



**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

**BEYİNE NAZAL YOLLA İLAÇ TAŞIYICI BİR FORMÜLASYON
GELİŞTİRİLMESİ, *IN VITRO* VE RAT HAYVAN MODELİNDE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Özgür EŞİM

DANIŞMAN

Prof.Dr. Ayhan SAVAŞER

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç.Dr.Cansel KÖSE ÖZKAN

**Farmasötik Teknoloji
DOKTORA TEZİ**

ANKARA/2018

Özgür EŞİM tarafından hazırlanan "Beyine Nazal Yolla İlaç Taşıyıcı Bir Formülasyon Geliştirilmesi, In Vitro ve Rat Hayvan Modelinde Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr. Ayhan SAVAŞER

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan: Prof.Dr. Nilüfer YÜKSEL

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof.Dr. Zelihagül DEĞİM

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Biruni Üniversitesi


Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof.Dr. Betül ARICA YEGİN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

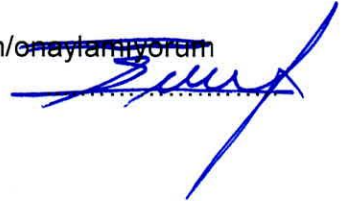
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 23/02/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof.Dr. Ömer AZAL

Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.



Özgür EŞİM

23.02.2018

ÖZET

Burun havanın vücuda girişini sağlayan, solunum sisteminin ilk bölümüdür. Kolay uygulanabilirlik ve geniş yüzey alanı nazal yolun ilaç uygulamaları için önemli bir alternatif olmasını sağlamıştır.

İlaçların beyne taşınmasında nazal yolun kullanımı konusunda günden güne artan bir ilgi mevcuttur. Beyne ilaç taşınması için nanopartiküllerin kullanımı güncel yöntemlere önemli üstünlük sağlamaktadır. Nanopartiküllerle ilaç taşıma teknolojisinin en önemli üstünlüğü nanopartiküllerin terapötik ilaç molekülünün kan beyin engeli geçişini arttırmasıdır. Özellikle p-glikoprotein substratı maddelerin hücreden geçişlerinin ve emilimlerinin arttırılmasında nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı yıllardır çalışılmaktadır.

Bu tez çalışması ile beyinde migren hastalığında kullanılan p-glikoprotein substratı olduğu bilinen eletriptan hidrobromürün (EH) nazal yolla uygulanacak nanopartiküler formülasyonları geliştirilerek nazal yolla elde edilen etkinliğin intravenöz yolla uygulanan EH çözeltisi ve nanopartiküllerinin etkinlikleri ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla PLGA polimeri ve stabilizan olarak polivinil alkol (PVA), sodyum seskioleat (SS), pluronik F68 (F68) ve sodyum kolat (SK) kullanılarak EH yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküller ürün verimi, ilaç yükleme etkinliği, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi, yüzey yükleri, morfolojik özellikleri, *in vitro* çözünme hızı açısından değerlendirilmiştir. Kullanılan dört yüzey etken madde ile hazırlanan nanopartiküllerin hücre kültürü çalışmalarlarıyla etken maddenin sitotoksitesi ve p-glikoprotein substratı özelliklerinin inhibisyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Wistar Albino ratlara intravenöz ve intranazal çözelti halinde veya nanopartikül içerisinde EH uygulanmış, elde edilen kan ve beyindeki etken madde miktarları kıyaslanmıştır. Nanopartikül uygulamasının, eletriptan hidrobromürün beyne ilaç hedefleme etkinliğini % 206,23'ten % 367,57'ye yükselttiğini ve elde edilen en yüksek AUC değerinin intranazal stabilizan olarak PVA içeren nanopartikül formülasyonunun (100,34±29,13) uygulamasıyla olduğu tespit edilmiştir. Ratların beyinlerinin *Trigeminal Nucleus Caudalis* bölgesinde ölçülen c fos mRNA ve P maddesi miktarlarına göre beyne geçen eletriptan hidrobromür miktarlarına benzer sonuçlar bulunmuştur.

Sonuç olarak EH'nin beyinde daha yüksek derişime ulaşması amacıyla nazal uygulama için nanopartikül formülasyonları geliştirilmiş, ancak migren tedavisinde etkinliğinin arttırılmasına yönelik hem kan hem de beyinde etkinliğin arttırılması için yeni çalışmalar planlanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Beyne Hedefleme, Eleriptan Hidrobromür, Nanopartikül



ABSTRACT

The nose is the first part of the respiratory system that allows air to enter the body. Easy application and high surface area make it an important alternative for nasal drug applications.

There is a growing interest in use of nasal passages for the transport of medicines to the brain. The use of nanoparticles for drug delivery in the brain provides a significant advantage over current methods. The most important advantage of drug delivery technology with nanoparticles is that the therapeutic drug molecule of nanoparticles increases blood-brain barrier penetration. For many years, the use of nanoparticle drug delivery systems has been studied for increasing the absorption and cellular uptake of p-glycoprotein substrates.

This thesis study aims to compare the efficacy of nasal administration of eletriptan hydrobromide (EH) which is known to be a p-glycoprotein substrate used in migraine headache in the brain, with the efficacy of intravenous EH by using both solution and nanoparticles.

For this purpose, EH loaded nanoparticles were prepared by using PLGA polymer and Polyvinyl Alcohol (PVA), Sodium Sesquioleate (SS), Pluronic F68 (F68) and Sodium Colate (SK) as stabilizing agent. The prepared nanoparticles were evaluated in terms of product yield, encapsulation efficiency, particle size and polydispersity index, surface charges, morphological characteristics and *in vitro* dissolution rate. The effects of the nanoparticles prepared with four surface active agents on the inhibition of the cytotoxicity and P glycoprotein substrate properties of the active substance were investigated by cell culture studies.

EH was administered intravenously and intranasally to wistar albino rats in solution or in the nanoparticles, and the amounts of active substance in blood and blood obtained were compared. Nanoparticle administration increased the drug targeting activity of the eletriptan hydrobromide to brain from 206.23% to 367.57%, and the highest AUC value obtained was the intranasal application of nanoparticle formulation containing PVA as a stabilizer ($100,34 \pm 29,13$). Similar results were obtained with the amounts of c fos mRNA and Substance P measured in the Trigeminal Nucleus Caudalis region of the brains of the rats.

As a result, nanoparticle formulations for nasal application have been developed to achieve higher concentration of EH in the brain, but new studies have been planned to increase the efficacy of migraine treatment in order to increase both blood and brain activity.

Keywords: Brain targeting, Eletriptan Hydrobromide, Nanoparticle



TEŞEKKÜR

Bu çalışmada tekrarlanan, iş gücü kaybına yol açan bir nörolojik bozukluk olan ve Türkiye’de 15-55 yaş grubunda kadınlarda % 21.8 ve erkeklerde %10.9 gibi yüksek prevalans değerleri gösteren migrenin, santral ve periferik olarak trigeminovasküler sistemin aktivasyonunun inhibisyonu amacıyla poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri hazırlanmış ve etkinlikleri hücre kültürü ve rat modelinde araştırılmıştır.

Çalışmamda bana her türlü desteği sağlayan Eczacılık Bilimleri Merkez Başkanım Prof.Dr. Yalçın ÖZKAN’a, danışman hocalarım F.Teknoloji AD. Bşk. Prof.Dr. Ayhan SAVAŞER’ e ve Doç.Dr. Cansel KÖSE ÖZKAN’a, tez çalışması aşamalarında yardımlarını gördüğüm Doç.Dr. Çetin TAŞ’ a, Doç.Dr. Onur ERDEM’e, Dr.Ecz.Buğra SOYKUT’a sonsuz teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde birlikte olduğum, hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen, güler yüzleri sıcak ilgileri ve sonsuz destekleri ile yanımda olan çalışma arkadaşlarım Uzm.Ecz. Serdar ÇETİNKAYA, Uzm.Ecz. Alper ARSLAN, Uzm. Ecz. Filiz ATALAY ve tüm diğer Eczacılık Bilimleri Merkez Başkanlığı personeline teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca bana destek olan ve birçok konuda yardımlarını gördüğüm Ankara Üniversitesi’nden Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN’a, Dr. Sevinç KURBANOĞLU’ na ve tez izleme komitemdede yer alan Hacettepe Üniversitesi’nden Prof.Dr. Betül ARICA YEGİN’e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımında; hücre kültürü çalışmalarında hem teorik hem de pratik olarak bana yardımcı olan Doç.Dr. Mehmet ÖZLER’e, Uzm.Bio. Meral SARPEN’ e, Uzm.Bio. Pınar ELÇİ’ye, Uzm.Kim. Burcu ESER’e, Uzm.Bio. Sema ÖREN’e; hayvan deneylerimde çok büyük yardımlarını gördüğüm Uzm.Vet. Okan Ali AKSOY ve Uzm. Vet. Berk Alp ÜNSAL’a; qPCR çalışmalarının gerçekleştirilmesini sağlayan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Yusuf TUNCA başta olmak üzere Uzm.Dr. Ali ÖZTUNA ve Dr. Haluk KAVUŞ’a teşekkürü bir borç bilirim.

Varlıkları ile bana destek olan, hiçbir zaman sevgi ve ilgilerini eksik etmeyen, her türlü zorlukta yanımda olup bana güç ve moral veren sevgili ablama, enişteme ve yeğenim Doruk’a; her zaman yanımda olduğu için ailemden biri olarak gördüğüm dostum Uzm.Dr. Hakan ZEYBEK’e; bana her zaman inanan, güvenen, daima destek olan anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda ve benimle olan, karşılaştığım tüm zorluklara benimle birlikte göğüs geren, anlayışı, sevgisi ve desteği ile beni hiç yalnız bırakmayan ve bana moral veren eşim Özge’ye çok teşekkür ederim.

Bu tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi (Bilimsel Araştırma Projesi 2017/006) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xvi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xvii
RESİMLERİN LİSTESİ	xx
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Santral Sinir Sistemi.....	4
2.2. Kan Beyin Engeli	7
2.2.1. Kan Beyin Engelinden Taşınmayı Etkileyen Temel Faktörler	9
2.2.1.1. Molekül Boyutu	9
2.2.1.2. Yağda Çözünürlük	9
2.2.1.3. Plazma Proteinlerine Bağlanma	10
2.2.1.4. İlaçların Fizyolojisi	10
2.3. Santral Sinir Sisteminde İlaç Derişimini Artırma Mekanizmaları.....	11
2.3.1. Ultrason veya Yüzey Modifikasyonu ile Kan Beyin Engelinde Harabiyet	13
2.3.2. Nanopartikül Kullanımı	13
2.3.3. Endojen Madde Geçiş Sistemi Yardımıyla Aktif Taşınma.....	14
2.3.4. İntranazal Taşıma	16
2.3.4.1. Nazal Epitel Engelinden Geçiş.....	16
2.3.4.2. Nazal Mukozadan İlaç Geçiş Mekanizmaları	19
2.3.4.3. İlaçların Uygulanmasında Nazal Yol	20

2.3.4.4. Burundan Beyne Taşınma Yolakları.....	20
2.4. Nazal Uygulamada Santral Sinir Sistemine İlaç Hedeflendirilmesi İçin Kritik Faktörler	20
2.4.1. İlaçların Fizikokimyasal Özellikleri.....	21
2.4.1.1. İlacın Kimyasal Yapısı.....	21
2.4.1.2. Polimorfik Geçişler	21
2.4.1.3. Molekül Ağırlığı	21
2.4.1.4. Partikül Büyüklüğü	22
2.4.1.5. Çözünürlük ve Çözünme Hızı.....	22
2.4.2. Formülasyondan Kaynaklı Faktörler.....	22
2.4.2.1. pH.....	22
2.4.2.2. Tampon Kapasitesi.....	23
2.4.2.3. Osmolarite	23
2.4.2.4. Jelleşme Ajanları veya Jel Oluşturan Taşıyıcılar	24
2.4.2.5. Çözündürücüler	24
2.4.2.6. Koruyucular.....	24
2.4.2.7. Antioksidanlar	25
2.4.2.8. Nem Çekiciler	25
2.4.2.9. Emilim Arttırıcılar.....	25
2.4.3. Fizyolojik Faktörler.....	25
2.4.3.1. İlaç Depolanması ve Dağılımının Emilim Üzerine Etkisi	25
2.4.3.2. Nazal Kan Akışı	25
2.4.3.3. Mukosilyer Klirens Etkisi	26
2.4.3.4. Enzimatik Aktivite Etkisi.....	26
2.4.3.5. Hastalık Durumları.....	26
2.4.4. P-Glikoprotein.....	26

2.5. Beyne İlaç Geçişinde Kullanılan Modeller	30
2.5.1. Yapay Membranlar.....	30
2.5.1.1. PAMPA Modeli	31
2.5.2. Hücre Kültürü.....	31
2.5.2.1. Primer Kültürler	32
2.5.2.2. Ölümsüz Hücreler	32
2.5.2.3. Ko-Kültürler.....	32
2.5.2.4. Santral Sinir Sistemi Kaynaklı Olmayan Hücreler	33
2.5.3. <i>In Vivo</i> Model.....	33
2.6. Santral Sinir Sistemi Hastalıkları	33
2.6.1. Multipl Skleroz	33
2.6.2. Alzheimer ve Parkinson	34
2.6.3. <i>Human Immunodeficiency Virus</i> / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (HIV)	34
2.6.4. Kanser	35
2.6.5. Enfeksiyon	35
2.6.5.1. Bakteriyel Menenjit.....	35
2.6.5.2. Viral Ensefalit	36
2.6.6. Travmatik Beyin Hasarı (TBI).....	36
2.6.7. Gilles de la Tourette Sendromu (GTS)	36
2.6.8. Nörodejenaratif Hastalıklar	36
2.6.9. Epilepsi.....	37
2.6.10. Migren	37
2.7. Etken Madde Hakkında Bilgi.....	38
2.7.1. Genel Özellikleri	38
2.7.2. Fizikokimyasal Özellikleri	38
2.7.3. Farmakokinetik Özellikleri	39

3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Gereçler	41
3.1.1. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
3.1.2. Deneyleerde Kullanılan Aygıtlar	42
3.2. Yöntem	43
3.2.1. Etken Maddeye Ait Çalışmalar	43
3.2.1.1. Etken Maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumu	43
3.2.1.2. Etken Maddenin Infrared (IR) Spektrumu	43
3.2.1.3. Etken Maddenin Erime Derecesinin Tayini	43
3.2.1.4. Etken Maddenin Termal Analizi	44
3.2.2. Yöntem Validasyonları	44
3.2.2.1. Eletriptan Hidrobromürün Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile Miktar Tayini	44
3.2.2.2. Eletriptan Hidrobromürün Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini	46
3.2.3. Etken Maddeye Ait Organik/Su Fazı Dağılım Çalışmaları	49
3.2.4. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması	49
3.2.4.1. Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi	49
3.2.4.2. S/Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi	49
3.2.5. Partiküllerin Analizi	51
3.2.5.1. Partikül Boyut Analizi	51
3.2.5.2. Zeta Potansiyel Analizi	51
3.2.5.3. Partikül Özellikleri	52
3.2.5.4. Elektron Mikroskobu Analizi	52
3.2.5.5. İçerik Miktar Tayini	52
3.2.5.6. Enkapsülasyon Etkinliği Çalışmaları	53
3.2.5.7. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	53

3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	54
3.2.6.1. Kültür Çözeltilerinin Hazırlanması	54
3.2.6.2. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi	54
3.2.6.3. Pasajlama İşlemi (Subkültür)	54
3.2.6.4. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	55
3.2.6.5. Eletriptan Hidrobromür ve Eletriptan Hidrobromür Yüklü Nanopartiküllerin P-gp ile Etkileşimlerinin İncelenmesi	56
3.3. Stabilite Çalışmaları	56
3.4. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	57
3.4.1. Farmakokinetik Çalışmalar	57
3.4.2. Etkinlik Çalışmaları	59
3.4.2.1. RNA İzolasyonu	60
3.4.2.2. c fos mRNA ve P Maddesi Geni Ekspresyon Ölçümü	60
3.5. İstatistiksel Analizler	61
4. BULGULAR	62
4.1. Etken Maddeye Ait Bulgular	62
4.1.1. Etken Maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumu	62
4.1.2. Etken Maddenin Infrared (FT-IR) Spektrumu	62
4.1.3. Etken Maddenin Erime Derecesinin Tayini	63
4.1.4. Etken Maddenin Termal Analizi	63
4.1.5. Eletriptan Hidrobromürün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu	64
4.1.5.1. Doğrusallık	64
4.1.5.2. Doğruluk	64
4.1.5.3. Kesinlik	65
4.1.5.4. Tekrar Elde Edilebilirlik	66
4.1.5.6. Teşhis ve Tayin Sınırları	67

4.1.6. Eletriptan Hidrobromürün Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu	67
4.1.6.1. Doğrusallık.....	67
4.1.6.3. Teşhis ve Tayin Sınırları	69
4.1.7. Etken Maddeye Ait Organik/Su Fazı Dağılım Çalışmaları.....	69
4.2. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması	70
4.2.1. Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi	70
4.2.2. S/Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi.....	74
4.2.2.1. Etken Madde, Polimer, Stabilizan Derişiminin Nanopartikül Üzerine Etkileri	74
4.2.2.2. Su Fazı pH Değerinin Nanopartikül Yükleme Etkinliği Üzerine Etkisi.....	75
4.2.2.3. Yüzey Etken Maddenin Enkapsülasyon Etkinliği Üzerine Etkisi	76
4.3. Nanopartikül Özellikleri.....	79
4.3.1. DTK Analizi.....	79
4.3.2. FT-IR Analizi	80
4.3.3. Elektron Mikroskobu Analizi.....	84
4.4. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	85
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	91
4.5.1. MTT Yöntemi İle Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	91
4.5.2. Eletriptan Hidrobromür veya Eletriptan Hidrobromür Yüklü Nanopartiküllerin P-gp ile Etkileşimlerinin İncelenmesi	92
4.6. Stabilitenin İncelenmesi	93
4.7. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	94
4.7.1. Farmakokinetik Çalışmalar	94
4.7.1. Etkinlik Çalışmaları	96
5.TARTIŞMA	98
5.1. Etken Maddenin Özelliklerine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi	99

5.2. Formülasyon Seçimi	101
5.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi	105
5.3.1. Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi ile Elde Edilen Partiküllerin Değerlendirilmesi.....	105
5.3.2. S/Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi ile Elde Edilen Partiküllerin Değerlendirilmesi.....	107
5.3.3. Partikül Boyut ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi.....	108
5.3.4. Zeta Potansiyel.....	110
5.3.5. FT-IR ve DTK Çalışmaları	111
5.3.6. Morfolojik Özellikler	112
5.3.7. Eletriptan Hidrobromür Salımının Değerlendirilmesi	113
5.4. Hücre Kültürü.....	114
5.4.1. Eletriptan Hidrobromür veya Eletriptan Hidrobromür Yüklü Nanopartiküllerin P-gp ile Etkileşimlerinin İncelenmesi	115
5.5. Formülasyonun Stabilitesinin İncelenmesi	115
5.6. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	116
5.6.1. Farmakokinetik Çalışmalar	117
5.6.2. Etkinlik Çalışmaları	118
6.SONUÇLAR	122
7. KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ.....	140
EKLER.....	143
EK 1. Tezden Türetilmiş Yayınlar	143
EK 2. Etik Kurul Raporu.....	144

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1.Kan beyin engelinden SSS'ne ilaç taşınması için farmakolojik izlemler	11
Çizelge 2.2. P-gp inhibitörleri listesi	29
Çizelge 2.3. Eletriptanın farmakokinetik parametreleri.....	39
Çizelge 3.1: D-Optimal tasarım kullanılarak hazırlanan Y/S emülsiyon parametreleri	50
Çizelge 3.2: Hazırlanan S/Y/S emülsiyon parametreleri	51
Çizelge 4.1. YPSK metodu doğruluk değerleri.....	65
Çizelge 4.2. YPSK metodu kesinlik değerleri	65
Çizelge 4.3: YPSK metodu tekrar elde edilebilirlik değerleri	66
Çizelge 4.4: D-Optimal tasarım ANOVA sonuçları	70
Çizelge 4.5. S/Y emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yöntemiyle elde edilen partiküllerin büyüklükleri ve polidispersite indeksleri	71
Çizelge 4.6. Etken madde, polimer ve stabilizan derişiminin nanopartikül üzerine etkileri	74
Çizelge 4.7. Formülasyonların salım kinetik parametreleri.....	90
Çizelge 4.8 Başlangıç, 1. ay ve 3. aydaki partikül büyüklüğü, etken madde miktarı ve polidispersite indeksi sonuçları	93
Çizelge 4.9. Çözelti ve NP uygulamasının İHE ve İTY değerleri	95
Çizelge 4.10. Eletriptan Hidrobromür çözeltisi ve nanopartiküllere ait farmakokinetik parametreler.....	96
Çizelge 5.1. Eletriptan Hidrobromüre ait FT-IR titreşimleri ve dalga sayıları	100

