroklorür'ün distile su içindeki UV spektrumu



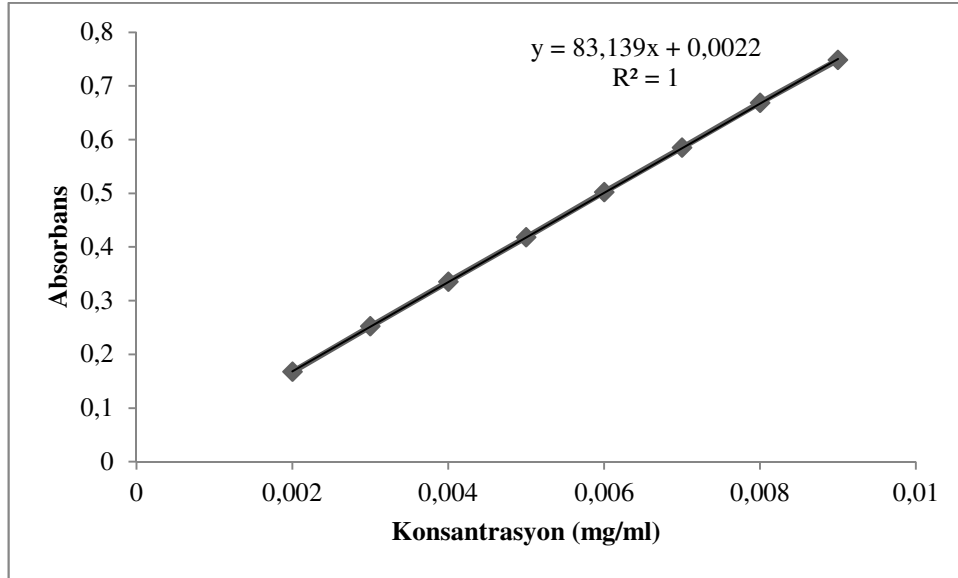
Şekil 3.4. Siprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu içindeki UV spektrumu

3.1.4. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemiyle Kalibrasyonuna Ait Bulgular

Bölüm 2.2.1.4'de açıklanan şekilde yapılarak distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki kalibrasyon grafikleri ve denklemleri bulunmuştur (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). Bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki UV kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.6. Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu içindeki UV kalibrasyon grafiği.

Çizelge 3.1. Sipprofloksasin hidroklorür'ün UV kalibrasyon doğrularına ait parametreler.

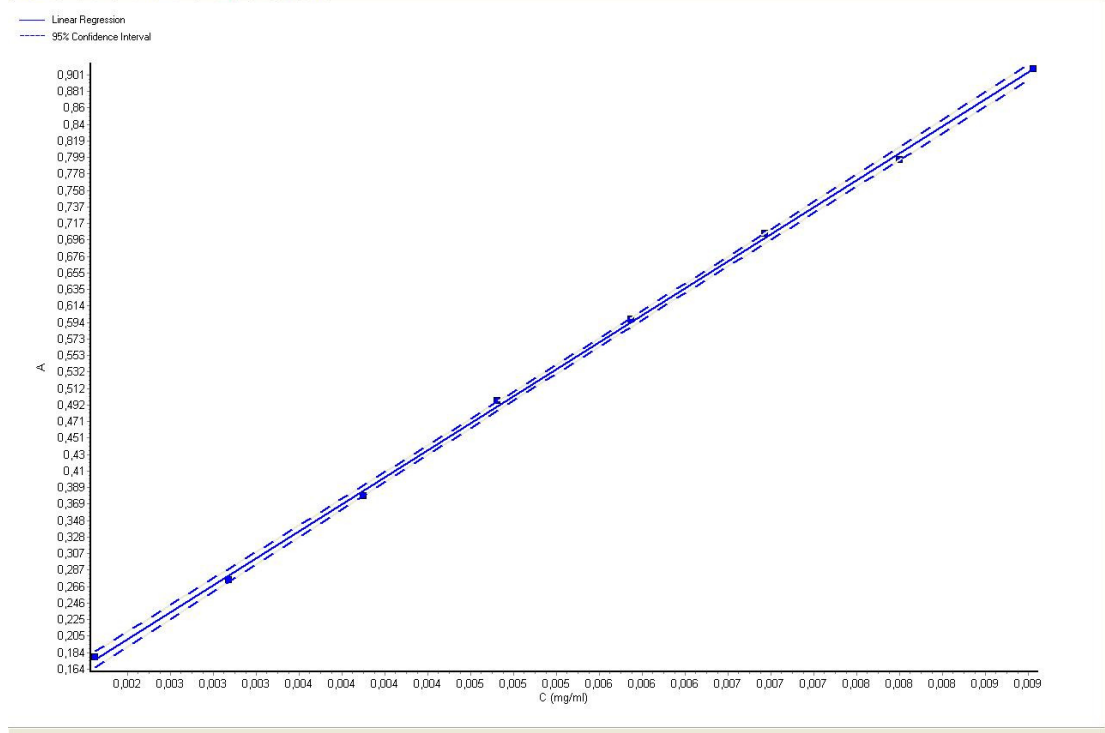
Ortam	Doğru Denklemi	r ²
Distile su	$y = 104,08x - 0,0294$	0,9997
%0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu	$y = 83,139x - 0,0022$	1,0000

3.1.5. Etkin Maddenin UV Spektrofotometrik Yöntemiyle Kalibrasyonunun Validasyonuna Ait Bulgular

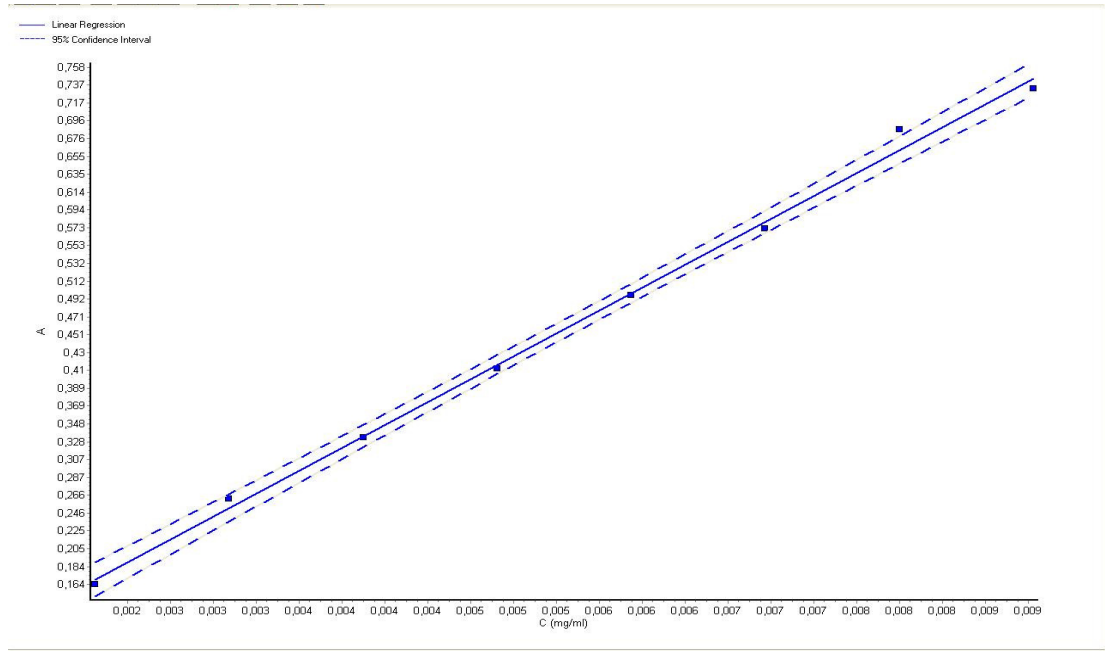
3.1.5.1. Doğrusallık ve Aralığı

Etkin maddenin devamlı okunabileceği minimum ve maksimum konsantrasyonları arasında 8 nokta seçilmiş, distile su içinde 10 mg/100 mL konsantrasyonda hazırlanan ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu içinde 10 mg/100 mL konsantrasyonda hazırlanan etkin maddenin stok çözeltilerinden hareketle birbirinin katları şeklinde seçilen noktalara seyreltmeler yapılarak her bir ortam için bir seri farklı konsantrasyonda çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerin absorbans değerleri 270 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu verilerden hesaplanmış doğrusallık ve

doğrusallık aralığına ait doğrular Şekil 3.7 ve Şekil 3.8’de bu doğrulara ait parametreler ise Çizelge 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.7. Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki doğrusallık grafiği



Şekil 3.8. Siprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki doğrusallık grafiği

Çizelge 3.2. Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu içerisindeki doğrusallık parametreleri

	Distile su	%0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu
Eğim	104,63	82,190
Eğimin standart hatası	0,9721	1,9070
Güven aralığı (%95)	102,25→107,01	77,525→86,856
Korelasyon katsayısı (r)	0,9997	0,9984
Regresyon katsayısı (r^2)	0,9995	0,9968
Kesişim (n)	-0,0336	0,00520
Kesişimin standart hatası	0,0058	0,0114
Kesişimin güven aralığı (%95)	-0,0478→-0,0194	-0,0226→0,0330
Regresyon doğrusundan sapmanın standart hatası (Sy.x)	0,0063	0,0124
Lineer regresyon kareler toplamı	0,4598	0,2837
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	0,0002	0,0009
Artık kareler toplamı	0,4600	0,2846

3.1.5.2. Doğruluk ve Geri Elde

Doğruluk testi için sipprofloksasin hidroklorür'ün distile suda ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponunda, üç farklı konsantrasyonda hazırlanan ve altışar kez okunan numunelerin hesaplanan ve bulunan konsantrasyon, % geri elde değerleri ve

% geri elde değerlerinin ortalama, standart sapma SS ve bağıl standart sapma BSS değerleri Çizelge 3.3 ve 3.4’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Siprofloksasin hidroklorür’ün distile sudaki doğruluk ve geri elde bulguları.

Teorik Konsantrasyon: 2 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 8 µg/mL	
Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde
2,098	104,92	5,067	101,35	8,027	100,33
2,098	104,92	5,067	101,35	8,036	100,46
2,098	104,92	5,067	101,35	8,036	100,46
2,108	105,40	5,077	101,54	8,055	100,69
2,098	104,92	5,077	101,54	8,046	100,57
2,098	104,92	5,067	101,35	8,046	100,57
Ortalama %Geri Elde	104,90	Ortalama %Geri Elde	101,41	Ortalama %Geri Elde	100,51
Standart Sapma	0,19	Standart Sapma	0,09	Standart Sapma	0,13
Bağıl Standart Sapma	0,18	Bağıl Standart Sapma	0,09	Bağıl Standart Sapma	0,13

Çizelge 3.4. Siprofloksasin hidroklorür’ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 tamponundaki doğruluk ve geri elde bulguları.

Teorik Konsantrasyon: 2 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 8 µg/mL	
Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde
2,066	103,32	4,989	99,79	8,032	100,40
2,066	103,32	5,013	100,27	8,032	100,40
2,078	103,92	5,013	100,27	8,044	100,55
2,066	103,32	5,013	100,27	8,044	100,55
2,078	103,92	5,025	100,51	8,044	100,55
2,078	103,92	5,037	100,75	8,044	100,55

Çizelge 3.4. Devamı

Ortalama %Geri Elde	103,62	Ortalama %Geri Elde	100,31	Ortalama %Geri Elde	100,50
Standart Sapma	0,33	Standart Sapma	0,32	Standart Sapma	0,08
Bağıl Standart Sapma	0,32	Bağıl Standart Sapma	0,32	Bağıl Standart Sapma	0,08

3.1.5.3. Kesinlik

3.1.5.3.1. Tekrarlanabilirlik

3 farklı konsantrasyonda 6 kez yapılan ölçümlere ait ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Çizelge 3.5. Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki tekrarlanabilirlik bulguları.

Teorik Konsantrasyon: 2 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 8 µg/mL	
Absorbans	Konsantrasyon	Absorbans	Konsantrasyon	Absorbans	Konsantrasyon
0,189	2,098	0,498	5,067	0,807	8,036
0,188	2,089	0,499	5,077	0,808	8,046
0,188	2,089	0,501	5,096	0,806	8,027
0,188	2,089	0,497	5,058	0,806	8,027
0,189	2,099	0,499	5,078	0,809	8,055
0,189	2,099	0,498	5,067	0,806	8,027
Ortalama	2,094	Ortalama	5,074	Ortalama	8,036
Standart Sapma	$5,26 \times 10^{-6}$	Standart Sapma	$1,31 \times 10^{-5}$	Standart Sapma	$1,21 \times 10^{-5}$
Bağıl Standart Sapma	0,25	Bağıl Standart Sapma	0,26	Bağıl Standart Sapma	0,15

Çizelge 3.6. Sipprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 tamponundaki tekrarlanabilirlik bulguları.

Teorik Konsantrasyon: 2 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 8 µg/mL	
Absorbans	Konsantrasyon	Absorbans	Konsantrasyon	Absorbans	Konsantrasyon
0,175	2,079	0,416	4,977	0,668	8,008
0,175	2,079	0,417	4,989	0,668	8,008
0,175	2,079	0,417	4,989	0,668	8,008
0,175	2,079	0,416	4,977	0,668	8,008
0,175	2,079	0,416	4,977	0,668	8,008
0,174	2,067	0,415	4,965	0,668	8,008
Ortalama	2,0769	Ortalama	4,979	Ortalama	8,008
±Standart Sapma	$4,91 \times 10^{-6}$	±Standart Sapma	$9,05 \times 10^{-6}$	±Standart Sapma	$1,90 \times 10^{-18}$
Bağıl Standart Sapma	0,24	Bağıl Standart Sapma	0,18	Bağıl Standart Sapma	$2,37 \times 10^{-14}$

3.1.5.3.2. Ara Kesinlik

İki farklı günde, aynı konsantrasyonda 6 kez yapılan ölçümlere ait ortalama, standart sapma ve bağıl sapma değerleri değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.7. Sipprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki ara kesinlik bulguları.

	Teorik Konsantrasyon: 2 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 8 µg/mL	
	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün
1.Ölçüm	2,089	2,069	5,067	5,173	8,046	8,094
2.Ölçüm	2,098	2,069	5,067	5,173	8,055	8,094
3.Ölçüm	2,079	2,079	5,067	5,173	8,046	8,103
4.Ölçüm	2,079	2,079	5,077	5,163	8,036	8,094
5.Ölçüm	2,079	2,079	5,067	5,163	8,046	8,084
6.Ölçüm	2,079	2,076	5,077	5,163	8,027	8,075
Ortalama	2,069	2,077	5,07	5,168	8,043	8,091
±Standart Sapma	$8,04 \times 10^{-6}$	$4,97 \times 10^{-6}$	$4,96 \times 10^{-6}$	$5,26 \times 10^{-6}$	$9,92 \times 10^{-6}$	$9,92 \times 10^{-6}$
Bağıl Standart Sapma	0,39	0,24	0,09	0,10	0,12	0,12

Çizelge 3.8. Siprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 tamponundaki ara kesinlik bulguları.

	Teorik Konsantrasyon: 2 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 8 µg/mL	
	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün	1.Gün	2.Gün
1.Ölçüm	2,103	2,042	5,073	5,061	8,020	8,032
2.Ölçüm	2,103	2,018	5,061	5,061	8,020	8,044
3.Ölçüm	2,103	2,030	5,025	5,073	8,020	8,044
4.Ölçüm	2,103	2,042	5,037	5,073	8,008	8,032
5.Ölçüm	2,103	2,030	5,061	5,061	8,020	8,056
6.Ölçüm	2,103	2,042	5,049	5,073	8,032	8,044
Ortalama	2,103	2,034	5,051	5,067	8,020	8,042
±Standart Sapma	0,00	$9,82 \times 10^{-6}$	$1,77 \times 10^{-5}$	$6,59 \times 10^{-6}$	$7,61 \times 10^{-6}$	$9,05 \times 10^{-6}$
Bağıl Standart Sapma	0,00	0,48	0,35	0,13	0,095	0,11

3.1.5.4 Teşhis ve Tayin Sınırları

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin teşhis ve tayin sınırları Bölüm 2.2.1.5.4'de belirtildiği gibi belirlenmiştir. Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10'da teşhis ve tayin sınırları yer almaktadır.

Çizelge 3.9. Siprofloksasin hidroklorür'ün distile sudaki miktar tayininin teşhis ve tayin sınırları

Teşhis Sınırı (LOD) (g/ml)	Tayin Sınırı (LOQ)
$1,5500 \times 10^{-4}$	$4,6900 \times 10^{-4}$

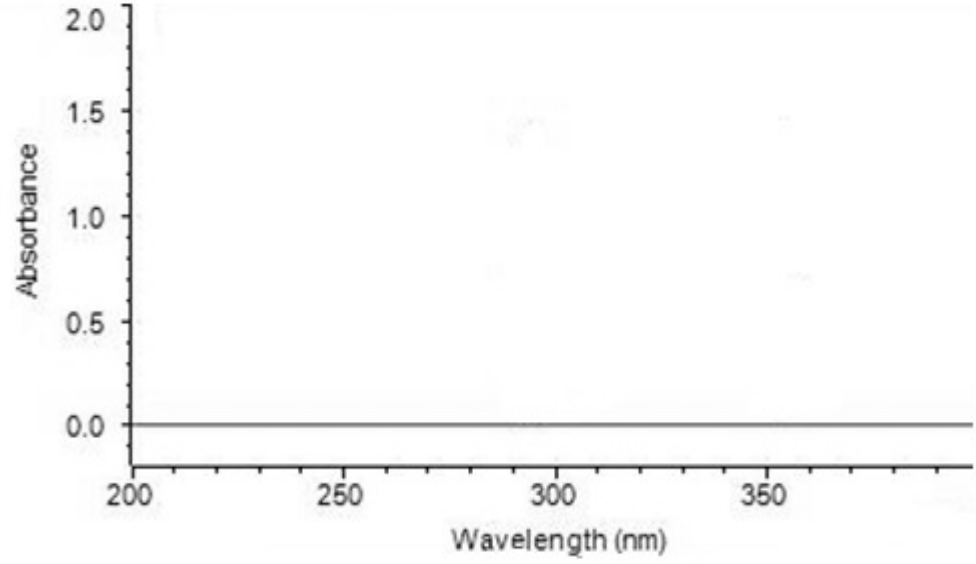
Çizelge 3.10. Siprofloksasin hidroklorür'ün %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayininin teşhis ve tayin sınırları

Teşhis Sınırı (LOD) (g/ml)	Tayin Sınırı (LOQ)
$7,9516 \times 10^{-5}$	$2,4096 \times 10^{-4}$

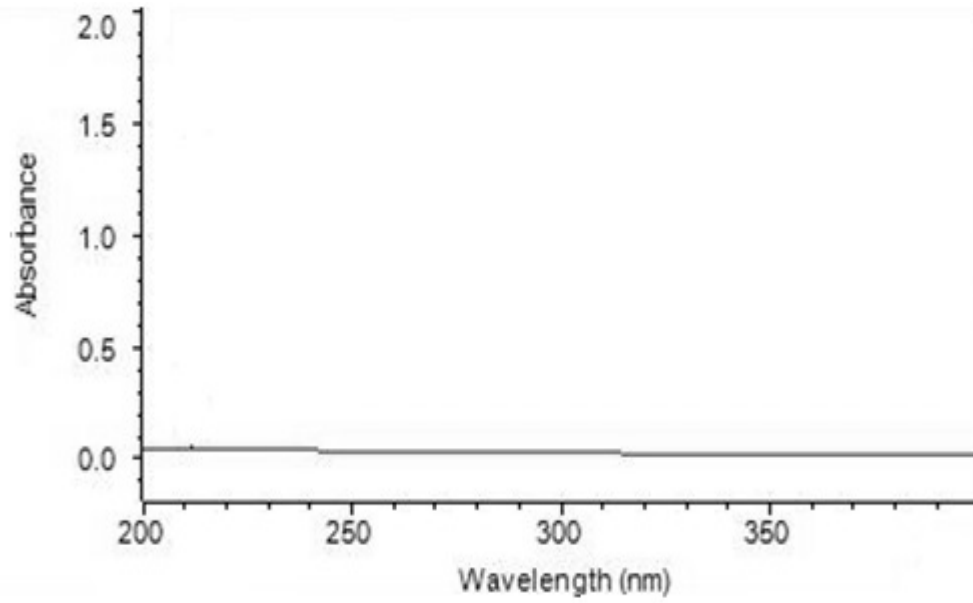
3.1.5.5. Seçicilik

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin bu madde için seçiciliği Bölüm 2.2.1.5.5.'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Siprofloksasin hidroklorür içermeyen, boş

nanopartiküllerin distile sudaki spektrumu Şekil 3.9’da, %0,05 a/h Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki spektrumu ise Şekil 3.10’da verilmiştir.



Şekil 3.9. Boş nanopartiküllerin distile sudaki spektrumu.



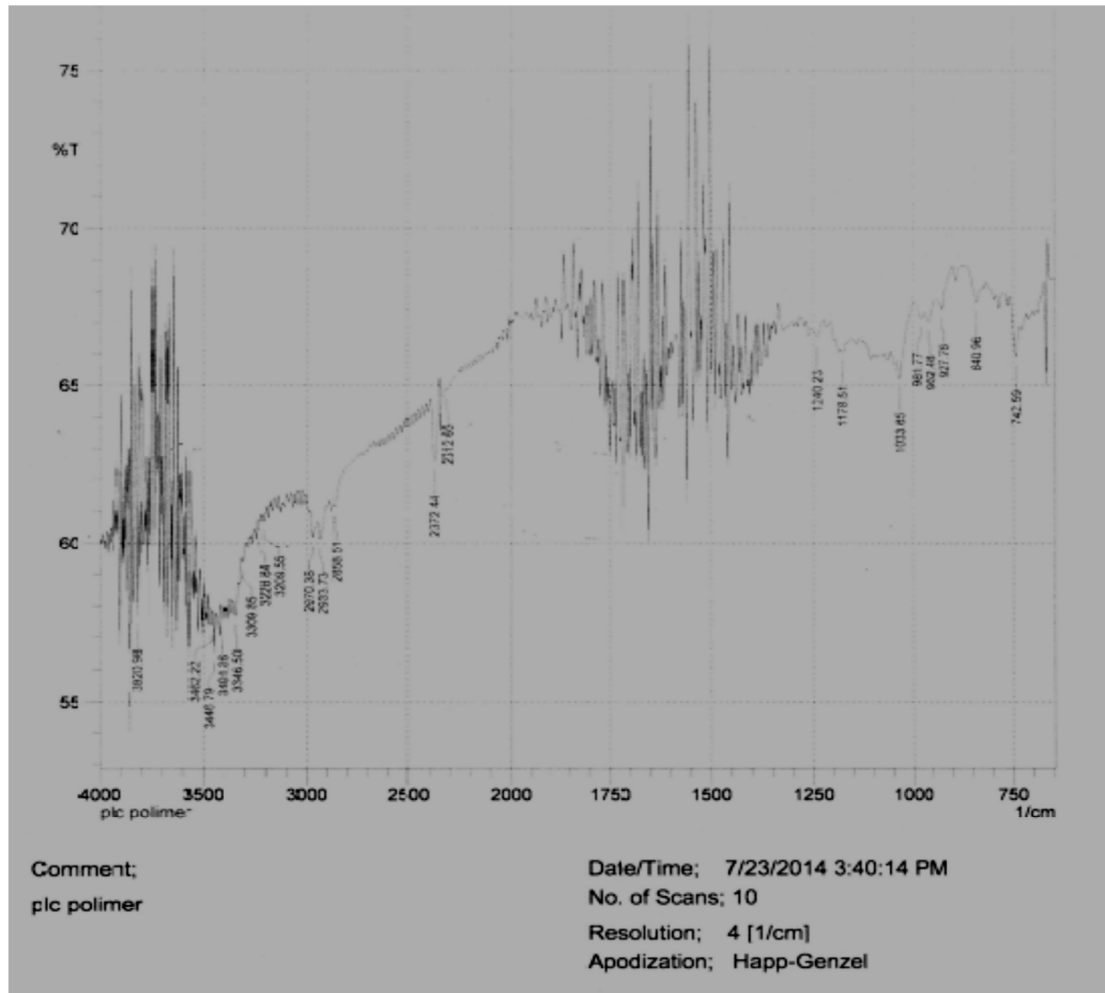
Şekil 3.10. Boş nanopartiküllerin %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki spektrumu.