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. pKa- iyonizasyon arasındaki ilişki.....	23
Şekil 4.1. Eletriptan hidrobromürün dalga boyu taramasıyla elde edilen UV-spektrumu.....	62
Şekil 4.2. Eletriptan hidrobromürün FT-IR spektrumu	63
Şekil 4.3. Eletriptan hidrobromür termal analiz grafiği	63
Şekil 4.4. Eletriptan hidrobromürün distile suda YPSK kalibrasyon doğrusu ve denklemi.....	64
Şekil 4.5. YPSK yöntemiyle 225 nm’de elde edilen eletriptan hidrobromür piki	66
Şekil 4.6. Eletriptan hidrobromürün hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi.....	67
Şekil 4.7. Eletriptan hidrobromürün plazmadaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi. 68	68
Şekil 4.8. Eletriptan hidrobromürün beyindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi....	68
Şekil 4.9. LC-MS yöntemi ile elde edilen eletriptan hidrobromür piki	69
Şekil 4.10. Polimer ve stabilizan oranının partikül büyüklüğü üzerine etkisi	72
Şekil 4.11. Sonikasyon zamanı ve sonikasyon enerjisinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi	72
Şekil 4.12. Polimer ve stabilizan oranının polidispersite indeksi üzerine etkisi.....	73
Şekil 4.13. Sonikasyon zamanı ve sonikasyon enerjisinin polidispersite indeksi üzerine etkisi	73
Şekil 4.14. Formülasyon parametrelerinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, % enkapsülasyon etkinliği ve polidispersite indeksi üzerine etkileri.....	76
Şekil 4.15. Su fazı pH değerinin nanopartikül % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi	76
Şekil 4.16. Yüzey etken maddenin nanopartikül partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi üzerine etkisi	77
Şekil 4.17. Yüzey etken maddenin nanopartikül enkapsülasyon ve yükleme özellikleri üzerine etkisi.....	79

Şekil 4.18. Kullanılan etken madde ve yardımcı maddelere ait DTK termogramları.	79
Şekil 4.19. Farklı YEM ve stabilizanlar ile hazırlanan nanopartiküllerin DTK termogramları.....	79
Şekil 4.20. PVA'nın FT-IR spektrumu	80
Şekil 4.21. PLGA'nın FT-IR spektrumu.....	80
Şekil 4.22. Sodyum Kolatın FT-IR spektrumu	81
Şekil 4.23. Pluronik F 68' in FT-IR spektrumu	81
Şekil 4.24. PVA-NP' in FT-IR spektrumu.....	82
Şekil 4.25. SS-NP' in FT-IR spektrumu	82
Şekil 4.26. F68-NP' in FT-IR spektrumu	83
Şekil 4.27. SK-NP' nin FT-IR spektrumu.....	83
Şekil 4.28. Hazırlanan partiküllerin PCS sonuçları ve SEM görüntüleri.....	84
Şekil 4.29: Farklı yüzey etken maddelerin Eletriptan Hidrobromür-PLGA nanopartiküllerinin salımı üzerine etkisi.....	85
Şekil 4.30. PVA-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri	86
Şekil 4.31. SS-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri.....	87
Şekil 4.32. Pluronik F68-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri	88
Şekil 4.33. SK-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri	89
Şekil 4.34. Yüzey etken maddenin hücre sel canlılık üzerine etkileri	91
Şekil 4.35. Stabilizan Yüzey etken maddenin hücre sel canlılık üzerine etkileri	92
Şekil 4.36. Partikül süspansiyonunun 24 saat 37 ⁰ C' de bekletilmesi sonucu elde edilen partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları.....	93
Şekil 4.37. Ratlara uygulanan formülasyonların kan derişim-zaman grafikleri	94
Şekil 4.38. Ratlara uygulanan formülasyonların beyin derişim-zaman grafikleri	95
Şekil 4.39. c-fos mRNA ekspresyon düzeyleri	96
Şekil 4.40. P maddesi ekspresyon düzeyleri	97

Şekil 5.1. Beyne nazal yolla ilaç uygulama şekilleri (a) ve uygulanan sistemlerin partikül büyüklükleri (b) 102

Şekil 5.2. Tasarım sonuçlarının arzulanan parametre değerlerini karşılama oranları. 106



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Beynin yapısı	4
Resim 2.2. Mukosilyer yapı	20
Resim 3.1. Ratlara ilaç uygulanması.....	58



SİMGELER ve KISALTMALAR

ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
AUC	Area Under Curve (Eğri Altı Alan)
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CaCo 2	<i>Caucasian Colorectal Adenocarcinoma</i> Hücre Hattı
C_{max}	En Yüksek Derişim Seviyesi
DTK	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EH	Eletriptan Hidrobromür
F68	Pluronik F68 (Poloksamer 188)
FT-IR	<i>Fourier Transform Infrared</i> (Kızılötesi) Spektroskopisi
İHE	İlaç Hedefleme Etkinliği
İTY	İlaç Taşıma Yüzdesi
KBE	Kan Beyin Engeli
K_{el}	Eliminasyon Sabiti
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i> Hücre Hattı
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
P-gp	P Glikoprotein
PAMPA	Paralel yapay membran geçiş modeli
PLGA	Polilaktik ko-glikolik asit
PVA	Polivinil Alkol
SK	Sodyum Kolat
SS	Sodyum Seskioleat
SSS	Santral Sinir Sistemi
t_{1/2}	Yarılanma Ömrü
T_{max}	En Yüksek Derişim Seviyesi Görülen Zaman
TNC	<i>Trigeminal Nucleus Caudalis</i>
UV	Ultraviyole
V_d	Sanal Dağılım Hacmi
YPSK	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

GİRİŞ VE AMAÇ

Burun solunum için havanın vücuda girişini sağlayan, solunum sisteminin ilk bölümüdür. 120-140 mm derinliğe ve 160 cm² alana sahiptir. Burun vestibular, turbinat ve kuko bölgesi olmak üzere 3 bölümden oluşur. Kolay uygulanabilirlik ve yüksek yüzey alanı nazal yolun ilaç uygulamaları için önemli bir alternatif olmasını sağlamıştır.

Nazal yol öncelikle nazal enfeksiyonlar, nazal konjestiyon ve alerji gibi lokal hastalıkların tedavisinde kullanılır. Nazal yol ayrıca oral ve parenteral yol gibi sistemik ilaç uygulama yollarına alternatif olarak da kullanılabilir. Sistemik etki amacıyla kullanıldığında nazal mukoza hızlı ilaç emilimi ve buna bağlı hızlı etki başlangıcı, gastrointestinal ve hepatik ilk geçiş etkisinin aşılması nedeniyle biyoyararlanımın artırılması ve girişimsel olmaması nedeniyle acısız uygulama gibi birçok avantaj sunar (1).

Veziküler stomatitis ve çocuk felci gibi virüslerin nazal boşluktan beyne geçtikleri gözlenmiştir. Bu geçiş koku sinirleri vasıtasıyla öncelikle beynin koku bölgesine daha sonra diğer beyin bölgelerindedir(2, 3). Yapılan çalışmalarla birçok molekülün bu yolla beyne geçebildiği gözlenmiştir. Burundan beyne ilaç geçişi amacıyla nazal yolun kullanımı son yıllarda ilgi çekici bir hal almıştır. Birçok çalışma ile çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla farklı etken maddeler kullanılmıştır. Ancak polar yapılı ve büyük moleküllerin permeabiliteleri bu yol kullanıldığında düşüktür. Nazal epitelde yer alan enzimlerle metabolize olan maddelerin etkinliği de bu yolla kullanıldığında düşer. Nazal yolla uygulanan toz ve sıvı formüller 15-20 dakika içerisinde klirens uğramaktadır(1).

İlaçların beyne taşınmasında nazal yolun kullanımı konusunda günden güne artan bir ilgi mevcuttur. Birçok çalışma ile düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerin intranasal uygulama ile beyne geçişinin artırıldığı gösterilmiştir. Bu yolla ilaç taşınmasında çeşitli mekanizmalar ve yollar öne sürülmüştür(4, 5). Koku sinirlerinin burundan beyne ilaç taşınmasında ana yolak olduğu düşünülmektedir. Koku reseptör nöronları ile alınan moleküller aksonlar boyunca yol alarak beynin koku bölgesine ulaşır. Bu geçiş genellikle yavaştır ve birkaç saat alır. Bu yolla genellikle düşük molekül ağırlığına sahip ve yüksek lipofilik özellik gösteren maddeler taşınır.

Moleküller ayrıca perinöral nöron kanallarını kullanarak ekstraselüler mekanizma ile de taşınırlar. Bu işlem 30 dakikadan daha az sürer(1, 6).

Varlığı kanıtlanan bir diğer geçiş yoluğı trigeminal sinirlerdir. Radyolojik olarak işaretlenmiş insülin benzeri büyüme faktörünün nazal uygulama sonrası doku dağılımını incelenmiş ve santral sinir sistemine girişte beynin koku bölgesiyle nazal boşluk arasında yer alan koku bölgesi ve beyinsapı ile omurilik arasında yer alan trigeminal sistem olmak üzere iki yolak ile karşılaşmıştır. Ayrıca diğer çalışmalar ile lenfatik kanallar gibi farklı yolaklarında beyin ve santral sinir sistemine ilaç geçişinde etkili olduğu gösterilmiştir(6, 7).

Son olarak nazal boşluk ile beyin arasındaki diğer yolak, nazal boşluktaki venöz kan damarlarıyla sistemik dolaşıma giren ilaçların hızla beyin ve omuriliğı besleyen şahdamarile taşınmasıyla açıklanan yoldur. Bu işleme ters taşınma da denilir(6, 8).

Nörolojik bozukluklardan biri olan migren özellikle 15-55 yaş arasını etkileyen ciddi bir hastalıktır. Şiddetli ağrı ile beraber bazı durumlarda bulantı, kusma, ışığa ve sese hassasiyet genel belirtileridir. Patofizyolojisi halen tam olarak aydınlatılmayan bu hastalığın oluşumunda genellikle 3 temel mekanizmanın etkili olduğu düşünülmektedir. Bunlar: kranyal arteriyel vazodilatasyon, ekstraserebral nörojenik inflamasyon ve santral ağrı iletiminin inhibisyonundaki azalmadır (9).

Serotonin mediyatörleri migren ataklarında düşen serotonin seviyesinin düzeltilmesi amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır. Serotonin mediyatörlerinden biri olan eletriptan lipofilik, oral olarak uygulanabilen, hızlı ve etkili bir ilaçtır. Lipofilik özellikleri ilacın kan beyin engelinden yüksek oranda geçeceğini düşündürmesine rağmen bu ilacın p-glikoprotein (P-gp) substratı olması ve santral sinir sisteminden dışarı atılması nedeniyle eletriptanın kan beyin engelini geçişi diğer maddelerden düşüktür(10).

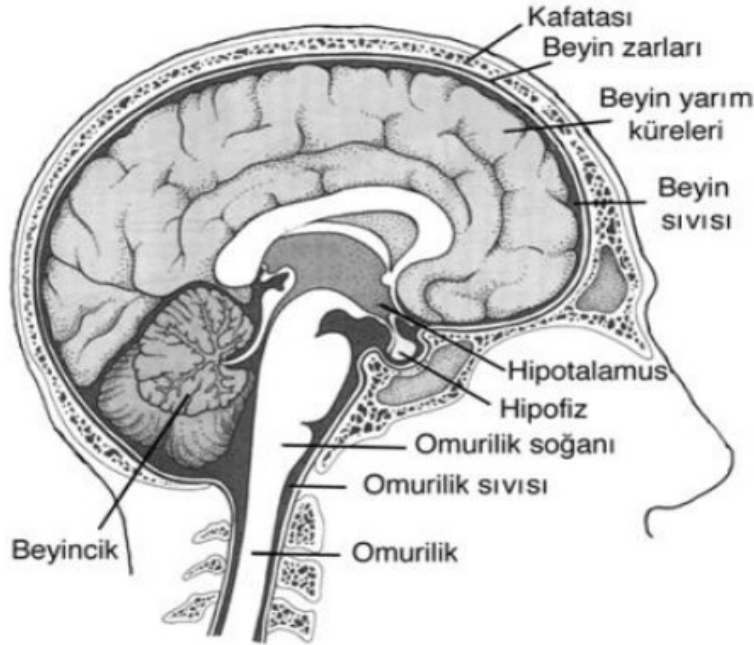
Kan beyin engelinden beyne ilaç taşınması için nanopartiküllerin kullanımı güncel yöntemlere önemli üstünlük sağlamaktadır. Nanopartiküllerle ilaç taşıma teknolojisinin en önemli üstünlüğü nanopartiküllerin terapötik ilaç molekülünün kan beyin engeli geçişini arttırmasıdır(11). Bu özelliklerden birisi olan P-gp substratı maddelerin hücrese geçiş ve emilimlerinin arttırılmasında nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı yıllardır çalışılmaktadır.

Bu tez çalışması ile beyinde migren hastalığında kullanılan P-gp substratı olduğu bilinen EH'nin nazal yolla uygulanacak nanopartiküler formülasyonları geliştirilerek (1) nazal uygulamada eletriptan hidrobromür çözeltisinin ve nanopartiküllerinin hangi hücresel geçiş mekanizmasını kullanarak etki gösterdiği, (2) EH içeren PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması ve işlem parametrelerinin etkilerinin açıklanması, (3) hazırlanan nanopartiküllerin P-gp inhibisyonunda etkinliğinin incelenmesi, (4) farmakokinetik özelliklerinin tespit edilmesi, (5) beyindeki migren ataklarında miktarı değişen c-fos-mRNA ve P maddesi miktarı üzerine etkisinin belirlenmesi ve (6) nazal yolla elde edilen etkinliğin intravenöz yolla uygulanan eletriptan hidrobromür çözeltisi ve nanopartiküllerinin etkinlikleri ile karşılaştırılması amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Santral Sinir Sistemi

Santral sinir sistemi (SSS) beyin ile omurilikten oluşur ve travmalardan kafatasıyla *vertebra* tarafından (Resim 2.1) korunur (2, 12). Omurilik, kafatasından ilk *lumbar vertebra*ya kadar uzanır. Omurilik; vücuttaki cilt, eklemler, kaslardan duyu sinirleri alır ve istemli ve refleks hareketlerden sorumlu motor nöronları içerir. Yapısal olarak omurilik gri madde ve çevreleyen beyaz maddeden oluşur. Sinir hücrelerinin gövdelerini içeren gri madde *dorsal* ve *enine* kesitte şekline göre bu isim verilen ön boynuz kısmına ayrılır. Dorsal boynuz çevresel uyarıları alan sensör nöronların düzenli dizilimlerinden oluşurken ön boynuz belirli kasları uyaran motor çekirdekleri içerir. Beyaz madde, duyu sinirlerin beyne ulaştığı yükselen yollar, motor komutları ve modülatör etkileri beyinden taşıyan alçalıcı yolları oluşturan *miyelinli aksonlardan* meydana gelir. *Dorsal köklerde* yer alan farklı akson sınıfları acı, sıcaklık ve dokunma gibi duylara aracılık eder. Omurilik ayrıca iç organlardan duyu sinirleri alır. *Ventral kökler*, kasları uyaran motor nöronların çıkan *aksonlarından* oluşan demetlerdir (12).



Resim 2.1. Beynin yapısı (13)

Beyin; sıvı dolu *ventriküler* sistem ve beyin omurilik sıvısının (BOS) bulunduğu *araknoid* boşluk tarafından çevrelenmiştir. Bu boşluk ise üç membrandan oluşan beyin zarı ile çevrelenmiştir: Kafatasının altında bulunan dış zar (*dura mater*), doğrudan beyni saran *pia mater* ve arada bulunan *araknoid*. *Pia mater* ve *arachnoid* arası ise *araknoid* boşluktur (2). Beyin; iki beyin yarıküresi, beyincik, beyin sapı ve *ventriküllerden* oluşur (14).

Beyin sağ ve sol yarım küreden meydana gelir. Beynin içinde *serebrum* ile beyin sapının arası *diensefalon* (gri cevher) diye adlandırılır ve beyin dokusu genel olarak beyin zarı adı verilen gri madde, beyaz madde, beyin-omurilik sıvısı (BOS) şeklinde sınıflandırılabilir. Gri madde ağırlıklı olarak sinir hücrelerinin gövdelerinden, beyaz madde ise sinir liflerinden oluşur. Beyin yarım küreleri beynin en büyük kısımlarıdır ve beyaz madde lifleri ile birbirine bağlanmışlardır (15).

Beyin zarı, üzerini örten kafatasına göre *frontal*, *parietal*, *temporal* ve *okspital* şeklinde dört ana loba ve *corpus callosum* undorsal yüzünü çevreleyen *singular korteks* ve *frontal*, *parietal* ile *temporal* lobların aşırı büyümesi nedeniyle yüzeyde görülemeyen *insula* bölgelerine ayrılır. *Frontal* lobların işlevi planlama, organize etme, strateji oluşturma olduğu gibi aynı zamanda başlama, değiştirme ve dikkati sürdürmedir. Beynin yürütücüsü olarak tanımlanırlar. *Parietal* loblar genel olarak dokunma, basınç, ateş, soğuk ve acı gibi duyuşal sinirleri almak ve işlemekten sorumludurlar. Ayrıca vücut farkındalığının algılanması ve çevreyi tanımlamak için gerekli uzaysal koordinat sisteminin oluşturulmasına katkıda bulunur. *Temporal loblar*; dil, duygular/heyecan ve hafıza işlevlerine hizmet ederken, *okspital loblar* görsel bilgileri işleme ve nesnelere tanıma işlevlerine dahil olur (15).

Bu dört lob insan beyninde göreceli olarak tutarlı bir yerde bulunan korteks yolaklarına göre tanımlanır. *Serebral korteksin* en önemli girintilerinden biri *temporal lobu frontal ve parietal loblardan* ayırır. *İnsular korteks*, *lateral sulcusun* orta sınırını oluşturur. Bir diğer önemli girinti, merkezi *sulcus*, yarı kürenin *dorsal* yüzeyinin ortasında ve yanında yer alır ve *frontal* ve *parietal lobları* ayırır. *Frontal*, *parietal* ve *temporal lobların* çevrelediği ve beynin sıvı dolu *ventriküllerini* saran *serebral yarıkürelerin* orta kısımlarının sürekliliğine ilk kez Pierre Paul Broca dikkat çekmiştir. Broca, bu bölgeyi *limbik lob* olarak adlandırmıştır. *Limbik lob serebral korteksin* büyük alt bölümlerinden biri olarak değil *corpus callosumu* çevreleyen *singular*

korteks, insular korteks gibi, *neokorteksin* ayrı bir bölümü olarak düşünülmektedir (2, 15).

Beyincik, ya da küçük beyin, iki yarıküreye sahip olması ve hayli katlanmış yüzeyi ya da korteksi ile beyne benzemektedir. Beyincik, *serebral* yarıküreler de dahil beynin diğer albt bölümlerinden daha çok sayıda nöron içerir. Beyinciğin yüzeyi ya da *korteksi*, belirgin çatlaklarla ayrılan çok sayıda loba ayrılır. Beyincik, duruşu devam ettirmek, baş ve göz hareketlerinin koordinasyonu ve kas hareketlerinin ince ayarı ve motor yeteneklerin öğrenilmesinde önemli olan; omurilikten *somatosensör* bilgileri, *serebral korteksten* motor bilgileri, iç kulaktaki *vestibuler* organlardan dengeyle ilgili bilgileri alır. Beyincik önceleri hareketlerin koordinasyonuna dahil olan bir beyin bölgesi olarak görülse de artan sayıda *nöropsikolojik, nörofizyolojik* ve nörogörüntüleme çalışmaları beyinciğin zihinsel işlev, dil ve duygusal kontrol konusunda daha çok rol oynadığını göstermiştir. Bu fonksiyonların altında yatan duyuşal bağlantı bölgelerinden gelen girdilerdir (12).

Beyin sapı omurilikle devam eder ve duyuşal ve motor sistemlerin çeşitliliklerine katkıda bulunan farklı sinir hücresi kümeleri içerir. Duyuşal girdiler ve beyin kökünün motor cevapları işlevsel olarak 31 *spinal* sinirin analogu olan 12 *kranial* sinir tarafından yürütülür. Omurilik algılama ve gövde ile *ekstremitelerin* motor kontrolüne aracılık ederken, beyin kökü kafa, boyun ve yüzdeki duyuşların kontrolü ile ilgilidir (15).

Beyin sapı ayrıca işitme, denge ve tat alma gibi özelleşmiş farklı duyuşlardan veri giriş bölgesidir. Beyin kökündeki motor nöronlar kafa ve boyun kaslarını kontrol eder. Beyin kökündeki nöronlar ayrıca kardiyak çıkış ve kan basıncında düşüş, gut *peristaltizminde* artış ve *pupil* daralması gibi parasempatik reflekslere de aracılık eder. Beyin kökü duyuşal ve motor verileri merkezi sinir sisteminin diğer bölümlerine taşıyan inen ve çıkan yolaklar içerir. Ek olarak, *retiküler* oluşum olarak bilinen, beyin kökünün çekirdeğinde dağılmış nöronların görece ayrıntılı ağı, omurilik ve beyin köküne giren duyuşal verilerin çoğunun bir özetini alır ve organizmanın uyarılma seviyesini etkilemesi açısından önemlidir (2, 14, 15).

Ventriküller, beynin *serebrovasküler* sıvı dolu boşluklarıdır. Birbirine bağlı *serebrospinal* sıvı ile dolu dört *serebral* boşluk içerir (2, 14).

2.2. Kan Beyin Engeli

Kan-beyin/kan-*serebrospinal* sıvı engelinin varlığını gösteren ilk çalışmalar 19. yy'ın sonunda Paul Ehrlich tarafından gerçekleştirilmiştir: Ehrlich deney hayvanlarının kanına anilin boyası enjekte etmiş ve beyin dışında tüm organların lekeliğinin farkına varmıştır (16). 20. yy'ın başında Ehrlich'in öğrencisi olan Edwin Goldmann iv ya da sc olarak tripan mavisi enjekte etmiştir. Tripan mavisi *koroid pleksus* ve *dura materi* lekelemiş ve *serebrospinal* sıvıya önemli miktarda girmemiştir. Tersine *serebrospinal* sıvıya doğrudan tripan mavisi enjeksiyonundan sonra beyin ve omuriliğin lekelenmesi *serebrospinal* sıvı ve beyin dokusu arasında sıkı difüzyonel bir engel varlığını göstermiştir (17, 18). *Dura mater* ve *araknoid* arasında çok sayıda düz hücre tabakası sıkı kavşaklar ve bağ kavşaklarına bağlıdır ve tam olmayan bazal membranla kaplıdır (19). Beyincik bölgelerinde, kapiller endoteller sıkı bağlantılara sahiptir. Kan-*serebrospinal* sıvı engelinin morfolojik ilişkisi sıkı bağlantılarla bağlı *koroid pleksusun* silindirik epitelidir(20).