3.2. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

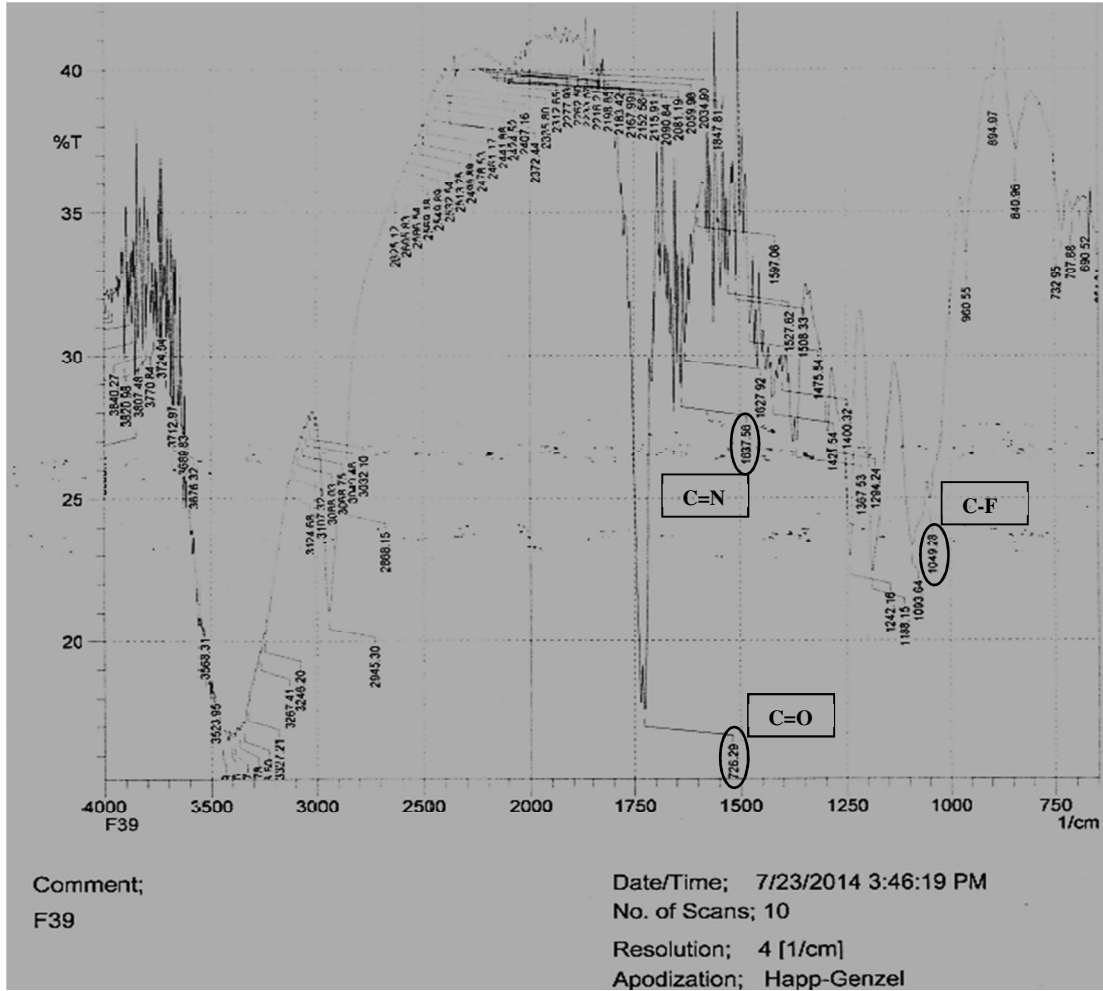
3.2.1. Nanopartiküllerde Etkin Madde-Polimer Etkileşimi Tayini

3.2.1.1. FTIR Spektrumları

Nanopartiküllerde etkin madde-polimer etkileşimini incelemek için Bölüm 2.2.4.1.'de anlatılan yöntemle FTIR analizi yapılmıştır. Polimere (PCL) ve hazırlanan nanopartikül formülasyonuna (F30) ait FTIR spektrumları Şekil 3.11 ve Şekil 3.12'de verilmiştir.



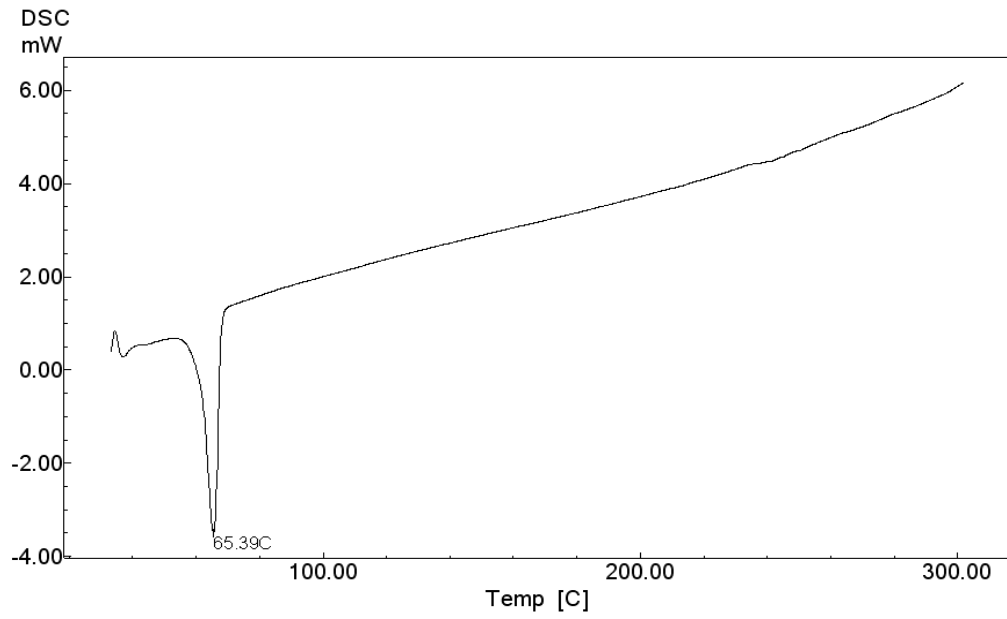
Şekil 3.11. PCL'a ait FTIR spektrumu.



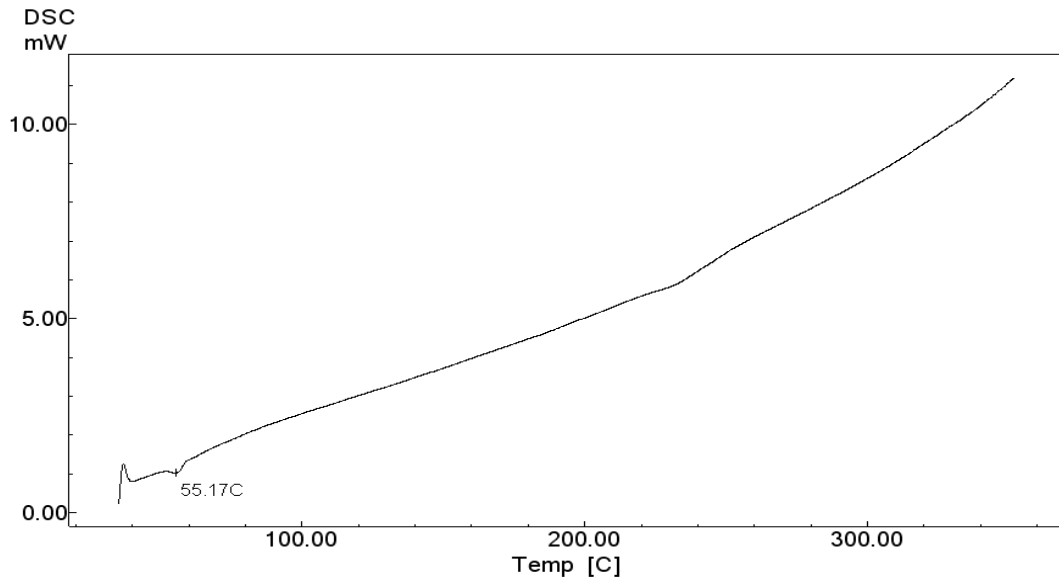
Şekil 3.12. Nanopartiküle ait FTIR spektrumu.

3.2.1.2. DSC Termogramları

Nanopartiküllerde etkin madde-polimer etkileşimini incelemek için Bölüm 2.2.4.2.'de anlatılan yöntemle DSC analizi yapılmıştır. Polimere (PCL) ve hazırlanan nanopartikül formülasyonuna (F30) ait DSC termogramları Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'de verilmiştir.



Şekil 3.13. PCL'a ait DSC termogramı.



Şekil 3.14. F30 kodlu formüle ait DSC termogramı

3.2.2. Partikül Büyüklüğünün Saptanması

Bölüm 2.2.4.3 'de anlatıldığı şekilde nanopartiküllerin geometrik ortalama çapları ve polidispersite indeksleri saptanmıştır. Ön formülasyon çalışmaları ve üretilen nanopartiküllerden elde edilen veriler Çizelge 3.11-3.26'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.11. ÖF4 ve ÖF5 kodlu formüllere ait partikül büyüklükleri

Formül kodu	Kullanılan cihaz	Partikül büyüklüğü (nm) ±SS
ÖF4	Homojenizatör	1931,00±1338,64
ÖF5	Sonikatör	250,93±15,25

Çizelge 3.12. ÖF8 ve ÖF9 kodlu formüllere ait partikül büyüklükleri

Formül kodu	Organik fazdaki PEG 4000 durumu	Partikül büyüklüğü (nm) ±SS
ÖF8	yok	1381±200,63
ÖF9	var	441,92±28,09

Çizelge 3.13. Çeşitli PVA konsantrasyonları ile üretilmiş formüllere ait partikül büyüklükleri

Formül kodu	Dış fazdaki PVA konsantrasyonu	Partikül büyüklüğü (nm) ±SS
ÖF10	%1	262,42±8,58
ÖF11	%2	209,88±3,09

Çizelge 3.14. Farklı molekül ağırlığındaki PVA konsantrasyonları ile çalışılan formüllere ait partikül büyüklükleri (n=6)

Formül kodu	Kullanılan PVA molekül ağırlığı	Partikül büyüklüğü (nm) ±SS
ÖF13	14000	212,23±2,78
ÖF14	30000-70000	1043±21,65

Çizelge 3.15. Çeşitli kriyoprotektan maddeler kullanılarak liyofilize edilen formüllere ait partikül büyüklükleri

Formül kodu	Kullanılan kryoprotektan	Part. büyüklüğü (nm) ±SS
ÖF15	Glukoz	Yapışkan ve büyük partiküllü olduğu için partikül büyüklüğüne bakılamadı.
ÖF16	Sorbitol	Yapışkan ve büyük partiküllü olduğu için partikül büyüklüğüne bakılamadı.
ÖF17	Mannitol	323,06±9,19
ÖF18	PEG 2000	Yapışkan ve büyük partiküllü olduğu için partikül büyüklüğüne bakılamadı.

Çizelge 3.16. Etkin maddenin iç su fazında çözöldüğü ve katı toz olarak eklendiğı nanopartiköllerde partiköl büyüklüğü verileri (n=6)

Formöl kodu	İç su fazı	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F1	%1 a/h PVA çöz	262,23±7,52	0,23±0,02
F2	---	200,98±1,45	0,13±0,02

---: İç faz yok.

Çizelge 3.17. Farklı siprofloksasin hidroklorür miktarlarıyla hazırlanan formölasyonlarda partiköl büyüklüğü verileri (n=6)

Formöl kodu	Siprofloksasin hidroklorür miktarı	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F2	5 mg	200,98±1,45	0,13±0,02
F3	10 mg	228,77±2,81	0,17±0,04
F4	20 mg	202,10±1,55	0,09±0,06

Çizelge 3.18. Dış faza yapılan eklemeler sonucu elde edilen nanopartiköllerin partiköl büyüklüğü verileri (n=6)

Formöl kodu	Dış faza eklenen madde	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F3	---	228,77±2,81	0,17±0,04
F5	100 ml %0,5 PVA çöz.	218,95±9,12	0,22±0,06
F6	0,4 ml DCM	225,75±1,78	0,09±0,02

---: ekleme yapılmamıştır.

Çizelge 3.19. Dış fazın pH'sı değıştirilerek üretilen edilen nanopartiköllerin partiköl büyüklüğü verileri (n=6)

Formöl kodu	Dış faz pH'sı	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F3	%2 a/h PVA sulu çözeltisi	228,77±2,81	0,17±0,04
F7	%2 a/h PVA içeren pH 4,5 tamponu	206,77±1,61	0,16±0,01
F8	%2 a/h PVA içeren pH 7,4 tamponu	194,62±0,91	0,15±0,02
F9	%2 a/h PVA içeren pH 9 tamponu	200,42±1,76	0,08±0,01

Çizelge 3.20. Farklı organik çözücüler ile hazırlanan formülasyonlarda partikül büyüklüğü verileri (n=6)

Formül kodu	Kullanılan organik çözücü	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F3	DCM	228,77±2,81	0,17±0,04
F10	DCM:AC	143,92±0,71	0,08±0,02
F11	DCM:EA	195,65±45,33	0,18±0,05
F12	AC	269,50±2,02	0,21±0,01

Çizelge 3.21. Değişik PCL miktarları kullanılarak üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri (n=6)

Formül kodu	PCL miktarı (mg)	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F3	100 mg	228,77±2,81	0,17±0,04
F13	150 mg	235,23±10,40	0,25±0,01
F14	200 mg	212,47±1,69	0,09±0,01
F15	300 mg	263,68±2,25	0,22±0,02

Çizelge 3.22. Değişik PEG 4000 miktarları kullanılarak üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri (n=6)

Formül kodu	PEG 4000 miktarı (mg)	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F16	---	223,42±1,21	0,09±0,02
F14	10 mg	212,47±1,69	0,09±0,01
F17	20 mg	220,82±2,15	0,12±0,02
F18	40 mg	214,18±1,38	0,13±0,03

Çizelge 3.23. 50:50 laktik asit:glolik asit oranına sahip farklı molekül ağırlığındaki PLGA'lar ile PCL (1:1) kullanılarak yapılan formüllere ait partikül büyüklüğü verileri (n=6)

Formül kodu	PEG 4000 miktarı (mg)	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F21	50:50 PLGA(MA. 40000- 75000):PCL(1:1)	205,75±2,27	0,07±0,01
F23	50:50 PLGA (MA 24000-38000):PCL (1:1)	205,83±1,36	0,13±0,03

Çizelge 3.24. Değişik polimer ve polimer karışımları kullanılarak üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri (n=6)

Formül kodu	Polimer tipi	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F19	PCL (MA. 70000-90000)	197,87±1,69	0,21±0,02
F20	PCL (MA. 14000):PCL(MA. 70000) (1:1)	181,90±1,97	0,10±0,01
F22	75:25 PLGA(MA. 66000-107000):PCL(1:1)	213,30±2,69	0,09±0,01
F24	PLA:PCL (1:1)	274,10±22,66	0,22±0,01
F25	PCL:Eudragit (1:1)	217,40±3,07	0,29±0,01

Çizelge 3.25. Dış fazına değişik konsantrasyonlarda kitozan eklenerek üretilen formüllerde partikül büyüklüğü verileri (n=6)

Formül kodu	Kitozan konsantrasyonu	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F28	%0,5 (a/h)	266,13±1,62	0,22±0,01
F29	%1,0 (a/h)	384,1±4,14	0,24±0,00
F30	%2,0 (a/h)	489,00±7,32	0,22±0,03
F31	%4,0 (a/h)	---	---

---: Nanopartikül oluşmadı.

Çizelge 3.26. Diğer yapılan değişik modifikasyonlar ile hazırlanan nanopartiküllerde partikül büyüklüğü verileri (n=6)

Formül kodu	İç faz	Dış faz	Polimer	Part. büyüklüğü (nm) ±SS	Polidispersite indeksi (PI)
F26	---	%2 a/h PVA çöz.	PCL:Lesitin (200 mg:20 mg)	298,00±4,51	0,24±0,01
F27	---	%2 a/h PVA çöz.	%2 PVA çöz.+%4 NaCl	190,5 ±0,23	3,53±0,01
F32	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Tween 80 (10 ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---	---
F33	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---	---

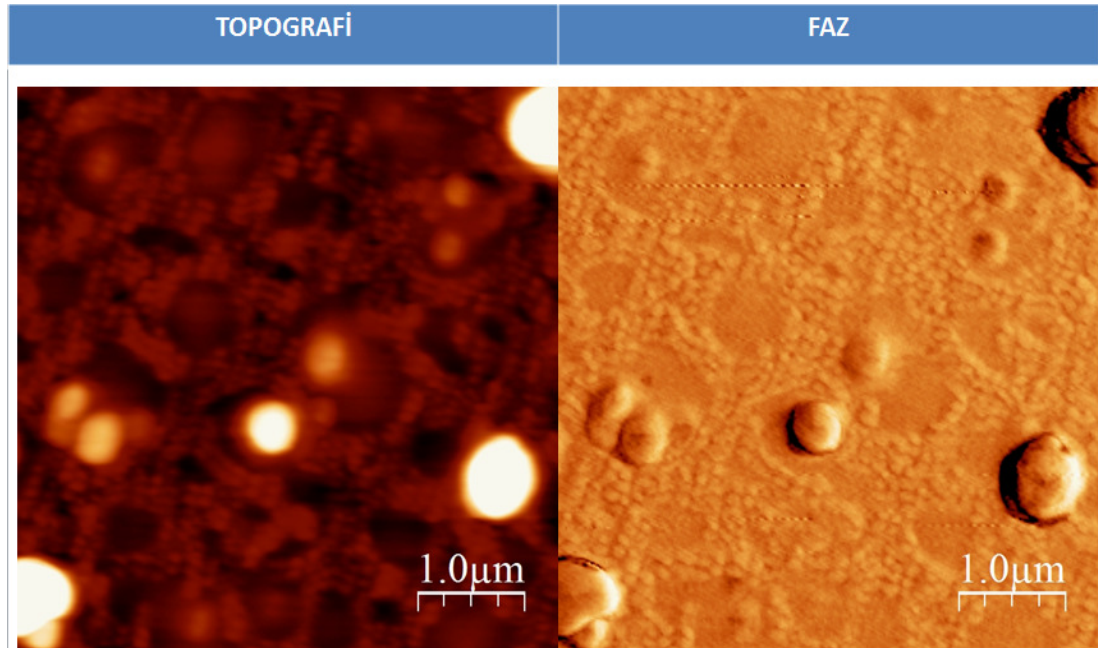
Çizelge 3.26. Devamı.

F34	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (40ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---	---
F35	%5 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	132,60±2,09	0,29±0,03
F36	%5 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(200 mg)	221,80±5,38	0,31±0,02
F37	%1PVA+ SDS	%2 a/h PVA çöz.	PCL: 200 mg	243,3±6,21	0,24±0,01

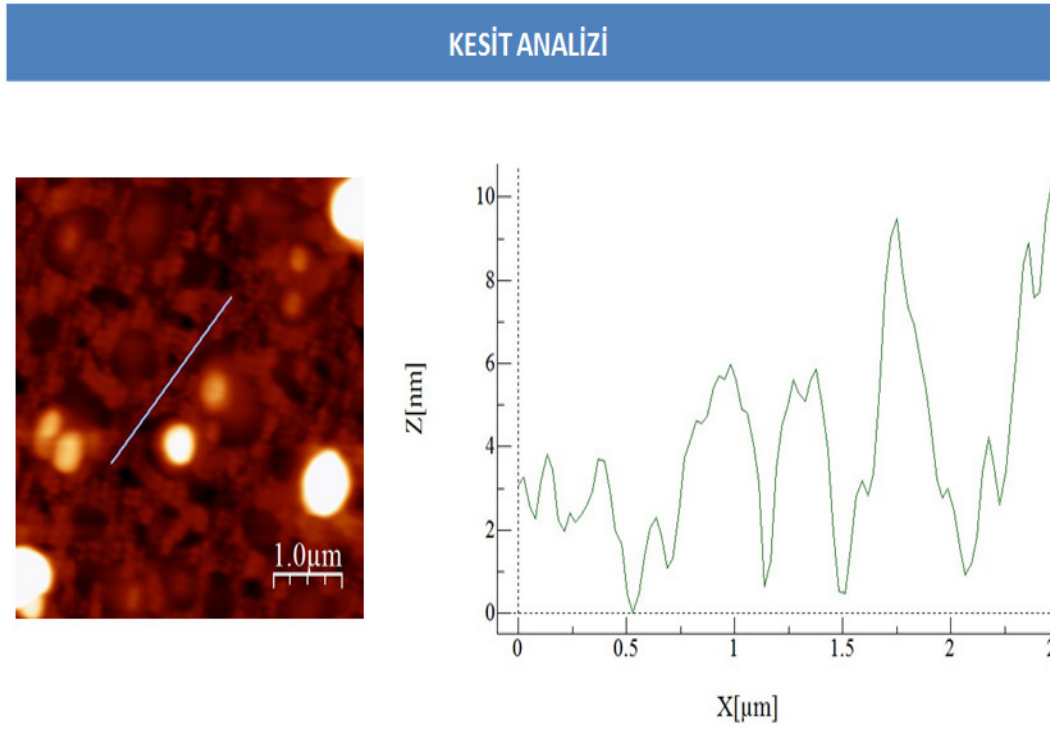
---: Nanopartikül oluşmadı.

3.2.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Nanopartiküllerin Görüntülenmesi

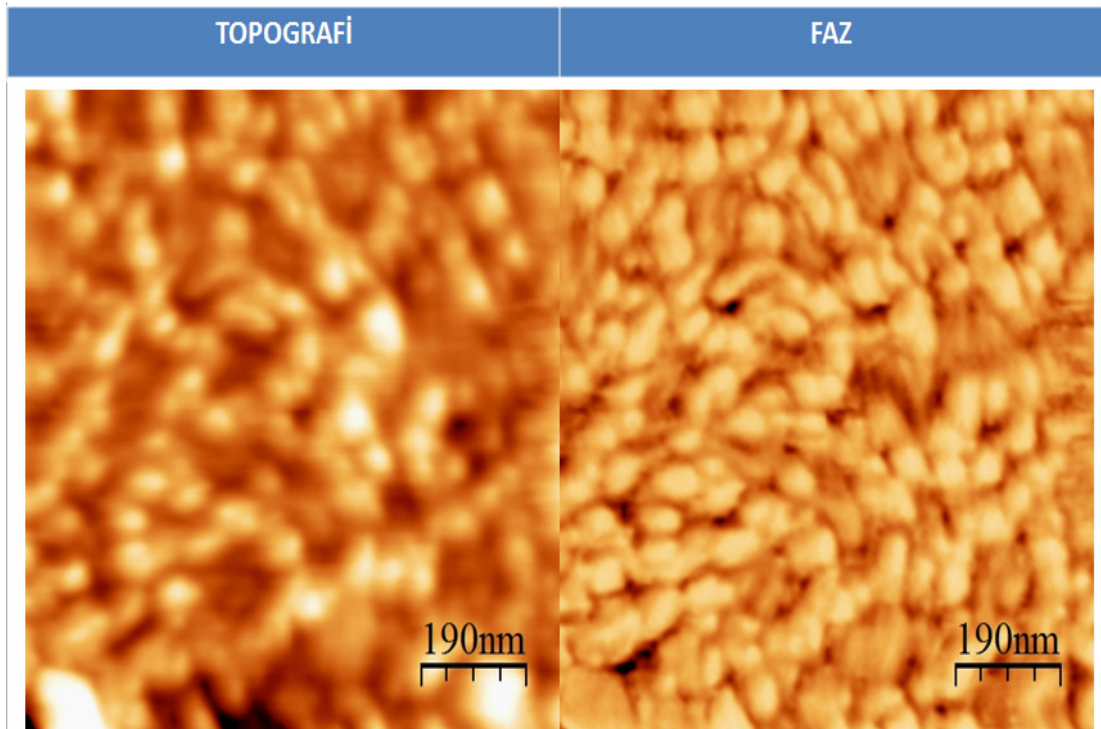
Partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği göz önünde bulundurularak seçilen F30 kodlu formül için, Bölüm 2.2.4.4.'de anlatılan şekilde AFM ile görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen görüntüler Şekil 3.15-3.18'de verilmiştir.



Şekil 3.15. 5x5 µm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait topografi ve faz görüntüleri

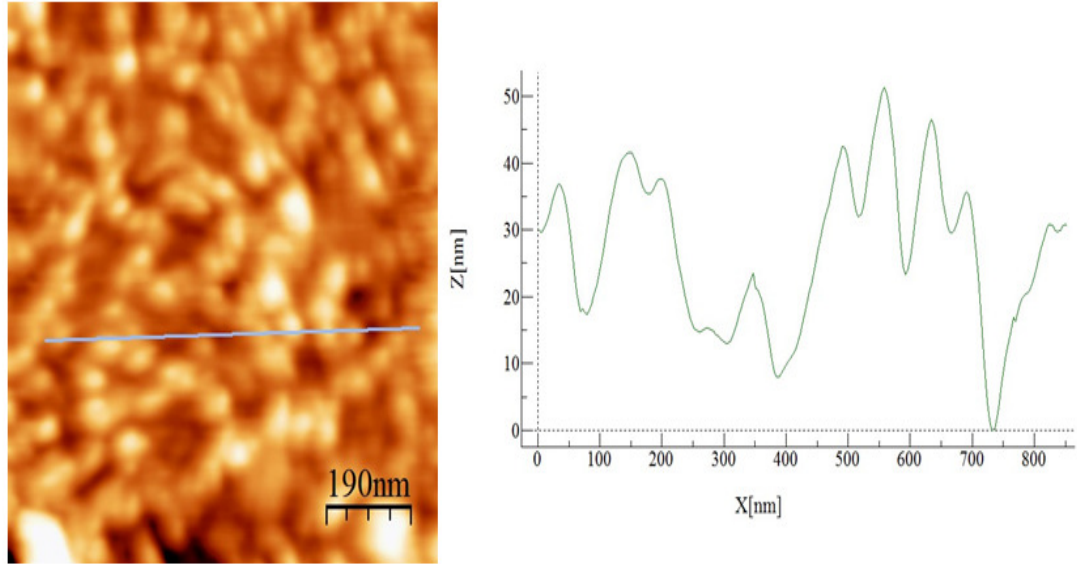


Şekil 3.16. 5x5 μm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait kesit analizi



Şekil 3.17. 1x1 μm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait topografi ve faz görüntüleri

KESİT ANALİZİ



Şekil 3.18. 1x1 µm tarama alanındaki F30 kodlu formüle ait kesit analizi

3.2.4. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini

Nanopartikül formülasyonlarında Bölüm 2.2.4.5’de anlatıldığı şekilde miktar tayini yapıldıktan sonra Bölüm 2.2.4.6’da anlatıldığı şekilde enkapsülasyon etkinlikleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.27-3.37’de bulunmaktadır.

Çizelge 3.27. Etkin maddenin iç su fazında çözülüp ve katı toz olarak eklendiği nanopartiküllerde enkapsülasyon etkinliği (n=3)

Formül kodu	İç su fazı	Enkapsülasyon etkinliği (%) ± SS
F1	%1 a/h PVA çöz	1,61±0,67
F2	---	1,05±0,01

----: İç faz yok.

Çizelge 3.28. Farklı siprofloksasin hidroklorür miktarlarıyla hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliği (n=3)

Formül kodu	Siprofloksasin hidroklorür miktarı	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F2	5 mg	1,05 $\pm$ 0,01
F3	10 mg	2,87 $\pm$ 0,01
F4	20 mg	1,46 $\pm$ 0,05

Çizelge 3.29. Dış faza yapılan eklemeler sonucu elde edilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği (n=3)

Formül kodu	Dış faza eklenen madde	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F3	---	2,87 $\pm$ 0,01
F5	100 ml %0,5 a/h PVA çöz.	1,46 $\pm$ 0,05
F6	0,4 ml DCM	1,83 $\pm$ 0,04

---: ekleme yapılmamıştır.

Çizelge 3.30. Dış fazın pH'sı değiştirilerek üretilen nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği (n=3)

Formül kodu	Dış faz pH'sı	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F3	%2 a/h PVA sulu çözeltisi	2,87 $\pm$ 0,01
F7	%2 a/h PVA içeren pH 4,5 tamponu	3,5 $\pm$ 0,25
F8	%2 a/h PVA içeren pH 7,4 tamponu	1,31 $\pm$ 0,10
F9	%2 a/h PVA içeren pH 9 tamponu	3,32 $\pm$ 0,01

Çizelge 3.31. Farklı organik çözücüler ile hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliği (n=3)

Formül kodu	Kullanılan organik çözücü	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F3	DCM	2,87 $\pm$ 0,01
F10	DCM:AC	3,44 $\pm$ 0,05
F11	DCM:EA	3,39 $\pm$ 0,11
F12	AC	1,10 $\pm$ 0,01

Çizelge 3.32. Değişik PCL miktarları kullanılarak üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri (n=3)

Formül kodu	PCL miktarı (mg)	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F3	100 mg	2,87 $\pm$ 0,01
F13	150 mg	2,68 $\pm$ 0,01
F14	200 mg	2,95 $\pm$ 0,01
F15	300 mg	2,5 $\pm$ 0,00

Çizelge 3.33. Değişik PEG 4000 miktarları kullanılarak üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri (n=3)

Formül kodu	PEG 4000 miktarı (mg)	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F16	---	1,72 $\pm$ 0,01
F14	10 mg	2,95 $\pm$ 0,01
F17	20 mg	3,18 $\pm$ 0,00
F18	40 mg	4,97 $\pm$ 0,16

---: PEG 4000 kullanılmamış.

Çizelge 3.34. 50:50 laktik asit:glolik asit oranına sahip farklı molekül ağırlığındaki PLGA'lar ile PCL (1:1) kullanılarak yapılan formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri (n=3)

Formül kodu	PEG 4000 miktarı (mg)	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F21	50:50 PLGA(MA. 40000-75000):PCL(1:1)	5,35 $\pm$ 0,01
F23	50:50 PLGA (MA 24000-38000):PCL (1:1)	6,71 $\pm$ 0,02

Çizelge 3.35. Değişik polimer ve polimer karışımları kullanılarak üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri (n=3)

Formül kodu	Polimer tipi	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F14	PCL (MA. 14000)	2,95 $\pm$ 0,01
F19	PCL (MA. 70000-90000)	2,59 $\pm$ 0,01
F20	PCL (MA. 14000):PCL(MA. 70000) (1:1)	1,63 $\pm$ 0,01
F22	75:25 PLGA(MA. 66000-107000):PCL(1:1)	3,84 $\pm$ 0,01
F24	PLA:PCL (1:1)	1,95 $\pm$ 0,03
F25	PCL:Eudrogit (1:1)	1,66 $\pm$ 0,01

Çizelge 3.36. Dış fazına değişik konsantrasyonlarda kitozan eklenerek üretilen formüllerde enkapsülasyon etkinliği verileri (n=3)

Formül kodu	Kitozan konsantrasyonu	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F28	%0,5 (a/h)	2,02 $\pm$ 0,02
F29	%1,0 (a/h)	8,02 $\pm$ 0,02
F30	%2,0 (a/h)	8,26 $\pm$ 0,02
F31	%4,0 (a/h)	---

---: Nanopartikül oluşmadı.

Çizelge 3.37. Diğer yapılan değişik modifikasyonlar ile hazırlanan nanopartiküllerde enkapsülasyon etkinliği verileri (n=3)

Formül kodu	İç faz	Dış faz	Polimer	Enkapsülasyon etkinliği (%) $\pm$ SS
F26	---	%2 a/h PVA çöz.	PCL:Lesitin (200 mg:20 mg)	4,20 $\pm$ 0,01
F27	---	%2 a/h PVA çöz.	%2 PVA çöz.+%4 NaCl	1,40 $\pm$ 0,04
F32	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Tween 80 (10 ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---
F33	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---
F34	%1 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (40ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	---
F35	%5 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(100 mg)	4,81 $\pm$ 0,01
F36	%5 a/h Tween 80	%1 a/h Pluronic F127 (10ml)	Lesitin (6 mg) +Gliseril tripalmitat (34 mg) + PCL(200 mg)	4,76 $\pm$ 0,01
F37	%1PVA+ SDS	%2 a/h PVA çöz.	PCL: 200 mg	2,62 $\pm$ 0,00

---: Nanopartikül oluşmadı.

3.2.5. Ürün Verimi Tayini

Nanopartikül formülasyonlarında Bölüm 2.2.4.7.'de anlatıldığı gibi ürün verimi tespiti yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.38'de yer almaktadır.

Çizelge 3.38. Hazırlanan nanopartiküllerde ürün verimi verileri

Formül kodu	% Ürün Verimi
F1	60,32
F2	67,22
F3	65,86
F4	73,93
F5	47,09
F6	77,86
F7	65,54
F8	58,95
F9	59,73
F10	23,65
F11	31,81
F12	71,96
F13	70,89
F14	71,90
F15	84,05
F16	65,63
F17	59,31
F18	54,26
F19	64,47
F20	58,34
F21	65,86
F22	74,69
F23	70,90
F24	71,15
F25	12,89
F26	32,72
F27	56,19
F28	48,55
F29	82,33
F30	74,92

Çizelge 3.38. Devamı.

F31	---
F32	---
F33	---
F34	---
F35	39,20
F36	47,41
F37	58,22

---: Nanopartikül oluşmadı.

3.2.6. Zeta Potansiyel Ölçümü

Nanopartiküllerin yüzey yüklerinin belirlenmesi için zeta potansiyel ölçümleri Bölüm 2.2.4.8’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.39’da ve yer almaktadır.

Çizelge 3.39. Hazırlanan nanopartiküllerde zeta potansiyeli ölçüm verileri (n=6)

Formül kodu	Zeta Potansiyeli (mV)±SS
F1	-21,37±1,87
F2	-11,33±1,75
F3	-24,28±1,22
F4	-12,07±1,56
F5	-20,40±5,48
F6	-22,28±1,97
F7	-1,63±0,37
F8	-11,48±0,66
F9	-5,35±0,46
F10	-2,98±2,26
F11	-4,68±2,43
F12	-17,73±3,28
F13	-12,3±0,65
F14	-14,25±1,79
F15	-20,93±2,05
F16	-22,27±0,9
F17	-14,57±1,58
F18	-22,40±2,09
F19	-20,83±1,42

Çizelge 3.39. Devamı.

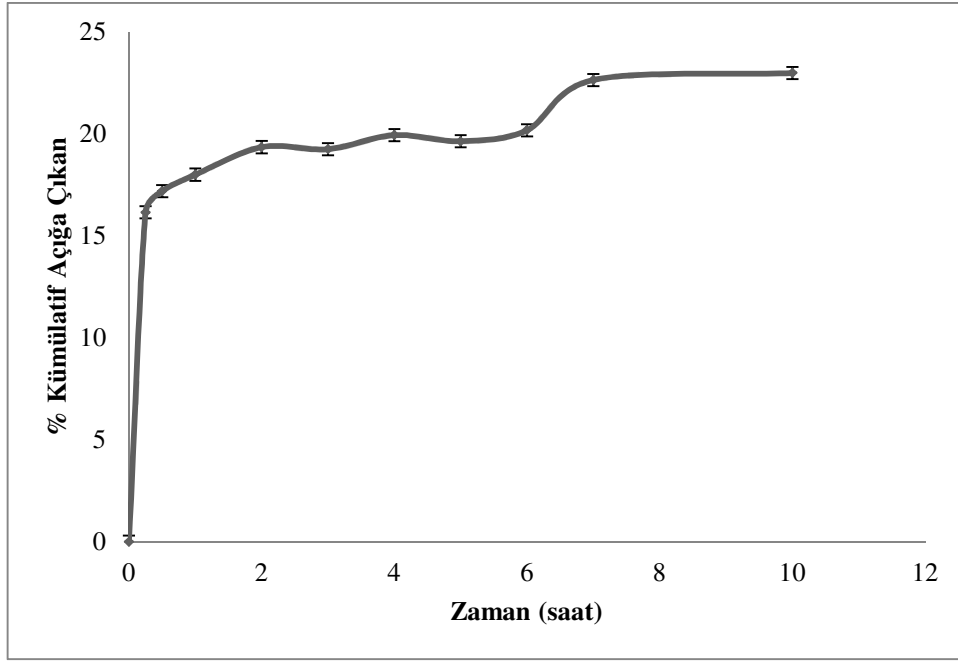
F20	-20,73±4,75
F21	-16,02±1,02
F22	-19,68±0,84
F23	-16,45±1,39
F24	-14,10±0,80
F25	-3,63±1,35
F26	-4,44±0,91
F27	-4,40±0,62
F28	12,2±0,93
F29	56,3±2,02
F30	62,00±0,93
F31	---
F32	---
F33	---
F34	---
F35	-21,4±3,35
F36	-16,9±2,78
F37	-4,85±0,89

---:Nanopartikül oluşmadı.

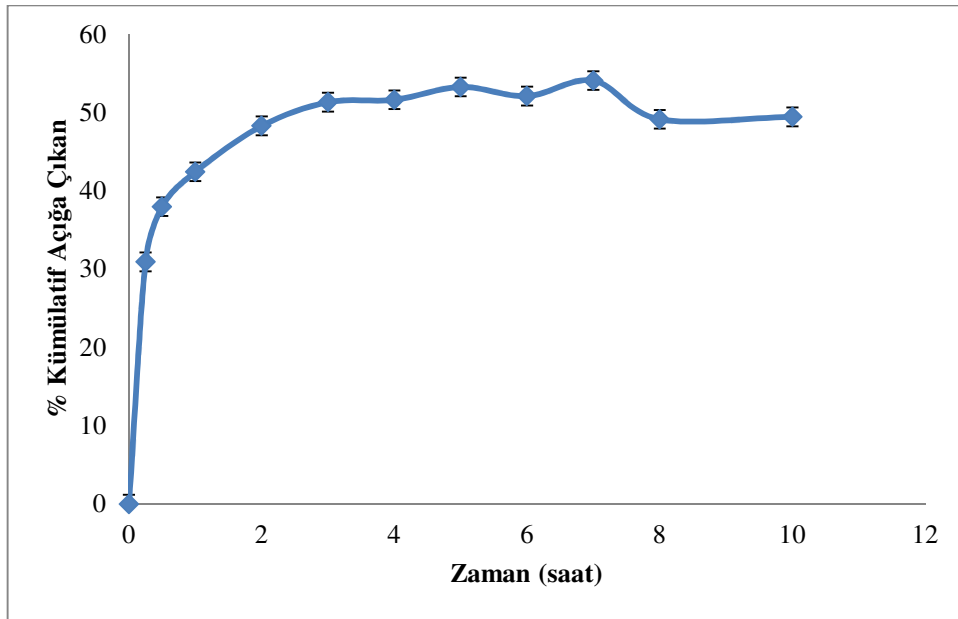
3.2.7. Çözünme Hızı Deneyi

Nanopartiküllerde çözünme hızı deneyleri Bölüm 2.2.4.9’da belirtildiği gibi statik yöntem kullanılarak, $37 \pm 0,5$ °C’de %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponunda yapılmıştır.

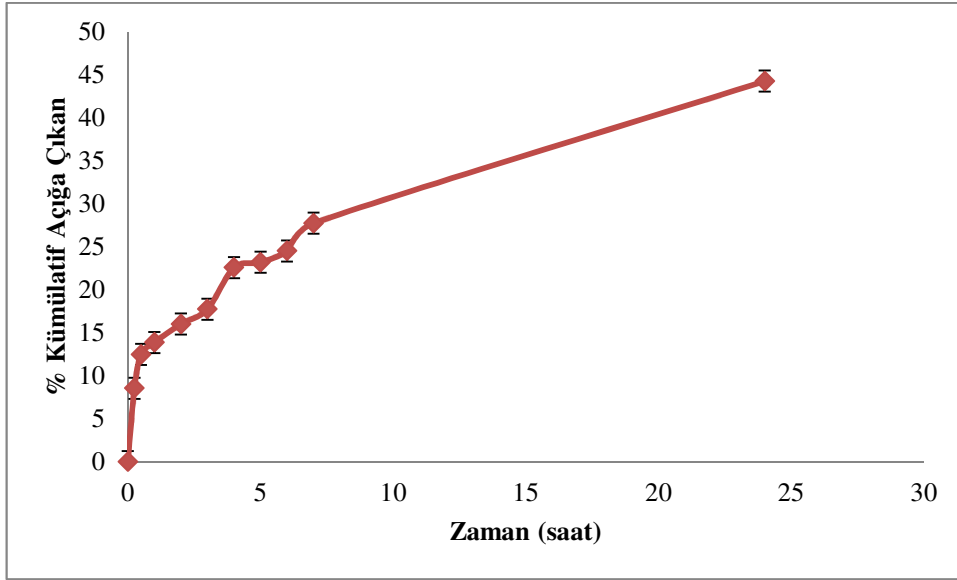
Elde edilen çözünme hızı verilerine ait grafikler Şekil 3.19-3.29’da verilmiştir.



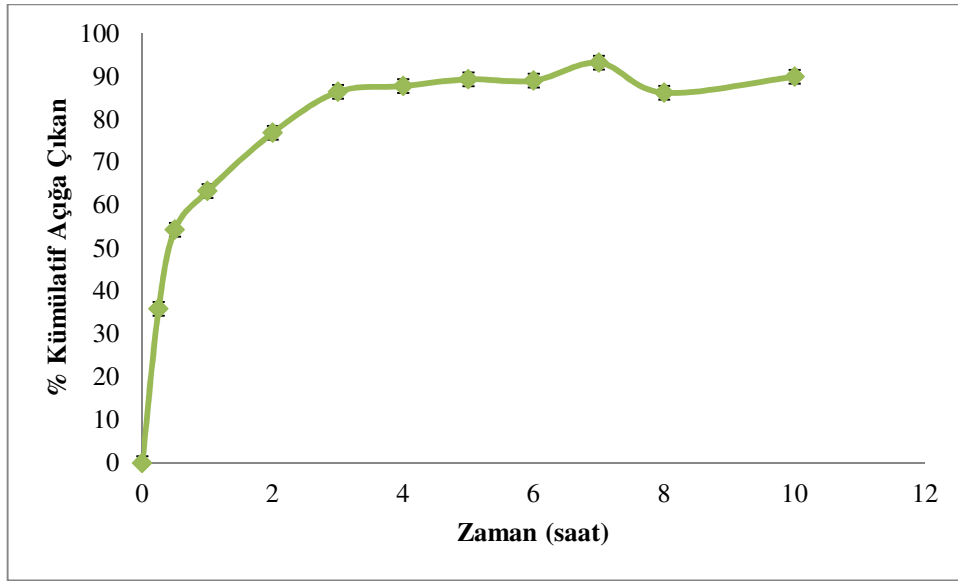
Şekil 3.19. F18 kodlu formülün salım hızı grafiği



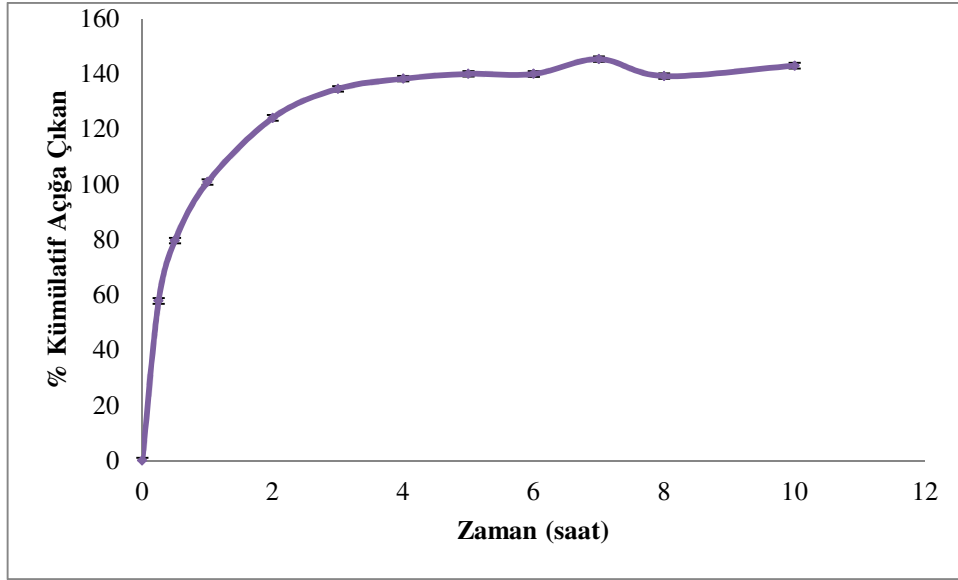
Şekil 3.20. F21 kodlu formülün salım hızı grafiği



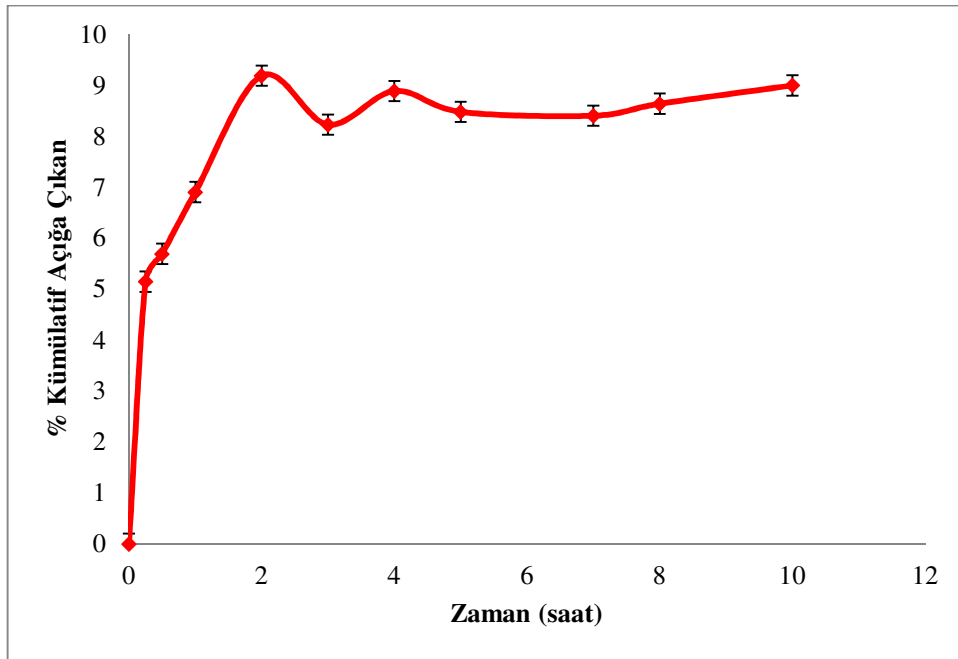
Şekil 3.21. F22 kodlu formülün salım hızı grafiği



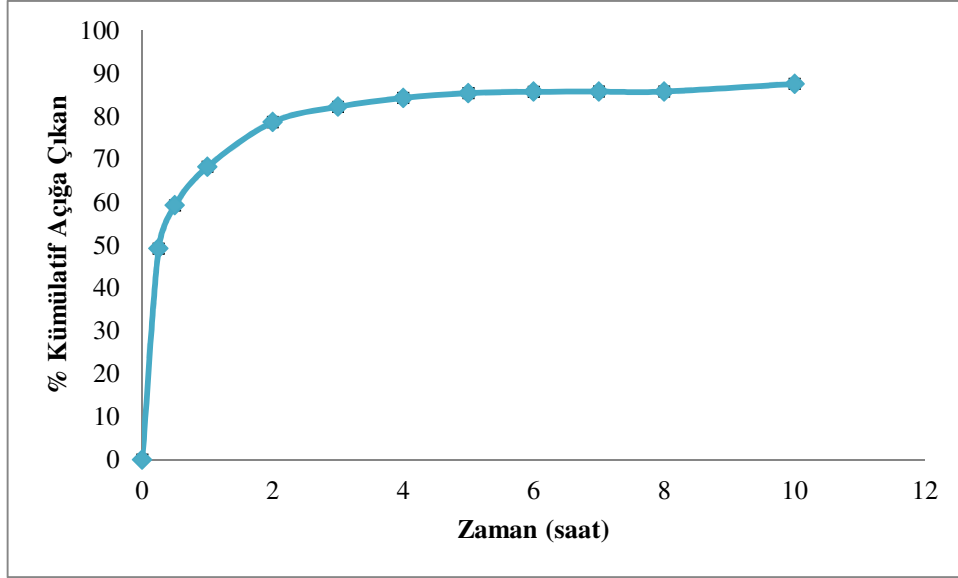
Şekil 3.22. F23 kodlu formülün salım hızı grafiği