Kan beyin engeli, maddelerin periferel dolaşım ve SSS arasında hareketi için bir sınır oluşturur. Bu şekilde olası nörotoksik maddelerin beyne girişini sınırlasa da aynı zamanda merkezi sinir sistemine tedavi amacıyla terapötiklerin ulaşımı için de büyük bir engel oluşturur. Kan beyin engeli, düşük hızda *pinositoza* izin verir ve sıkı bağlantılara sahiptir. Yetişkin memeliler iki aktif SSS *jerminal* bölgesine sahiptir: *hipokampal internöronları* üreten *dentate gyrusun subgranular* bölgesi (21), *lateral ventriküllerin endodimal* tabakasının yanında yer alan ve nöron inkorporasyonunun ergenlik dönemine kadar devam ettiği koku soğanına göç eden internöronları üreten ön beyin *subventriküler* bölge (SVZ) (22, 23). Kan-beyin engeli mikrodamarlanma seviyesinde yer alır ve merkezi sinir sisteminin *homeostazi* için önemlidir. Kan beyin engeli kandan beyne çözülmüş maddelerin *paraselüler* difüzyonunu önemli ölçüde kısıtlar(24). Bu kısıtlama 3 tip engelle gerçekleşir:

Kan beyin engeli öncelikli olarak *serebral* mikrodamarları ve çevreleyen *perivasküler* elementleri kaplayan *endotelial* hücrelerden oluşmuştur. Beynin *serebral* kan *kapillerleri* beyin mikrodamar *endotelial* hücrelerinden oluşmuştur (BMVEC). BMVEC ile normal *endotelial* hücreler arasındaki temel fark sıkı bağlantılardır. Komşu *endotelial* hücreler önemli *transendotelial* elektriksel dirençle (TEER) karmaşık sıkı bağlantılar oluşturarak kan beyin engelinden *paraselüler* geçişi önemli

ölçüde kısıtlayan fiziksel bir engel meydana getirir. Bu yapı, düşük TEER ve etkili *paraselülergeçiş* gösteren *periferik* dolaşım ile taban tabana zıttır. Sıkı bağlantılar, suda çözünen maddenin hücrelere serbestçe geçişini ve beyin hücrelerinin sıvı çevresine girişini engeller (25).

Kan beyin engeli, sıkı bağlantılarla yaratılan fiziksel engele ek olarak ilaç taşıma için farklı *metabolik* engeller de içerir. Kan beyin engelinin *endotelial* hücreleri, minimum *pinositoza* izin verecek ve böylece seçici olmayan *transselüler* geçişi büyük ölçüde ortadan kaldıracak şekilde tasarlanmıştır. Ek olarak kan beyin engelini her bir hücresel bileşeni, kan beyin engelini geçmeye çalışacak pek çok bileşiği etkisizleştiren bir dizi hücre içi ve dışı enzim üretir. Beynin kan *kapillerlerini* kaplayan pek çok enzim, kandaki istenmeyen peptidleri ve diğer küçük molekülleri parçalar ya da etkisizleştirir. Örneğin, dolaşımdaki *adenozin* kandan beyne “*BBB concentrative nucleoside transporter type 2 (CNT2)*” aracılığı ile girer; ancak kan beyin engelindeki *adenozin metabolize* edici enzimin hızlı inaktivasyonu nedeniyle beyinde farmakolojik aktivitesi yoktur. Bunun aksine enzimatik kan beyin engeli, ön ilaçları aktif hale geçirebilir. Dolaşımdaki L-DOPA beyne “*BBB large neutral amino acid transporter type 1*” aracılığı ile girer ve hızla farmakolojik olarak aktif olan formu dopamine dönüştürülür (26).

Kapiller endotelium çok sayıda geri atım (*efflux*) taşıyıcısı içerir. Belirli ilaçlar *endotelial* engeli serbest difüzyon aracılığı ile geçebilir ve kandan beyne girerler. Eğer ilaç beyin mikrodamarlarında üretilen aktif geri atım taşıyıcılarından (AET) birinin *substratı* ise bu içeri alınma hemen beyinden kana aktif dışarı atılma ile takip edilebilir. *P-gp*, en çok çalışılan aktif geri atım engelidir. *P-gp* hücreleri birbirinden bağımsız yüzlerce kimyasal toksini ve yabancı küçük moleküllü dışarı atarak zararlı etkilerini azaltır. *P-gp*, *ATP-binding cassette (ABC) transporter* ailesinin bir üyesidir. Substrat çeşitliliği *P-gp* aktivitesinin ayırıcı bir özelliğidir. *P-gp*'nin *X-ray* yapısı, hem apo hem ilaç bağlı formu için son zamanlarda belirlenmiştir (27). Apo ve ilaç bağlı *P-gp* yapıları ilaç girişi için sitoplazmaya açılan kapılara ve lipit çifte tabakalı yapılara sahiptir. *P-gp*'nin içe bakan yüzünün konformasyonu taşınma döngüsünün başlangıç aşamasını oluşturur. Bir maddenin ilaç geçişini artırma çalışmalarında sadece maddenin fizikokimyasal özelliklerinin aşılması yeterli olmayabilir. Bunun yanında pasif difüzyonun ve *P-gp* aktivitesinin de optimize edilmesi gerekir (25).

SSS'ne ilaç geçişi fizikokimyasal özellikler ve kan beyin engelindeki taşıyıcı sistemler ile olası etkileşimlerden etkilendiği çeşitli kaynaklarda gösterilmiştir (28).

Kan beyin engelinden temel taşınma yolları řu şekilde sıralanabilir;

- 1) Sıkı bağlantılarla kısıtlanmış olan *paraselülerakz* yolak,
- 2) *Transseller lipofilik* yolak,
- 3) Substrata özgü taşıyıcı proteinler,
- 4) *Reseptör* aracılı *transitozis*,
- 5) *Adsorptif* aracılı transitozistir(29, 30).

Normalde sadece küçük, lipofilik moleküller, *transselüler* pasif difüzyonla normal, sağlıklı bir kan beyin engelini geçebilmesine rağmen, belli peptid ve protein analoglarının sınırlı transportu bildirilmiştir. Glukoz ve demir gibi temel besin maddeleri, *glukoz transporter 1* gibi zgltaşıyıcılarla ya da *transferrin* reseptörü gibi reseptörlerle SSS'ne girebilirler (31).

2.2.1. Kan Beyin Engelinden Taşınmayı Etkileyen Temel Faktörler

2.2.1.1. Molekl Boyutu

Sıvılarda difüzyon katsayısı, maddenin hidrodinamik yarıçapıyla ters orantılıdır ve hidrodinamik çap yaklaşık olarak molekl ağırlığının karekökü ile orantılıdır; yani maddenin *serebrosipinal* sıvıya girişi molekl ağırlığının kareköküne bağlıdır (32). Büyük hidrofilik maddelerin *serebrospinal* sıvıya geçişi az olmasına rağmen, kesin bir sınır yoktur. 500 Da (400-600 Da) molekl ağırlığına sahip moleküller kan beyin engelini farmakolojik olarak önemli miktarlarda geçebilirler (33). Kan beyin engelini geçen küçük molekl ağırlıklı ilaçların pek çok rneği olmasına rağmen, büyük molekl ağırlıklı ilaçların hemen hepsinin normal koşullarda kan beyin engelini geçişi sınırlıdır (34, 35).

2.2.1.2. Yağda znrlk

Santral sinir sistemi elemanları en az bir hücre tabakası, yani her hücre için ağırlıklı olarak sıkı bağlantılarla bağlanmış iki lipid membran ile sarılmış oldukları için tüm SSS lipid tabakalarla sarılmış olarak düşünülebilir. Bir bileşiğin lipofilikliği bileşiğin bu membranlara geçiş yeteneğini artırır. Plazmadan BOS'a difüzyon için pH 7.4'te ideal oktanol-su partiyon katsayısı 1-10, logP 0-1 arasındadır. Ayrıca polar yüzey alanına sahip ilaçlar (>80 ) kan beyin engelini farmakolojik olarak önemli miktarlarda geçebilirler (20, 36).

2.2.1.3. Plazma Proteinlerine Bağlanma

Plazma proteinlerine bağlanma ilaçların santral sinir sistemi elemanlarınagirişini önemli ölçüde etkiler. Bağlanma proteinleri (özellikle albumin ve globulinler) kan-beyin/kan-*serebrospinal* sıvı engelini az miktarda geçebileceği için sağlam bir engel varlığında bağlanmamış plazma bölümünün geçebileceğine inanılır (37, 38).

2.2.1.4. İlaçların Fizyolojisi

Intrakranial alan ve *vertebral* kanal tek bir fizyolojik bölge olarak görülemez. BOS alanı, beyin ile omuriliğin hücre dışı ve hücre içi alanlarına ayrılır. Aynı bölgenin farklı kısımları içinde derişimler genelde farklıdır (39). Damar içi enjeksiyon sonrasında çoğu ilaç *lumbar* BOS'da *ventriküler* kısımdan daha yüksek derişimde bulunur. Genelde ilaçların *lumbar serebrospinal* sıvıya enjeksiyonu *sisternal* ve *ventriküler serebrospinal* sıvıda etkin derişim oluşturmaz.

Sinir dokusu ve *serebrospinal* sıvının *interstisyel* alanlarının arasında difüzyonel bir engel bulunmaz. Büyük moleküller bile *serebrospinal* sıvı alanından difüzyonla sinir dokusunun *interstisyel* alanına girebilir. *Serebrospinal* sıvının yaklaşık üçte ikisi *koroid pleksus* tarafından üretilir. *Serebrospinal* sıvının üçte biri beyin ve omuriliğin hücre dışı alanından köken alır; yani beyin ve omuriliğin hücre dışı alanı ile *serebrospinal* sıvı alanı arasında *serebrospinal* sıvı alanı ve sinir dokusunun *ekstraselüler* sıvısında difüzyonla eşit ilaç derişimi oluşmasını engelleyen devamlı bir akış vardır (20).

İnsan beyninin hücre dışı alanındaki *antiñfektif* derişimini ölçmek için mikrodializ yöntemi kullanılır (40). Bu tekrarlayan örnelemeye dayanır ve beyin dokusunun *ekstraselüler* alanındaki farmakokinetik çalışmaları için kullanılabilir. Bu yöntemde bir katater beyne cerrahi olarak yerleştirilir. Mikrodializle ilaç derişiminin ölçülmesi probun ve perfüzyon çözeltisinin özellikleri, cerrahi travmaya bağlı olarak cerrahi sonrası aralık ve doku doğruluğundan etkilenir (41). Bu nedenle serebral hücre dışı alandaki ilaç derişimi genelde “*no-net-flow*” yöntemi aracılığıyla mikrodializ probunun farklı derişimlerde ilaç çözeltisi ile perfüzyonuyla belirlenir (40).

2.3. Santral Sinir Sisteminde İlaç Derişimini Artırma Mekanizmaları

Vücuda uygulanan makromoleküllerin yaklaşık %100'ü ve küçük moleküllerin yaklaşık %98'i kan beyin engelini geçerek *serebrospinal* sıvı ve beyin *ekstraselüler* boşluğuna ulaşamaz. Bu tip ilaçların beyne taşınması için *transkraniyal* ve intranasal uygulama, kan beyin engelini bozulması ve kan beyin engeli taşıyıcıları kullanılır. Eğer bir yöntem gelecekte SSS ilaçlarının keşfi üzerinde büyük bir etkiye sahip olarsa Çizelge 2.1'de yer alanyöntemlerin detaylı incelemesi gereklidir. Ayrıca kan beyin engeline girişi artırmak için *P-gp* inhibitörlerinin kullanımı da bir yaklaşımdır (11, 42, 43). *P-gp*'yi inhibe eden bileşiklerin *P-gp* aracılı çoklu ilaç direncini tersine çevirdiği ya da aksi halde geri atım nedeniyle tedavide başarısız olacak SSS ilaçlarının kan beyin engeli geçişini artırdığı fikri kabul görmüştür. Ancak bu tarzda bir yaklaşımda *P-gp* fonksiyon bozukluğu hem Parkinson hastalığında olduğu gibi toksinlerin birikim seviyesini artırabileceği hem de Alzheimer hastalığında olduğu gibi beyin geri atım proteinlerinin yeteneğini zayıflatabileceği için, tedavi boyunca izlenmelidir (25).

Çizelge 2.1.Kan beyin engelinden SSS'ne ilaç taşınması için farmakolojik izlemler (11)

İzlem	Gereke/Görüş
Lipitte çözünürlüğü artırmak için ilacın modifikasyonu	Bir ilacın lipit çözünürlüğü ve <i>in vivo</i> KBE geçirgenliği arasında iyi bir ilişki vardır.
Transport/taşıyıcı sistem kullanımı	Glukoz ve doğal aminoasitler gibi taşıyıcı sistemler yüksek taşıma kapasitesi ve KBE geçişinde artış sağlar.
İlaç taşınmasını engelleyen ya da ilacı SSS'nden uzaklaştıran geri atımtaşıyıcıların inhibisyonu	İnhibitör kullanımı yanında bu transporterların substratı olmayan ilaç geliştirmek de bir yaklaşımdır.
Truva atı yaklaşımı	Etken maddenin bir vektöre bağlanarak katalizlenmiş taşıyıcı mekanizma ile geçişinin sağlanması KBE'den Truva atı benzeri bir aldatma ile geçişini sağlar.

Başka bir yolla nakledilemeyen bir ilacın disülfid bağı ile bir KBE taşıyıcı vektörüne bağlanmasıyla oluşan şimerik peptid	Şimerik peptidler kapiler endotelial hücreler tarafından beyne geçişi sağlanırken disülfid redüktaz yardımıyla aktif kısım ayrılır.
Monoklonal antikör füzyon proteinlerinin bir ilacın taşıyıcı vektörüne konjugasyonuna katılımı	KBE'den geçemeyen spesifik antijen bağlayan monoklonal antikörler insülin benzeri büyüme faktörü gibi vektörlere bağlanır. Bu çift fonksiyonlu molekül insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü yardımıyla kan beyin engelini geçebilir.
Ön ilaç biyodönüşüm stratejileri	Daha lipofilik türevlere kimyasal modifikasyonlarla küçük hidrofilik moleküllerin KBE'den geçişini ve taşıyıcı aracılı ön ilaç taşınmasını artırır.
Nöroimmünofilinler (küçük moleküllü nörotropik faktörler)	Oral olarak uygulanabilir ve KBE'yi geçebilir.
Beyne hedeflendirilmiş kimyasal sistemler	Bu ilaçları sadece taşımak için değil aynı zamanda hedeflemek için de akılcı bir ilaç tasarım yaklaşımıdır.
SSS bozukluklarında terapötiklerin taşınması için gen kullanımı	Nanoteknoloji gen taşınmasını geliştirebilir.
KBE'den ilaç taşınması için nanopartikül tabanlı teknolojiler	Nanopartiküllerle taşıma teknolojisi-nin primer üstünlüğü nanoparti-küllerin terapötik ilaç molekülünün KBE sınırlı özelliklerini maskeler ve beyinde ilaç salımını yavaşlatabilir, periferel toksisiteyi artırabilir.

SSS'nde ilaç derişimini artırmanın en kolay yolu sistemik dozu artırmaktır. Beyin dokusu ve *serebrospinal* sıvıya ilaç girişi kan, *serebrospinal* sıvı ve beyin dokusu arasındaki *difüzyonel* engellerin geçici olarak, yapay bozulması, örneğin

hiperozmotik bileşiklerin ya da alkil gliserollerin *intraarterial* enjeksiyonu ile artırılabilir. SSS'nde yüksek ilaç derişimi sağlamanın etkili ancak girişimsel bir yolu da *intravenöz* uygulamaya ek olarak *intraventriküler* enjeksiyondur (20).

2.3.1. Ultrason veya Yüzey Modifikasyonu ile Kan Beyin Engelinde Harabiyet

Kan beyin engelini bozulmasıyla (*disruption*) madde geçişinin artırılması için çeşitli yaklaşımlar denenmiştir. Bunlardan birincisi MRI rehberliğinde *ultrason* kullanarak geçişin artırılmasıdır. Ayrıca *ultrason* ile birlikte mikro baloncuk taşıyıcı sistemler kullanılarak geçişin artırıldığı tespit edilmiştir (44). Mannitol belli bir akış hızında *karotid artere* uygulanarak geçici olarak engelde hasar meydana getirmiştir. Ayrıca *sodyum lauril sülfat, etanol, DMSO, gliserol ve tween 80* kullanılarak da hasar oluşturulmuştur. Ancak vasküler patoloji ve beyinde kronik nöropatolojik değişikliklere yol açma riski nedeniyle fazla kullanılmamaktadır (45, 46).

2.3.2. Nanopartikül Kullanımı

Kan beyin engelinden beyne ilaç taşınması için nanopartiküllerin kullanımı güncel izlemlere önemli üstünlük sağlamaktadır. (47). Sistem beyinde ilaç salımını yavaşlatabilir, periferik toksisiteyi artırabilir. Taşınmayı etkileyen faktörler; kullanılan polimer ve yüzey etken madde tipi, nanopartikül büyüklüğü ve ilaç molekülüdür (11, 48, 49). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek amacıyla nanotaşıyıcılar SSS terapötikleri için ilaç taşıyıcı sistemler olarak araştırılmaktadır (50-52). Nanotaşıyıcı terimi değişik pek çok ilaç taşıyıcı aracı kapsar: dendrimerler, miseller, lipozomlar, nanoboyutlu seramikler ve polimerik nanopartiküller. Bu nanotaşıyıcılar taşıma etkinliğini artırmak, hedef dışı etkileri azaltmak, ilaç kinetiklerini geliştirmek ve kimyasal olarak farklı tipte terapötik ajanların taşınmasına izin vermek amacıyla kullanılırlar. SSS'ne ilaç taşınmanın hedefleri için nanotaşıyıcılar sistemik (Kan beyin engelinden geçiş) ve lokal (Kan beyin engelinden sonrası) taşıma için uygun hale getirilebilmelidir (31). *Antinosiseptif opioidpeptid Dalarjin* kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalar hem boş *poli(bütül siyanoakrilat) (PBCA)* nanopartiküllerinin hem de *polisorbat 80'in* dalarjinin beyne *antinosiseptif* etki için yeterli miktarda girişine izin vermediği gösterilmiştir. Sadece dalarjin adsorbe ettirilmiş PBCA nanopartikülleri hayvanlarda *antinosiseptif* etkiyi indüklemiştir (53).

Lipozomal formülasyonlar ilaçların kan beyin engelinden taşınmasını sağlayabilir ve içeriklerinin bir kısmını kan beyin engeli içinde salabilirler. Sinir büyüme faktörü, *in vivo* enzim parçalanmasından korunmak için lipozomlara (100 nm büyüklükte) enkapsüle edilmiş ve kan beyin engelinde etken madde geçişini arttırmıştır (54). Peptid ya da protein yapılı ilaç yüklü lipozomlar beyin *kapiller endotel* hücrelerine ve hastalıklarının tedavisindeki avantajları nedeniyle özgül olarak lipozomlara hedeflenebilir (55).

Organik olarak yapısı değiştirilmiş silikat nanopartiküllerinin (30 nm) non-viral vektör olarak gen taşınmasında kullanıldığı ve hiçbir toksik etki görülmeden viral vektörle elde edilen sonuçlardan daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (56).

Beyne nanopartikül aracılı ilaç taşıma girişimsel taşıma araçlarına olan gereksinimi en aza indirebilir; özel durumlarda implantlara ve beyne ve *serebral ventriküllere* doğrudan ilaç taşımaya ihtiyaç vardır. Nanoteknoloji bu cihazların yapımındaki gelişmelere olanak sağlar. Karbon nanotüpler bu konudaki örneklerden biridir. Konvansiyonel silikon implantların yerini almak için ümit vaat eden karbon nanotüpler, 1-10 nm çapında, karbon atomlarının sarılı tabakalarıdır. Karbon nanotüpler, *astrosit proliferasyonu* nedeniyle meydana gelen yaraların oluşumuna engel olacak şekilde SSS hücreleri ile etkileşirler (31, 57).

2.3.3. Endojen Madde Geçiş Sistemi Yardımıyla Aktif Taşınma

Kan beyin engeli, beyin engelinde yerleşmiş, pek çok kimyasal madde ve mikroskopik nesnenin kandan beyne geçişini kısıtlayan, hücresel ve çok fonksiyonlu bir engeldir. Santral sinir sistemi kompartımanları, *immünoglobülinler* gibi büyük hidrofilik moleküllerin bile beynin *ekstraselüler* bölgesine ve serebrospinal sıvıya geçişine izin veren bir kaç zayıf bölge dışında en az bir lipid membran içeren difüzyonel bir engel ile sınırlıdır. Özellikle beyin metabolizması için *substrat* olan diğer bileşikler, beyne derişim farkı nedeniyle difüzyonla daha kolay girerler. Kan beyin engelinden difüzyonla geçebilen moleküllerin önemli örnekleri glukoz, aminoasitler ve ön ilaç L-3,4-dihidroksifenilalanindir (L-DOPA) (58). Pek çok aktif ilaç geri atımtaşıyıcıları kan-beyin/kan-serebrospinal sıvı engelini işlevine önemli ölçüde katkıda bulunur (59).

Besinler ve iyonlar, amino asitler, vitaminler ve proteinler gibi beyin fonksiyonlarının devamını sağlayan maddelerin kan beyin engelini geçişi için plazma

membranlarında gömülü özel taşıyıcı sistemler mevcuttur. Kan beyin engelinden geçiş genel olarak aşağıdaki mekanizmalar ile gerçekleşir (59):

Taşıyıcı aracılı taşınma, kan beyin engelinin beyin ve kan membranlarında bulunan moleküler taşıyıcılar tarafından gerçekleştirilir. Bu taşıyıcılar iyonlar ve aminoasitler gibi küçük moleküllerin taşınmasında yüksek stereoseçicilik ve fonksiyon gösterir. Doğal substratlara konjugasyonla madde geçişi sağlanabilir (60).