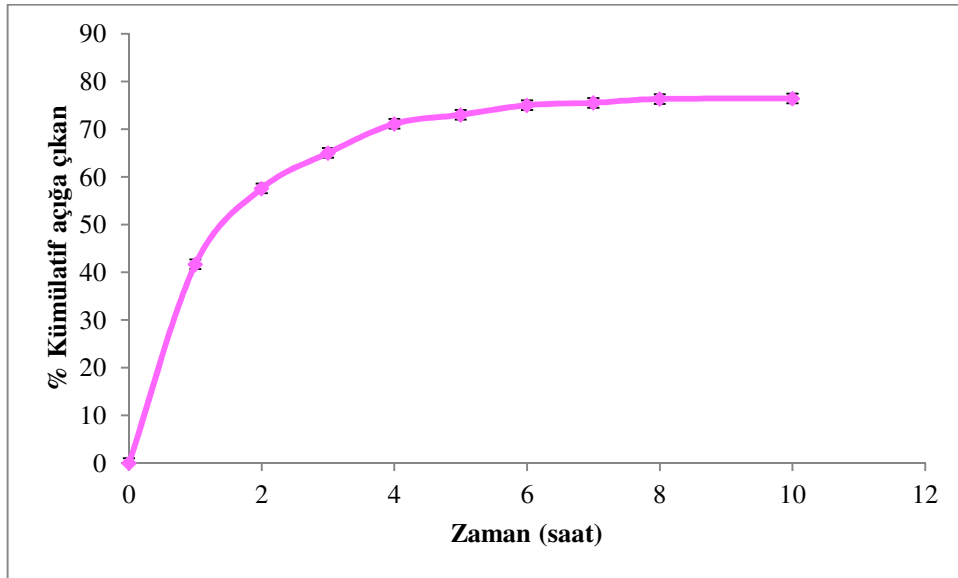
Şekil 3.23. F26 kodlu formülün salım hızı grafiği



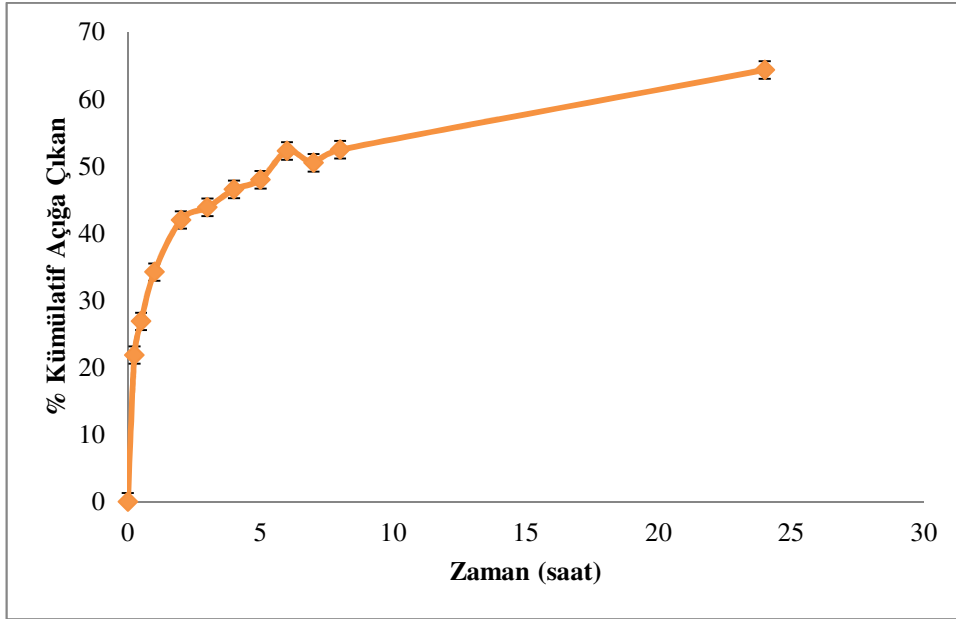
Şekil 3.24. F28 kodlu formülün salım hızı grafiği



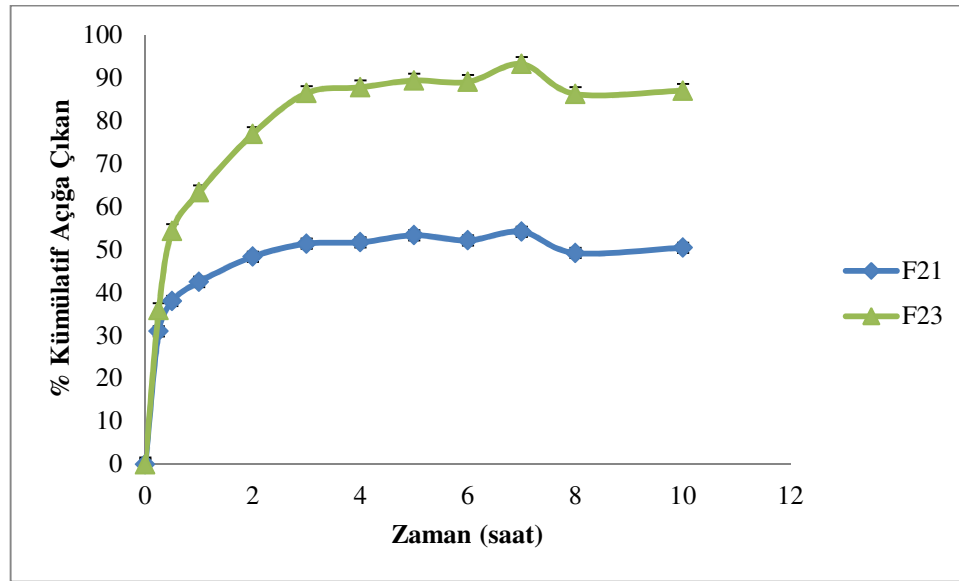
Şekil 3.25. F29 kodlu formülün salım hızı grafiği



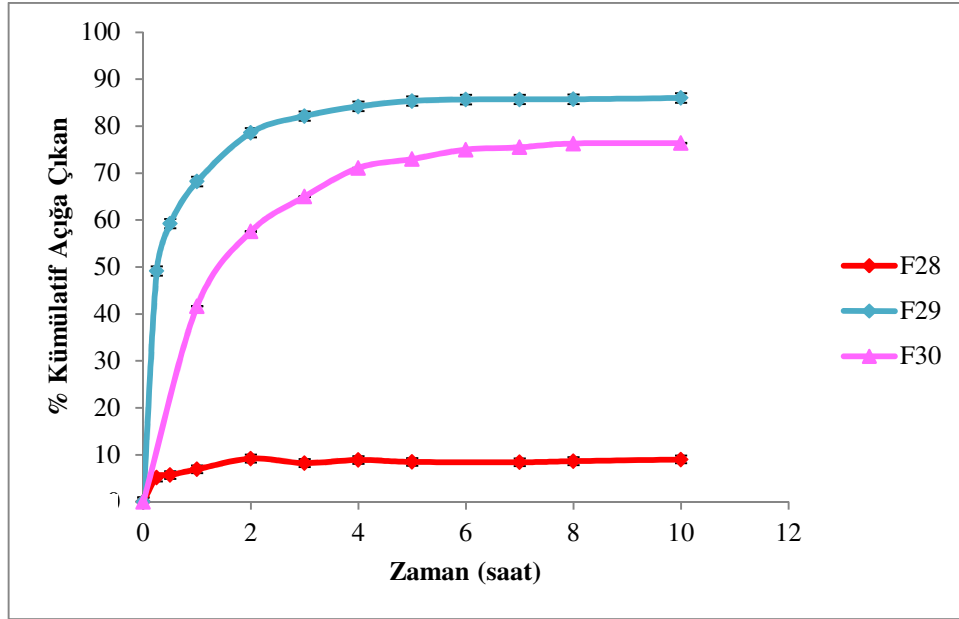
Şekil 3.26. F30 kodlu formülün salım hızı grafiği



Şekil 3.27. F35 kodlu formülün salım hızı grafiği



Şekil 3.28. Farklı molekül ağırlığına sahip 50:50 PLGA'lar ile PCL (1:1) karışımı içeren formüllerde PLGA molekül ağırlıklarının nanopartikül formülasyonlarından etkin madde salım profilleri üzerine etkisi



Şekil 3.29. Dış su fazındaki farklı kitozan konsantrasyonlarının nanopartikül formülasyonlarından etkin madde salım profilleri üzerine etkisi

3.2.8. Nanokompozit Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.8.1. Sıkıştırılmış Dansite Tayini Bulguları

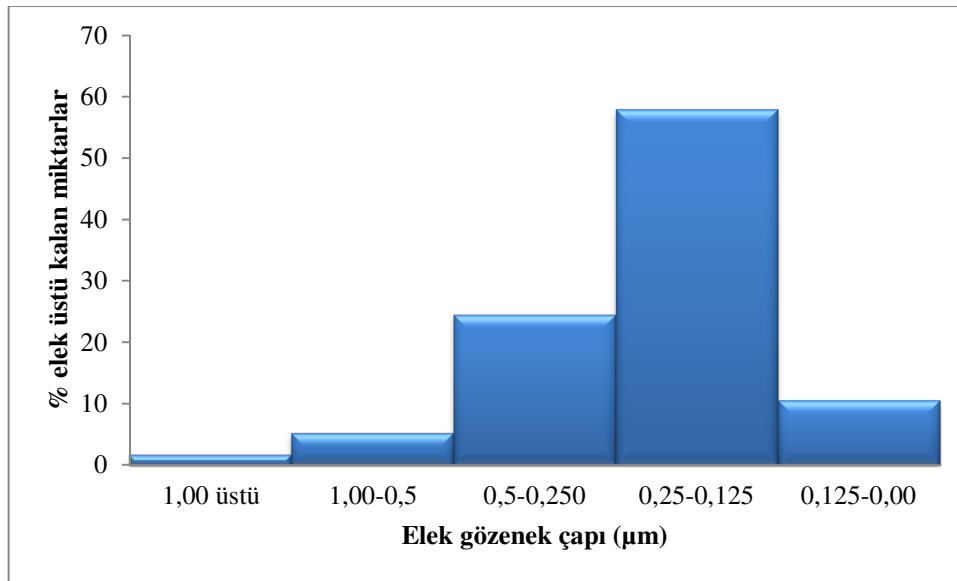
Bölüm 2.2.4.10'da anlatıldığı şekilde üretilen nanokompozit mikropartikül formülasyonlarında Bölüm 2.2.4.11.1'de anlatıldığı gibi sıkıştırılmış dansite tayini yapılmıştır. F30 kodlu formülasyonun Pearlitol 50 C ile 1:5 ve 1:10 a/a oranlarında hazırlanan karışımları için tayin edilen sıkıştırılmış dansite verileri Çizelge 3.40'da yer almaktadır.

Çizelge 3.40. Hazırlanan nanokompozit mikropartiküllerde sıkıştırılmış dansite verileri (n=3)

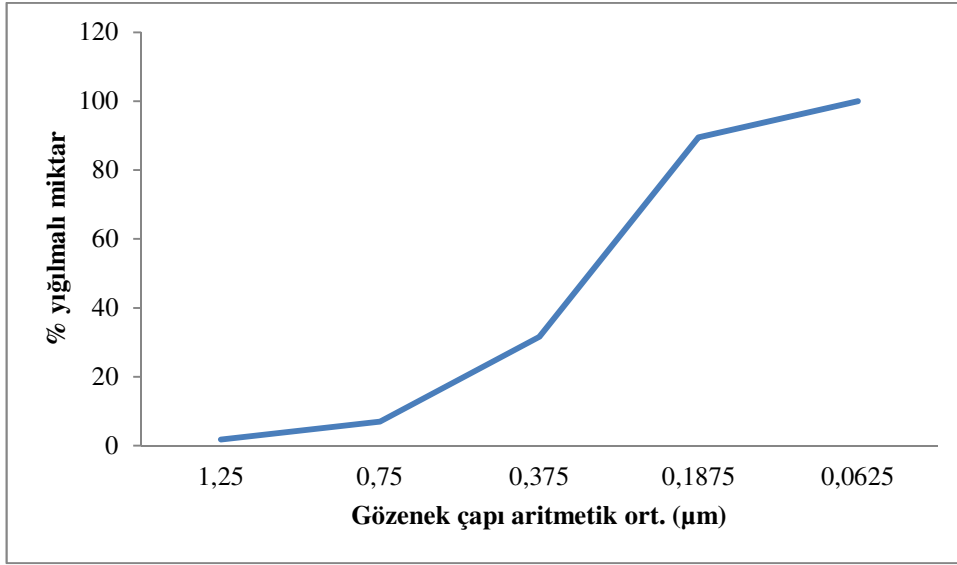
Formül kodu	Mannitol oranı (a/a)	Sıkıştırılmış dansite (g/cm ³) ± SS
NKM1	1:5	0,17±0,00
NKM2	1:10	0,24±0,02

3.2.9. Teorik Ortalama Aerodinamik Çap (KOAÇt) Tayinine Ait Bulgular

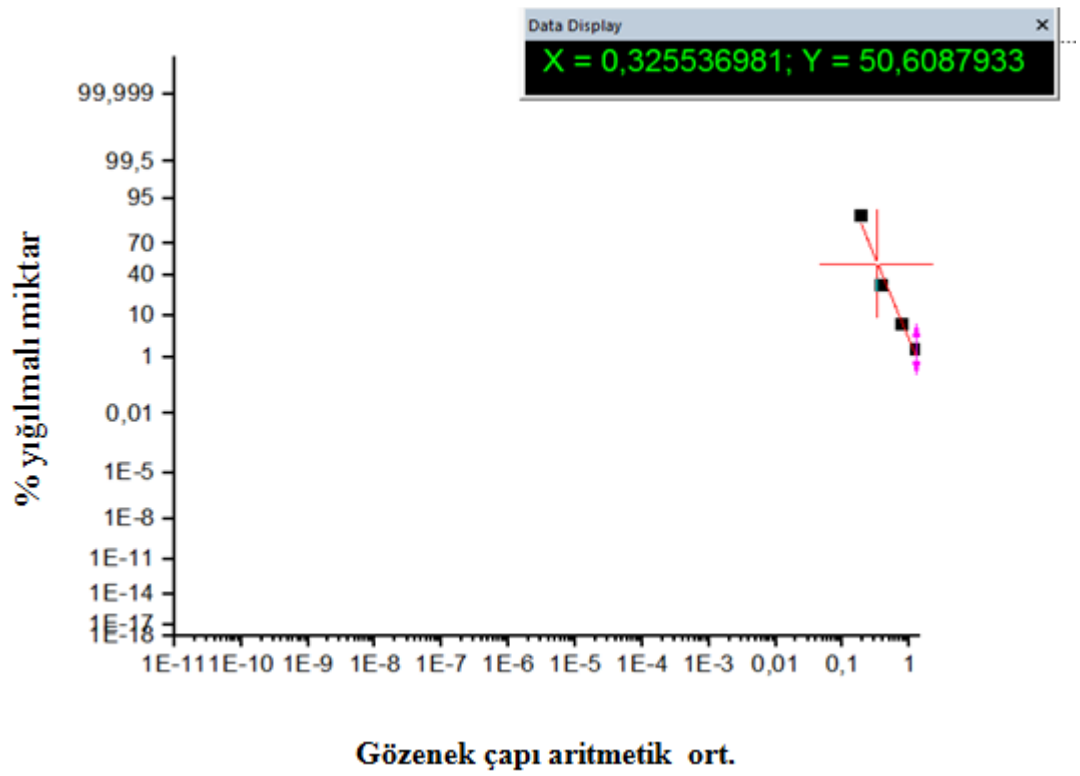
Üretilen nanokompozit mikropartikül formülasyonlarında Bölüm 2.2.4.12’de anlatıldığı gibi geometrik ortalama çap bulmak amacı ile elek analizi yapılmıştır ve buradan bulunan değerler ile Şekil 3.30-3.35’de gösterilen grafikler çizilmiştir. Şekil 3.32’de gösterilen NMK1 kodlu formül için çizilen grafik ve Şekil 3.35’de gösterilen NMK2 kodlu formül için çizilen grafik, Origin Lab 9.1 programı kullanılarak % yığılmalı miktar olasılık skalasında, partikül çapları logaritmik skalada olacak şekilde çizilmiştir. Bu grafiklerde %50 yığılmalı değere karşılık gelen partikül çapı geometrik ortalama çaptır. Programdan %50’ye denk gelen partikül büyüklüğü NMK1 kodlu formül için 0,32 μm ; NMK2 kodlu formül için ise 0,28 μm olarak bulunmuştur. Buradan bulunan geometrik ortalama çap değeri denklem 2.5’e yerleştirilmiş ve buradan teorik ortalama aerodinamik çap hesaplanmıştır (Çizelge 3.41).



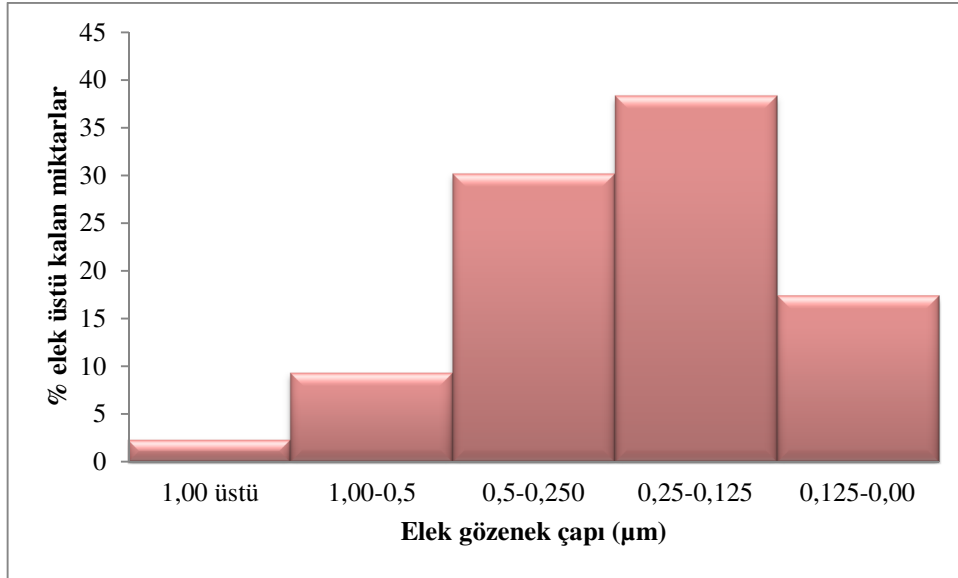
Şekil 3.30. NKM1 kodlu formül için elek üstünde kalan miktarları gösteren sütun grafiği



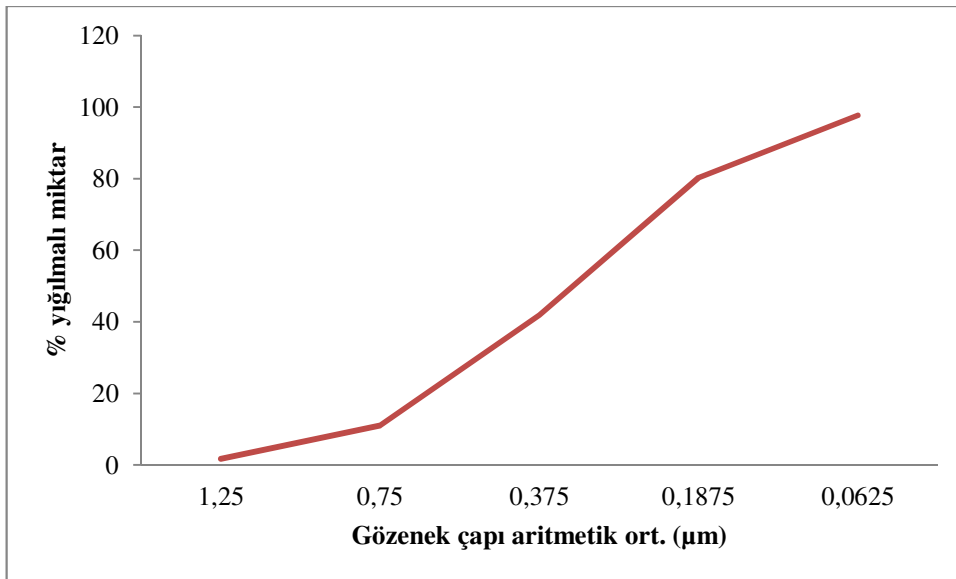
Şekil 3.31. NKM1 kodlu formüle ait yığılmış dağılım eğrisi



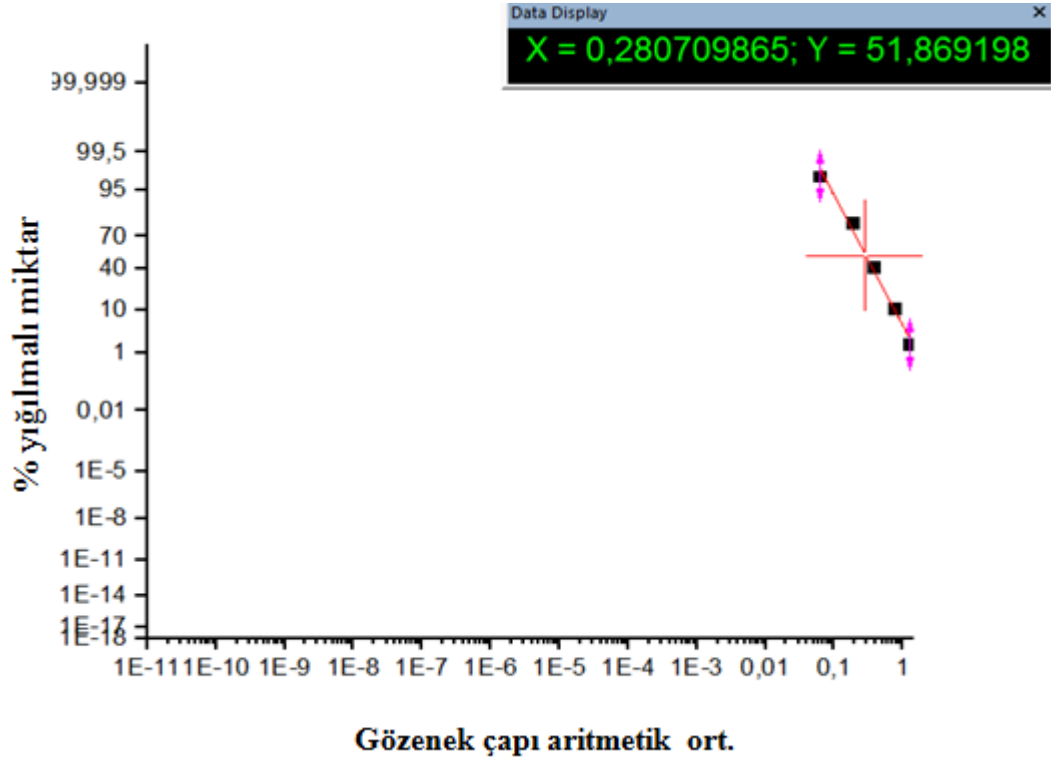
Şekil 3.32. NKM1 kodlu formül için, % yığılmış miktar olasılık skalasında, partikül çapları logaritmik skalada olacak şekilde Origin Lab 9.1 programı kullanılarak çizilmiş grafik ve geometrik ortalama çap değeri



Şekil 3.33. NKM2 kodlu formül için elek üstünde kalan miktarları gösteren sütun grafiği



Şekil 3.34. NKM2 kodlu formüle ait yığılmış dağılım eğrisi



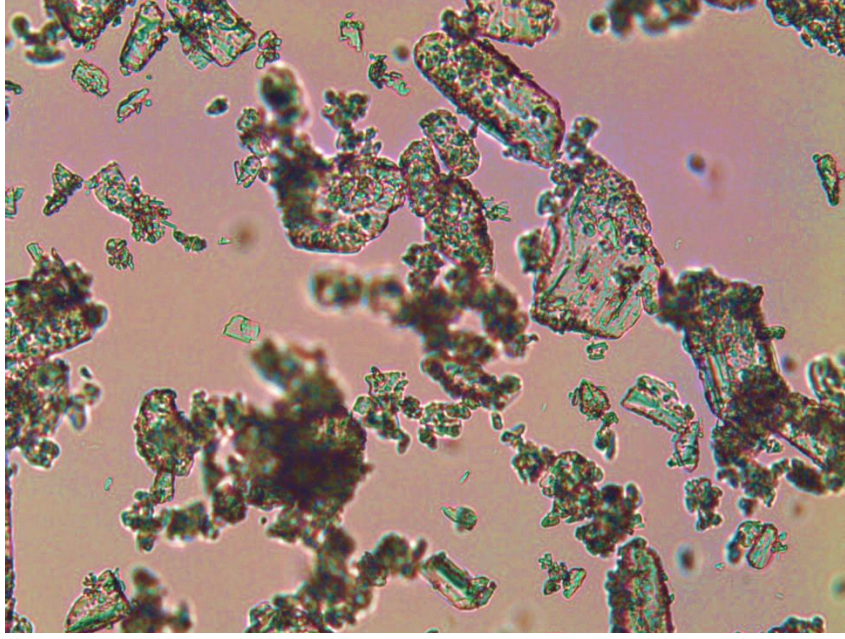
Şekil 3.35. NKM2 kodlu formül için, % yığılmalı miktar olasılık skalasında, partikül çapları logaritmik skalada olacak şekilde Origin Lab 9.1 programı kullanılarak çizilmiş grafik ve geometrik ortalama çap değeri

Çizelge 3.41. Denklem 2.5'e göre hesaplanan KOAÇt değerleri

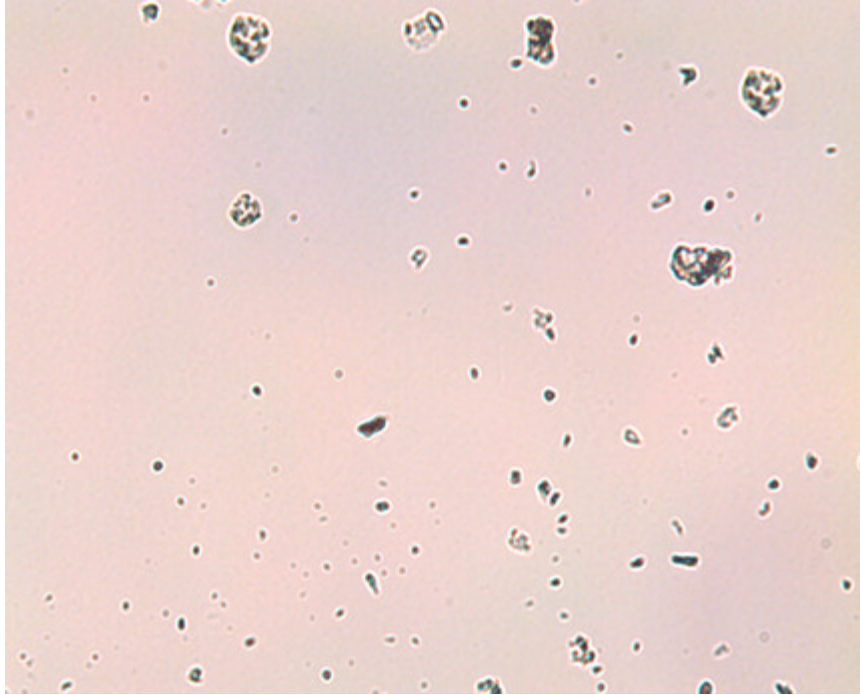
Formül kodu	Mannitol oranı (a/a)	KOAÇt değeri (µm)
NMK1	1:5	0,81
NMK2	1:10	0,57

3.2.10. Nanokompozit Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin İncelenmesi

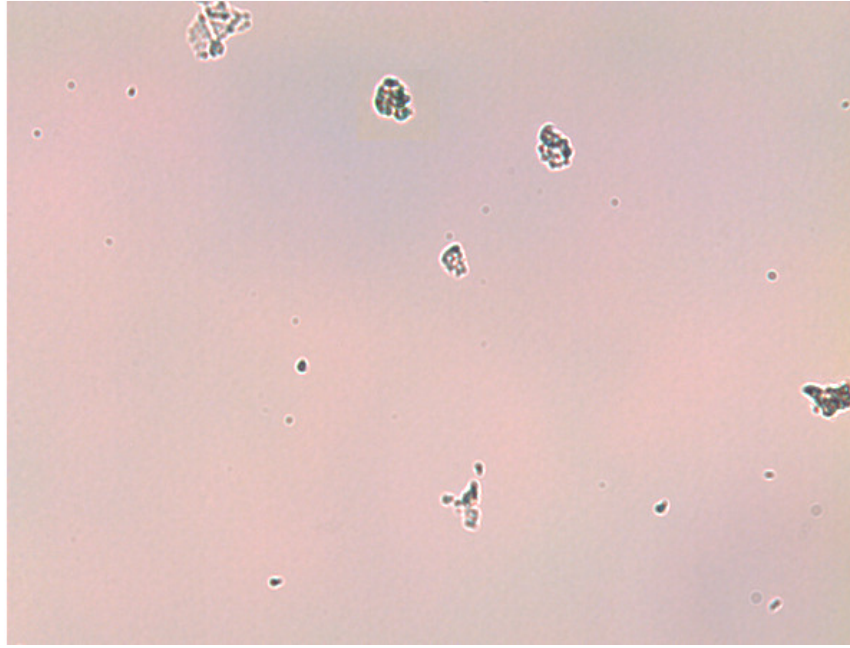
Elde edilen nanokompozit mikropartikül formülasyonlarının şekil ve yüzey özellikleri Bölüm 2.2.4.13'de belirtildiği gibi incelenmiştir. Çalışılan mikropartikül formülasyonlarına ait mikroskop+foto sistemi ile çekilen fotoğraflar Şekil 3.36-3.38'de yer almaktadır.



Şekil 3.36. F30 kodlu formülasyonun mikropartikül haline gelmesinde kullanılan Pearlitol 50 C'ye ait $\times 40$ ile çekilmiş mikroskop görüntüsü



Şekil 3.37. F30 kodlu formülasyonun Pearlitol 50 C ile 1:10 a/a oranında hazırlanan karışımına ait $\times 40$ ile çekilmiş mikroskop görüntüsü



Şekil 3.38. F30 kodlu formülasyonun Pearlitol 50 C ile 1:5 a/a oranında hazırlanan karışımına ait $\times 40$ ile çekilmiş mikroskop görüntüsü

3.2.11. Antimikrobiyal Etkinlik Çalışmasına Ait Bulgular

Bölüm 2.2.4.14’de anlatılan şekilde yapılan antimikrobiyal etkinlik çalışması sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 3.42- 3.43’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.42. F30 formüle ait başlangıç ve 6.ay antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları

Zon çapları	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Etkinlik (%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Etkinlik (%)	<i>Escherichia coli</i>	Etkinlik (%)
İnhibisyon zonu (mm) Standart	35	100	44	100	30	100
İnhibisyon zonu F30 başlangıç(mm)	23	65,71	38	86,36	28	93,33
İnhibisyon zonu F30 6.ay (mm)	30	85,71	40	90,91	30	100

Çizelge 3.43. F30 kodlu nanopartikül ve NMK1 kodlu nanokompozit mikropartikül formülasyonlara ait antimikrobiyal etkinlik testi sonuçları

Zon çapları	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Etkinlik (%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Etkinlik (%)	<i>Escherichia coli</i>	Etkinlik (%)
İnhibisyon zonu (mm) Standart	35	100	44	100	30	100
İnhibisyon zonu nanopartikül (F30) (mm)	23	65,71	38	86,36	28	93,33
İnhibisyon zonu (NMK1) (mm)	23	65,71	30	68,18	28	93,33

NMK: Nanokompozit mikropartikül

4. TARTIŞMA

4.1. Etkin Maddenin Özellikleri Üzerine İncelemeler

Çalışmamızda etkin madde olarak bir çok akciğer enfeksiyonunda etkinliği kanıtlanmış, florokinolon türevi bir antibiyotik olan siprofloksasin hidroklorür kullanılmıştır. İntraselüler enfeksiyonların tedavisi, makrofaj içerisindeki ilaç konsantrasyonuna bağlıdır. Akciğer enfeksiyonlarının tedavisindeki en büyük güçlük ilacın etkinliği değil, terapötik miktarlarında oluşan yan etkilerdir. Kolloidal bir taşıyıcı içindeki antibiyotiklerin intraselüler hedeflendirmeye olanak sağladığı ve böylece retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından alındıkları gözlenmiştir. Bu nedenle bir çok antibiyotiğin lipozom ve polimerik nanopartiküller ile çalışmaları yapılmıştır (Fawaz ve ark., 1998; Arnold ve ark., 2007).

Etkin maddenin özelliklerinin belirlenebilmesi için UV spektrumları, FTIR spektrumu, DSC termogramı saptanmış ve literatür verileri ile uyumlu oldukları görülmüştür (Sahoo ve ark., 2012; Gummadi ve ark., 2012; Dillen ve ark., 2004).

FTIR analizi sonucu elde edilen spektrum Şekil 3.1.b'de görülmektedir. 3500-3450 cm^{-1} (-OH grubu), 1750-1700 cm^{-1} (C=O grubu), 1650-1600 cm^{-1} (C=N grubu), 1050-1000 (C-F grubu) cm^{-1} 'lerde görülen pikler siprofloksasin hidroklorüre ait fonksiyonel grup pikleridir (Sahoo ve ark., 2012). Çalışmamızda elde ettiğimiz siprofloksasin hidroklorüre ait FTIR spektrumunda literatür ile uyumlu olarak 1700 cm^{-1} civarında karbonil (C=O) piki, 1624 cm^{-1} civarı C=N grubu, 1045 cm^{-1} civarı C-F grubu görülmektedir.

UV analizleri sonucunda etkin maddenin özelliklerinin saptanacağı ve formüllerden etkin madde çıkışı incelemeleri için kullanılan %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu ve miktar tayininin saptanabilmesi için kullanılan distile su ortamı içinde

270 nm olarak saptanan λ max değerinin literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Gummadi ve ark., 2012). Dalga boyu saptandıktan sonra etkin maddenin bu ortamlarda elde edilen kalibrasyon doğrularına ait r^2 değerlerinin 1'e yakın ve standart hata değerlerinin düşük olması, okunan absorbanslardan bulunan konsantrasyon değerlerinin güvenilir sonuçlar olacağını göstermiştir.

UV analizi ile elde edilen değerler kullanılarak oluşturulan kalibrasyon doğrularının validasyonu da yapılmıştır. Uygulanan yöntemin validasyon çalışmasının yapılması amacıyla doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik) teşhis sınırı, tayin sınırı, doğrusallık ve seçicilik parametreleri incelenmiştir. Analitik yöntemin validasyonuna ilişkin olarak incelenen parametrelerden, doğrusallık ve aralığı deneyi sonucunda her bir ortam için elde edilen doğrulara ait r^2 değerlerinin yüksek, regresyondan sapmanın standart hatasının düşük oluşu, elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir (Çizelge 3.2).

Bölüm 2.2.1.5.2'de anlatıldığı şekilde incelenen analitik yöntemin doğruluğuna ilişkin sonuçlar Çizelge 3.3 ve 3.4'de verilmiştir. Etkin maddenin % 0,05 a/h Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu ve distile sudaki hesaplanan BSS değerlerinin % 2'den küçük olması yöntemin doğruluğunu kanıtlamıştır.

Çizelge 3.5-3.8'de kesinlik tayini için hesaplanan ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik bulguları yer almaktadır. Bu veriler de % bağıl standart sapmanın %2'den az olması şartına göre yorumlanmış ve iki ortam için de bu şart sağlanmıştır.

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yöntemi için belirlenen teşhis ve tayin sınırları (Çizelge 3.9-3.10) doğrusallık aralığını oluşturan alt sınırın aşağısında yer almaktadır.

Siprofloksasin hidroklorür'ün distile su ve %0,05 Tween 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponundaki miktar tayini yönteminin bu madde için seçiciliğini belirlemek için, etkin madde içermeyen boş nanopartiküllerin bu ortamlardaki spektrumları alınmıştır

(Şekil 3.9 ve Şekil 3.10). Boş nanopartiküllerin bu ortamlarda absorbandsının olmaması kullanılan miktar tayini yönteminin etkin madde için seçici olduğunu göstermiştir.

Siprofloksasin hidroklorür'ün DSC termogramında (Şekil 3.2.b) 142 °C'de görülen endotermik pik maddenin erime noktasını ifade etmekte olup, bu değer literatür bulgularıyla örtüşmektedir. (Dillen ve ark., 2004)

4.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. Nanopartikül Üretim Yönteminin Seçilmesi ve Yönteme Ait Teknolojik Parametrelerin Geliştirilmesi

Nanopartikül formülasyon çalışmalarına başlanmadan önce, Bölüm 1.5.2.'de açıklanan nanopartikül üretim yöntemleri incelenip, bütün koşullar göz önünde bulundurularak en uygun yöntemin saptanmasına çalışılmıştır. Yöntemin seçimi etkin maddenin özellikleri, polimer ve bitmiş ürün kullanımına göre değişiklik göstermektedir. Üretilcek nanopartiküllerin pulmoner yolla uygulanacağı dikkate alınarak belirli bir partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin elde edilebilmesi için, kaynaklarda uygun üretim yöntemi araştırılmıştır. Nanopartiküllerin üretimi için Jeong ve arkadaşlarının 2008'de yapmış olduğu çalışma esas alınarak çoklu emülsiyon-çözücü buharlaştırma metodu seçilmiştir. Bu metod katı polimerik nanopartiküllerin üretilmesinde en çok kullanılan metottur (Hans ve Lowman, 2002). Laboratuvar ölçeğindeki üretimler için bu yöntem oldukça uygundur (Soppimath ve ark., 2001).

Ön formülasyon çalışmaları göz önüne alınarak etkin maddenin çözündüğü iç su fazının 0,5 ml %1 (a/h) PVA çözeltisi olmasına, polimerin çözündüğü organik faz hacminin ise 10 ml olmasına karar verilmiştir. Çizelge 2.1'den de görüleceği gibi diğer oranlarda emülsiyon oluşmamıştır.

Üretim sırasında homojenizatör ya da sonikatör kullanılması planlanmış, ön formülasyon çalışmalarında belirlenen formül her iki cihaz ile de üretilmiştir (Çizelge 2.2) Çizelge 3.11’de görüldüğü üzere homojenizatör ile üretilen formülde nano büyüklükte partiküller elde edilememiştir. Sonikatör ile üretilen formülasyonlarda ise nanometre boyutlarına sahip ($250,93 \pm 15,25$ nm) partiküller elde edilebildiği için üretime bu cihazla devam edilmesine karar verilmiştir.

İç sulu fazda stabilizer olarak kullanılacak madde seçimi için denemeler yapılmıştır (Çizelge 2.3). PVA ile emülsiyon oluşumu sağlandığı için, iç sulu faz stabilizeri olarak PVA kullanılması uygun görülmüştür.

Formülasyonlara primer emülsiyon stabilitesini artırmak için PEG 4000 eklenmiştir (Çizelge 2.4). PEG 4000 ile daha küçük partikül büyüklüğüne ulaşıldığı için üretime PEG 4000 ile devam edilmiştir (Çizelge 3.12).

Dış fazda kullanılan PVA oranını belirlemek için PVA’nın çeşitli konsantrasyonları ile denemeler yapılmıştır (Çizelge 2.5). %5 a/h konsantrasyonda dış sulu faz viskozitesinin yüksek olmasına bağlı olarak sonikatörün gücünün etkin bir sonikasyon için yetersiz olması nedeniyle emülsiyon oluşumu sağlanamamıştır. Dış faz olarak %1 ve %2 a/h PVA’nın sulu çözeltisi ile hazırlanan formülasyonlarda PVA’nın stabilizer etkisine bağlı olarak daha küçük nanopartiküller elde edilmiştir. Çizelge 3.13’ten de görüleceği gibi %2 a/h PVA konsantrasyonu ile daha küçük partikül büyüklüğüne ulaşılmıştır. Bu nedenle %2 a/h PVA konsantrasyonu ile üretime devam edilmiştir.

Dış fazda farklı molekül ağırlığına sahip PVA’lar kullanılarak denemeler yapılmıştır (Çizelge 2.6). 30000-70000 Da molekül ağırlığına sahip PVA kullanılarak üretilen formülde partikül büyüklüğü yüksek olduğundan üretime molekül ağırlığı 14000 olan PVA ile devam edilmiştir (Çizelge 3.14).

Üretim sırasında liyofilizasyon işlemi yapılacağından donma koruyucusu (kriyoprotektan) seçimi için, kriyoprotektan olarak kullanılan çeşitli maddeler denenmiştir (Çizelge 2.7). Partikül büyüklüklerinin mikron boyutunda ölçülmesi nedeni ile kriyoprotektan kullanılmamasına karar verilmiştir (Çizelge 3.15).

Üretimler sırasında sonikatör gücü %80, 9 siklus ve süresi 10 dakika olarak ayarlanmıştır. Santrifüj hızı 13500 rpm’de önce 40 dakika daha sonra 30 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu parametreler sabit tutulmuştur.

Deneysel çalışmaların devamında hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon etkinliklerinin düşük çıkması nedeni ile, kaybın daha az yaşanması için siprofloksasin hidroklorür’ün formülasyona sulu bir faz olarak değil, doğrudan katı toz halinde eklenerek organik faz içerisinde disperse edilmesine karar verilmiştir. Bu aşamadan sonra üretim yöntemi K/Y/S tipi emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemine dönüşmüştür. S/Y/S ve K/Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemleri ile üretilen formülasyonlar enkapsülasyon etkinlikleri, üretim verimleri, partikül büyüklüğü, zeta potansiyelleri açısından değerlendirildiğinde K/Y/S emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yönteminin daha avantajlı olacağı düşünülerek bu yöntemle ile üretim yapılmaya devam edilmiştir.

Nanopartikül üretimi polimerizasyonun sağlandığı ortamın pH’ından önemli derecede etkilenmektedir. Genellikle 3,0’ün altındaki pH’larda agregasyon olduğu görülmüştür (Soppimath ve ark., 2001). Bu nedenle dış faz için pH seçimi sırasında 4,5, 7,4 ve 9 pH’ları seçilmiştir. Böylece hem asidik, hem nötral, hem de bazik ortamlardaki fizikokimyasal değişimlerin incelenmesi amaçlanmıştır. Çizelge 3.19 ve Çizelge 3.29’da görüldüğü gibi dış faz pH’sının değiştirilmesi nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğünde ve enkapsülasyon etkinliğinde büyük bir değişikliğe neden olmamıştır.

Bu yöntemle üretilmiş olan çalışmalarda en çok kullanılan polimerler PCL, PLGA, PLA'dır. Literatürde siprofloksasin hidroklorür ve PCL ile yapılan çalışmaların daha az olması dikkate alınarak bu polimer ile çalışılması uygun bulunmuştur; ancak polimer tipi ve miktarının nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliğini etkilemesinden dolayı bazı formüllerde (F19-F25) polimer olarak PCL'nin PLGA ve PLA polimerleri ile belirli oranlardaki karışımları kullanılmıştır (Kwon ve ark., 2001; Hans ve Lowman, 2002; Musyanovych ve ark., 2008).

Nanopartikülün oluşumu sırasında kullanılan organik çözücünün su ile karışabilirliği, polimeri çözme yeteneği önem taşımaktadır. Bu parametreye bağlı olarak organik çözücü direkt olarak partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliğine etki etmektedir (Devrim ve ark., 2011a; Patil ve ark. 2013). Bu nedenle DCM ve DCM'nin AC ve EA değişik oranlardaki karışımları organik çözücü olarak kullanılmıştır (F10, F11, F12).

Formülasyonda kullanılan sürfaktan seçimi ve miktarı emülsiyon damlacıklarının ve üretim sonunda oluşacak olan final katı partiküllerin stabilizasyonunun sağlanması için önemli rol oynamaktadır (Musyanovych ve ark., 2008). Bu nedenle formüle eklenen PEG 4000 miktarı değiştirilerek nanopartiküller üzerindeki etkisine bakılması amaçlanmıştır (F16, F17, F18).

Yapılan bazı çalışmalarda organik faza eklenen yağ asitleri tuzları, laurik asit, kaprilik asit, lesitin v.b. maddelerin enkapsülasyon etkinliğini artırdığı gözlenmiştir (Govender ve ark., 1999; Cheow ve Hadinoto, 2010). Bu nedenle bu çalışmada organik faza gliseriltripalmitat ve lesitin eklenerek bazı formüller üretilmiştir (F32-F36).

Çalışmamızda PCL nanopartiküllerinin akciğerlerdeki kalış süresini uzatmak ve böylece etkin maddenin etkinliğini artırmak amacıyla mukoadhezif özellik kazanmaları amaçlanmıştır. Mukoadhezif özellikteki partiküler sistemlerin hazırlanmasında en yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardan birisi, partikül

yüzeylerinin mukoadhezif polimerler ile kaplanmasıdır (Takeuchi ve ark., 2001; Devrim ve Bozkır, 2014). Çalışmamızda bu amaçla mukoadhezif polimerlerden çözünür özellikteki kitozan kullanılmıştır. Kitozanın tercih edilme nedenlerinin başında, biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve düşük toksisiteye sahip olması gelmektedir. Kitozan iyi film oluşturma özelliği nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde kaplama materyali olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

4.2.2. Nanopartiküllerde Yapılan Kontroller

Nanopartiküllerdeki 4 temel önemli özellik partikül boyutu, enkapsülasyon etkinliği, zeta potansiyeli ve etkin madde çıkış özellikleridir (Hans ve Lowman, 2002). Bu nedenle kontroller sırasında bu 4 önemli özelliğin üzerinde durulmuştur.

4.2.2.1. Etkin Madde-Polimer Etkileşimi

4.2.2.1.1. FTIR Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan hazırlama yönteminin etkin madde üzerine etkisini belirlemek amacıyla FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Etkin madde ve nanopartikül formülasyonuna ait FTIR spektrumları (Şekil 3.1.b ve Şekil 3.12) karşılaştırıldığında etkin maddenin 1700 cm^{-1} civarında görülen karbonil ($\text{C}=\text{O}$) piki, 1624 cm^{-1} civarı görülen $\text{C}=\text{N}$ grubu piki ve 1045 cm^{-1} civarı görülen C-F grubu pikleri nanopartikül formülasyonunda sırasıyla 1726 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} ve 1049 cm^{-1} civarlarında görülmektedir. Buradan yola çıkarak hazırlama yönteminin etkin maddenin yapısını etkilemediğini söylemek mümkündür.

4.2.2.1.2. DSC Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Etkin madde ve polimer etkileşimini incelemek amacıyla ayrıca yapılan DSC analizi sonuçları Bölüm 2.2.4.2.'de anlatılan şartlar altında yapılan çalışmalarla elde edilmiştir.

Öncelikle, etkin madde 143°C'de keskin bir endotermik bir pik vermiştir (Şekil 3.2.b). PCL termogramında 65°C'de Tg değeri görülmekte ve polimer kristal bir yapı sergilemektedir (Şekil 3.13).

Nanopartikül formülasyonu termogramında ise etkin maddenin piki görülmemektedir (Şekil 3.14). Bu durum etkin maddenin amorf yapıya dönüştüğü ve polimer matriks içinde hapsediği şeklinde yorumlanabilir (Elkheshen ve ark. 2013; Przybyslawska ve ark. 2013). Polimerin Tg değeri ise 55°C'ye kaymıştır. Bu durumun nedeni üretim işlemi sırasında polimerin DCM'de çözülmesi ve bu çözücünün de hızlı bir karıştırma ile uçurulması olarak düşünülmektedir (Türk ve ark., 2009).

4.2.2.2. Partikül Büyüklüğü ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.4.3'de belirtildiği şekilde partikül büyüklükleri Malvern Zeta Sizer cihazı ile saptanmıştır.

Etkin maddenin direkt olarak organik faza eklenmesi ile partikül büyüklüğünde azalma görülmüştür ($200,98 \pm 1,45$). Etkin maddenin %1 a/h PVA'da çözülüp organik faza bu şekilde eklenmesi ile Çizelge 3.16'dan da görüleceği üzere daha büyük partiküller elde edilmiştir.

Organik faza eklenen farklı siprofloksasin hidroklorür miktarları partikül büyüklüğünde önemli bir fark yaratmamıştır (Çizelge 3.17). Bunun nedeninin bu parametrenin genelde enkapsülasyon etkinliğine yönelik bir parametre olmasından

kaynaklandığı düşünülmüştür. Devrim ve Bozkır'ın yaptıkları çalışmada (Devrim ve Bozkır, 2013) benzer şekilde iç faza eklenen etkin madde miktarı mikropartiküllerin büyüklüklerinde önemli bir değişime neden olmamıştır.

Partikül büyüklüğüne etkisini incelemek amacı ile dış su fazına F5 kodlu formülde %0,5 a/h PVA ve F6 kodlu formülde ise 0,4 ml DCM ilavesi yapılmıştır. Çizelge 3.18'den görülebilecek sonuçlara göre dış su fazında herhangi bir ilave olmayan F3 kodlu formül ile bu formüller karşılaştırıldığında partikül büyüklüğünde önemli bir değişim yaşanmadığı görülmektedir.