Reseptör aracılı taşınma, kan beyin engelinde gerçekleşir. Bu mekanizma ile demir insülin ve leptin gibi besinlerin beyne girişi sağlanır. Bu mekanizma aynı zamanda *transsitozis* olarak da bilinir. Genel olarak ligandın endotelial hücrenin apikal plazma membranındaki özgül reseptör ile etkileşime geçmesidir. Ligandla bağlantı sağlanınca geçiş gerçekleşir (59).

Emilim aracılı *transsitoz* diğer iki mekanizmadan farklı olarak seçici olmayan yük tabanlı etkileşimlere bağlıdır ve temel olarak polikasyonik moleküllerin plazma membranındaki negatif yüklere bağlanmasıyla geçiş olarak tanımlanabilir. Ancak bu yöntemseçici emilim yerine geniş bir alana yayılan emilime neden olur. Bu nedenle kullanımları sınırlıdır (59).

Bu sistemlerden ilaç taşınması amacıyla faydalanabilmek için tedavi sağlayan madde veya taşıyan yapının hedefleme sağlayan taşıyıcı moleküle bağlanması sağlanmalıdır. Bu taşıyıcı doğal bir ligand veya peptid ve antikorlar gibi yapay ligandlar olabilir (61).

Etken maddelerin *serebrospinal* sıvı derişimi ve BOS/serum eğri altı alan (AUC) oranları sadece fizikokimyasal özelliklerine değil aynı zamanda bu maddelerin taşıyıcı sistemlerine ilgilerine de bağlıdır (31).

P-gp lipofilik bileşikler için oldukça geniş bir spektruma sahiptir. Pompa, yaklaşık 300-4000 Da ağırlığında substratlara bağlanabilir (62). *P-gp*'nin moleküler mekanizması son zamanlarda *X-ışını* yapı analizi ile ortaya çıkarılmıştır (27). Kan beyin engelinin bazı *antienfektiflere* maruziyeti *P-gp* miktarını artırabilir. İnsan beyin mikrodamarlarında endotelial hücre hattının Rifampin, HIV proteinaz inhibitörleri Atazanavir ya da Ritonavir ile etkileşimi *P-gp* ekspresyon seviyesini sırasıyla 1.8, 6 ve 2 kat artırır (63). Bu geri atımpompa sistemi özellikle HIV proteinaz inhibitörleri ve makrolidlerin SSS'ndeki derişimini etkiler. 2 (PEPT) ağırlıklı olarak koroid pleksusta yerleşmiştir. 2 (PEPT) gibi zayıf organik asitlerin taşıyıcı sistemlerinin

çoğunda etken maddelerin SSS'ndeki farmakokinetikleri üzerindeki etkisi vardır. Ancak günümüzde fizikokimyasal özelliklere dayanarak bir ilacın *P-gp*'nin güçlü bir ligandı olup olmadığını tahmin etmek güçtür (20).

Laboratuvar hayvanlarındaki önemli metabolik yollar insanlarda önemsiz ya da az rastlanır olabilir. Hayvan modelleri, insan hastalıklarını tamamen tanımlamaz. Ancak SSS terapötüğü adaylarından yalnızca % 3-5' i pazarlanabilmektedir. Geleneksel faz 2 çalışmalarında etkinliğin gösterilmesini beklemek gittikçe daha masraflı hele gelmesi nedeniyle bu çalışmalar önemlidir (64).

2.3.4. İntranazal Taşıma

Intranasal (IN) taşıma girişimsel yöntemlere alternatif olarak koku alma ve nazal pasajı sinir sistemine bağlayan "*trigeminal*" ve koku (*olfactory*) yollarından faydalanarak kan beyin engelini atlamak ve peptidler, proteinler, oligonükleotidler, viral vektörler ve hatta kök hücreler gibi terapötikleri hızla SSS'ne hedeflemek için ön plana çıkmıştır (65, 66). Bu girişimsel olmayan yöntemi kullanmaktaki yenilik SSS bozukluklarında ilaçları hızla doğrudan nazal mukozadan beyne ve omuriliğe taşıyarak sistemik maruziyeti en aza indirmektir. İntranazal yolla uygulanan peptid ve proteinlerin insanlarda yararlı etkileri olduğunu kanıtlamıştır. İntranazal yol uzun zamandır etkinin hızlı başlaması, *enjeksiyonluk* olmayan uygulama yöntemi kullanılması gibi pek çok üstünlüğü ile bilinmektedir (6).

Tekrar üretilebilirliğin zorluğunun yanında intranazal yolun en büyük sakıncası olan nazal epitelinden sınırlı emilim uygulamayı özellikle potent maddeler için kısıtlar. Bu durumun geçirgenlik arttırıcılar kullanılarak düzeltilebileceği çeşitli çalışmalarla açıklanmıştır (24).

2.3.4.1. Nazal EpitelEngelinden Geçiş

Koku ve solunum epitelinin oluşturduğu engellerden geçiş hücre içi yada hücre dışı yollarla gerçekleşebilir. Koku epitelinde *interselüler* yollar, endositoz, koku soğanına intranöronal transport ya da destek hücrelerden *lamina propria*ya *transselüler* taşınmadır. Solunum epitelinde gerçekleşen hücre içi yollar, epitel yüzeyine yakın *periferal trigeminal* sinir endositozu ve beyin köküne hücre içi taşınma ya da solunum epitelinin diğer hücrelerinden *lamina propria*ya *transselüler* taşınmasıdır. Koku ya da solunum epitelinden *ekstraselüler* taşınma yolları öncelikli olarak *lamina propria*ya *paraselüler* difüzyonu içerir(67).

İntranazal uygulama ile özellikle nazal boşluğun üst kısmından, farklı bileşiklerin girişimsel olmayan yollarla ve büyük yan etkiler gerçekleşmeden SSS'ne doğrudan ilaç taşımının başarıldığı gösterilmiştir (68).

Intrakranial ve *intraspinal* alan farklı bölümleri içerir. Bir bölümün tek bir bölgesinde bile, örneğin *serebrospinal* sıvıda, kompartımanın *ventriküler*, *sisternal* ve *lumbar* bölgelerinde ilaç derişiminde önemli farklılıklar oluşabilir (69). Bu durum SSS'nin *ekstraselüler* alanı için de doğrudur (39). İnsandaki çoğu çalışmada *serebrospinal* sıvının *ventriküler* ve *lumbar* kısımlarındaki ilaç derişimi çalışılmış ve doku homojenizatlarındaki (sadece beyin dokusu değil) ilaç derişiminin değerlendirilmesi yapılamayacağı için *serebrospinal* sıvıya odaklanılmıştır.

Serebrospinal sıvı, immünolojik olarak aktif bir vücut sıvısıdır. Beyin ve omurilik, bu hassas dokular için koruyucu bir dolgu maddesi oluşturan ve SSS'nin metabolizasyon ve *homeostazına* katkıda bulunan *serebrospinal* sıvı içinde yüzer. *Serebrospinal* sıvının büyük çoğunluğu beynin *ventrikülleri* içinde bir *stroma* içine gömülü gözenekli endotelle birlikte kapiller ağlardan oluşan *koroid pleksus* tarafından üretilir. *Koroid pleksusun stroması* tek tabakalı epitelyum hücreleri ile kaplıdır. *Serebrospinal* sıvının küçük bir kısmı SSS'nin *interstisyel* sıvısından difüzyonla elde edilir. *Koroid pleksusun pulsasyonu* ve ventrikülleri kaplayan *ependimal* hücrelerin üzerindeki *siliaların* etkisiyle ileri itilen *serebrospinal* sıvı ventriküllerden beyin köküne dolaşır omurilik, beyin kökü, beyincik ve *serebral* korteksin dış yüzeyini kaplamak üzere dışarı çıkar. *Serebrospinal* sıvının kana doğrudan tekrar emilimi araknoid membranın *duraya* doğru, *serebrospinal* sıvının venöz kana maruz kaldığı venöz sinüsler içindeki dışarı doğru çıkımları olan "*arachnoid villi*"de gerçekleşir. *Serebrospinal* sıvı hacmi yaklaşık 140-200 mL'dir. Günlük *serebrospinal* sıvı üretimi ortalama 500 mL olduğu için sıvı günde 3-5 kez yenilenir (70).

Nazal yolla ilaç uygulaması nazal konjestiyon, allerji ve enfeksiyon gibi lokal hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Son yıllarda çeşitli nazal formülasyonların nazal boşluktan sistemik dolaşım için kullanımı araştırılmaktadır. Araştırmalar sonucu ilaç taşıyıcı sistemlerin burundan ilaç uygulamasının başarılı olacağı gösterilmiştir.

Santral sinir sistemi ilaç uygulamasında karşılaşılan en karmaşık engele sahip sistemlerden biridir. Kan beyin engeli endotel hücrelerden oluşan santral sinir sistemine ve sistem içinde ilaç difüzyon hız ve miktarını düşüren engeldir.

Epilepsi, analjezi, migren, beyin tümörü, ensefalopati, beyin damar hastalıkları, beyin hemorajı, depresyon ve Alzheimer hastalığı gibi SSS hastalıklarının tedavisi amacıyla günümüzde birçok çalışma mevcuttur. Birçok nöro-aktif ilacın etki gösterememesinin temel nedeni etkinlikleri değil sistemik toksisite oluşturmadan hedef bölgeye ulaştırılamamasıdır. SSS'ye ilaç hedeflenmesi yetersiz ilaç emilimi, GI bölgede inaktivasyon, parenteral olmayan yollarla uygulamadaki etki kaybı veya hızlı etkinin istenmesi nedeniyle sınırlıdır. Son yıllarda SSS'de hızlı etki istenmesi ve parenteral yola alternatif olması nedeniyle nazal yol araştırılmaya başlanmıştır. Damarca zengin yapısı nedeniyle yüksek geçirgenlik kapasitesine sahip nazal mukoza hidrofilik, P-gp substratı ve peptid-protein yapıları etken maddelerin uygulanması için potansiyel bir yol olarak ön plana çıkmıştır.

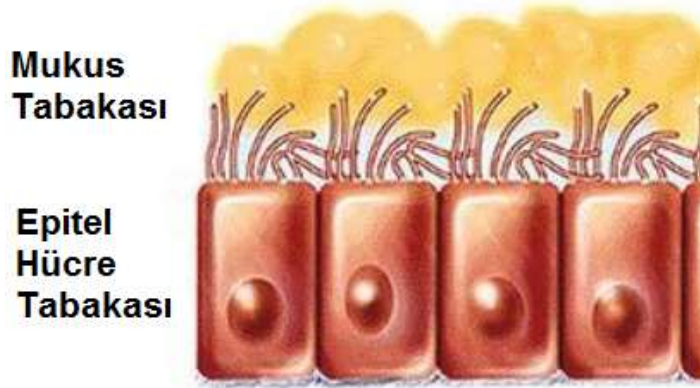
İnsan ve hayvan denekler üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde intranazal uygulamanın sadece sistemik dolaşıma ilaç taşınmasında değil aynı zamanda SSS'ye de taşınmada etkili olduğu tespit edilmiştir. İntranazal ilaç uygulaması güvenli, hasta uyuncu gösteren ve hızlı etki alınan bir yoldur. Daha önemlisi bu uygulama hastanın kendisi tarafından yapılabilir. Bazı çalışmalarda etkinin intravenöz uygulamadan daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Karaciğer ilk geçiş etkisi yine bu uygulama ile önlenmiş olur. Terapötik indeks artırılırken toksisite riskinin en aza indirilmesi ile düşük dozlarda ilaç uygulanması sağlanır ve maliyet etkinlik ile hasta uyuncunun artırılması sağlanır. Yukarıda sıralanan tüm bu nedenler neticesinde intranazal ilaç uygulaması akademik ve sanayi araştırmalarında dikkat çekici bir şekilde artış göstermektedir (2).

Düşük dozlarda veya düşük hacimli ilaç uygulanması özellikle düşük suda çözünürlük veya stabilite gösteren ilaçların nazal yolla uygulamasında kısıtlamalara neden olur. Nazal mukozadan geçişin sağlanabilmesi için yağda çözünürlük taşınması gereken bir özelliktir. Enzimatik bozunmaya uğrayan ve yüksek molekül ağırlıklı ilaçların bu yolla uygulandıklarında biyoyararlanımı düşüktür. Bu yolla uygulanan ilaçların kokusuz olması ve iritan özellik göstermemesi istenir (70).

2.3.4.2. Nazal Mukozadan İlaç Geçiş Mekanizmaları

Nazal boşluğun solunum ve koku bölgesi yüzeyleri burundan beyne ilaç geçişinden sorumludur. Lipofilik ilaçlar genelde basit difüzyonla iyi emilirler ve intravenöz uygulamaya benzer kan derişim profili oluştururlar. Diğer bir yandan polar moleküller iyi emilim göstermezler ve nazal mukozadan geçişleri düşüktür. Bu nedenle SSS'ye geçişleri sınırlıdır (71). Ayrıca polar moleküllerin moleköl ağırlıkları arttıkça emilimleri azalır. Örneğin yüksek moleköl ağırlığına sahip peptid ve protein yapıları (genelde %1'den düşük) düşük moleköl ağırlıklı polar ilaçlara göre (yaklaşık %10) daha düşük biyoyararlanım gösterirler (2). Moleköl ağırlığı düşük olan (1000 Dalton'dan küçük) ilaçlar genellikle paraselüler yolla taşınırlarken normal şartlarda polar moleküller veziküler (*pinositik ve endositik*) taşınma mekanizmalarını kullanırlar. Bu nedenle kimyasal modifikasyon veya kompleks oluşturularak lipofilisitenin yükseltilmesi biyoyararlanımı arttırabilir. İlaç taşınmasını etkileyen diğer önemli kritik faktör ise nazal boşluktan mukosilyer klirenstir (72).

Mukosilyer yapı Resim 2.2'de gösterilmiştir. Genelde oluşumu 15-20 dakika sürer. Bu süreç içerisinde uygulanan formülasyon temizlenir ve sonuçta damarlı yapı ve epitelyum ile formülasyon arasında kısıtlı temas zamanı sağlanır. Ancak Dhanda ve diğer. (66) tarafından yapılan çalışmalarla nazal boşluğun iç kısmında mukosilyer klirensin bir miktar uzadığı ve bu kısma ilaç uygulanması ile temas süresinin uzatılarak emilimin arttırılabileceği tespit edilmiştir. Özellikle peptid ve proteinler için nazal mukozadan ilaç geçişini etkileyen önemli faktörlerden birisi de enzimatik bozunmadır. Nazal boşluktaki endopeptidaz ve ekzopeptidazlar peptid ve proteinlerin 'N' ve 'C' terminallerinden ayrılmaya neden olur (73). Yüzey etken maddeler, safra tuzları ve türevleri, yağ asitleri ve türleri ve siklodekstrinler nazal olarak uygulanan ilaçların emilim hız ve oranında artışa neden olurlar. Genellikle bu geçirgenlik arttırıcılar, epitel hücrelerdeki fosfolipit çiftte tabakada değişikliğe neden olarak geçirgenliği değiştirirler. Bazı durumlarda ise sıkı kavşakları etkilerler veya enzimatik bozunmayı önlerler. Bu ajanlar bu mekanizmalardan biri veya birkaçını kullanarak nazal yolla uygulanan ilaçların biyoyararlanımını arttırırlar (74, 75). Ancak nazal mukoza üzerinde toksik etki veya kalıcı hasar meydana getirme riskleri vardır.



Resim 2.2. Mukosilyer yapı(76)

2.3.4.3. İlaçların Uygulanmasında Nazal Yol

Nazal yolla ilaçların uygulanmasında formülasyonun hızlı ve etkin bir şekilde nazal mukozadan geçişi SSS'ye ilaç geçişi açısından önemlidir(65). Nazal mukozadan SSS'ye ilaç geçişi ilacın fizikokimyasal özellikleri, formülasyon tasarımı ve emilim bölgesinin fizyolojik durumu gibi etkenlere bağlıdır. Bu faktörlerin dikkate alınmasıyla daha iyi bir etki sağlanabilir(77).

2.3.4.4. Burundan Beyne Taşınma Yolakları

Nazal boşluktan beyne ilaç taşınması üç ana yoldan gerçekleşir. Birincisi sistemik dolaşıma ilaç taşınması ve buradan kan beyin engelinden geçiş sağlanarak beyne ilacın ulaşmasıdır. Kan beyin engelini aşarak ilaçların burundan beyne ilaç taşınmasında kullanılan diğer iki doğrudan taşıma yoluğu koku ve trigeminal sinir yolaklarıdır. Koku bölgesi kullanılarak ilaç taşınması intranöronal ve ektranöronal yolaklar kullanılarak gerçekleştirilir. İntranöronal yolak uzun sürelidir. Trigeminal yol kullanılarak geçiş difüzyon işlemi ile gerçekleştirilir. Koku epiteli emilim için ana yolaktır. Küçük ve yüksüz moleküllerin bu yoldan geçişi kolayken, daha büyük veya yüklü moleküllerin geçişi daha zordur (78).

2.4. Nazal uygulamada Santral Sinir Sistemine İlaç Hedeflendirilmesi

İçin Kritik Faktörler

Nazal boşluğun farklı anatomisi ve fizyolojisi nedeniyle ilaç birikimi ve birikme alanı uygulama aletine bağlıdır (79). İlaç birikimi uygulama tipi, formülasyon partikül boyutu, uygulanan partiküllerin hızları, püskürtme açısı ve genişliğinden etkilenir. Uygulanan sistemin seçimi kullanılan etken maddenin terapötik etkinliği, hasta popülasyonu ve piyasa ihtiyaçlarına göre değişiklik göstermektedir.

Farmakokinetik özellikler ve buna bağlı olarak biyoyararlanım dozaj formuna göre değişmektedir. İntranazal ilaç uygulamasını etkileyen fizikokimyasal, formülasyondan kaynaklanan ve fizyolojik faktörler bulunmaktadır (78):

2.4.1. İlaçların Fizikokimyasal Özellikleri

2.4.1.1. İlacın Kimyasal Yapısı

Tüm formülasyonlardan ilaç emiliminin oranı ve hızı, etken maddenin kimyasal özelliklerinden etkilenir. Bu yüzden emilim işleminde kritik basamaklardan birisi ilacın kimyasal yapısıdır. Örneğin bir ilacın tuz ve ester formu arasındaki dönüşüm emilimi etkiler. Nazal boşluk sitokrom (CYP) P450 enziminin izoformları olan CYP1A, CYP2A, CYP2E, karboksilesterazlar ve glutatyon S-transferazlara ev sahipliği yapar. Bu nedenle intranazal önilaç uygulaması da yapılabilir (80, 81).

2.4.1.2. Polimorfik Geçişler

Polimorflar bir ilacın farklı kristal formlarıdır. İlacın çözünmesi o ilacın mide barsak bölgesindeki çözünürlük profiliyle alakalıdır. Vücut sıvılarında farklı çözünürlükleri nedeniyle polimorflar çözünme hız ve oranını etkiler. Bu nedenle farklı polimorfların biyolojik membranlardan emilimi farklıdır. Ostwald-ripening veya yaşlanma nedeniyle kristal yapı morfolojisindeki farklılıklar etken maddenin çözünürlüğünü değiştirebilir. Ayrıca bir maddenin stabil olmayan polimorfik formundan metastabil formuna geçişi de çözünürlük özelliğini ve dolayısıyla nazal emilimini etkiler. Büyük kristallerin alan hacim oranı küçük kristallere oranla küçüktür ve bu nedenle çözünme hızı kinetikleri bu durumdan etkilenir. Sıralı ve düzenli moleküller enerjisel olarak sıralı olmayan moleküllere göre daha stabildirler. Bu nedenle polimorfların farklı kristal yapısı ve düzeni, ilacın çözünmesi ve emiliminde farklılığa neden olur (82, 83).

2.4.1.3. Molekül Ağırlığı

Literatüre göre bir ilacın molekül ağırlığı arttıkça emilimi azalır. 300 daltona kadar olan moleküllerde molekül ağırlığı ile emilim arasında doğrusal bir ters orantı mevcuttur (84). Ancak molekül ağırlığı 1000 daltondan büyük olan bazı moleküllerle emilim artırıcı kullanılmasıyla bu oran tersine çevrilebilir. Yüksek molekül ağırlığına sahip salmon kalsitoninin (4400 dalton) emilim ve geçiş arttırıcılarla birlikte intranazal olarak uygulanması sonucu emiliminde kaydadeğer bir artış gözlenmiştir (85).

2.4.1.4. Partikül Büyüklüğü

Nazal ilaç taşıyıcı sistem tasarımında partikül boyutu ve şekli diğer bir kritik parametredir. Nazal uygulama sonrası küçük partiküller akciğerde depolanma eğilimindedirler. Genel kural olarak 10 mikrondan daha büyük partiküller nazal boşlukta bulunurlar. Daha küçük çapa sahip partiküllerin yüzey alanı daha geniş olması nedeniyle nazal mukozada tutulumu ve emilimi artar. Ancak mikronize edilmiş partiküller boğaz ve akciğere yönelmeleri nedeniyle ters etki gösterebilir. İntranazal ilaç uygulama sonrası optimum emilim elde edilmesi için partikül boyutu ve şekli bir dengeye getirilmelidir (84).

2.4.1.5. Çözünürlük ve Çözünme Hızı

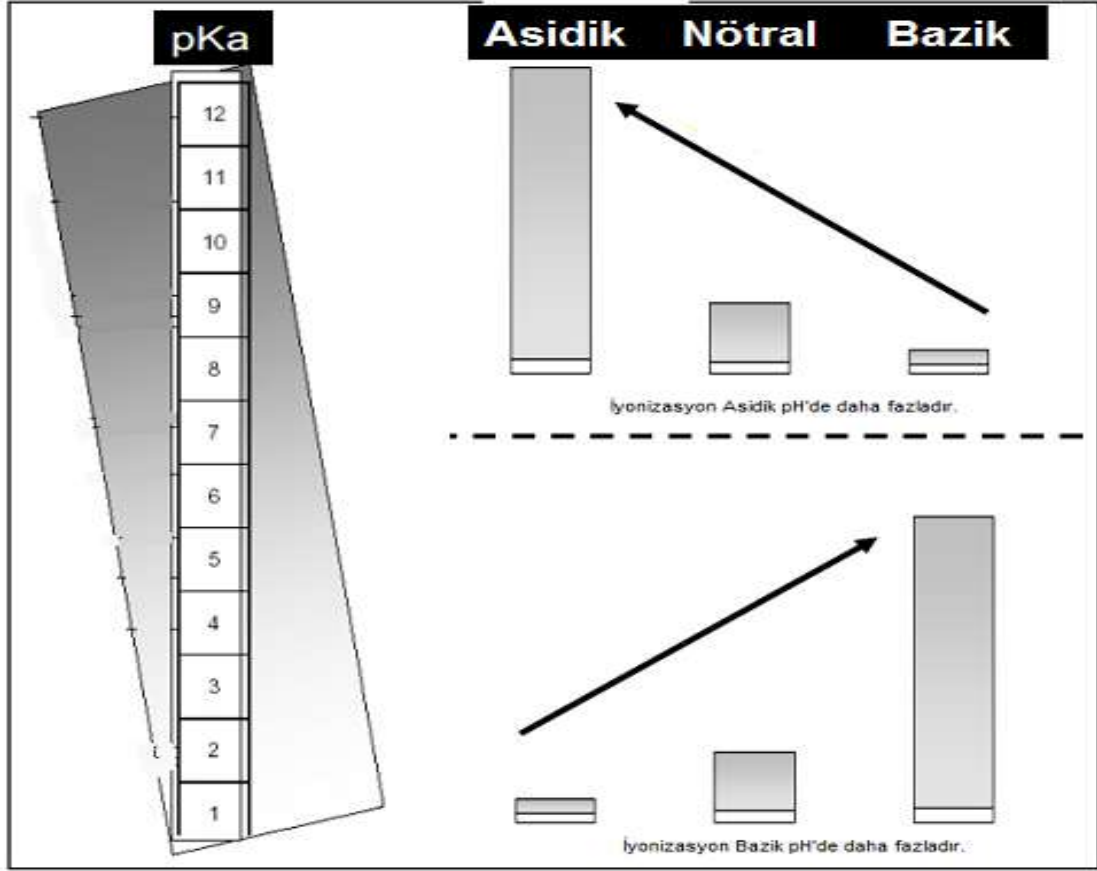
Toz, jel ve süspansiyon gibi katı ve yarı-katı ürünlerden etken maddenin emilim hız ve oranı üzerine etkilidirler. Nazal boşlukta depolanan ilaç partikülleri emilmeden önce çözünmelidir. Nazal sıvı ve sekresyonda partiküllerin düşük çözünme hızları nazal mukozadan geçişi azaltır. Katı partiküller nazal mukozada irritasyona yol açacağı için boşluktan daha hızlı eliminasyona neden olur. Partiküller nazal mukozadan hızla temizleneceği için iyi emilim gösteremezler. Diğer faktörlere ek olarak partikülün nazal mukozada bulunma zamanı arttırıldığında nazal mukozadan geçişi de artar. Islanma özelliklerinin iyi olması da emilimde bir faktördür (78).

2.4.2. Formülasyondan Kaynaklı Faktörler

2.4.2.1. pH

İntranazal ilaç uygulamasında formülasyonun pH'si ve etken maddenin pKa'sı önemli yaklaşımlardır. Siliyer hareketler gibi fizyolojik hareketlerin normal koşullarda devamı için formülasyonun pH'si nazal sekresyon pH'sine (5.5-6.5) olabildiğince yakın olmalıdır. Formülasyonun nötral veya nötrale yakın pH'ye sahip olması (5-7 arası) mukozal irritasyon veya diğer komplikasyonların ortaya çıkmasını önler. Ayrıca pH antioksidan ve koruyucular gibi yardımcı maddelerin etkinlikleri için önemli bir faktördür. Nazal sekresyon veya formülasyon pH'sindeki çok küçük bir değişiklik koruyucu etkisi için önemli olabilir. Formülasyonun pH'sinin 3 ten küçük veya 8 den büyük olması da lizozim gibi yokluğunda ciddi sorunlara yol açacak nazal enzimlerinin inaktivasyonuna neden olur. Handerson Hasselbach eşitliğine göre etken maddenin pKa'sı nazal uygulama sonrası non-iyonize: iyonize ilaç oranının hesaplanmasını sağlar. Nazal mukozadan ilaç geçişi ilacın noniyonize formunun

oranından ciddi şekilde etkilenir. İlaçların pKa'sı ile iyonizasyon arası ilişki Şekil 2.1'de gösterilmiştir (78).



Şekil 2.1. İlaç uygulamasında pKa- iyonizasyon arasındaki ilişki (78)

2.4.2.2. Tampon Kapasitesi

Nazal boşluğun toplam yüzey alanı yaklaşık 180 cm²'dir. Nazal formülasyonlar bu nedenle 25 ila 250 µL (ortalama 100 µL) gibi küçük hacimlerde uygulanır(84). Uygulanan dozun küçük olması nedeniyle nazal sekresyonlar formülasyon pH'sini değiştirebilir. pH'deki değişim noniyonize: iyonize ilaç oranını ve dolayısıyla emilimi de değiştirir. Formülasyonun uygulama bölgesinde pH'sinin devamlılığı açısından uygun tampon sisteminin eklenmesi önemlidir. Tampon ajanlarının seçimi formülasyonun son pH' sine bağlıdır.

2.4.2.3. Osmolarite

Hipertonik çözeltiler nazal siliyer aktiviteyi engeller ve epitelyum hücrelerde daralmaya yol açarlar. İyonize formdaki etken ve yardımcı maddeler formülasyonun toplam ozmolaritesini arttırabilir. Osmolarite sodyum klorür, mannitol, sükröz vb maddelerin kullanımı ile ayarlanabilir. Nazal formülasyonlar hazırlanmadan son ürün

izotonik olacak şekilde ozmolarite ayarlanmalıdır. Genelde 300-310 miliozmolar derişimindeki çözeltiler çoğu vücut sıvısı için izotonik kabul edilir ve kullanılır (86).

2.4.2.4. Jelleşme Ajanları veya Jel Oluşturan Taşıyıcılar

Nazal boşlukta formülasyonun bulunma süresinin uzatılması ilacın emilim hız ve oranının artırılmasına ve buna bağlı olarak terapötik etkinin artırılmasını sağlar. Nazal preparatlarda viskozitenin artırılması tutulma süresini de artırır. karbopol ve kitosan gibi jel oluşturan polimerler biyoadezif özellikleri nedeniyle nazal boşluğa uygulanan formülasyonun bulunma süresini artırır. Biyoadezif ajanlar ayrıca paraselüler bağlantıları açarak ve nazal boşluktaki proteolitik enzimleri inhibe ederek emilimi artırabilir (87).

2.4.2.5. Çözündürücüler

Suda çözünürlük, çözelti tip formülasyonların nazal yolla uygulanmasında her zaman bir sınırlamadır. Nazal boşluğa uygulanan ilaçların düşük hacimli olması nedeniyle çoğu formülasyon kosolvan veya çözündürücüye ihtiyaç duyar. Glikoller, düşük miktarda etil alkol, transcutol, orta zincirli gliseritler ve labrazol yardımcı çözücüler veya konvansiyonel çözücüler ilaçların çözünürlüğünü arttırmak için kullanılan ajanlara örnektir. Diğer seçenekler yüzey aktif madde kullanımı veya biyouyumlu çözücü olarak siklodekstrin kullanımı ile lipofilik emilim artırıcılar ile stabilizerlerin kullanımınıdır (88). Ancak kronik kullanımda çözücülerin nazal irritasyon, güvenlik, tolerans ve toksisite özellikleri dikkate alınmalıdır.

2.4.2.6. Koruyucular

Genelde çoğu intranazal uygulanan preparat su içerir ve mikrobiyal üremenin ve kontaminasyonun önlenmesi için koruyucuya ihtiyaç duyar. Parabenler, benzalkonyum klorür, fenil etil alkol, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve benzil alkol nazal formülasyonlarda kullanılan koruyuculardır. Koruyucular aslında siliyer fizyolojik işlemleri geciktirdiği veya değiştirdiği için nazal uygulamalarda kullanılmaması gerekir. Koruyucuların etkinlikleri formülasyonda bulunan şelasyon maddeleri ve etken maddeler tarafından düşürülebilir. Formülasyon geliştirme aşamasında bu durum göz önünde bulundurulmalı ve geçimsizlik profilleri dikkatlice çıkartılmalıdır (89).

2.4.2.7. Antioksidanlar

Birçok farmasötik içerik havayla temas ettiğinde oksidasyona uğrar ve etken madde kaybının önlenmesi için antioksidan eklenmesi (yaklaşık % 0.01-0.50 a/a oranında) gereklidir. Sodyum metabisülfid, sodyum sülfid, tokoferol, butillenmiş hidroksitoluen genelde kullanılan antioksidanlardır. Antioksidanlarla kullanılan yardımcı maddelerin ve kapların geçimliliği dikkatlice incelenmelidir (90).

2.4.2.8. Nem Çekiciler

Nem çekiciler nazal preparatlara nazal boşluktaki nemlenmenin geciktirilmesi ve böylece irritasyonun önlenmesi amacıyla konulur. Nazal mukoza dehidrasyonu propilen glikol, gliserin, sorbitol ve mannitol eklenmesi ile önlenir. Nem çekicilerin yanında sulu jel formülasyonları gerekli hidrasyon yararını sağlayabilir (91).

2.4.2.9. Emilim Arttırıcılar

Bazı etken maddeler nazal mukozadan düşük geçiş özellikleri gösterir. Geçişin arttırılması amacıyla mukozal veya hücrel engelleri modifiye ederek emilimi sağlayan emilim veya geçirgenlik arttırıcılar kullanılır. Etken maddenin düşük membran geçişi gösterdiği, enzimatik degradasyona duyarlı olduğu, etken maddenin molekül boyutunun büyük olduğu ve lipofilik olmadığı durumlarda emilim arttırıcılar gereklidir. Nazal mukoza yüzeyinde geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz değişikliğe neden olmayan güvenilir ve toksisite göstermeyen emilim arttırıcılar tercih edilir (92, 93).

2.4.3. Fizyolojik Faktörler

2.4.3.1. İlaç Depolanması ve Dağılımının Emilim Üzerine Etkisi

Nazal boşlukta uzun alıkonma süresine sahip formülasyonlar, nazal mukozadan daha yüksek oranda geçerler ve biyoyararlanımları kısa alıkonma süresine sahip formülasyonlara göre daha iyidir. Burunun ön kısmına uygulanan ilaçların burun boşluğuna uygulananlara oranla alıkonma süreleri uzundur. Burunun ön bölgesinden emilim düşükken burunun arka bölgesinde alıkonma zamanı daha kısa olmasına rağmen emilim daha yüksektir (78).

2.4.3.2. Nazal Kan Akışı

Nazal mukozal membran, ilaçların sistemik etki göstermesinde önemli olan damarlanma bakımından zengindir. Bu zengin yapı ilacın tercihen sistemik dolaşıma emilmesi nedeniyle taşımayı engeller. Test edilmemiş olmasına rağmen

vazokonstriksiyonun sistemik emilimi düşürerek SSS'ye geçişi arttıracakı düşünölmektedir (78).

2.4.3.3. Mukosilyer Klirens Etkisi

Nazal klirens mekanizmasının bütönlüğünün sağlanması toz, alerjen ve bakterilerin atılması gibi normal fizyolojik fonksiyonların devamı için gereklidir. İlaçların nazal mukozadan emilimi ilacın nazal mukozadaki epitel dokular arasındaki temas süresinden etkilenir. Ortalama mukozal dönüşüm zamanı insanlarda 5-6 mm/dk'dır. Nazal boşlukta uzatılmış alıkonma süresi biyoadezif polimerler ve mikroküre, nanopartiküller ve jeller gibi farklı formölasyonlar kullanılarak sağlanabilir (78).

2.4.3.4. Enzimatik Aktivite Etkisi

Nazal mukozada etken maddelerin stabilitesini etkileyen proteolitik ve metabolize edici (sitokrom P450) enzimler bulunur. Örneğın peptid ve proteinler nazal mukozada bulunan proteazlar ve amino peptidazlar vasıtasıyla degradesyona uğrarlar. Ancak nazal mukozadaki amino peptidaz miktarı gastointestinal bölgedekinden daha azdır. Bazı peptidler immünoglobulinler ile kompleks oluşturabilirler. Bu kompleksleşme molekül ağırlığında artışa neden olarak ilaç moleküllerinin emilimini azaltır (72, 73).

2.4.3.5. Hastalık Durumları

Alerjik rinit, nazal konjestiyon, bakteri veya virüs kaynaklı enfeksiyonlar gibi burunun fizyolojik durumları ve nazal boşlukta gerçekleştirilen ameliyatlar mukosilyer taşınma işlemini ve ilaç emilim kapasitesini etkiler. Örneğın alerjik veya enfeksiyöz rinit esnasında mukus klirensi artar ve bu ilaçformölasyonunun alıkonma zamanında düşüşe neden olarak biyoyararlanımı etkiler. Tip I diyabet gibi bazı kronik hastalıklar da nazal fizyolojide değışime neden olur. Birçok hastalık durumunda ilaç emilimi ve biyoyararlanıma etki eden nazal bölge pH' si, mukus viskozitesi ve dönüşüm hızında değışiklik gözlenir (94).

2.4.4. P-Glikoprotein

P-gp, permeabilite glikoproteini veya plazma glukoproteini olarak bilinen aktif dışa atım sağlayan membrana bağı taşıyıcı protein 1976 yılında keşfedilmiştir. ABC ailesinin ABCB alt ailesine ait olan P-gp, insanlarda 7q21.1 kromozomunda yer alan MDR1/ABCB1 geni tarafından kodlanmaktadır. İnsanlarda P-gp gen ailesinin iki

üyeyi (MDR1 ve MDR3); fare ve sıçanlarda ise bu ailenin üç üyesi (abcb1a/abcb1b ve abcc4) bulunmaktadır. Fare ve sıçanlardaki abc-b1a/abcb1b birlikte insandaki MDR1'in görevini üstlenmektedir (95). İnsan MDR1 ile fare abcb1a arasında %82 ve insan MDR1 ile fare abcb1b arasında %79 homoloji bulunmaktadır (96).

P-gp ilk ABC taşıyıcısıdır. Protein dışa atım mekanizması, taşıyıcı aracılı aktif taşıma mekanizmasıdır. Bu mekanizmayla atım için doğrudan ATP'ye gerek duyulur. ATP hidrolizi dışa atım işlemi için gerekli enerjiyi sağlar. İşlem sadece tek yönde (hücre içinden dışına doğru) ve bir seferde tek bir molekülü atacak şekilde gerçekleşir (97).

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda P-gp inhibisyonu ve indüksiyonunun ilaç etkileşmelerine neden olduğu gösterilmiştir. P-gp substratlarının ağız yolundan P-gp inhibitörleri ile birlikte kullanılması substrat ilaçların biyoyararlanımlarını artırarak terapötik etkilerini artırabileceği gibi toksisitelerinin artmasına ve yan etkilerinin şiddetlenmesine yol açabilmektedir (96).

Son derece geniş bir substrat seçiciliğine sahip olan P-gp, antineoplastik ilaçlar, immünosupresanlar, steroid hormonlar, kalsiyum kanal blokerleri, β -blokerler ve kardiyak glikozidler, antibiyotikler, antidepresanlar, antiepileptikler, antihiperlipidemik ilaçlar, H1 ve H2 reseptör blokerleri, HIV proteaz inhibitörleri gibi kimyasal yapı ve farmakolojik olarak farklı, çok sayıda hidrofobik ilacı taşıyabilmektedir (96).

İlaçların etkinliğinde bir engel olarak ortaya çıkan P-gp aracılı çoklu ilaç direncini yenmek amacıyla P-gp işlevini bloke eden moleküller elde etmeye yönelik birçok çalışma yapılmış ve çoklu ilaç direncini tersine çeviren çok sayıda molekül (multidrug resistance reversal agents) sentez edilmiştir. P-gp'yi inhibe eden bu moleküller, P-gp modülatörleri olarak da adlandırılmaktadır. P-gp ekspresyonunun ve/veya aktivitesinin modülasyonunun, P-gp substratı olan ilaçların farmakolojik profillerini geliştirmek adına yararlı bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür (98).

Dışa atım pompasının inhibisyonu ana faktör olarak etken maddelerin etkisinin artırılması amacıyla yapılır. Genel olarak P-gp üç mekanizma ile inhibe edilir: (i) kompetitif, non-kompetitif veya allosterik olarak ilaç bağlantı bölgesinin engellenmesi, (ii) ATP hidrolizinin engellenmesi ve (iii) hücre membran lipitlerinin bütünlüğünün bozulması. Bu yöntemlerin amacı biyoyararlanımın artırılması, hedef

organda ilaç emilimi ve P-gp' in selektif olarak engellenmesi ile daha etkin bir tedavi sağlanması olarak sıralanabilir. İnhibitörler substratlar olarak çeşitlendirilebilir. Birçok inhibitörün kendisi P-gp tarafından taşınır (99).

P-gp inhibitörleri seçicilik, afinite ve toksisite özelliklerine göre üç jenerasyona sınıflandırılabilir. Birinci jenerasyon inhibitörler klinik olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ancak P-gp'i de inhibe edebilen farmakolojik olarak etkin maddelerdir. Birinci jenerasyon inhibitörlerin kullanımı yüksek serum derişimlerinin (P-gp inhibisyonu için gerekli dozların) potansiyel toksisite riski taşıması nedeniyle sınırlıdır. Aynı zamanda diğer taşıyıcılar ve enzim sistemlerinin de substratı olmaları nedeniyle beklenmeyen farmakokinetik etkileşimlere neden olabilmektedir (99-101).

İkinci kuşak inhibitörler farmakolojik aktivite göstermez ve daha yüksek P-gp afinitesi sağlarlar. Ancak bu kuşakta yer alan maddeler de aynı zamanda CYP3A4 enzimini ve diğer ABC taşıyıcılarını inhibe ederler. Bu nedenle metabolizasyon hızı düşer ve iki veya daha fazla ABC taşıyıcısının inhibisyonu karmaşık farmakokinetik değişikliğe yol açar (102).

Üçüncü kuşak P-gp inhibitörleri klinik gelişim aşamasındadır. Amaçları daha düşük toksisite göstererek daha seçici P-gp inhibisyonudur. Yapı aktivite ilişkileri kullanılarak geliştirilmişlerdir ve birçoğu daha seçici bir P-gp etkinliğini daha düşük toksisite göstererek sağlar (103). P-gp inhibitörlerine ait liste Çizelge 2.2' de gösterilmiştir (99).

Etkinliğin artırılması amacıyla sadece *P-gp* inhibitörleri kullanılmaz. Monoklonal antikolar da *P-gp* inhibisyonu amacıyla etkin bir şekilde kullanılabilir. *MRK16* ve *MRK17* gibi birçok anti *P-gp* monoklonal antikoru çoklu ilaca karşı direnci ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiştir (99).

P-gp tüm substratlarının emilimini azaltsa da bu azalma ilaç miktarıyla doğrudan bağlantılı değildir. Yüksek dozda hızlı emilen ilaç uygulamalarında *P-gp* etkinliği düşer, biyoyararlanım ve farmakokinetik parametrelerde önemsiz bir hal alabilir. *P-gp* taşıyıcı etkinliğinin doygunluğa ulaşması etkisinin azalmasına yol açar. Bu nedenle *P-gp* etkisi daha çok düşük dozlarda ve yavaş emilimde görülür (99).

Çizelge 2.2. P-gp inhibitörleri listesi(99)

Kuşak	Örnekler	Seçicilik	Sınırlamalar
Birinci Kuşak	Verapamil, Siklosporin A, Rezerpin, Kinidin, Tamoksifen vb.	Seçici değildir ve düşük bağlanma afinitesi vardır.	Diğer taşıyıcıların ve enzim sistemlerinin de substratlarıdır. Farmakolojik olarak etkindirler. P-gp tarafından taşınırlar.
İkinci Kuşak	Deksverapamil, Valspodar (PSC 833), Dofekidar fumarat (MS-2099)	Birinci kuşağa göre seçiciliği yüksektir fakat diğer sistemlerle etkileşime girer.	CYP 3A4 enzimi ve diğer ABC taşıyıcılarının substratlarıdır.
Üçüncü Kuşak	Mitotan (NSC-38721), LY335979, R101933, Elakridar, ONT-093, Tarikidar (XR9576) ve HM30181	Yüksek seçicilik gösterir ve P-gp fonksiyonunu inhibe eder.	Birinci ve ikinci kuşakta görülen sınırlamalar bulunmamaktadır.