Govender ve arkadaşlarının 1999'da yapmış oldukları çalışmada üretim sırasında dış sulu faz olarak değişik pH'a sahip sulu fazlar kullanılmış ve bu parametrenin partikül büyüklüğünü etkilediğini gözlemlemişlerdir. Çalışmamızda dış sulu faz olarak farklı tamponlar kullanılarak üretilmiş olan F7, F8 ve F9 kodlu formüllerin partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında dış su fazında pH 7,4 fosfat tamponu içeren F8 kodlu formülde partikül büyüklüğünün daha küçük olduğu, dış su fazlarında pH 4,5 ve pH 9,0 tamponlarını içeren sırasıyla F7 ve F9 formüllerinde ise önemli bir farklılık olmadığı görülmektedir (Çizelge 3.19). Ayrıca bu formüller dış su fazında herhangi bir tampon kullanılmamış olan F3 kodlu formül ile karşılaştırıldığında partikül büyüklüğünde küçük bir değişiklik gözlenmiştir. Bu durumda dış su faz pH'sının partikül büyüklüğü üzerinde çok önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Bu sonuç Przybyslawska ve arkadaşlarının 2013'te yapmış olduğu çalışma ile uyumludur.

Palamoor ve Jablonski'nin yapmış olduğu çalışmada (2014) nanopartikül üretimi sırasında kullanılan organik çözücünün partikül büyüklüğünü etkilediği gözlenmiştir. Belli bir oranda su ile karışabilen etil asetat, tamamen su ile karışabilen aseton ve su ile karışmayan DCM gibi organik çözücülerle ve bu çözücülerin birbirleriyle belli oranlardaki karışımlarıyla hazırladıkları nanopartiküllerde partikül büyüklüğünün önemli derecede etkilendiğini görmüşlerdir. Çizelge 3.20'den görüleceği gibi 1:1 oranında aseton:DCM karışımı ile hazırlanan F10 kodlu formül, sadece DCM ve DCM:etil asetat (1:1) karışımı ile hazırlanan nanopartiküllere göre daha küçük

partikül boyutuna ulaşmıştır. Bu durum çözücülerin difüzyon prosesine, çözücü ve polimerin birbirleriyle olan etkileşimine, su ile karışabilirliklerine bağlı olarak açıklanmıştır. Organik faz olarak suyla karışabilen ve karışmayan çözücülerin belli oranlarda kullanıldığı F10 ve F11 kodlu formüllerde, suyla karışabilen çözücünün spontan difüzyonundan dolayı bir ara yüzey türbülansı oluşmasını sağladığı ve bu durumun daha küçük partiküllerin oluşmasına neden olduğu düşünülmüştür. Organik çözücünün sudaki çözünürlüğünün düşük olması daha stabil bir emülsiyon oluşmasını sağlarken partikül boyutunun büyümesine neden olmaktadır (Patil ve ark. 2013). DCM su ile karışmamaktadır. Bu durum sadece DCM ile hazırlanan F3 kodlu formülün partikül büyüklüğünün DCM:AC ve DCM:EA karışımlarını içeren formüllere göre fazla olmasını açıklamaktadır.

Polimerin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu nanopartikülün partikül büyüklüğü ile yakından ilgilidir. Kwon ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2001) polimer konsantrasyonu fazlaştıkça partikül büyüklüğü artmıştır. Çizelge 3.21'e bakıldığında en yüksek konsantrasyonda PCL içeren F15 kodlu formül en yüksek partikül büyüklüğüne sahiptir ($263,68 \pm 2,25$ nm). Yüksek konsantrasyondaki polimer viskoziteyi artırmakta ve oluşan emülsiyon damlacıklarının daha küçük damlacıklara parçalanması zorlaşmaktadır. Bu sırada daha büyük partiküller meydana gelmektedir. Polimer-polimer etkileşimi ve organik fazın viskozitesinin artması ile sulu faza etkili bir şekilde çözeltinin difüze olmasını önleyerek partikülerde büyüme görüleceği belirtilmiştir (Palamoor ve Jablonski, 2014).

Formülasyonda kullanılan sürfaktan seçimi ve miktarı emülsiyon damlacıklarının ve üretim sonunda oluşacak olan final katı partiküllerin stabilizasyonunun sağlanması için önemli rol oynamaktadır (Musyanovych ve ark., 2008). Formülasyonda kullanılan sürfaktan miktarı arttıkça genellikle partikül büyüklüğü azalmaktadır (Blanco ve Alonso, 1997). Çizelge 3.22'ye bakıldığında F14, F16, F17 ve F18 kodlu formüllerin partikül büyüklükleri organik faza eklenen PEG 4000 miktarının artması ile partikül büyüklüğünde artış ve azalışlar görülmüştür. Stabilizör miktarı fazla olduğunda etkin madde ve stabilizör arasındaki etkileşim azalabilmektedir; miktarı

düşük olduğunda ise agregasyon oluşmakta ve büyük partiküller meydana gelmektedir. Bu nedenle stabilizör miktarı partikül büyüklüğünü kontrol edebilmek amacı ile belirli limitler arasında olmalıdır (Hans ve Lowman, 2002). Bu nedenle araştırmamızda bulduğumuz 212,47 nm partikül büyüklüğüne sahip olan F14 kodlu formüldeki PEG 4000 miktarının optimum olduğu düşünülebilir.

Kullanılan farklı polimer karışımları ve kullanılan polimerlerin molekül ağırlıkları nanopartikülün partikül büyüklüğünü etkileyebilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı polimerler ile daha düşük partikül büyüklüğüne sahip partiküller elde edilir. Partikül büyüklükleri polimerlerin molekül ağırlıklarına göre değişim göstermektedir. F19 ve F20 kodlu formüller karşılaştırıldığında PCL'nun daha düşük molekül ağırlığına sahip olan tipinin kullanıldığı F20 kodlu formülde partikül büyüklüğü daha düşüktür (Çizelge 3.24). Polimer olarak 50:50 laktik asit:glikolik asit oranına sahip PLGA:PCL (1:1) kullanılan F21 ve F23 kodlu formüllerin her birinde farklı molekül ağırlıklarına sahip PLGA'lar kullanılmıştır. Bu formüllerde partikül büyüklükleri arasında farklılık yoktur (Çizelge 3.23). 75:25 laktik asit:glikolik asit oranına sahip PLGA:PCL (1:1) kullanılarak üretilen F22 kodlu formülde ise çok küçük bir miktar partikül büyüklüğü artmıştır (Çizelge 3.24). Elde edilen bu sonuçlar polimerin molekül ağırlığı düştükçe partikül büyüklüğünün azaldığını göstermektedir. Bu sonuçlar literatür verilerini desteklemektedir (Blanco ve Alonso, 1997).

Farklı polimer karışımlarını 1:1 oranında içeren F20, F21, F24 ve F25 kodlu formüllerden en yüksek partikül büyüklüğüne sahip olanı, polimer olarak PCL:PLA karışımını içeren F24 kodlu formüldür ($274,10 \pm 22,66$ nm). Farklı polimerler ile üretilmiş formülasyonların arasındaki fark bu polimerlerin DCM ile oluşturdukları çözeltilerin viskozite farklarından kaynaklanmaktadır (Devrim ve ark., 2011a). Daha büyük partikül oluşum mekanizmasının, daha yüksek viskoziteli bir DCM çözeltisi oluşması ve karıştırma esnasında nano damlacıkların oluşumu basamağında yeterince küçülemeyen ağır damlacıkların daha büyük partiküller halinde katılaşması olduğu düşünülmüştür.

Dış faza eklenen kitozan partikül büyüklüğünü artırmaktadır (Vila ve ark., 2002). F28, F29 ve F30 formül kodlu partiküllerde sırası ile dış faza %0,5 a/h, %1,0 a/h ve %2 a/h kitozan ilave edilmiştir. Çizelge 3.25'ten de görüleceği gibi kitozan konsantrasyonu ile beraber partikül büyüklüğü belirgin ölçüde artmıştır (Devrim ve Bozkır, 2014a). Bu durumun kitozanın dış faz viskozitesini artırmasından dolayı olduğu düşünülmüştür. %4 a/h kitozanın eklenmiş olduğu F31 kodlu formülde ise dış fazın çok viskoz olmasından dolayı sonikatörün gücü emülsiyon oluşumu için yeterli olmamış ve emülsiyon oluşturulamamıştır.

Yapısında PCL'a ek olarak lesitin içeren F26 kodlu formül ile lesitin ve gliseril tripalmitat içeren F35 ve F36 kodlu formüllerden PCL'u 100 mg miktarında içeren F35 kodlu formülün partikül büyüklüğünde belirgin bir düşüş gerçekleşmiştir (Çizelge 3.26). Sadece PCL'u aynı miktarda içeren F3 kodlu formül ile karşılaştırıldığında ($228,77 \pm 2,81$ nm) partikül büyüklüğündeki düşüş göze çarpmaktadır. Bu durumun amfifilik özellikteki lesitin yüzey aktif madde gibi görev yaparak partikül büyüklüğünü küçülttüğü düşünülmüştür. Sürfaktanlar yüzey gerilimini düşererek daha küçük damlacıkların oluşumunu ve böylece de daha düşük boyutta partikül eldesini sağlarlar (Palamoor ve Jablonski, 2014).

Musyanovych ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (2008) sürfaktan olarak eklenen sodyum dodesil sülfat, PVA ile karşılaştırıldığında daha küçük partikül büyüklüğüne ulaşılmasını sağlamıştır. İç su fazında %1 PVA içeren F1 ve iç su fazında SDS içeren F37 kodlu formüller karşılaştırıldığında, F37 kodlu formülde partikül büyüklüğünde küçük bir azalış görülmektedir (Çizelge 3.16 ve Çizelge 3.26). Bu sonuç literatür bulgularıyla uyusmaktadır. Bu durum SDS'in anyonik yapısından kaynaklanıyor olabilir. SDS ile etkin madde arasında zayıf bir kompleks oluşmuştur.

4.2.2.3. AFM Görüntülerinin Değerlendirilmesi

AFM görüntüleri Bölüm 2.2.4.4.'de anlatılan şekilde elde edilmiştir.

Şekil 3.15-3.18'de görüldüğü üzere nano boyutta küresel partiküller oluşmuştur. Görüntülerde nanopartiküller kümelenmiş şekilde görülmektedir. Bu durumun örneğin görüntüleme için hazırlanan kolloidal süspansiyonunun kurumasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Dubes ve arkadaşlarının 2003'te yapmış olduğu çalışmada elde ettikleri görüntülerde de benzer kümelenmeler görülmüştür.

4.2.2.4. Enkapsülasyon Etkinliği Tayini Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Başarılı bir nanopartikül sistemi yüksek yükleme kapasitesine sahip olmalı ve böylece uygulama için gerekli olan miktarı düşürmelidir. Nanopartiküllere etkin madde yüklenmesi iki metot ile sağlanmaktadır. Birincisi nanopartikülün üretimi sırasında etkin maddenin katılımıdır; ikincisi ise nanopartikül oluşumundan sonra etkin madde çözeltisinde nanopartikülü inkübe ederek, etkin maddenin adsorbe ettirilmesidir. Bu iki metot birbiri ile karşılaştırıldığında birinci yöntem ile diğerine kıyasla, büyük miktarda etkin maddenin yüklenebildiği görülmüştür (Soppimath ve ark., 2001). Nanopartikül üretimi için seçmiş olduğumuz yöntem birinci metota uymaktadır.

Nanopartiküllerde enkapsülasyon etkinliği tayini Bölüm 2.2.4.6'da anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.27'den F1 ve F2 kodlu formüller karşılaştırıldığında etkin maddeyi sulu çözeltisi olarak katmak yerine, katı toz halinde katılması enkapsülasyon etkinliğinin küçük bir miktar arttığı görülmüştür. Bu nedenle formülasyonlara etkin madde bu

şekilde katılmıştır. Bu durumun, iç fazda sulu çözelti halinde bulunan etkin maddenin emülsifikasyon sırasında kolaylıkla dış faza difüze olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Nanopartikül üretiminde kullanılan etkin madde miktarının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini belirlemek amacıyla 5, 10 ve 20 mg olmak üzere üç farklı miktarda siprofloksasin hidroklorür kullanılarak nanopartikül formülasyonları (F2, F3 ve F4 kodlu formüller) hazırlanmış ve enkapsülasyon etkinliği değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.28). 5 mg'lık miktardan 10 mg'lık miktara çıkıldığında enkapsülasyon etkinliğinde artış görülmüş; ancak miktar artırılmaya devam edildiğinde (20 mg) artışın devam etmediği belirlenmiştir. Nanopartikülün içinde bulunan etkin madde miktarının artmasının dış ve iç faz arasındaki osmotik basıncı değiştirmesi ve bunun emülsiyon damlacıklarının oluşumu sırasında damlacıkların yapısına zarar vermesi sonucu etkin maddenin dış faza kaçışının kolaylaşması sonucu olduğu düşünülmüştür (Palamoor ve Jablonski, 2014). Govender ve arkadaşlarının 1999'da yapmış oldukları çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur.

F5 kodlu formülde, sekonder emülsiyon oluşturulduktan sonra 100 ml %0,5 a/h PVA içeren sulu çözelti içine eklenerek DCM'nin dış sulu faza ekstraksiyonu ile emülsiyon damlacıklarının daha kısa sürede katılaşması ve etkin maddenin iç fazda hapsolması amaçlanmıştır. Ancak enkapsülasyon etkinliğinde beklenen artış elde edilememiştir. Benzer şekilde F6 kodlu formülasyonda dış sulu faza eklenen 0,4 ml DCM'in enkapsülasyon etkinliğinde beklenen şekilde artışa neden olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.29).

Sulu fazların pH'sı yükleme kapasitesine etki edebilmektedir (Soppimath ve ark., 2001). Govender ve arkadaşlarının 1999'da yapmış oldukları çalışmada üretim sırasında değişik pH'a sahip sulu fazlar kullanılmış ve bu parametrenin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisine bakılmıştır. Çizelge 3.30.'daki sonuçlara bakıldığında dış fazda sulu faz olarak saf su yerine pH 4,5, pH 7,4 ve pH 9,0 tampon

çözeltilerinin kullanıldığı F7, F8 ve F9 kodlu formüllerde dış fazı pH 7,4 olan F8 kodlu formülün enkapsülasyon etkinliği daha düşük çıkmıştır (%1,31). Bu durumda siprofloksasin hidroklorürün pH 7,4 tamponunda daha çok çözündüğü ve bu nedenle etkin maddenin dış faza kaçtığı, bu nedenle de yükleme etkinliğinin bir miktar azalmış olduğu söylenebilir.

Cheow ve Hadinoto 2010'da yapmış oldukları çalışmada organik faz olarak DCM, aseton, etil asetat ve bunların farklı oranlarını kullanmışlardır ve DCM:AC ve DCM:EA karışımlarında enkapsülasyon etkinliğinin daha fazla olduğunu görmüşlerdir. Çizelge 3.31'den de görülecek sonuçlar bu literatür verisini destekler niteliktedir (F10, F11 ve F12). Bu durumun AC ve EA'ın DCM'a göre suyla karışabilirliğinin daha fazla olmasından dolayı olduğu düşünülmüştür.

Polimer konsantrasyonu ile enkapsülasyon etkinliği arasında doğru orantı bulunmaktadır. Genellikle polimer miktarı arttıkça partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği artar (Hans ve Lowman, 2002). Song ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (1997) bu orantıyı göstermişlerdir. Polimer miktarının artması ile enkapsülasyon etkinliği belli bir miktar artmıştır. Çalışmamızda organik çözücüdeki PCL konsantrasyonunun artması ile enkapsülasyon etkinliğinde görülen değişim Çizelge 3.32'de sunulmaktadır. 200 mg PCL içeren F14 kodlu formülde 100 mg PCL içeren F3 kodlu formüle göre küçük bir artış olmuş, bu sonuçtan yola çıkarak polimer miktarı daha da artırılmıştır (F15:300 mg); ancak enkapsülasyon etkinliğinde beklenildiği gibi bir artış olmamıştır (F14:%2,95 ve F15:%2,5). Bu nedenle F14 kodlu formülde kullanılan PCL miktarı ile üretime devam edilmiştir.

Kullanılan yüzey aktif madde ve stabilizörler yükleme kapasitesini etkilemektedir (Soppimath ve ark., 2001). F14, F16, F17 ve F18 formülasyonları karşılaştırıldığında en yüksek PEG 4000 miktarına sahip olan F18 kodlu formülün

enkapsülasyon etkinliğinin diğer formüllere göre yüksek olduğu açıkça görülmektedir (Çizelge 3.33).

Song ve arkadaşları 1997’de yapmış oldukları çalışmada yüksek molekül ağırlıklı polimer kullandıklarında enkapsülasyon etkinliğinin arttığını görmüşlerdir. Çalışmamızda ise düşük ve yüksek molekül ağırlıklı PCL’nun kullanıldığı F19 ve F14 kodlu formüllerin enkapsülasyon etkinleri arasında çok küçük bir fark olduğu ve daha düşük molekül ağırlıklı PCL içeren F14 kodlu formülün enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.35).

Niwa ve arkadaşları 1994’de yapmış oldukları çalışmada nanopartikül üretimi sırasında düşük molekül ağırlıklı ve yüksek molekül ağırlıklı polimer karışımı kullanmış ve polimer molekül ağırlığı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin arttığını bulmuşlardır. Çizelge 3.34’ deki enkapsülasyon etkinliği sonuçlarına bakıldığında 50:50 laktik asit:glikolik asit oranına sahip PLGA (MA. 24000-38000/50:50):PCL (1:1) polimer karışımını kullanılarak üretilmiş olan F23 ve PLGA (MA. 40000-75000/50:50):PCL (1:1) polimer karışımını kullanılarak üretilmiş olan F21 kodlu formüllerde enkapsülasyon etkinliğinin arttığı görülmektedir. Bu sonuç literatür verisini desteklemektedir. Enkapsülasyon etkinliğindeki bu artışın, PLGA’nın PCL ile karşılaştırıldığında lipofilitesinin daha düşük olması ve suda çözünen bir etkin madde olan siprofloksasin hidroklorürün polimerdeki çözünürlüğünün artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak F20, F22, F24, F25 kodlu yine polimer karışımları içeren formüllerde enkapsülasyon etkinliğinde bir artış görülmemiştir (Çizelge 3.35).

Song ve arkadaşları 1997’de yapmış oldukları çalışmada sulu fazın viskozitesi arttığında enkapsülasyon etkinliğinin arttığı sonucuna varmışlardır. Çizelge 3.36.’da elde edilen sonuçlar bu literatürü doğrulamaktadır. F29 kodlu formülde dış faza %1 a/h oranında suda çözünebilir kitozan eklenmiş ve dış sulu fazda kitozan içermeyen

F14 kodlu formül ile karşılaştırıldığında enkapsülasyon etkinliğinde önemli derecede artış olduğu görülmüştür. Dış fazda oluşan kitozan tabakasının etkin maddenin emülsiyon damlacıklarından difüzyonunu engellemesi nedeniyle etkili bir şekilde enkapsüle olmasını sağladığı düşünülmüştür. Dış fazdaki kitozan miktarının %1 a/h'den %2 a/h'e çıkarılması (F30) ise oranlarındaki farklılık enkapsülasyon etkinliğinde bir değişiklik oluşturmamıştır.

Enkapsülasyon etkinliğini artırmak için dış su fazına tuz eklenmesi yapılan modifikasyonlardan bir tanesidir (Cheow ve Hadinoto, 2010). F27 kodlu formülde dış sulu faza % 4 (a/h)'lik NaCl çözeltisi eklenerek, dış sulu fazda etkin maddenin çözünürlüğünün düşük olduğu bir ortam oluşturulması ve böylece enkapsülasyon sırasında etkin maddenin bu ortama partiyon ile geçmesi engellenip iç fazda kalması ve sonuçta daha fazla miktarda enkapsüle olması amaçlanmıştır. Ancak bu değişiklik enkapsülasyon etkinliğinde beklenildiği gibi bir değişiklik oluşturmamıştır (%1,40±0,04).

Yapılan bazı çalışmalarda organik faza yağ asitleri tuzları, laurik asit, kaprilik asit, lesitin v.b. maddeler eklendiğinde enkapsülasyon etkinliğinin arttığı gözlenmiştir (Govender ve ark., 1999; Cheow ve Hadinoto, 2010) . F26 kodlu formülde benzer şekilde organik faza polimer miktarının %10'u kadar lesitin ilave edilmiş ve enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. Lesitin enkapsülasyon etkinliğini artırdığı görülmüştür (Çizelge 3.37). Lesitin nanopartikül için fizikokimyasal bir bariyer oluşturmaktadır. Amfifilik özellikteki lesitin polimerin yüzeyi ile hidrofobik bir etkileşime girer, benzer bir etkileşim etkin madde ile lesitin arasında da oluşmaktadır ve bu durumun enkapsülasyon etkinliğinin artmasında etkili olduğu düşünülmüştür. Aynı durum gliseriltripalmitat ve lesitin organik faza eklenerek üretiminin yapıldığı F35 (%4,81) ve F36 (%4,76) kodlu formüller için de geçerlidir. Bu formüllerde de enkapsülasyon etkinliği artmıştır (Çizelge 3.37).

Anyonik bir sürfaktan olan sodyum dodesil sülfat (SDS) ile yapılan bazı çalışmalarda, SDS'in katyonik etkin maddeler ile suda çözünmeyen lipofilik özellikteki kompleksler oluşturarak enkapsülasyon etkinliğinin artırıldığı belirlenmiştir (Devrim ve Bozkır, 2014a). Bu nedenle denemiş olduğumuz F37 kodlu formülümüzde, siprofloksasin hidroklorür'ün sulu çözeltisine SDS eklenerek kompleks oluşturulmaya çalışılmıştır. Enkapsülasyon etkinliğinde beklenenin aksine önemli bir artış olmamasının, siprofloksasin hidroklorür ile SDS arasındaki etkileşimin zayıf olması nedeni ile etkili bir kompleks oluşumunun sağlanamamasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Çizelge 3.37).

4.2.2.5. Ürün Verimi Tayini Verilerinin Değerlendirilmesi

Hazırladığımız nanopartikül formülasyonlarında % 12,89 - 84,05 ürün verimi elde edilmiştir (Çizelge 3.38).

Kullanılan polimer olarak kullanılan PCL miktarının artırılması (F15) ürün veriminin belirgin şekilde artmasını sağlamıştır (% 84,05). Polimer olarak 1:1 PCL:Eudragit karışımını kullandığımız F25 kodlu formülasyonda da ürün veriminde bir miktar düşüş gözlenmiştir. Genellikle ürün verimi düşük olan formüllerde partikül büyüklükleri küçüktür. Bu küçük partiküllerin santrifüj ve yıkama işlemi sırasında fazla miktarda kayıba uğraması nedeni ile ürün veriminin düştüğü öngörülmüştür.

4.2.2.6. Zeta Potansiyel Ölçümü Verilerinin Değerlendirilmesi

Zeta potansiyeli kullanılan polimerin yapısına yada imalat işleminde kullanılan diğer sürfaktanlara bağlı olarak negatif veya pozitif olabilmektedir (Soppimath ve ark., 2001).

Hazırladığımız nanopartikül formülasyonlarında değişen formülasyon parametrelerine bağlı olarak zeta potansiyel değerlerinde farklılıklar gözlenmekle birlikte zeta potansiyel değerlerinin genel olarak negatif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.39). Negatif olan zeta potansiyel değerinin PCL'nun karboksil gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, PCL içeren nanopartiküllerinin mukoadhezif polimerler ile yüzey modifikasyonu zeta potansiyelinde değişime neden olmuştur (Yamamoto ve ark., 2005). F28, F29 ve F30 kodlu formülasyonlarda, nanopartiküllerin yüzeyini modifiye etmek için kullandığımız kitozanın nanopartiküllerin zeta potansiyel değerindeki etkisi incelendiğinde, aynı formülün yüzeyi kaplanmamış hali olan F14 kodlu nanopartiküllerin PCL'nun karboksil grupları nedeniyle negatif olan zeta potansiyel değerinin (-14,25 mV) kitozan ile kaplandığında pozitif değer aldığı görülmüştür. Zeta potansiyelleri kitozan miktarı arttıkça artış göstermiştir (%0,5 a/h: 12,2; %1 a/h: 56,3; %1 a/h: 62,00). Kitozanın pozitif yüklü amino grupları PCL'nun karboksil gruplarına bağlanmakta ve zeta potansiyelinin pozitif olmasını sağlamaktadır (Takeuchi ve ark., 2001). Biyoadhezif özellik, yüzeyi kitozanla kaplı nanopartiküllerin pozitif yüklü amino grupları ile müsin glikoproteinlerinin negatif yüklü grupları arasındaki elektrostatik etkileşmenin bir sonucu olarak gerçekleştiği için, pozitif zeta potansiyel değeri biyoadhezyonun oluşumunda etkili olmaktadır (Jaganathan ve Vyas, 2006; Bravo- Osuna ve ark., 2007). Kitozan kaplı pozitif yüklü nanopartiküllerin hücresel içine alımda kaplı olmayan nanopartiküllere göre daha başarılı olduğu bulunmuştur (Ma ve Mumper, 2013).