İlaç emiliminin artırılması amacıyla bir *P-gp* ile kombine halde uygulanması genelde kullanılan bir yaklaşımdır. Oral formülasyonların düşük emilimini arttırmak amacıyla *P-gp* inhibitörleri ile kombine kullanım yöntemleri mevcuttur. İlaç ve inhibitör birlikte uygulandığında eğer inhibitör de substratı ise *P-gp* aracılı taşınma mekanizması ikisi için de aynı şekilde gerçekleşir. Bu aşamada *P-gp* tarafından moleküler seviyede ilaç ve inhibitörün ayırt edilebilir olması gereklidir. İnhibitör ile substrat atılımı arası büyük fark bu şekilde gerçekleşebilir. İnhibitör maddeler dışarı atıldığında hızla tekrar *P-gp* bağlanma bölgesi ile etkileşime girerler. Bu şekilde ilaç atılımı engellenir. İşlem bileşenlerin hidrofobisitesine bağlıdır. Paklitakselin bu şekilde *P-gp* inhibitörü valspodar ile oral uygulaması sonucu biyoyararlanımında 10 kat artış gözlenmiştir(104).

İdeal bir *P-gp* inhibitörü toksik ve farmakolojik olarak etkin değildir. Bu amaçla birçok yardımcı madde etkinliği denenmiştir. *P-gp* aktivitesi yağ çifte tabakasının fiziksel durumuna bağlıdır. Kosolvan, yüzey etken madde, polimer ve lipit özellikli yardımcı maddelerin birçoğunun *P-gp*'i inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu inhibisyonun daha çok lipit membran üzerinde etkinlik göstererek gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bazı yüzey etken maddeler aynı zamanda *P-gp ATPaz* aktivitesini düşürerek de etkili olurlar (97).

Farmasötik amaçla kullanılan yardımcı maddelerin bu etkinliğinin yanında mikroküre, nanopartikül ve lipozom gibi *P-gp* etkinliğinden kaçınmak amacıyla kullanılan çeşitli formülasyon tasarımlarına ilgi artmaktadır. PEG kaplı partiküllerin *p-gp* üzerinde etkili olarak etken madde geçişini arttırdığı bilinmektedir. Yüzey etken madde kaplı polimer nanopartiküllerin etken madde geçişini arttırdığına dair çalışmalar da mevcuttur. Ayrıca bu sistemler ile etken madde ve *P-gp* inhibisyonunu sağlayacak madde tek bir taşıyıcıda veya etken madde taşıyıcı sistem içindeyken inhibitör ayrı bir şekilde uygulanabilir (97).

Kan beyin engeli, santral sinir sistemine ilaç geçişinin önlenmesinde en önemli bariyerdir. Kan beyin engelinde *P-gp* varlığı santral sinir sisteminden ilaç atılımının sağlanması nedeniyle ayrı bir engel oluşturmaktadır. *P-gp* inhibisyonu santral sinir sistemine *P-gp* substratı olan maddelerin geçişinde yardımcı olmaktadır. Kemper ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada paklitaksel ile GF120918 (Elacridar) beraber uygulanmış ve paklitaksel derişiminde 5 kat artış gözlemlenmiştir (99).

2.5. Beyne İlaç Geçişinde Kullanılan Modeller

Etken maddelerin beyin engelinden geçip geçemediğinin analiz edilmesi için farklı yaklaşımlar mevcuttur. Elde edilen veriler, maliyet ve yöntem zorluğu bakımından tüm yöntemler birbirinden farklıdır. Beyne ilaç geçişi için aşağıdaki modeller kullanılır.

2.5.1. Yapay Membranlar

Lipofilisitenin (Log P veya $P_{oktanol/su}$) santral sinir sistemi aktivitesinde ve beyne ilaç geçişinde en önemli parametre olduğu düşünülmektedir (105). Lipofilik özelliklerinden dolayı n-oktanol farmakokinetik çalışmalarda en çok kullanılan yöntemdir. n-oktanolün küçük polar başı ve hidrofobik karbon zinciri fosfolipid membranlara benzer özellik göstermesini sağlar. Ancak Log P değeri tek başına santral

sinir sistemine ilaç geçişinin açıklanması için yeterli değildir. Bunun yanında Log P yöntemine alternatif olarak yapay membranlar kullanılır. Silikaya kovalent olarak bağlanmış fosfolipidler ile hazırlanmış modifiye yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) kolonları bu amaçla kullanılır. Yapılan çalışmalarda gecikme zamanları ile su fazı ve lipozomlar arası dağılım arasında doğrusal ilişki bulunmuştur (106). Ancak lipofilik maddelerin seçilen mobil fazdaki davranışları ve stabilitesi bu yöntemin kullanımında sınırlamalar oluşturmaktadır.

2.5.1.1.PAMPA Modeli

Paralel yapay membran geçiş modeli (PAMPA) 1998 yılında Kanay tarafından ilaçların mide barsak kanalı geçişinin yüksek doğrulukla tahmini için geliştirilen bir yöntemdir (107). Bu yöntemde donör ve alıcı bölüm sıvı yapay bir membran tarafından ayrılmıştır. Test dilecek ilaç donör kompartımana konulur. Daha sonra bu maddenin alıcı ve donör fazdaki miktarları incelenir. Yüksek doğrulukta sonuç vermesi nedeniyle genellikle 96' lık hücre yuvaları kullanılır. Fosfolipitlerle hazırlanan organik çözücüler ve çözücü karışımları da yapay membran olarak kullanılabilir (108).

PAMPA yöntemiyle birçok ilacın geçişinin hızlı bir şekilde tahmin edebilmesi mümkündür. Ancak PAMPA modelinsadece pasif difüzyon ile ilaç geçişi hakkında bilgi vermektedir. Beyne ilaç geçişinde birçok taşıma yolağının ve enzimlerin etkin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle PAMPA sadece pasif transselüler geçiş hakkında bilgi verir. Örneğin P-gp substratlarının PAMPA modelinden geçişi *in vivo* ve *in vitro* hücre modellerine göre daha yüksektir (109).

2.5.2. Hücre Kültürü

İlaçların geliştirilmesi aşamasında beyne ilaç geçişinin tahmininde hücre modellerinin yaygın bir kullanımı vardır. Farklı taşıyıcı ve sıkı kavşak yapılarına sahip farklı kaynaklardan elde edilen çeşitli hücre tipleri vardır. Bu faktörler geçiş çalışmalarının tekrarlanabilirliği ve *in vivo* beyne geçişin tahminini etkiler. Bu nedenle tüm hücre modelleri farklıdır ve beyne ilaç geçişini kendine özgü bir şekilde modellerler. Ancak hiçbir hücre çalışması tam anlamıyla *in vivo* beyne geçişini taklit edemez.

Hücre modelinin en büyük avantajı birçok ürünün aynı anda analizinin yapılabilmesi nedeniyle işlem hızıdır. Ek olarak hücre modelleri madde geçişinde etkili taşıyıcıya bağlı olan taşıma mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılır.

Bunlar haricinde hücre kültürü çalışmaları metabolizasyon ve hücrel toksisite hakkında da fikir verebilir. Ancak hücre kültürü çalışmalarında tekrar edilebilirlik ve standart protokolde çalışmak zordur (109).

2.5.2.1. Primer Kültürler

Kan beyin engelini *in vitro* modellenmesi amacıyla yapılan hücre biyolojisi çalışmaları büyük beyin alanları nedeniyle sığır ve domuzlarda başlatılmıştır (110, 111). Ayrıca rat, fare ve insan hücre kültürü sistemleri de geliştirilmiştir. Bu hücrelerin hiçbiri aynı değildir. Ayrıca bireyiçi ve bireylerarası farklılık da gösterirler. Bu nedenle tekrarlı ölçüm yapmak çok zordur. İnsan beyin hücreleri kan beyin engeli çalışmalarında altın standart olmasına rağmen etik nedenlerle kullanımı sınırlıdır.

Primer hücre kültürleri ilaçların beyne geçişinde ilginç sonuçlar vermiştir. Ancak beyinde yer alan tüm hücrelerin aynı olmaması nedeniyle bu model sonucu garantili bir çalışma değildir. Ayrıca beyin endotel hücrelerinin, kültürlenme işlemi sonrası sıkı kavşak ve taşıyıcı özellikleri gibi kan beyin engeli özelliklerinin hızlı bir şekilde etkisini kaybettiği gösterilmiştir (112).

2.5.2.2. Ölümsüz Hücreler

Sığır, insan, fare ve rat endotel hücreleri ölümsüz hücreler oluşturma amacıyla geliştirilmiş ve test edilmiştir. En iyi kan beyin engeli özelliğini gösteren hücre insan beyin endotel hücreleridir. Ancak yapılan çalışmada sükröz geçişi gözlenmemiş ve inülinin düşük paraselüler geçiş özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonra Weksler tarafından geliştirilen hCEMC/D3 hücrelerinde sükröz geçişi ve birçok yolağın varlığı da saptanmıştır (113).

2.5.2.3. Ko-Kültürler

Hücre kültür modellerinin geliştirilmesi ve beyin endotel hücrelerinin tayininden sonra bu hücrelerin tek başlarına beyne ilaç geçişini taklit edemediği gözlenmiştir. Bu nedenle ko-kültürler geliştirilmiştir. İnsan beyinde beyin endotel hücreleri ile astrosit, perisit ve nöronlar gibi hücrelerle devamlı bağlantı yoktur. Yapılan çalışmalarda özellikle astrositler ile beyin endotel hücrelerinin ko-kültürünün kan beyin engeli özelliklerini düşürdüğü gözlenmiştir (114). En iyi engel özellikleri gösteren model Dehouck tarafından geliştirilen BBCEC modelidir (115). Kan beyin engeli verileri ile ilişki yapıldığında molekül ağırlığına göre beyne geçişin taklit

edilebildiği gözlenmiştir. Tüm hücre kültürleri göz önüne alındığında ko-kültür modelleri *in vivo* değerlere en yakın sonuçları vermiştir.

2.5.2.4. Santral Sinir Sistemi Kaynaklı Olmayan Hücreler

Daha çok MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) ve CaCo-2 (*Caucasian colon adenocarcinoma*) hücre hatları kullanılmıştır. MDCK hücreleri kolay üretilmelerini ve özellikle P-gp özelliklerini gösteren MDR1 gen özelliklerinin aydınlatılması amacıyla kullanılmaktadır. Ancak k_a beyin engeli ile düşük ilişki göstermiştir ($r^2=0.40$).

CaCo-2 hücreleri insan kolon karsinoma kaynaklıdır ve intestinal geçiş modellemede kullanılan epitelyum hücreleridir. Bu hücreler aynı zamanda kan beyin engelini geçişi modellemek amacıyla da kullanılmaktadır. Ancak özellikle P-gp baskılanması çalışmalarında CaCo-2 hücreleri etkin bir yöntemdir (116).

2.5.3. *In Vivo* Model

İnsanda kan beyin engelini geçişi en iyi taklit eden model fizyolojik engel, taşıyıcılar ve metabolik yollar gibi biyolojik beklentilerin tam olarak karşılandığı *in vivo* modellerdir. Ancak bu modeller pahalıdır, işlemin zaman alır ve hayvan çalışmalarında uzmanlaşma ve genellikle radyolojik işaretlenme gereksinimi vardır. Bu nedenle *in vivo* çalışmalar genellikle klinik çalışmaların hemen öncesinde ilaç geliştirme çalışmalarının son fazlarına doğru yapılır. Bu amaçla kullanılan farklı çalışma şekilleri vardır. Bu modeller *in vivo* perfüzyon çalışmaları, kartoid enjeksiyon, intravenöz enjeksiyon ve mikrodializ olarak sıralanabilir (117). Beyne ilaç geçişinin tayin edilmesi her noktada birden fazla hayvan gereksinimi ve bu nedenle yüksek bütçeye ihtiyaç duyulan birkaç noktada ölçüm içerir. Ayrıca metabolizasyon ve bağlanma gibi etkenler beyne ilaç geçişini etkiler (118).

2.6. Santral Sinir Sistemi Hastalıkları

2.6.1. Multipl Skleroz

Multipl skleroz (MS) beyaz ve grisevherde yaygın fokal ve mononükleer hücrelerin yaygın infiltrasyonu ile tanımlı tipik insan *nöroinflamator* SSS hastalığıdır. Uzun süre MS' in sadece *white matter* etkilediği düşünülmüştür. Ancak yapılan görüntüleme ve histopatolojik analizler *serebral* korteksin de erken MS' te durumun içinde olduğunu göstermiştir. MS hastalığı için rat modeli T hücrelerinin bağlanmasını ve kan beyin engelinden ve *leptomeningeal* damarlardan *diapedesisi* (kan sızması)

göstermiştir. Böylece *meningeal* damarlar immün hücrelerin *leptomeningeal* boşluğa ulaşması ve buradan *parenkimaya* taşınması konusunda ipucu sağlarlar. Klinik örneklerde “*subpial demyelinating lezyonlar*” *menegeal infiltratlar* ile topografik olarak ilişkilendirilmiştir. Optik sinirler ve omurilik ile preventriküler beyaz maddede MS lezyonlarının bulunması, sadece kan beyin engeli ile değil, *leptomeningeal* boşluk ve kan BOS engeli vasıtasıyla immün hücre istilası kavramını güçlendirir. *Leptomeningeal* damarlarda permeabilite engelinin kısıtlayıcı yapısının oranı tekdüze değildir ve kısıtlama ve önleme meyilleri farklı SSS alanlarında bulunur (119).

2.6.2. Alzheimer ve Parkinson

Serebral vasküler EC disfonksiyonu ve lökositlerin kan beyin engelinden göçü Alzheimer (AD) ve Parkinson (PD) hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimdeki erken evrede görülen olaylardır. Ancak bu olayların bir neden mi yoksa başka bir olayın sonucu mu olduğunu tasvir etmek zordur. AD ve PD fenotipleri yaşa bağımlıdır ve patoloji belirtilerinden yıllar önce başlar. Kan beyin engelinin ilaç direnç fonksiyonu yaşlanma ile azalır ve nörotoksik ürünlerin kleransının azalması ile beyinde oksitativ stresin artmasına yol açar. Böylece nörodejenatif patoloji riski artmış olur (119).

Alzheimerda en önemli faktörlerden biri *amiloid β akümülyasyonudur*. Birçok çalışmada BOS’un ölçümü veya beynin pozitron emission tomography (PET) ile görüntülenmesiyle Alzheimer hastalığında amiloid β ’nin 3 kat arttığı gösterilmiştir. Hastalığın tedavisi için temel yaklaşımlardan biri olarak görülen amiloid yükünün azaltılması ile ilgili yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar ümit vaat etmemektedir. AD tedavisi için güncel yaklaşımlardan biri de amiloid β üretiminin azaltılması amacıyla *γ -secretaz* inhibisyonudur. Tarenflurbil ve semagacestat faz III çalışmasına kadar gelmiş ancak çeşitli nedenlerle ikisi de durdurulmuştur (120).

2.6.3. *Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (HIV)*

Anektodal raporlara göre HIV akut enfeksiyon sırasında kan beyin engelini geçebilir ancak serokonversiyon öncesi periyotta toplanan veri eksikliğinden dolayı insanlarda kesin zamanlama, SSS enfeksiyon çeşidi ve SSS inflamasyon derecesinin anlaşılma ihtimali zayıftır. Konakçının erken immünolojik cevabı ve rezervuar yük

derecesi, erken SSS hasarının ve HIV'in uzun dönem nöropatojenezisinin anlaşılmasını açıklığa kavuşturabilir (121).

2.6.4. Kanser

Primer ve metastazik beyin tümörleri farklı sonuçları ve yönetim stratejileri olan heterojen tumor gruplarıdır. Primer beyin tümörleri nadir görülen, girişimsiz ve cerrahi olarak tedavi edilebilen “*pilocytic astrocytoma*”lardan, girişim yapan, tedavi edilemeyen ve yetişkinlerde görülen intraparenchymal beyin tümörü olan birden çok formlu glioblastomalara kadar farklılık gösterir (122).

Genelde görülen SSS kanser tipleri; *malignant glioma, low-grade glioma, brainstem glioma, optic glioma, CNS lymphoma, ependymoma, choroid plexus tumor, meningioma, acoustic neuroma, craniopharyngioma, pituitary tumor, pineal tumor, medulloblastoma, primary spinal cord tumor, arteriovenous malformation, and trigeminal neuralgia*dır (123). Uygulanabilir olduğu zaman tedavi yaklaşımları ve hastalıklar hakkındaki bilgileri içeren kılavuzlar her yıl yenilenir. Bu alan devamlı geliştiği için hastalar için en doğru yaklaşım göz önüne alınmalıdır.

2.6.5. Enfeksiyon

2.6.5.1. Bakteriyel Menenjit

Bakteriyel menenjit *Streptococcus pneumonia* ve *Neisseria meningitides*' nin neden olduğu yaygın bir hastalıktır. *Neisseria meningitides*' in neden olduğu *meningococcal* menenjit yeni doğanlar ve çocuklarda da görülme oranının yetişkinler kadar yüksek olduğu şekilde yaş grupları arasında farklılık gösterir. En çok görülen üç grubu da enkapsüle haldedir ve bu şekilde üst hava yolunu istila edip kan akımına geçerek subaraknoid boşluğa geçerler. Enfeksiyöz organizma ilk olarak nazofarinkste kolonize olur. Kan dolaşımına katıldığında kapsül yapısı organizmanın vücut tarafından tanınmasını ve yıkılmasını önler. Organizma daha sonrakın beyin engelini geçer ve SSS'de proliferasyon olarak inflamasyona neden olur. İnflamasyon kan beyin engelinin permeabilitesini artırır ve vasogenik ödem oluşur. Serebral ödem interkranial basınç artırır ve bu olay azaltılmış serebral perfüzyon ve iskemiye bağlı ikincil yaralanmalarla sonuçlanır (124).

2.6.5.2. Viral Ensefalit

Viral ensefalit beyin parenkimasında enflamasyona neden olan bir enfeksiyondur. Ensefalite neden olan virüsler; arbovirusler, HSV, herpes zoster virus (HZV), epstein-barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) ve rabiestir (124).

2.6.6. Travmatik Beyin Hasarı (TBI)

TBI gelişmiş ülkelerde çocuk ve genç erişkinlerde ölümlerin en sık nedenidir. TBI' nin patolojisi ani ve geciktirilmiş mekanizmaların sonuçları olarak yüksek heterojenlik gösterir. Ani primer yaralanma etkiye bağlıdır ve tedavi edilemez ancak önlenabilir olduğu düşünülmektedir. Gecikmiş ikinci faz hasarda müdahale için zaman vardır ve bu nedenle dikkat çekmektedir.

Tedavi için yaklaşımlardan biri kan beyin engeli geçişini arttırmaktır. Bu amaçla VEGF ümit vaat eden sonuçlar vermiştir. Diğer öne çıkan kan beyin engeli hasar indükleyen adaylar ödemi önlemek için kullanılan *histamin* ve *5-hydroxytryptamine*' dir. Kafa travmasından sonra MMP aktivitesinin azaltılması kan beyin engelinin korunmasını sağlayabilir. Endojen bir antikoagülan olan ve felçte nöroproteksiyon sağlayan etkinleştirilmiş protein C (APC), TBI tedavisinde uygun bir yaklaşım olarak görülmektedir (125).

2.6.7. Gilles de la Tourette Sendromu (GTS)

GTS' nin uzun bir süre psikolojik kaynaklı olduğu düşünülmekteydi. Yapılan çalışmalar ile GTS'nin genetik, otoimmün, nöroanatomik ve nörokimyasal bozukluklara dayandığı tanımlanmıştır. Nörolojik görüntüleme çalışmaları kortikal ve subkortikal bölgede anormal aktiviteler göstermiştir. Nörobiyolojisinde dopaminin görev aldığı farmakolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır ve GTS tedavisi hakkındaki çalışmalarda dopamin antagonistleri kullanılmaktadır (126).

2.6.8. Nörodejeneratif Hastalıklar

Spinocerebellar nörodejenerasyonu farklı hastalıklara yol açabilir. Nörodejenerasyon inkoordinasyon (*ataxia*), kas güçsüzlüğü ve duyu kaybı belirtilerine neden olabilir (127). *Huntington* hastalığı ve *Friedreich ataxia* bu durumda görülen hastalıklardan ikisidir. Nörodejeneratif bozuklukların tedavi stratejileri gen ekspresyonunu modifiye ederek etki gösteren "*histone deacetylase (HDAC) inhibitor*"lerini içerir. Özellikle HTT geninin CAG tekrarlı bölgesinin genişletilmesi nedeniyle oluşan Huntington hastalığında önemlidir (128).

2.6.9. Epilepsi

Epilepsi dünyada oldukça fazla kişiyi etkileyen kronik nörolojik bir hastalıktır. Mevcut tedavi yaklaşımları ile hastaların %30' u tedavi edilemez ve %20' si tedaviye dirençli nöbetler geçirirler. Bu amaçla farklı tip nöbetlerde etkin olarak kullanılabilen etken maddeler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Epilepside kullanılan geniş spektrumlu bazı antikonvülzanlar diğer SSS hastalıklarının tedavisinde faydalıdır. Ayrıca bu tip ilaçlar nöropatik ağrı, bipolar bozukluk, migren ve madde istismarında da kullanılmaktadır (129).

2.6.10. Migren

Migren tekrarlanan ve iş gücü kaybına yol açan bir nörolojik bozukluktur. 2007 yılı verilerine göre Türkiye'de migren prevalansı 15-55 yaş grubunda kadınlarda % 21.8 ve erkeklerde %10.9'dur. Migren, aralıklı şiddetli zonklama tipi tek taraflı baş ağrıları ve ağrı ile birlikte görülen bulantı, kusma, ışığa, sese veya harekete hassasiyet ile karakterize edilir. Ataklar 4-72 saat arasında sonlanır ve hastaların %10-20'si arasında aura adı verilen görsel bozukluklar meydana gelir. Migren ataklarının aylık görülme ortalaması 2'ye yakındır (130).

Migren patofizyolojisi halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak beyinsapındaki nörolojik bozukluğun migrene neden olduğu düşünülmektedir. Üç mekanizma ile gerçekleşir: Kranyal arteriyel vazodilatasyon, ekstraserebral nörojenik inflamasyon ve santral ağrı iletiminin inhibisyonundaki azalma, santral ve periferik olarak trigeminovasküler sistemin aktivasyonu, kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP), P maddesi ve nörokinin A gibi vasoaktif nöropeptidlerin salımına ve böylece vazodilatasyona, kan damarlarında steril inflamasyona ve ağrı sinyal iletimine neden olur (9).

Serotonin mediyatörü, migren ataklarında seviyesinin düşmesi ve serotonin infüzyonunun atakları rahatlatması nedeniyle uzun yıllar migren ataklarının aracısı olarak ilişkilendirilmiştir. Sumatriptan bu amaçla geliştirilen ilk seçici 5-HT 1B/1D serotonin reseptör agonistidir. İlk keşfedildiğinde ergot alkaloidlerine göre görülen daha az yan etki akut migren tedavisinde çığır açan bir buluş olarak nitelendirilmiştir. Ancak sınırlı oral biyoyararlanımı, kısa yarı ömrü, ağrı tekrarı oranındaki yükseklik, kan beyin engelini geçememesi ve kardiyovasküler yan etkiler kullanımını sınırlandırmıştır (10).

Migren ataklarının tedavisinde zamanlama önemlidir. Triptanların migren atakların erken evresinde uygulanmasında daha etkin oldukları tespit edilmiştir (131). Etkinin başlangıcından 30 dakika içerisinde 40 mg eletriptan kullanımının hastaların % 71 inde ağrıyı 2 saat geçirdiği gözlemlenmiştir (10). eletriptan ile migren atakları sonucu oluşan iş gücü kayıplarında kaydedeğer bir düşüş yaşandığı tespit edilmiş ve bu değer sumatriptan ile benzer ve ergotamin/kafein kombinasyonundan daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Maliyet-etkinlik çalışmalarında ise eletriptan 40 mg'ın en az sumatriptan 50 veya 100 mg kadar etkin hatta genellikle daha maliyet-etkin olduğu tespit edilmiştir. Karşılaştırmalı bir çalışmada eletriptan 40 mg'ın migren atakları tedavisinde en düşük tedavilerden biri olduğu, en düşük olmasa bile atakların başarıyla tedavisi- maliyet oranında en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir (132).

2.7. Etken Madde Hakkında Bilgi

2.7.1. Genel Özellikleri

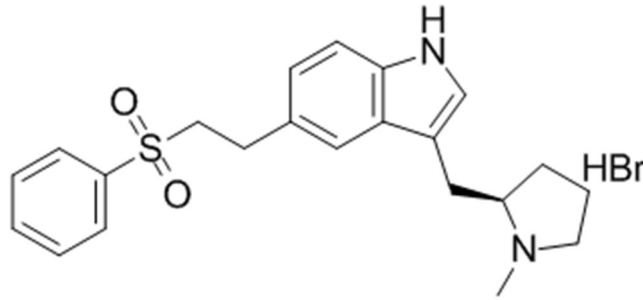
Özel İsmi: Eletriptan hidrobromür

Kimyasal Adı: 3-[[[R)-1-methyl-2-pyrrolidinyl]methyl]-5-[2-(phenylsulfonyl)ethyl]-indole monohydrobromide(10)

Molekül Formülü: C₂₂H₂₆N₂O₂S•HBr

Molekül Ağırlığı :463.43

Yapısal Formülü :



2.7.2. Fizikokimyasal Özellikleri

Eletriptan suda kısmen çözünen (0.00118 mg/mL) beyaz veya hafif solgun renkli tozdur. Log P değeri 3.77-3.84' tür. Eletriptan hidrobromürün suda çözünürlüğü ise yaklaşık 4 mg/mL' dir. pKa değeri güçlü asidik: 17.11, güçlü bazik: 8.37, polar yüzey alanı 53.17 Å²' dir(10).

Erime Noktası:169-171 °C

Piyasada Bulunan İlaç Şekilleri (132)

İlaç Şekli	Veriliş Yolu	Doz
Tablet	oral	20 mg
Tablet	oral	40 mg
Tablet, Film Kaplı	oral	20 mg
Tablet, Film Kaplı	oral	40 mg

2.7.3. Farmakokinetik Özellikleri

Sağlıklı gönüllerde ve yetişkin migren hastalarında eletriptan kullanımını ile elde edilen farmakokinetik veriler Çizelge 2.3'te verilmiştir. Yayımlanan çalışmalarda kullanılan oral doz 1.5 ile 120 mg arası değişmektedir. Ancak doza bağlı özelliklerin gösterildiği çalışma sayısı fazla değildir (10).

Eletriptan lipofilik ve biyolojik membranlardan geçebilen bir maddedir. oktanol: pH 7.4 tampon dağılım katsayısı +1.1' dir (sumatriptan -1.5, naratriptan -0.2, rizatriptan -0.7, zolmitriptan -1.0). Eletriptan anestezi altındaki ratlarda duedenum ve jejunumdan sumatriptandan 5 kat daha hızlı emilir (132).

Çizelge 2.3. Eletriptanın farmakokinetik parametreleri(10)

Doz (mg)	Parametre	Değer*
20	C _{max} (ng/mL)	62
30		57-115
80		235
20-80	t _{max} (sağlıklı) (saat)	0.75-1.5
30-80	t _{max} (migrenli) (saat)	2.0-2.8
20	AUC _∞ (ng.saat/mL)	306
30		382-550
80		1459
Tüm Dozlar	V _d (L)**	138-184
20-80	k _{el} (saat ⁻¹)	0.113-0.159
20-80	t _{1/2} (saat)	4.4-6.5

* Ortalama veya ortanca değerler

** İntravenöz uygulama sonrası

C_{max}: En yüksek kan derişimi, t_{max}: C_{max} görülme süresi, AUC: Eğri altı alan, V_d: Sanal dağılım hacmi, Kel: Eliminasyon sabiti, t_{1/2}: Yarılanma ömrü

Eletriptan lipofilik, oral olarak uygulanabilen, hızlı etkili ve sumatriptandan 4-8 kat 5-HT_{1B/1D} reseptör afinitesine sahip bir etken maddedir. Kranyovasküler seçiciliği sumatriptan'ın 2-3 katıdır. Bu etkinliğin kardiyovasküler yan etkileri arttırdığına dair bir kanıt yoktur. İlacın lipofilik özelliklerinin kan beyin engelinden daha yüksek oranda geçişine ve trigeminal sinir ağında yüksek santral aktiviteye neden olacağı düşünülmektedir. Ancak P-gp substratı olması ve santral sinir sisteminden dışarı atılması nedeniyle eletriptan'ın kan beyin engelini geçişi diğer maddelerden düşüktür. Oral eletriptan (20, 40 ve 80 mg) akut migren ataklarında hızlı etki gösterir. 20 mg eletriptanın etkinliği 100 mg sumatriptana eşdeğerdir (10).

Eletriptan genellikle iyi tolere edilir ve genel yan etkileri triptan sınıfı ilaçlarda görülen etkiler ile aynıdır. Yan etki görülme oranı artan dozla beraber yükselir. Bu yan etkiler nedeniyle % 2-8 oranında hasta eletriptan kullanımına devam edemez. Eletriptan 20 mg kullanımı sonucu yan etki görülme sıklığı plasebo ile aynıken, eletriptan 40 mg ile bu oran sumatriptan 50 mg veya 100 mg, naratriptan 2.5 mg veya zolmitriptan 2.5 mg ile aynıdır. Eletriptan 80 mg'da bu oran diğer triptan türevlerinden fazladır. Ancak hasta uyuncu eletriptan 80 mg da daha yüksek olarak tespit edilmiştir. 1 yıla kadar kullanımda hastalar tarafından iyi derecede tolere edilebilir (10).

Eletriptanın, ketakonazol, flukonazol, eritromisin ve verapamil gibi potent CYP3A4 inhibitörleri ile ilaç etkileşimleri vardır. Eletriptana maruziyetin artması klinik olarak kaydadeğer sonuçlar doğurmasa da eletriptan ile beraber veya kullanımdan sonraki ilk 72 saatte potent CYP3A4 inhibitörü kullanılması önerilmez (132).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril	Merck, Almanya
Diklorometan	Merck, Almanya
Eletriptan Hidrobromür	Alfa Chemistry, ABD
Fetal Bovin Serum	Amresco, ABD
Formik Asit	Sigma, ABD
İsopropil Alkol	Sigma, ABD
Kalsiyum Klorür	Merck, Almanya
Light Cycler 480 Probes Master	Roche, ABD
Metanol	Merck, Almanya
MTT Reaktifi	Sigma, ABD
Orto Fosforik Asit	Merck, Almanya
PLGA (lactide:glycolide 50:50, mol. ağırlığı 30000-60000)	Sigma, ABD
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Merck, Almanya
Proteinaz K	Thermo, ABD
PVA (Mowiol 4-88)	Sigma, ABD
Random Hexamer Primer	Roche, ABD
RealTime ready Assay	Roche, ABD
Reverse Transcriptase	Roche, ABD
RNASave	BI, İsrail

Sodyum Bikarbonat	Merck, Almanya
Sodyum Kolat	Serva, Almanya
Sorbitan Seskiolat	SpectrumChem., ABD
Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti	Roche, ABD
Triton X-100	Sigma, ABD
Vitamin E Polietilen Glikol Süksinat	BASF, Almanya

3.1.2. Deneyleerde Kullanılan Aygıtlar

Çalkalayıcı (Su banyosu)	Nüve, Türkiye
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DTK)	Perkin Elmer, ABD
Erime Derecesi Tayin Cihazı	SRS, Optimelt, ABD
Foton Korelasyon Spektrometresi/ Zetametre	PSS Nicomp, ABD
FT-IR Spektrofotometresi	Perkin Elmer, ABD
Geri Çeviren Soğutucu	Buchi, Almanya
Hassas Terazı	Mettler, Almanya
İklim Dolabı	Nüve, Türkiye
Liyofilizatör	Christ, Almanya
Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı	Julabo EM, Almanya
Otomatik Pipet	Boeco, İtalya
pH Metre	Metrohm, İsviçre
Plak Okuyucu	Biotek, ABD
Polimeraz Chain Reaction Ölçüm Cihazı (qPCR)	Roche, ABD
Santrifüj	IEC Centra, ABD

Sıvı Kromatografi Kütle spektrometrisi (LC-MS)	Agilent, ABD
Taramalı Elektron Mikroskobu	Zeiss, Almanya
Ultra Saf Su Cihazı (Tip 1)	ELGA, İngiltere
Ultrasonik Prob Karıştırıcı	Bandelin, Almanya
UV Spektrofotometresi	GBC, İngiltere
Yüksek Devirli Homojenizatör	IKA, Almanya
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK)	Agilent, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Etken Maddeye Ait Çalışmalar

EH'nin kimyasal özelliklerini ve saflığını saptamak için aşağıdaki çalışmalar yapılmıştır.

3.2.1.1. Etken Maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumu

Etken maddenin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun (λ_{max}) saptanması için 30 μ g/ 10 mL derişiminde sulu çözeltisi hazırlanarak 200-400 nm dalga boyunda UV-spektrofotometresi kullanılarak, λ_{max} değeri belirlendi. Deney 3 defa tekrarlandı.

3.2.1.2. Etken Maddenin Infrared (IR) Spektrumu

EH'nin infrared spektrumu olarak, *attenuated total reflectance* (ATR) aparatı ile Çinko Selenyum Kristali seçilerek 650-4000 cm^{-1} dalga aralığında FT-IR analizi yapıldı.

3.2.1.3. Etken Maddenin Erime Derecesinin Tayini

EH'nin erime derecesi, erime noktası tayin cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Cihaz 140°C' ye getirildi (beklenen erime noktasının 30°C altı) ve daha sonra erime gerçekleşinceye kadar dakikada 2°C arttırılarak kılcaldaki etken maddeye ait tozun erimesi incelendi. Deney 3 defa tekrarlandı (133).

3.2.1.4. Etken Maddenin Termal Analizi

EH' nin termal analizinde, diferansiyel taramalı kalorimetre (DTK) kullanıldı. Örnekler, alüminyum pan (kap) üzerinde, 30-350°C arasında değerlendirildi. Referans olarak, alüminyum analog boşpan (kap) kullanıldı. 10°C/dk sıcaklık artışı, 20mL/dk azot akış hızında, termal analiz işlemleri gerçekleştirildi. Deney 3 defa tekrarlandı.

3.2.2. Yöntem Validasyonları

3.2.2.1. Eletriptan Hidrobromürün Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile Miktar Tayini

In vitro çalışmaların tümünde, EH miktar tayini için uygun olan YPSK yöntemi kullanılmıştır. 25°C'de, 1.0mL/dk akışta, (UV dedektöründe, 225nm dalga boyunda), C8 (Agilent Zorbax SB-C8 150 × 4.6 mm, 3.5 µm, ABD) tersfaz kolonu ve 10 µL enjeksiyon hacmi kullanılarak çalışıldı. *In vitro* çalışmalar için Agilent 1100 YPSK cihazı kullanıldı.

3.2.2.1.1. Mobil Faz Hazırlanması

68 g potasyum dihidrojen fosfat 1000 mL bidistile suda çözündürüldü. Çözeltinin pH değeri fosforik asit kullanılarak 3.5' e ayarlandı (134), 0.45 µm filtreden süzüldü. % 6 bu çözelti, % 30 asetonitril ve % 64 su oranlarında karıştırılarak mobil faz hazırlandı (135). Bu yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi için validasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.2.1.2. YPSK İçin Validasyon Çalışmaları

3.2.2.1.2.1. Doğrusallık

Çalışmada kullanılacak kalibrasyon doğrusunun ve denkleminin belirlenmesi için EH bidistile suda 1 mg/100mL olacak şekilde çözüldü ve hazırlanan çözelti stok çözelti olarak kullanıldı. Bu çözeltilerden sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL olacak şekilde 8 farklı derişimde seyreltme yapıldı. Hazırlanan bu çözeltiler YPSK'ye enjekte edildi ve her bir derişime ait pik alanları bulundu. Her bir EH derişimine denk gelen pik alanı yardımıyla kalibrasyon doğru denklemi hesaplandı. Hesaplarda her bir nokta için en az 3 değer ortalama kullanıldı. Her ölçüm 3 defa tekrarlandı (136, 137).

3.2.2.1.2.2. Doğruluk

Doğruluk, deney yolu ile elde edilen değerlerin, gerçek/teorik değerlerle yakınlığının saptanmasıdır. Bu hesaplamada % geri kazanım değerlerinin ortalaması hesaplanarak, yöntemin doğruluğu onaylanır. Standart sapma (SD) veya varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilir.

Yapılan validasyonun doğruluğunun hesaplanması için bidistile suda EH' nin farklı derişimde(5, 10, 25 µg/mL) 3 seri çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin YPSK'da alan değerleri 6 defa okundu. Okunan değerler kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen derişimlerden % gerikazanım değerleri Eşitlik 1 yardımı ile bulundu: (136, 137).

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (K_{\text{pratik}} / K_{\text{teorik}}) \times 100 \quad 3.1.$$

K_{pratik} : Etkin maddelerin kalibrasyon denkleminde elde edilen derişim değerleri.

K_{teorik} : Etkin maddelerin hazırlanan derişim değerleri

3.2.2.1.2.3. Kesinlik

Kesinlik, normal çalışma koşullarında bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecesinin bir ölçüsüdür. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı derişimdeki örnekler ölçülerek ortalama, standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısının (VK) hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. VK'nın % 2'den küçük olması yöntemin kesinliğinin bir göstergesidir (136, 137). Bu amaçla 25 µg/mL derişimde çözeltiler hazırlanarak analiz gerçekleştirildi.

3.2.2.1.2.3.1. Tekraredilebilirlik

EH' nin bidistile suda, farklı günlerde hazırlanan 10 µg/mL derişimdeki çözeltileri değerlendirildi. 6 kez okuma yapıldı (136).

3.2.2.1.2.3.2. Tekrar elde edilebilirlik

EH' nin bidistile sudaki 10 µg/mL derişimde çözeltileri hazırlanarak farklı analistler tarafından test edildi ve YPSK'da verdikleri değerler kıyaslandı. Her bir ortam için 6 kez okuma yapıldı(136).

3.2.2.1.2.4. Özgünlük (Seçicilik)

Formülasyonlarda kullanılan yüzey etken madde, koruyucu madde,polimer ve boş nanopartikül formülasyonu mobil fazda çözüldürüldü ve EH piki ile girişim yapıp yapmadığı, pik gecikme zamanı değerlendirildi. Ayrıca kullanılan tüm çözücülerin de EH' nin piki ile etkileşip etkileşmediği değerlendirildi. Deney her grup için 3 defa tekrarlandı (137).

3.2.2.1.2.5. Teşhis ve tayin sınırları

Bir analitik yöntemin teşhis sınırı, örnek içerisindeki teşhis edilen fakat kesinlikle kantitatif olarak tam miktarının belirlenmesine gerek olmayan analitin en küçük miktarıdır. Bu sınırlar düşük derişime sahip bir seri örneğin analiz edilmesiyle belirlenmiştir. Her bir ortam için 3 paralel kalibrasyon denklemi bulundu. En düşük değerine karşılık gelen alanların standart sapma değerleri hesaplandı ve bu değerlerin ortalaması, seçilen kalibrasyon doğrusunun eğimine bölündü. Bu değer 3.3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD); 10 ile çarpılarak tayin sınırı (LOQ) belirlendi (136, 137).

3.2.2.2. Eletriptan Hidrobromürün Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini

Hücre kültürü ve *in vivo* çalışmaların tümünde, EH miktar tayini için uygun olan LC-MS yöntemi kullanılmıştır. 25⁰C'de, 1.0mL/dk akışta, (MS dedektöründe, 383 ve 385 iyonlarında), C18 (Agilent Zorbax SB-C18 150 × 4.6 mm, 3.5 µm, ABD) ters faz kolonu ve 10 µL enjeksiyon hacmi kullanılarak çalışıldı. *In vitro* çalışmalar için Agilent 1100 YPSK-MS cihazı kullanıldı.

3.2.2.2.1. Mobil Faz Hazırlanması

Formik asit 1000 mL bidistile suda % 0.1 oranında karıştırıldı. 0.45 µm filtreden süzüldü. % 60 formik asit çözeltisi, % 40 metanol ile karıştırılarak mobil faz

hazırlandı. Bu yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi için validasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.2.2.2. LC-MS İçin Validasyon Çalışmaları

3.2.2.2.2.1. Doğrusallık

Çalışmada kullanılacak kalibrasyon doğrusunun ve denkleminin belirlenmesi için EH bidistile suda 1 mg/100mL olacak şekilde çözüldü ve hazırlanan çözelti stok çözelti olarak kullanıldı. Bu çözülden sırasıyla 0.5, 2.5, 5, 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 5000 ng/mL olacak şekilde 11 farklı derişimde seyreltme yapıldı. Hazırlanan bu çözeltiler LC-MS' ne enjekte edildi ve her bir derişime ait pik alanları bulundu. Her bir EH derişimine denk gelen pik alanı yardımıyla kalibrasyon doğru denklemi hesaplandı. Hesaplarda her bir nokta için en az 3 değerin ortalaması kullanıldı. Her ölçüm 3 defa tekrarlandı (136, 137).

Biyolojik örnek kullanılan çalışmalar için, standartlar 200 µL plazma veya beyin homojenizatına, 100 µL metanol, 400 µL asetonitril ve 200 µL değişik derişimlerde iç standart ve etken madde içeren çözeltiler ilave edilerek hazırlandı. Numuneler 30 sn vortekslendikten sonra 10 dk süreyle +4°C'de 10000 rpm'de santrifuj edildi. Santrifujun ardından üstteki berrak kısım ayrılmış ve cihaza enjekte edildi. Etken maddenin plazma veya beyin içerisinde farklı derişimlerde 6 ayrı seri çözeltisi hazırlandı ve LC-MS'e enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Etken madde derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi. Gerekli istatistiksel parametreler hesaplandı.

3.2.2.2.2.2. Doğruluk

Yapılan validasyonun doğruluğunun hesaplanması için biyolojik ortamdaki EH' nin farklı derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin LC-MS'de alan değerleri okundu. Okunan değerler kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen derişimlerden % geri kazanım değerleri Eşitlik 3.2 yardımı ile bulundu:(136, 137).

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (K_{\text{pratik}} / K_{\text{teorik}}) \times 100$$

3.2.

K_{pratik} : Etken maddelerin kalibrasyon denkleminde elde edilen derişim değerleri.

K_{teorik} : Etken maddelerin hazırlanan derişim değerleri

3.2.2.2.2.3. Kesinlik

Kesinlik, normal çalışma koşullarında bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecesinin bir lusüdür. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı derişimdeki örnekler ölçülerek ortalama, standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısının (VK) hesaplanmasıyla gerçekleştirilir. VK'nın % 2'den küçük olması yöntemin kesinliğinin bir göstergesidir (136, 137).

3.2.2.2.2.3.1. Tekrar Edilebilirlik

EH' nin biyolojik ortamdaki, farklı günlerde hazırlanan zlteleri değerlendirildi. 6 kez okuma yapıldı (136).

3.2.2.2.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

EH' nin biyolojik ortamdaki zlteleri hazırlanarak farklı analistler tarafından test edildi ve değerler kıyaslandı. Her bir ortam için 6 kez okuma yapıldı (136).

3.2.2.2.2.4. zgnlk (Seçicilik)

Biyolojik ortamdaki gelen maddelerin ve i standardın EH' nin piki ile etkileşip etkileşmediği değerlendirildi. Deney her grup için 3 defa tekrarlandı (137).

3.2.2.2.2.5. Teşhis ve Tayin Sınırları

Her bir ortam için 3 paralel kalibrasyon denklemini bulundu. En düşük değerine karşılık gelen alanların standart sapma değerleri hesaplandı ve bu değerlerin ortalaması, seçilen kalibrasyon doğrusunun eğimine bölündü. Bu değer 3.3 ile çarpılarak teşhis sınırı (LOD); 10 ile çarpılarak tayin sınırı(LOQ) belirlendi (136, 137).