4.2.2.7. Çözünme Hızı Verilerinin Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerden etkin madde çıkışı başarılı bir formülasyon için önemli parametrelerden bir tanesidir. Nanopartiküllerde in vitro salım çalışmaları diyaliz membran difüzyon tekniği, difüzyon hücre, ters diyaliz, ultrasantrifüj gibi çeşitli metotlar ile yapılabilmektedir. Salım çalışmaları sırasında nanopartikülün salım ortamından ayrılması ile ilgili zorluklar nedeniyle zaman kazanmak amacıyla diyaliz membran yöntemi çalışma için seçilmiştir. Bu yöntemde bir diyaliz membrana

nanopartikül süspansiyonu eklenir ve bu membranlar çözünme ortamında inkübe edilir (Soppimath ve ark., 2001).

Przybyslawska ve arkadaşlarının 2013'te siprofloksasin içeren partiküllerle yapmış oldukları çalışmada ilk 4 saat ilk çıkış etkisinin olduğu ve etkin madde çıkışının 72 saate kadar devam ettiği verisine ulaşmışlardır. İlk çıkış etkisi, kontrollü salım sağlayan mikro ve nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesinde en büyük problemlerden bir tanesidir (Hasan ve ark. 2007). Yapmış olduğumuz çıkış deneylerine ait grafiklere bakıldığında (Şekil 3.19-3.27) F30, F29, F23, F26 kodlu formüllerde ilk 4 saatteki ilk çıkış etkisi görülebilmektedir. Fresta ve arkadaşları (1998) yapmış oldukları çalışmada ilk çıkış etkisinin yüksek olduğu nanopartiküllerde bu etkinin etkin maddenin nanopartikül yüzeyine adsorbe olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu formüllerde ilk 4 saatteki hızlı çıkıştan sonra 24 saat boyunca izlenmiştir. 10. saatten sonra salım görülmemiştir.

F21 ve F22 kodlu formüllerde salım daha yavaş olup 24 saat sonunda etkin maddenin ancak F21 için %50'si, F22 için ise %44'ü açığa çıkmış bulunmaktadır (Şekil 3.20 ve Şekil 3.21). Polimer karışımı ile hazırlanan nanopartiküller tek bir polimer ile hazırlanan nanopartiküllere göre daha yavaş salım yapmaktadırlar. Bu durumun, polimerlerin molekül ağırlıklarına bağlı olarak daha yoğun matris yapısı oluşturmalarının bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Hasan ve ark. 2007). Saravanan ve arkadaşlarının 2003'te yapmış oldukları çalışmada polimer karışımı kullanmış oldukları formülde, tek polimer kullandıkları formüle göre daha az ilk çıkış etkisi görülmüş ve salımı 24 saatten daha uzun sürmüştür. 21 ve 22 kodlu formüllerimizde 24 saatte etkin maddenin yaklaşık %50'si açığa çıkmıştır.

50:50 PLGA:PCL (1:1) içeren formüllerden molekül ağırlığı daha düşük PLGA (MA 24000-38000 Da) ile üretimi yapılmış olan F23 kodlu formül, MA:40000-75000 Da olan PLGA içeren F21 kodlu formül ile karşılaştırıldığında etkin madde salımı F23

kodlu formülden daha hızlı olmuştur (Şekil 3.28). F23 kodlu formülde molekül ağırlığı düşük olan PLGA kullanılması ve bu nedenle viskozitenin düşmesinin bir sonucu olarak çıkışın hızlandığı düşünülmektedir. 50:50 laktik asit:glisolik asit oranına sahip PLGA içeren F21 ve 75:25 laktik asit:glisolik asit oranına sahip PLGA içeren F22 kodlu formüllerdeki salım ve ilk çıkış etkisi ise daha yavaş olmuştur (Şekil 3.20 ve Şekil 3.22).

Bouissou ve arkadaşlarının 2006'da yapmış olduğu çalışmada sürfaktan kullanımı ile ilk çıkış etkisinde azalma görülmüştür. 40 mg PEG 4000'inin kullanıldığı F18 kodlu formülde bu veri ile uyumluluk sağlamaktadır (Şekil 3.19). Bu durumun PEG 4000'inin partikülün porozitesini azaltması ve böylece etkin maddenin difüzyonunu önlediği düşünülmüştür.

Dış su fazında kitozan bulunan nanopartiküllerde F28 kodlu formül yüklemesinin düşük olması, buna bağlı olarak da çıkış profilinin düzgün olmaması nedeni ile elenmiştir. Diğer formüllerde (F29 ve F30) kitozan miktarının artması ilk çıkış etkisini bir miktar azaltmıştır. Ayrıca kitozan miktarı arttıkça etkin madde salımında da azalma yaşanmıştır. Kitozan partikül üzerinde bir ağ tabakası oluşturur ve etkin maddenin suya difüze olmasını ve çıkışını sınırlandırır (Budhian ve ark., 2008). Bu nedenle kitozan miktarının artmasıyla orantılı olarak çıkış daha da azalmıştır (Şekil 3.29).

F35 kodlu formülde PCL ile kullanılan gliseriltripalmitat ve lesitin çıkışı azaltmıştır. Polimerin yanında kullanılan bu lipidlerin tabaka oluşturarak etkin maddenin çıkışını geciktirdiği düşünülmüştür (Chan ve ark., 2009; Shenoy ve ark., 2009).

4.2.3. Nanokompozit Mikropartiküller İçin Uygun Nanopartikül Formülasyonlarının Seçimi

Hazırlanan tüm formüllerin partikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği ve in vitro salım özellikleri birlikte değerlendirildiğinde kitozan içeren F29 ve F30 kodlu formülasyonların özellikleri uygun bulunmuştur. Bu formülasyonlardan F30 kodlu formül nanokompozit mikropartikül hazırlanmak üzere kullanılmıştır. Nanokompozit formülasyon bileşimi Çizelge 2.10'da verilmektedir.

4.3. Nanokompozit Mikropartiküllerin Aerodinamik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda partikül büyüklükleri ve yüksek enkapsülasyon etkinlikleri göz önünde bulundurularak seçilen nanopartikül formülasyonlarının (F29 ve F30) inhalasyon sistemlerinin, diğer inhalasyon sistemlerine göre avantajları ve etkin maddemizin stabilitesi göz önünde bulundurularak KTİ sistemi şeklinde tasarlanmasına karar verilmiştir.

Kuru toz nanopartiküller yüksek yüzey enerjilerinden dolayı agregasyona meyillidirler ve bu durum aerosolize olamayan toz oluşumu ile sonuçlanır. Aerodinamik çapı 50 nm altındaki partiküller akciğerlerde tutulmadan solunum ile atılırlar. Nanopartiküllerin akciğerlerde etkili bir dağılımının sağlanması için inhale olabilecek mikro boyuttaki toz agregatları hazırlanmaktadır (Cheow ve Hadinoto, 2010). İnhalasyon formüllerinde, nanopartiküller ile birlikte kullanılan kaba taşıyıcılar inhalasyon tozlarının akış özelliklerini düzelterek doz doğruluğunu artırmaktadır (Matilainen ve ark., 2006). Çalışmamızda mannitolün ortalama partikül büyüklüğü 50 µm olan ve Pearlitol 50 C ticari adı ile bilinen tipi kullanılmıştır.

İnhale edilen partiküllerin aerodinamik çap ve dansiteleri akciğerlerde başarılı bir şekilde tutulmalarında önemli rol oynamaktadır (Devrim ve ark., 2011b). Genellikle KOAÇ 10 µm'den yüksek olan partiküller orofarinkste, 5-10 µm arasında olanlar

merkezi solunum yollarında ve 0,5-5 μm arasında olanlar küçük hava yollarında ve alveollerde birikirler. Bu nedenle lokal solunum yolu hastalıklarının tedavisi için en iyisi 0,5-5 μm arasında KOAÇ değeri olanları kullanmaktır (Tena ve Clara, 2012).

Seçtiğimiz nanopartikül formülasyonunun pulmoner veriliş için uygun kritere sahip olup olmadığının belirlenmesi için geometrik çap ve sıkıştırılmış dansite değerlerinden hareketle KOAÇt değeri belirlenmiştir. Nanokompozit mikropartikül üretimi için kullanmış olduğumuz F30 kodlu formülün KOAÇt'si hesaplandığında çok küçük bir değer bulunduğundan, optimum KOAÇ değerine ulaşmak amacı ile nanokompozit mikropartikül üretilmesi kararlaştırılmıştır. Partikül büyüklüğü olarak Bölüm 3.2.2.'de verilen veriler geometrik ortalama çaptır. Sıkıştırılmış dansite partiküllerin inhalatörden akabilme özellikleri, poroziteleri, büyüklük dağılımları, gerçek dansiteleri ve partiküllerarası kohezif ve adhezif güçler hakkında önemli bilgiler vermektedir (Devrim ve ark., 2011b). Çizelge 3.40'da nanokompozit mikropartiküllerin sıkıştırılmış dansite değerleri yer almaktadır. KOAÇ, partiküllerin respiratuar bölgedeki tutulumu ve dağılımını belirleyen önemli bir parametredir. KOAÇ teorik olarak Bölüm 2.2.4.12'de belirtilen şekilde geometrik ortalama çap ve Çizelge 3.40'da bulunan sıkıştırılmış dansite değerlerinden hareketle hesaplanmıştır (NMK1: 0,81 μm ve NMK2: 0,57 μm). Bulunan KOAÇt değerlerinin 5 μm 'den küçük olmasının, partiküllerin respiratuar bölgede etkili tutulumu için uygun olduğu düşünülmektedir.

4.4. Nanokompozit Mikropartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.4.13'te anlatılan şekilde nanokompozit mikropartikül formülasyonlarının şekil ve yüzey özellikleri incelenmiştir. Şekil 3.36'dan görülebileceği gibi Pearlitol 50C partikülleri çok daha büyük ve düzensiz şekle sahip iken nanopartiküller ile liyofilizasyonu sonucunda küçük ve küresele yakın partiküller elde edilmiştir (Şekil 3.37 ve Şekil 3.38). Bu görüntülere dayanarak başarılı bir şekilde mikropartiküle geçiş yapıldığını söyleyebiliriz.

4.5. Antimikrobiyal Aktivite Testi Değerlendirmesi

Antimikrobiyal etkinlik çalışması Bölüm 2.2.4.14’de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu çalışma için F30 kodlu nanopartikül ve NMK1 kodlu nanokompozit mikropartiküller kullanılmıştır. Ayrıca F30 kodlu nanopartikül formülasyonun başlangıç aktivitesi ve 6.aydaki aktivitesi mukayese edilmiştir. Bu formülasyonların süspande halleri referans olarak siprofloksasin hidroklorür çözeltisi kullanılarak karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 3.42 ve Çizelge 3.43 ‘de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bütün formülasyonların akciğerde enfeksiyona neden olan bakterilerden olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli*’ye karşı etkin olduğu görülmüştür.

F30 kodlu nanopartikül formülasyonu ve bu formülasyonun nanokompozit mikropartikül hali olan NMK1 kodlu formülasyonların aktivitelerine bakıldığında aktivitelerinin siprofloksasin hidroklorür’den düşük olduğu; ancak hem nanopartikül hem mikropartikül ile elde edilen aktivitelerin birbirlerine benzer olduğu bulunmuştur. Moazeni ve arkadaşlarının 2010’da yapmış olduğu benzer bir çalışmada siprofloksasin hidroklorür içeren partiküler sistemin, referans siprofloksasin’e göre etkinliği daha düşük bulunmuştur. Nanopartikülün aktivitesinin siprofloksasin hidroklorür’den düşük görülmesinin nedeni, nanopartiküler sistem içerisinde etkin maddenin hapsolması ve bu formülasyondan 24 saatte etkin maddenin yaklaşık %70’inin salınması olarak düşünülmüştür. Salımın devam edeceğini düşünürsek, antimikrobiyal aktive testinin süresi uzatıldığında zon çapının büyümeye devam edebileceğini söyleyebilmekteyiz. Bu sonuç partiküler sistemi başarı ile elde ettiğimizi göstermektedir.

F30 kodlu nanopartikül formülasyonun başlangıç ve 6.aydaki antimikrobiyal aktivitesi karşılaştırılmıştır. Elde edilen zon çapları incelendiğinde hem başlangıç hem de 6.aydaki aktivitenin siprofloksasin hidroklorür’den düşük olduğu, 25°C’de desikatörde 6 ay muhafaza edilmiş olan nanopartiküllerin aktivitesinin, başlangıç aktivitesinden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.42). 6.ayda görülen bu

artışın nanopartiküllerin yapılarında oluşan bir gevşeklikten dolayı olabileceği düşünülmüştür. Yine de sonuçların siprofloksasin hidroklorür referansından daha düşük olması, nanopartiküllerin 6 ay sonra bile yapısının hala korunduğunu, sistemin etkin maddeyi içinde tuttuğunu göstermektedir. Nanopartiküllerin üretiminin üzerinden 6 ay geçmiş olmasına rağmen salım gerçekleşmektedir ve etkin madde etkindir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında çeşitli solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanan bir antibiyotik olan Siprofloksasin hidroklorür'ün, pulmoner yolla uygulanan nanopartiküler sistemlerini içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Araştırmamızda biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler (polikaprolakton, polilaktik asit ve polilaktik-ko-glikolik asit gibi) kullanılarak Siprofloksasin hidroklorür'ün nano-boyuttaki formülasyonlarını içeren mikropartiküler sistemleri hazırlanarak, akciğerde alveolar bölgeye kadar partiküllerin geçişinin sağlanması ve kanda yeterli tedavi konsantrasyonlarına ulaşılması düşünülmüştür.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında önde gelen işlem ve formülasyon parametrelerinin nanopartiküllerin özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü lazer kırınımı yöntemi ile belirlenmiş ve değişen formülasyon parametrelerine bağlı olarak partikül büyüklüğünün değiştiği gözlenmiştir.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinlikleri değerlendirildiğinde, en yüksek enkapsülasyon etkinliği değerlerinin F18, F21, F22, F23, F26, F28, F29 ve F30 kodlu formülasyonlar ile elde edildiği belirlenmiştir. Bu formülasyonlar içinde ise en yüksek enkapsülasyon etkinliği F30 kodlu formülasyon ile elde edilmiştir.

Ürün verimi tayini sonuçlarına bakıldığında, oldukça yüksek ürün verimi değerleri elde edilebilmiştir.

Yapılan zeta potansiyel ölçümleri sonucunda nanopartiküllerin yüzeyinin mukoadhezif polimerler ile modifiye edilmesinin zeta potansiyel değerlerinde

değişime neden olduğu, yüzeyi modifiye edilmeyen nanopartiküllerde negatif olan zeta potansiyel değerinin kitozan ile kaplanan nanopartiküllerde (F29 ve F30) pozitif değer aldığı gözlenmiştir.

Yapılan çözünme hızı deneyi sonuçlarından ilk 4 saatte hızlı bir çıkış olduğu, daha sonra yavaşladığı ve 24 saat boyunca salımın olduğu gözlenmiştir.

Hazırlanan nanopartiküllerin inhalasyon için uygun hale getirilmesi amacı ile partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinlikleri göz önünde bulundurularak seçilen F30 kodlu formül, nanokompozit mikropartikül haline getirilmiştir. Formülasyonun bu sisteme çevrilmesindeki amaç; aglomere toz halinde bulunan nanopartikül formülasyonun akış özelliklerinin iyileştirilerek KTİ farmasötik formu için uygun hale getirilmesidir. İn hale edilecek olan nanokompozit mikropartiküller akciğerdeki sıvı ortamda nanopartiküllere ayrılacak ve etkilerini bu şekilde göstereceklerdir. Bu nedenle nanokompozit mikropartikül formülasyonunda akış özelliklerine yönelik çalışmalar yapılmış, elde edilen verilerden KOAÇt değeri belirlenmiştir.

Geometrik ortalama çap ve sıkıştırılmış dansite değerlerinden hareketle hesaplanan KOAÇt değerlerinin 5 µm'den küçük olmasının, partiküllerin respiratuar bölgede etkili tutulumu için uygun olduğu düşünülmektedir.

Nanokompozit mikropartiküllerde yapılan morfolojik incelemeler sonucunda, nanopartiküllerin Pearlitol 50C ile belirli oranlarda liyofilizasyonu sonucunda küresele yakın partiküller elde edilebildiği görülmüştür. Bununla birlikte, çalışmanın devamında püskürterek kurutma yöntemi gibi farklı yöntemler kullanılarak daha küresel partiküllerin elde edilip edilemeyeceğinin değerlendirilmesi düşünülmektedir.

Yapılan antimikrobiyal aktivite çalışmalarında nanopartikül ve nanokompozit mikropartiküllerin akciğerde enfeksiyonlara neden olan bakterilere karşı etkin olduğu görülmüştür. Ayrıca nanopartiküllerin başlangıç ve 6.ay aktiviteleri karşılaştırıldığında, etkinliğin hala var olduğu bulunmuştur. Bu durum nanopartiküller

sistemin stabilitesinin korunduğunu, stabilitesi düşük olan bir etki madde olan siprofloksasinin stabilitesinin partiküler sistem içerisinde korunabileceğini düşündürmüştür.

Bu sonuçlardan yola çıkarak NMK1 ve NMK2 formülasyonlarının geliştirilebileceği öngörülmüştür.

ÖZET

Pulmoner yol ile uygulanacak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri içeren kuru toz inhalasyon formülasyonlarının geliştirilmesi ve değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı çeşitli solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanan bir antibiyotik olan Siprofloksasin hidroklorür'ün, pulmoner yolla uygulanan nanopartiküler sistemlerini içeren kuru toz inhaler formülasyonlarının geliştirilmesidir.

Pulmoner yol ile ilaç verilmesi, diğer uygulama yolları ile karşılaştırıldığında, absorpsiyon için geniş yüzey alanı, hızlı absorpsiyona izin veren ince alveoler epitel, ilk geçiş eliminasyonunun olmaması, etkinin hızlı başlaması ve yüksek biyoyararlanım elde edilmesi, lokal olarak uygulanan etkin maddelerin akciğerlerde etki göstererek etkinliklerinin düzeltilmesi ve istenmeyen sistemik yan etkilerin azaltılmasının sağlanması nedeniyle birçok avantaja sahiptir. Çeşitli akciğer hastalıklarının tedavisinde inhalasyon yolu ile direkt olarak akciğerlere uygulanan terapötiklerin yararını destekleyen bulgular günden güne artmaktadır. Bu çalışmada çeşitli solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden biri olan siprofloksasin hidroklorür'ün pulmoner yol ile uygulanan nanopartiküler sistemlerini içeren kuru toz inhaler formülasyonlar geliştirilmesi amaçlanmıştır. Pulmoner yol ile uygulamanın avantajları göz önüne alınarak, etkin maddenin kuru toz inhaler bir formülü geliştirilmiştir.

Nanopartiküller çoklu emülsiyon metodu ile üretilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında polimer olarak biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu olmaları nedeniyle poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polikaprolakton (PCL) polimerleri kullanılmıştır.

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında organik çözücü tipi, dış fazda kullanılan sulu ortamın tipi; organik faza eklenen yardımcı maddeler, polimer tipi, karışım oranları ve miktarı; etkin madde miktarı ve nanopartiküllerin yüzey özelliklerini modifiye etmek için kullanılan mukoadhezif polimer miktarının nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve dağılımı, enkapsülasyon etkinlikleri, ürün verimi, zeta potansiyel değerleri, etkin madde salım profilleri üzerine etkisi incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda F29 ve F30'un optimum formüller olduğuna karar verilmiştir.

Optimum olarak seçilen formüllerden F30 ile, mannitol kullanılarak kompozit mikropartiküle geçiş yapılmıştır ve aerodinamik özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Kuru toz inhalasyon formüllerinde mannitolün kullanılması partikül agregasyonunu önleyerek aerodinamik özelliklerinin iyileşmesini sağlamıştır.

Nanopartiküller ve nanokompozit mikropartiküller üzerinde antimikrobiyal aktivite testleri yapılmış ve enfeksiyonlara neden olan patojenlere karşı partiküllerimizin aktif olduğu bulunmuştur. Ayrıca nanopartiküllerin başlangıçtaki ve 6.aydaki antimikrobiyal aktivitesi incelendiğinde, partiküler sistemin yapısının hala korunduğu görülmüştür.

Sonuçlarımız siprofloksasin hidroklorür içeren, inhalasyon için uygun özelliklere sahip kompozit nanopartiküllerin elde edildiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kuru toz inhaler, nanokompozit mikropartikül, nanopartikül, siprofloksasin hidroklorür.

SUMMARY

Evaluation and development of dry powder inhaler formulations that comprising nanoparticular drug delivery systems for administration by pulmonary route.

In this study we aim to develop dry powder inhaler which contains ciprofloxacin hydrochloride, an antibiotic that is used the treatment of various lung diseases nanoparticular system.

Compared to pulmoner administration and the others, pulmonary route has many advantages such as large surface area for absorption, thin alveolar epithelium to allow speed absorption, the lack of first pass elimination, rapid start of effect, high bioavailability, fixing effect of active substance which is applicated local, reduction of unwanted systemic side-effects. In the treatment of various lung diseases directly to the lungs by inhalation of therapeutic benefits of supporting the findings are increasing from day to day. There isn't any inhaler pharmaceutical form of ciprofloxacin hydrochloride that we plan to use in this study. On the market tablet form of ciprofloxacin hydrochloride is used. Because of advantages of applying pulmonary route, we aim to develop dry powder inhaler of this active substance.

Multiple emulsion method will be used during production of nanoparticles. The nanoparticles that we produce will be use making composite microparticles. Poly(lactic-co glycolic acid) (PLGA) and poly- ϵ -caprolactone (PCL) polymers were used in nanoparticle formulations due to their biodegradable and biocompatible properties.

The effects of type of the organic solvent, polymer type and ratios, quantity of active substance, type of aqueous solution which is used as external phase, excipients added to organic phase and type of the mucoadhesive polymer used to modify surface properties, on particle size, encapsulation efficiencies, production yield, zeta potentials, drug release profiles and aerodynamic properties of nanoparticles were investigated. According to results of these tests, F29 and F30 were thought as optimal formulations.

Composite microparticles were prepared by using mannitol and one of these formulations F30 and aerodynamic prooporties were investigated. Usage of Pearlitol 50 C with microparticles in dry powder inhalations was beneficial on aerodynamic properties by preventing particle aggregation.

Antibacterial activity test was made with our nanoparticles and nanocomposite microparticles. This study indicates that ciprofloxacin retained its antimicrobial efficacy when incorporated in the particular system. Also considering nanoparticles 0 and 6th month activities, we found that the particular system is still stabile.

Our results showed that composite nanoparticles with appropriate properties for inhalation were prepared which contain ciprofloxacin hydrochloride.

Keywords: Ciprofloxacin hydrochloride, dry powder inhaler, nanocomposite microparticle, nanoparticle.

KAYNAKLAR

AI J., BIAZAR E., JAFARPOUR M., MONTAZERI M., MAJDI A., AMINIFARD S., ZAFARI M., AKBARI H.R., RAD H.G. (2011). Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International Journal of Nanomedicine*, (6): 1117–1127.

AKBARI B., PIRHADI TAVANDASHTI M., ZANDRAHIMI M. (2011). Particle size characterization of nanoparticles – a practical approach. *Iranian Journal of Materials Science & Engineering*, 8 (2): 48-56.

ANDERSON, J.M. AND SHIVE, M.S. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 28: 5–24.

ARNOLD M.M, GORMAN E.M., SCHIEBER L.J., MUNSON E.J., BERKLAND C. (2007). NanoCipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles. *Journal of Controlled Release*, 121: 100–109.

BAILEY M.M., BERKLAND C.J. (2009). Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Med. Res. Rev.*, 29: 196–212.

BANERJEE R. (2007). Nanoparticles for Respiratory Drug Delivery. *Nanoparticles for Pharmaceutical Applications*. Ed. Domb A.J., Tabata Y., Ravi Kumar M.N.V., Farber S., American Scientific Publishers. Chapter:19.

BASARAN B., BOZKIR A. (2012). Thermosensitive and pH Induced In Situ Ophthalmic Gelling System For Ciprofloxacin Hydrochloride: Hydroxypropyl-B-Cyclodextrin Complex. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 69(6) : 1137-1147.