3.2.3. Etken Maddeye Ait Organik/Su Fazı Dağılım Çalışmaları

10 mg EH alınarak 8 mL su/2 mL diklorometan içerisine koyuldu. 4 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve bu süre sonunda su fazındaki EH miktarı YPSK ile ölçüldü. Deney 3 defa tekrarlandı.

3.2.4. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması

Polimerik nanopartiküller hazırlanırken, PLGA polimeri kullanılarak emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yönteminden faydalanıldı. Bu amaçla EH'nin hem Y/S hem de S/Y/S emülsiyonları hazırlanarak özellikleri incelendi.

3.2.4.1. Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi

Nanopartiküllerin üretimi için Mainardes ve diğ. (138) tarafından kullanılan yöntem referans alınmıştır. Yöntemde EH ve PLGA 1 mL diklorometan içerisinde çözüldü ve 10 mL PVA içeren ultrasaf su içerisine eklenerek ultrasonik prob yardımıyla emülsiyon oluşumu sağlandı. Hazırlanan emülsiyondan geri çeviren soğutucu yardımıyla diklorometanın uçurularak ayrılması sağlandı. Daha sonra 10000 rpm'de 15 dk 4°C'de santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Üst kısımdaki süpernatant ayrıldı ve geride kalan çökelti aynı miktar ultra saf su eklenerek tekrar süspansiyon oluşturuldu. Bu işlem 3 defa tekrarlanmış ve son olarak elde edilen süspansiyon liyofilize edilmiştir.

Formülasyonun boyut ve dağılım özelliklerine etkisinin saptanması amacıyla Çizelge 3.1'de özetlenen D-Optimal tasarım kullanılarak farklı etken madde, PLGA, PVA derişimleri ile sonikasyon enerji ve zamanları denendi.

3.2.4.2. S/Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi

Cohen ve diğ. tarafından hazırlanan yöntem modifiye edilmiştir (139). 3 mL diklorometan içerisine belirlenen miktarda PLGA, organik fazda çözülmesi istenen (varsa) yüzey etken madde eklenerek yağ fazı oluşturuldu. İç su fazı için 1 mL ultrasaf su içerisine belirlenen miktar EH ve (varsa) su fazına eklenmesi istenen yüzey etken madde eklendi. Dış su fazı 10 mL ultrasaf su içerisine istenen oranda stabilizan eklenerek hazırlandı. İç su fazı ile yağ fazı bir kaba konarak buz banyosunda, ultrasonik prob yardımıyla 30 W enerji 45 sn uygulanarak karıştırıldı. Hazırlanan emülsiyondış su fazına eklenerek buz banyosunda, ultrasonik prob yardımıyla 50 W 60 sn karıştırıldı. Hazırlanan emülsiyondan geri çeviren soğutucu yardımıyla

diklorometanın uçurularak ayrılması sağlandı. Daha sonra 10000 rpm’de 15 dakika 4 °C’ de santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Üst kısımdaki süpernatant ayrılmış ve geride kalan çökelti aynı miktar ultra saf su eklenerek tekrar süspansiyon oluşturuldu. Bu işlem 3 defa tekrarlandı ve son olarak elde edilen süspansiyon liyofilize edildi. Bu amaçla elde edilen nanopartikül süspansiyonu öncelikle 12 saat derin dondurucuda bekletilmiştir. Dondurulan partiküller -80°C sıcaklıkta 0.0005 mbar basınçta 48 saat lyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1: D-Optimal tasarım kullanılarak hazırlanan Y/S emülsiyon parametreleri (135)

Sıra	A:PLGA (mg)	B:PVA(%)	C:EH (mg)	D:Sonikasyon Enerjisi(W)	E:Sonikasyon Zamanı (sn)
1	75.00	1.00	15.00	30.00	60.00
2	75.00	5.00	5.00	70.00	30.00
3	75.00	5.00	15.00	30.00	30.00
4	75.00	1.00	5.00	70.00	30.00
5	25.00	1.00	5.00	30.00	30.00
6	25.00	5.00	15.00	30.00	60.00
7	25.00	1.00	5.00	30.00	90.00
8	75.00	1.00	10.00	30.00	30.00
9	25.00	1.00	5.00	70.00	30.00
10	75.00	1.00	5.00	50.00	90.00
11	75.00	1.00	15.00	30.00	60.00
12	75.00	5.00	5.00	70.00	90.00
13	25.00	5.00	5.00	30.00	30.00
14	25.00	5.00	5.00	50.00	90.00
15	50.00	3.00	12.5	50.00	60.00
16	25.00	1.00	15.00	70.00	30.00
17	50.00	3.00	12.5	50.00	60.00
18	50.00	5.00	15.00	30.00	90.00
19	75.00	5.00	15.00	70.00	90.00
20	75.00	5.00	10.00	30.00	90.00
21	50.00	5.00	5.00	30.00	90.00
22	50.00	1.00	5.00	70.00	90.00
23	75.00	3.00	15.00	70.00	30.00
24	25.00	1.00	15.00	70.00	90.00
25	75.00	3.00	5.00	30.00	30.00
26	25.00	5.00	15.00	70.00	30.00
27	25.00	1.00	15.00	30.00	30.00
28	25.00	5.00	15.00	70.00	90.00
29	75.00	5.00	15.00	30.00	30.00
30	50.00	1.00	15.00	30.00	90.00
31	25.00	5.00	5.00	30.00	30.00
32	25.00	5.00	5.00	70.00	60.00
33	25.00	5.00	15.00	50.00	30.00

Üretim parametrelerinin nanopartikül özellikleri üzerine etkilerinin tespit edilmesi amacıyla farklı polimer, etken madde, yüzey etken madde, stabilizan derişimleri ile farklı yüzey etken madde ve stabilizan ile Çizelge 3.2’de yer alan nanopartiküller hazırlandı.

3.2.5. Partiküllerin Analizi

3.2.5.1. Partikül Boyut Analizi

Üretilen formülasyonlar, agregat oluşumu, partikül büyüklüğü ve polidispersite indisi açısından, foton korelasyon spektroskopisi cihazı (PCS) ile oda sıcaklığında, 90° lik açı ile değerlendirildi. Her örnekten 3 deneme yapıldı, her deneme 3 defa değerlendirildi. Örnekler değerlendirmeden önce ultrasaf su (pH=7) ile seyreltildi. Suyun viskozitesi 0.0089 poise ve refraksiyon indisi 1.333 olarak alındı.

Çizelge 3.2: Hazırlanan S/Y/S emülsiyon parametreleri

S.N u.	PLGA (mg)	EH (mg)	PVA (%)	F68 (mg)	SK (mg)	SS (mg)	Dış Faz PVA (%)	pH
F1	90	1	1				1	7
F2	60	1	1				1	7
F3	90	5	3				3	7
F4	90	1	3				3	7
F5	60	1	3				1	7
F6	90	1	1				3	7
F7	90	3	1				1	9,6
F8	90	3	1				1	5,6
F9	90	3	1				1	7
F10	90	3				300	1	7
F11	90	3		90			1	7
F12	90	3			0.5		1	7
F13	90	3	1				1 ^a	7

^aDış faz olarak distile su yerine 0.2 mM CaCl₂ çözeltisi kullanılmıştır (139).

3.2.5.2. Zeta Potansiyel Analizi

Seçilen formülasyonlar, zeta potansiyel ölçüm cihazında 25°C’de, 18.9 derecelik bir dağıtma açısıyla, 78.5 dielektrik sabitinde, 0.4 cm elektrod aralığında, 15

V/cm olacak şekilde bir alan gücünde değerlendirildi. Örnekler ölçülmeden önce ultrasaf su ile seyreltildi. Ortalama zeta potansiyel belirlendi. Deney 3 defa tekrarlandı.

3.2.5.3. Partikül Özellikleri

Hazırlanan formülasyonların ilaç yüklenme ve parçalanma ürünü oluşumu DTK ve FT-IR kullanılarak değerlendirildi.

3.2.5.3.1. DTK Analizi

Kullanılan tüm polimer ve etken maddenin ayrı ayrı, fiziksel karışımları ve hazırlanan nanopartiküllerin DTK ile termogramları çekildi. Bu amaçla yaklaşık 1 mg ağırlıkta tartılmış numune kapaklı bir alüminyum pan (kap) içine konuldu. 10°C/dak ile sıcaklık artırılarak, 30-350°C sıcaklık aralığında, azot ortamında termogramı alındı. Elde edilen piklerdeki değişime göre sonuçlar değerlendirildi. Her deneme 3 defa tekrar edildi.

3.2.5.3.2. FT-IR Analizi

Kullanılan tüm polimer ve etken maddenin ayrı ayrı, fiziksel karışımları ve hazırlanan nanopartiküller bir spatül yardımıyla FT-IR spektrumunun çekileceği ATR kristali üzerine dikkatli bir şekilde konuldu. Cihazın aparatı yardımıyla kristal üzerinde sıkıştırıldı. Sıkıştırma işlemine IR spektrumu sabitleninceye kadar devam ettirildi. Daha sonra spektrum 4000-650 cm⁻¹ dalga sayısında tarandı.

3.2.5.4. Elektron Mikroskobu Analizi

Morfolojik analiz çalışmaları için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanıldı. Örnekler, altın ile kaplandı ve 30000 büyütmesinde görüntülendi.

3.2.5.5. İçerik Miktar Tayini

Nanopartikül formülasyonları 10 mL asetonda çözüldü. Gerekli seyreltmeler YPSK mobil fazı ile yapıldı ve EH miktarı YPSK ile değerlendirildi. Deney 3 defa tekrarlandı. Sonuçlar Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Miktar} = (M_{EH} / M_{madde}) \times 100 \quad 3.3.$$

M_{EH} = Deneysel olarak elde edilen EH miktarı

M_{madde} = Formülasyondaki madde miktarı

3.2.5.6. Enkapsülasyon Etkinliği Çalışmaları

Enkapsülasyon etkinliği tayini için örnekler santrifüjleme işleminde elde edilen süzütüden YPSK yöntemiyle yüklenmemiş EH miktarı hesaplandı. Bu miktar başlangıçta tartılan miktardan çıkartıldı. Elde edilen sonuç, aşağıdaki eşitlik 4yardımıylaenkapsülasyon etkinliği (EE) yüzde olarak bulundu. Her deney 3 kez tekrarlandı.

$$\%EE = [(C_b - C_s) / C_b] \times 100 \quad 3.4.$$

C_b : Başlangıç EM miktarı, C_s : Final EM miktarı

3.2.5.7. *In Vitro* Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirildi. Etken madde içeren polimerik nanopartikül dispersiyonu, 12000-14000 kDa por çapı değerine sahip diyaliz membranına konuldu. Diyaliz membranları içerisinde 30 mL distile su bulunan kaplara yerleştirildi. Bu sistem çalkalayıcıda, 30 salınım/dk'da karıştırıldı. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 28, 36. saatlerde örnekler alındı. 9000 dev/dk'da, santrifüj ile katı kısım ayrıldı. Kalan sulu kısım 0.2 μm 'lik filtre kağıdından süzüldü ve miktar tayini YPSK ile yapıldı. Her deney 6 defa tekrarlandı.

Hazırlanan nanopartiküllerden tespit edilen EH salımı sonuçları ilaç salım mekanizmalarının açıklanması için "KinetDS 3.0" adlı yazılım kullanılarak genel olarak kullanılan sıfırıncı derece, birinci derece, Korsmeyer Peppas, Weibull, Higuchi, Hixson Crowell kinetik modelleri açısından değerlendirildi (140). Her bir salım kinetiğine ait ilaç salım sabitleri (k), salım parametreleri, kinetik grafiklerinin korelasyon (r^2) değerleri ve grafiklerin ortalama hata kareleri kökü (RMSE) değerleri hesaplandı. En yüksek korelasyon ve en düşük RMSE değeri gösteren kinetik model en iyi uyum sağlayan olarak değerlendirildi (141).

3.2.6. Hücre Kültürü Çalışmaları¹

3.2.6.1. Kültür Çözeltilerinin Hazırlanması

Hücre kültürü çalışmalarında hücre çeşidine uygun besiyeri karışımı kullanılmaktadır. Her hücrenin özelliğine bağlı olarak besiyeri içeriğindeki karışım değişmektedir, Hücre kültürü çalışmalarında kullandığımız CaCo-2 hücrelerinde besiyeri olarak %10 fetal bovine serum (FBS), %1-2 glutamin ve %1 Penisilin/streptomisin çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.6.2. Dondurulan Hücrelerin Çözülmesi

Daha önce -80 °C derin dondurucuda veya sıvı azot tankından alınan kriyovialler 37 °C lik su banyosunda tamamen çözülene kadar bekletildi. Bu işlem çok hızlı ve seri yapıldı. Tüp içeriği konik tüplere aktarıldıktan sonra ürün hacminin 3 misli oranında fosfat salin tamponu (PBS) ile karıştırıldı. 800 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Kalan hücreler 25 cm² lik flask için 7 ml, 75 cm² lik flask için 14 mL medya ile sulandırılarak ekildi. Çözdürme işleminden 24 saat sonra ortamda kalabilecek DMSO kalıntılarını uzaklaştırmak için bir yıkama daha yapıldı. Çalıştığımız hücre yapışan özelliğe olduğu için 24 saat sonunda hücreler hala yapışmamışsa yıkama işlemi falkon tüp yardımıyla santrifüj kullanılarak yapıldı.

3.2.6.3. Pasajlama İşlemi (Subkültür)

Hücrelerin ekim kaplarının yüzeyini %80 kapladığı zaman flask içindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, hücrelerin yıkanması için üzerine 5 mL PBS ilave edildikten sonra aspire edilerek uzaklaştırıldı. 25 cm² hücre kültür kabında büyütülen hücreler için 2 mL tripsin, 75 cm² hücre kültür flaskında büyütülen hücreler için ise 4 mL tripsin uygulandı ve hücreler CO₂'li inkübatörde 37°C'de 5 dk bekletildi. Bu bekleme işleminden sonra hücrelerin yüzeyden kalkıp kalkmadıkları faz-contrast mikroskopu ile test edildi. Hücre kültür flaskına, ilave edilen tripsinin miktarı kadar besiyeri eklendi (75 cm² flask için 4 mL tripsinin üzerine 4 mL PBS; 25 cm² flask için 2 mL tripsinin üzerine 2 mL PBS). Tripsin besiyeri karışımı pipetlenerek hücre süspansiyonu haline getirildi ve bir falkon tüpe aktarıldı. Hücre süspansiyonu 500-800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi

¹* Hücre kültürü çalışmaları SBÜ Gülhane Kök Hücre laboratuvarında yapılmıştır.

ve üstte kalan sıvı (süpernatant) uzaklaştırıldı. Santrifuj işlemi sonucunda alta çöken hücreler (pellet) 10 mL besiyerinde çözüldü ve sayıldı. Ekim yapılacak flaska yeterli miktarda besiyeri konulduktan sonra ekim yapıldı. Flask inkübatöre kaldırıldı. Her 3 günde bir besiyeri değiştirildi.

3.2.6.4. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

MTT testi canlı hücrelerin “yellow tetrazolium MTT” bileşiğini indirgemesi sonrası değişen rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Bu test esnasında canlılık oranı fazla (daha çok proliferen olan) hücre gruplarında daha koyu mor renk görülmektedir.

MTT solüsyonu; 5 mg/mL olacak şekilde hücre türüne uygun boş medium içinde çözüldü. Daha sonra 15 mL' lik konik steriltüp içine 0,22 µm filtre kullanılarak yapılan filtrasyon ile kullanılacak hale getirildi. Hücreler, her bir viyaldede 5×10^3 hücre olacak şekilde hemositometre yardımıyla sayılarak hazırlandı. 96 kuyucuklu hücre tabakalarına, çalışma planı doğrultusunda hazırlandı ve her bir kuyucuğa 100 µL hücre solüsyonu (hücre+ %10 FBS'li medium) tek yada çok kanallı pipet yardımıyla dağıtıldı. Tabaka 24 saat inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. 24 saat inkübasyon sonunda, etken madde çözeltisi ve aynı derişimde etken madde içeren nanopartiküller (50 µg/mL)100 µL içinde (20 µL nanopartikül süspansiyonu + 80 µL %10 FBS'li medium) olacak şekilde her bir kuyucuğa eklenerek ortamın son hacmi 200 µL' ye tamamlandı. Çalışma planına göre plate 48 saat bekletilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. 48 saat sonundaher bir kuyucuğa 20 µL MTT solüsyonu pipetlendikten sonra 3-4 saat inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı. 3-4 saat sonunda süpernatant hücrelere dokunmadan nazikçe aspire edildi.100 µL isopropil alkol her bir kuyucuğa ilave edilerek tabaka folyo yardımıyla sarılarak oda ısısında, karanlıkta 3-4 saat inkübasyona bırakıldı. İşlem sonunda tabaka hafifçe çalkalandı ve 570 nm dalga boyunda plak okuyucuda okutuldu. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi (142).

Testin değerlendirilmesi;

Test edilen hücrelerin proliferasyonu, kontrole göre Eşitliğe göre % olarak ifade edilir.

CANLILIK= Test kuyucuğunun absorbansı / Kontrol kuyucuğunun absorbansı X100

3.2.6.5. Eletriptan Hidrobromür ve Eletriptan HidrobromürYüklü Nanopartiküllerin P-gp ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

CaCo-2 hücreleri 12 kuyucuklu hücre tabakalarına her bir tabakada 1×10^6 /hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan alınan hücrelere 800 μ L vasat, 200 μ L 50 μ g/mL etken madde veya etken madde içerecek nanopartikül süspansiyonu konulup 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonunda inkübasyondan alınan hücreler soğuk PBS (7.4) ile 2 kez yıkandı, tripsin eklendi ve santrifüj tüplerine yerleştirildi. Hücreler 1% triton X-100 içeren 500 μ L PBS ile 37°C 30 dakikayıkım işlemine tabi tutuldu. Elde edilen çözelti ilgili eppendorf tüplere konuldu (143).

Geri atım çalışmasında 2 saat inkübasyona bırakılan hücreler bu sürenin sonunda inkübasyondan alındı, soğuk PBS (7.4) ile 2 kez yıkandı, tripsinlendi ve santrifüj tüplerine yerleştirildi. PBS (7.4) eklenerek 30,60,120 dk 37°C beklendi. Bu süre sonunda inkübasyondan alınan hücreler soğuk PBS (7.4) ile 2 kez yıkandı, tripsin eklendi ve santrifüj tüplerine yerleştirildi. Hücreler %1 triton X-100 içeren 500 μ L PBS ile 37°C 30 dakikayıkım işlemine tabi tutuldu. Elde edilen çözelti ilgili eppendorf tüplere konuldu (144).

3.3. Stabilite Çalışmaları

Toksosite çalışmaları sonucu hücre toksisitesi az ve diğer özellikleri uygun olan F1 formülasyonu ile elde edilen partiküllerin stabiliteyi incelendi. Stabilite çalışmaları partiküllerin çeşitli sıcaklıklardaki davranışlarının partikül büyüklükleri ve polidispersite indeks değerleri açısından değerlendirilmesini ve nanopartiküllere yüklenmiş etken madde miktarının incelenen sıcaklık değeri açısından tayin edilmesini içermektedir. Bu amaçla hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonları liyofilize hale getirilerek +4°C' de buzdolabında, oda sıcaklığında desikatörde ve -20°C buzdolabı dondurucu kısmında 3 ay süreyle muhafaza edildi. Birinci ve üçüncü ay sonunda her bir nanopartikül formülasyonu belirtilen kontroller açısından incelendi.

Hazırlanan nanopartiküllerden *in vivo* çalışmalarda kullanılacak F1 formülasyonunun biyolojik ortam stabilitesinin incelenmesi amacıyla formülasyon 24 saat 37°C'de su banyosunda bekletilmiş ve nanopartiküller boyut ve PDI açısından değerlendirilmiştir.

3.4. *In Vivo* Çalışmalar²

Dişi wistar albino ratlar (250-300 g) Sağlık Bilimleri Üniversitesinden (Ankara) temin edildi (SBÜ Gülhane HAYDEK Etik Nu:2017-001). Ratlar propilen kafeslerde (her bir kafeste 3 hayvan olacak şekilde) kontrol altında tutuldu. Ratların bakımı ve sakrifikasyon işlemi laboratuvar hayvanları ile ilgili kılavuz etik kurullar içerisinde gerçekleştirildi. 0., 30., 60., 120., 240. ve 480. dakikalar çalışma noktaları olarak planlandı. Her bir çalışma noktası için üçer rat kullanıldı. Öncelikle ratlarda migren hastalık modeli oluşturulması amacıyla kontrol grubu (3 rat) hariç tüm ratlara subkütan 10 mg/kg gliseril trinitrat uygulandı. İlaç formülasyonları 75 µg EH içerecek şekilde nanopartikül içerisinde veya çözelti olarak kuyruk veninden veya insülin enjektörü ve kanül kullanılarak burundan uygulandı. Burundan uygulama her bir burun deliğinden 50 µL olacak şekilde toplam 100 µL olarak ayarlandı. Uygulama sırasında ratlar sırtlarından eğimli bir şekilde tutuldu (Resim 3.1). Ratlar her bir çalışma noktasında yüksek dozda ketamin ve daha sonra servikal dislokasyon uygulanarak sakrifikasyon işlemi uygulandı. Kanlar kardiyak olarak alınmıştır ve daha sonra rat beyinleri dikkatlice çıkartılmıştır. Çıkartılan beyinler % 0.9 NaCl çözeltisi ile yıkanarak üzerine yapışmış doku ve diğer sıvıların ortamdaki uzaklaştırılması sağlandı. Her bir beyin tartıldı. Beyinlerin TNC kısımlarından 50 mg tartıldı ve RNA ölçümleri için ayrıldı. Tüm numuneler çalışma zamanına kadar -40 °C’de saklandı.