BİLENSOY E. (2014). Nanopartiküller. *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*. Ed. A.Z. Gürsoy, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını. Bölüm 2. s:23-35.

BINNING G., QUATE C.F., GERBER C. (1986). Atomic force microscope. *Phys Rev Lett*, 56:930-934.

BLANCO M.D., ALONSO M.J. (1997). Development and characterization of protein loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43:287-294.

BOWEN, P. (2002). Particle Size Distribution Measurement from Millimeters to Nanometers and from Rods to Platelets. *J. Disper. Sci. Tech*, 23: 5-631.

BOUISSOU C., ROUSE J.J., PRICE R., VAN DER WALLE C.F., (2006). The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release. *Pharm. Res.* 23: 1295–1305.

BRAVO-OSUNA, I., VAUTHIER, C., FARABOLLINI, A., PALMIERI, G. F., PONCHEL, G. (2007). Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials*, 28: 2233-2243.

BUDHIAN A, SIEGEL SJ, WINEY KI. (2008). Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*, **346(1-2)**:151-9.

CAMPEN LV, VENTHOYE G. Inhalation, dry powder. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Ed. J Swarbrick, JC Boyian, Vol II, Marcel Dekker Inc., New York, 2002, s.1529-1544.

CHAN J.M., ZHANG L., YUET K.P., LIAO G., RHEE J.W., LANGER R., FAROKHZAD O.C. (2009). PLGA-*lecithin*-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*, **30**: 1627-1634.

CHEN X., YOUNG T.J., SARKARI M., WILLIAMS R.O., JOHNSTON K.P. (2002) Preparation of cyclosporine a nanoparticles by evaporative precipitation into aqueous solution. *Int. J. Pharm.*, **242**: 3-14.

CHEN H., KHEMTONG C., YANG X., CHANG X., GAO J. (2011). Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discovery Today*, **16(7/8)**: 354-360.

CHEOW W.S. , HADINOTO K. (2010). Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **370**: 79-86.

CHOW A.H.L., TONG H.H.Y., CHATTOPADHYAY P., SHEKUNOV B.Y. (2007). Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharm. Res.*, **24**: 411-437.

CLARKES ANALYSIS OF DRUGS AND POISONS 4th Edition. (2011). Ed. A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop. Pharmaceutical Press, s:1111-1112.

COURRIER H.M., BUTZ N., VANDAMME T.F. (2002). Pulmonary drug delivery systems: recent developments and prospects. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **19**:425-498.

ÇELEBİ N. (2009). Kolloidler. *Modern Farmasötik Teknoloji*, Ed. Acartürk F., Ağabeyoğlu İ., Çelebi N., Değim T., Değim Z., Doğanay T., Takka S., Tırnaksız F., Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, 2.Baskı. Bölüm:14. S:263-275.

DALVI S.V., DAVE R.N. (2009). Controlling particle size of a poorly water-soluble drug using ultrasound and stabilizers in antisolvent precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **48**: 7581-7593.

DANIHER D.I., ZHU J. (2008). Dry powder platform for pulmonary drug delivery. *Particuology* **6**: 225-238.

DATE A.A., PATRAVALE V.B. (2004). Current strategies for engineering drug nanoparticles, Curr. Opin. *Colloid Interface Sci.*, **9**: 222-235.

DEVİRİM, B., BOZKIR, A., CANEFE K. (2011a). Preparation and Evaluation of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microparticles as a Carrier for Pulmonary Delivery of Recombinant Human Interleukin-2: I.Effects of Some Formulation Parameters on Microparticle Characteristics. *Journal of Microencapsulation*, **28(6)**: 582-594.

DEVİRİM, B., BOZKIR, A., CANEFE K. (2011b). Preparation and Evaluation of Poly(lactic-co-glycolic acid) Microparticles as a Carrier for Pulmonary Delivery of Recombinant Human Interleukin-2: II. In Vitro Studies on Aerodynamic Properties of Dry Powder Inhaler Formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **37(11)**: 1376-1386.

DEVİRİM, B., BOZKIR, A. (2013). Preparation and evaluation of double-walled microparticles prepared with a modified water-in-oil-in-oil-in-water (w1/o/o/w3) method. *Journal of Microencapsulation*, **30(8)**:741-754.

DEVİRİM, B., BOZKIR, A. (2014a). Preparation and In Vitro Evaluation of Surface-Modified Poly (lactide-co-glycolide) Microparticles as Biodegradable Drug Carriers for Pulmonary Peptide and Protein Delivery. *Journal of Microencapsulation*, DOI:10.3109/02652048.2013.858791.

DEVİRİM, B., BOZKIR, A. (2014b). Preparation and characterization of protein-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles with polycaprolactone as polymeric core material. *Journal of Biomolecular Research and Therapeutics*, in press.

DICKINSON P.A., HOWELLS S.W., KELLAWAY I.W. (2001). Novel nanoparticles for pulmonary drug administration., *J. Drug Target.*, **9**: 295–302.

DILLEN K., VANDERVOORT J., VAN DEN MOOTER G., VERHEYDEN L., LUDWIG A. (2004). Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **275**:171-187.

DUBES A., PARROT-LOPEZ H., ABDELWAHED W., DEGOBERT G., FESSI H., SHAHGALDIAN P., COLEMAN A.W. (2003). Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **55**: 279–282.

ELKHESHEN S.A., MOBARAK D.H., SALAH S., ESSAM T. (2013). Formulation of Ciprofloxacin Hydrochloride Loaded Biodegradable Nanoparticles: Optimization of The Formulation Variables. *Journal of Pharmaceutical Research and Opinion*, **3(11)**: 72 - 81.

ENGSTROM J., LAI E., LUDHER B., CHEN B., MILNER T., WILLIAMS R., KITTO G., JOHNSTON K. (2008) Formation of stable submicron protein particles by thin film freezing. *Pharm. Res.* **25**: 1334–1346.

ERYOL C., ÖNER L. (2005). Çözünme Profili Karşılaştırma Yöntemleri. *TÜFTAD Haberler*, **12(1)**: 3-11.

EP 6.0. (2008). Druckerei C. H. Beckpress, Nördlingen, Germany.

FAWAZ F., BONINI F., MAUGEIN J., LAGUENY A.M. (1998). Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: pharmacokinetics and in vitro antimicrobial activity. *Int. Journal of Pharmaceutics*, **168**: 255-259.

FRESTA M., PUGLISI G., GIAMMONA G., CAVALLARO G., MICALI N., FURNERI P.M. (1995). Pefloxacin mesilate- and ofloxacin loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles; characterization of the colloidal drug carrier formulation. *J. Pharm. Sci.*, **84**: 895–901.

GAO L., ZHANG D., CHEN M. (2008). Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J.Nanopart. Res.*, **10**: 845-862.

GEISER, M., KREYLING, W.G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **7**:2-17.

GELPERİNA, S., KİSİCH K., ISEMAN M.D., HEİFETS L. (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **172**: 1487–1490.

GOVENDER T., STOLNIK S., GARNETT M.C., ILLUM L., DAVIS S.S. (1999). PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, **57**:171-185.

GUMMADI S., THOTA D., VARRI S.V., VADDİ P., JILLELLA V. (2012). Development and validation of UV spectroscopic methods for simultaneous estimation of ciprofloxacin and tinidazole in tablet formulation. *International Current Pharmaceutical Journal* **1(10)**: 317-321.

GUPTA R., HINDLE M., BYRON P.R., COX K.A., MCRAE D.D. (2003). Investigation of a novel condensation aerosol generator: solute and solvent effects. *Aerosol Sci. Technol.*, **37**: 672–681.

GÜLSÜN T., GÜRSOY N.R., ÖNER L. (2009). Nanocrystal Technology for Oral Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs. *Fabad J. Pharm. Sci.*, **34**: 55-65.

GÜRSOY A.Z. (2002). Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler. *Kontrollü Salım Sistemleri*, Ed.: A. Z. Gürsoy, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını No:1, Bölüm:2.

HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS 6TH EDITION. (2009) American Pharmaceutical Association 2215 Constitution Avenue NW, Washington, DC 20037-2985, USA.

HANS M.L., LOWMAN A.M., (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **6**: 319–327.

HASAN A. S., SOCHA M., LAMPRECHT A., EL GHAZOUANI F., SAPIN A., HOFFMAN M., MAİNCENT P., UBRİCH N. (2007). Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *International Journal of Pharmaceutics* **344**: 53–61.

HINDS, W.C. (1999). Respiratory Deposition. In: *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles (2nd ed)*, Wiley Interscience Publication John Wiley and Sons Inc.. Chapter:11.

HOO M.C., STAROSTIN N., WEST P., MECARTNEY M.L. (2008). A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*, **10 (1)**: 89-96.

HOUCHIN, M.L., TOPP, E.M. (2009). Physical properties of PLGA films during polymer degradation. *J. Appl. Polym. Sci.*, **114**: 2848–2854.

<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01072942>

<http://www.malvern.com>

ICH Guidelines for Stability and Analytical Validation. Q1A(R2) ve Q2(R1), 2011.

IRACHE J.M., , ESPARZA I., GAMAZO C., AGÜEROS M., ESPUELAS S. (2011). Nanomedicine: Novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary Parasitology*, **180**: 47– 71.

İSKİT A.B. (2008). Jenerik İlaç Nedir?. VI.Ulusal Epilepsi Kongresi - Konuşmacı Sunumları, K-12. *Epilepsi 2008*; **14(1)**: 17-51.

JACOBS C., MULLER R.H. (2002). Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm. Res.*, **19**: 189–194.

JAGANATHAN, K. S., VYAS, S. P. (2006). Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant Hepatitis B antigen administered intranasally. *Vaccine*, **24**: 4201-4211.

JAMES J., CREAN B., DAVIES M., TOON R., JINKS P., ROBERTS C.J. (2008). The surface characterisation and comparison of two potential sub-micron, sugar bulking excipients for use in low-dose, suspension formulations in metered dose inhalers. *Int. J. Pharm.*, **361**: 209–221.

JEONG Y.-I., NA H.S., SEO D.-H., KIM D.-G., LEE H.C., JANG M.K., NA, S.K., ROH S.H., KIM S., NAH J.W. (2008). Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, **352**: 317–323.

KAWASHIMA Y., YORK P. (2008). Drug delivery applications of supercritical fluid technology. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**: 297–298.

KAUR G., NARANG R. K., RATH G., GOYAL A.K. (2012). Advances in Pulmonary Delivery of Nanoparticles. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, **40**: 75–96.

KECK C.M., MULLER R.H. (2006). Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **62**: 3–16.

KECK C., MULLER R., KOBIEKSKI S. (2008). Second Generation of Drug Nanocrystals For Delivery of Poorly Soluble Drugs: Smartcrystals Technology. *Dosis*, **24 (2)**: 124-128.

KESİSOĞLOU F., PANMAI S., WU Y. (2007) Nanosizing – Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**: 631–644.

KREUTER, J. (2007). Nanoparticles-a historical perspective. *Int. J. Pharm.*, **331**: 1–10.

KWON H.Y., LEE J.Y., CHOI S.W., JANG Y., KIM J.H. (2001). Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **182**: 123–130.

LABIRIS N.R., DOLOVICH M.B. (2003). Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **56**: 600–612.

LABIRIS N. RENEE, BOSCO ANDREW P., DOLOVICH MYRNA B. (2006). Aerosols as Drug Carriers. *Nanoparticles as Drug carriers* Ed.: Torchilin V.P., Chapter 17: s.367-396.

LEARY J.F. (2011). The Importance of Zeta Potential for Drug/Gene Delivery in Nanomedicine. Malvern Instruments Workshop. USA.

LOURENCO RV, COTROMANES E. (1982). Clinical aerosols. I. Characterization of aerosols and their diagnostic uses. *Arch Intern Med.* **142(12)**: 2163–72.

MA P., MUMPER R.J. (2013). Paclitaxel nano-delivery systems: A Comprehensive Review. *J Nanomed Nanotechnol*, **4(2)**: 1-16.

MAKADIA H.K., SIEGEL S.J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, **3**: 1377-1397.

MANSOUR H.M., RHEE Y.S., WU X. (2009). Nanomedicine in pulmonary delivery. *Int. J. Nanomedicine*, **4**: 299–319.

MARTINDALE, The Complete Drug Reference (2009). Ed: Sean C. Sweetman, Vol: 1, 35th Edition, Pharmaceutical Press, London. s: 243.

MATILAINEN, L., JÄRVINEN, K., TOROPAINEN, T., NÄSI, E., AURIOLA, S., JÄRVINEN, T., JARHO, P. (2006). In vitro evaluation of the effect of cyclodextrin complexation on pulmonary deposition of a peptide, cyclosporine A. *Int. J. Pharm.* **318**: 41-48.

MOAZENI E., GILANI K., SOTOUDEGAN F., PARDAKHTY A., NAJAFABADI A.R., GHALANDARI R., FAZELI M.R., JAMALIFAR H. (2010). Formulation and in vitro evaluation of ciprofloxacin containing niosomes for pulmonary delivery. *Journal of Microencapsulation*, **27(7)**: 618-627.

MOSÉN K, BÁCKSTROM K, THALBERG K. (2004). Particle formation and capture during spray drying of inhalable particles. *Pharm Dev Technol.*, **9**:409–418.

MULLER R.H., JACOBS C., KAYSER O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**: 3–19.

MUSYANOVYCH A., SCHMITZ-WIENKE J., MAILANDER V., WALTHER P., LANDFESTER K. (2008). Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions. *Macromol. Biosci*, **8**: 127–139.

NEWMAN SP, BUSSE WW, (2002). Evaluation of dry powder inhaler design, formulation, and performance. *Respiratory Medicine*, **96**: 293-304.

NIWA T., TAKEUCHI H., HINO T., KUNOU N., KAWASHIMA Y. (1994). In vitro drug release behavior of D,L,Lactide/glycolide copolymer nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method. *J Pharm Sci.*, **83(5)**: 727-32.

OLSSON, B., BONDESSON, E., BORGSTROM, L. (2011). Pulmonary drug metabolism, clearance, and absorption. *Controlled Pulmonary Drug Delivery.* , 1st ed. Eds: Smyth, H.D.C., Hickey, A.J. Springer, New York, NY. S:21-50.

PALAMOOR M., JABLONSKI M.M. (2014). Comparative study on diffusion and evaporation emulsion methods used to load hydrophilic drugs in poly(ortho ester) nanoparticle emulsions. *Powder Technology*, **253**: 53–62.

PANDEY, R. AND KHULLER, G.K. (2005). Antitubercular inhaled therapy: opportunities, progress and challenges. *J. Antimicrob. Chemother*, **55**: 430–435.

PARK, S.H., KWON, J.H., LIM, S.H., PARK, H.W., KIM, C.W. (2007). Characterization of human insulin microcrystals and their absorption enhancement by protease inhibitors in rat lungs. *Int. J. Pharm.*, **339**, 205–212.

PASQUALI I., BETTINI R., GIORDANO F. (2008). Supercritical fluid technologies: an innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**: 399–410.

PATEL A.R., VAVIA P.R. (2007). Nanotechnology and pharmaceutical inhalation aerosols. *Indian Journal of Experimental Biology*, **45**: 166–174.

PATIL A.S., DESHAPANDE T.D., JOSHI P.M., GADAT A.P. (2013). Influence of organic solvents on nanoparticles loaded with gatifloxacin. *Universal Journal of Pharmacy*, **02 (02)**: 95–101.

PATTON, J.S., BYRON, P.R. (2007). Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**: 67–74.

PHILLIPS G., JOHNSON B.E., FERGUSON J. (1990). The loss of antibiotic activity of ciprofloxacin by photodegradation. *J Antimicrob Chemother.*, **26(6)**:783–9.

PHYSICIANS' DESK REFERENCE (PDR) (2003). Edition 57, Thomson PDR, Montvale. s:875–885.

PRZYBYSLAWSKA M., AMELIAN A., WINNICKA K. (2013). Preparation of ciprofloxacin-encapsulated poly-ε-caprolactone microcapsules by the solvent evaporation technique. *e-Polymers*, **30**:1–11.

SAHOO S., CHAHARBORTI C.K., BEHERA P.K. (2012). Spectroscopic Investigations of A Ciprofloxacin / HPMC Mucoadhesive Suspension. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, **4(3)**: 1–8.

SARAVANAN M., BHASKAR K., SRINIVASA RAO G., DHANARAJU M.D. (2003). Ibuprofen-loaded ethylcellulose/polystyrene microspheres: an approach to get prolonged drug release with reduced burst effect and low ethylcellulose content. *J. Microencapsul.* **20**:289–302.

SCENIHR/002/05. (2006). Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. European Commission Health & Consumer Protection Directorate General Directorate C - Public Health and Risk Assessment C7 - Risk Assessment. **Erişim:** http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_003b.pdf. **Erişim tarihi:** 26.08.2014.

SCHEUCH G., KOHLHAEUFL M.J., BRAND P., SIEKMEIER R. (2006). Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **58**: 996–1008.

SHEGOKAR R., MULLER R. (2010). Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly-soluble actives. *International Journal of Pharmaceutics.*, **399**:129-139.

SHOYELE A.S., SLOWEY A. (2006). Prospects of formulating proteins/peptides as aerosols for pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.*, **314**: 1-8.

SHENOY V.S., RAJYAGURU T.H., GUDE R.P., MURTHY R.S.R. (2009). Studies on paclitaxel-loaded glyceryl monostearate nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, **26(6)**: 471–478.

SIEGEL, S.J.; KAHN, J.B.; METZGER, K.; WINEY, K.I.; WERNER, K.; DAN, N. (2006). Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **64**: 287–293.

SMITH, IJ, BILLINGS, MP. (2003). The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market. *Pulm.Pharmacol.Ther.*, **16**: 79-95.

SONG C.X., LABHASETWAR V., MURPHY H., QU X., HUMPHREY W.R., SHEBUSKI R.J., LEVY R.J. (1997). Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **43**: 197–212.

SOPPIMATH K. S. , AMINABHAVIA T. M., KULKARNIA A. R., RUDZINSKI W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, **70**: 1–20.

STONE, K.C., MERCER R.R, GEHR P., STOCKSTIB., CRAPO J.D. (1992). Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **6**: 235–243.

SUNG J.C., PULLIAM B.L., EDWARDS D.A. (2007). Nanoparticles for drug delivery to the lungs. *TRENDS in Biotechnology*, **25 (12)**: 563-570.

TAYLOR G., KELLEWAY I. (2001). Pulmonary Drug Delivery. *Drug Delivery and Targeting for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists*. Ed. Hillery A.M., Lloyd A.W., Swarbrick J., Taylor & Francis. Chapter: 10.

TAKEUCHI H., YAMAMOTO H., KAWASHIMA Y. (2001). Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **47**: 39–54.

TAKKA S. (2009). Aerosoller. *Modern Farmasötik Teknoloji*, Ed. Acartürk F., Ağabeyoğlu İ., Çelebi N., Değim T., Değim Z., Doğanay T., Takka S., Tırnaksız F., Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, 2.Baskı. Bölüm:17. s:318-335.

TAKKA S., ACARTÜRK F., AĞABEYOĞLU İ., ÇELEBİ N., DEĞİM T., DEĞİM Z. (2009). Önformülasyon. *Modern Farmasötik Teknoloji*, Ed. Acartürk F., Ağabeyoğlu İ., Çelebi N., Değim T., Değim Z., Doğanay T., Takka S., Tırnaksız F., Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, 2.Baskı. Bölüm:9. s:119-140.

TENA A.F., CLARA P.C. (2012). Deposition of Inhaled Particles in the Lungs. *Arch Bronconeumol.*, **48(7)**: 240–246.

THE UNITED STATE OF PHARMACOPEIA-NATIONAL FORMULARY (USP 30-NF 25) (2007). The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.

TINKE, A. P., GOVOREANU R., VANHOUTTE K. (2006). "Particle Size and Shape Characterization of Nano- and Submicron Liquid Dispersions. *American Pharmaceutical Review*, **9**: 33-37.

TODOROFF, J., VANBEVER, R. (2011). Fate of nanomedicines in the lungs. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **16**: 246–254.

TOMAR P., JAİN N., DIXIT V.K. (2012). Nanoparticulate delivery of LHRH analogue for the treatment of prostate cancer. *Pharmaceutical Development and Technology*, **Early Online**: 1–8.

TÜRK C.T., HASÇİÇEK C., GÖNÜL N. (2009). Evaluation Of Drug-Polymer Interaction in Polymeric Microspheres Containing Diltiazem Hydrochloride. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **95(3)**: 865–869.

UNGARO, F., D'ANGELO, I., MIRO, A., LA ROTONDA, M.I., QUAGLIA, F. (2012). Engineered PLGA nano- and micro-carriers for pulmonary delivery: challenges and promises. *J.Pharm. Pharmacol.*, **64**: 1217–1235.

ÜSTÜNEŞ, L., (2014). Rx Media Pharma.

VAN EERDENBRUGH B., VAN DEN MOOTER G., AUGUSTIJNS P. (2008). Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int. J. Pharm.*, **364**: 64–75.

VILA A., SANCHEZ A., TOBIO M., CALVO P., ALONSO M.J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Control Release*, **78**:15–24.

WANG Y., WATTS A. B., PETERS J.I., WILLIAMS R.O. (2014). The impact of pulmonary diseases on the fate of inhaled medicines—A review. *International Journal of Pharmaceutics*, **461**: 112– 128.

WEERS J.G., TARARA T.E., CLARK A.R. (2007). Design of fine particles for pulmonary drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **4**: 297–313.

WEIBEL, E.R., (1963). Organization of the Human Lung. *Morphometry of the Human Lung*. Academic Press, New York. Chapter:2.

WEIBEL, E.R. (1973). Morphological basis of alveolar-capillary gas exchange. *Physiol. Rev.*, **53**: 419–495.

WEIBEL, E.R. AND GOMEZ, D.M. (1962). Architecture of the human lung: Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science*, **137**: 577–585.

WEST, J.B. (2007). Normal Physiology: Exercise. *Pulmonary Physiology and Path-ophysiology: An Integrated, Case-Based Approach*, 2nd ed. Wolters KluwerHealth/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. Chapter:1.

YAMAMOTO, H., KUNO, Y., SUGIMOTO, S., TAKEUCHI, H., KAWASHIMA, Y. (2005). Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the tight junctions. *J. Control. Release*, **102**: 373-381.

YANG Y.Y., CHUNG, T.S., NG, N.P. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, **22**: 231–241.

YANG H.-J., CHU G.-W., ZHANG J.-W., SHEN Z.-G., CHEN J.-F. (2005). Micromixing efficiency in a rotating packed bed: experiments and simulation. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**: 7730–7737.

YANG W., PETERS, J.I., WILLIAMS III R.O. (2008). Inhaled nanoparticles—a current review. *Int. J. Pharm.*, **356**: 239–247.

YEO L.Y., FRIEND J.R., MCINTOSH M.P., MEEUSEN E.N., MORTON D.A. (2010). Ultrasonic nebulization platforms for pulmonary drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **7**: 663–679.

ZHANG J., WU L., CHAN H.K., WATANABE W. (2011). Formation, characterisation and fate of inhaled drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**:441-455.

ZIELIŃSKA-JUREK A., WALICKA M., TADAJEWSKA, A., ŁĄCKA I., GAZDA M., ZALESKA, A. (2010). Preparation of Ag/Cu-doped titanium (IV) oxide nanoparticles in W/O microemulsion. *Physicochem. Probl. Miner. Process.*, **45**: 113-126.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Gizem Rüya ÇAMCA

Doğum Tarihi : 31.10.1987

Doğum Yeri : Samsun

Uyruğu : T.C.

Medeni Hali : Bekar

İletişim adresi : Şehit Bahadır Demir Sok. No:12/12 Maltepe/Çankaya ANKARA

Telefon : +905058099604

e-mail : ruyacamca@gmail.com

camca@ankara.edu.tr

Eğitim Durumu :

2011 – 2014 Ankara Üniversitesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Eğitimi

2005 – 2010 Ankara Üniversitesi

Eczacılık Lisans Eğitimi

2000 – 2005 Samsun Anadolu Lisesi (Samsun)

Ortaöğrenim

1993 – 2000 Mustafa Kemal İlköğretim Okulu (Samsun)

İlköğrenim

Yabancı Diller _____ :

İngilizce

Almanca

Mesleki Deneyimler :

2011 -

Polifarma İlaç San. ve Tic. A.Ş. (Ankara)

Ruhsatlandırma Uzmanı ve Farmakovijilans Yetkilisi

2010 - 2011

Adeka İlaç Sanayi (Samsun)

*AR-GE Sorumlusu*Staj _____ :

2009

Novartis (İstanbul)

*Ruhsatlandırma Departmanı*Verilen Seminerler

2012

Pulmoner Yolla Uygulanan Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri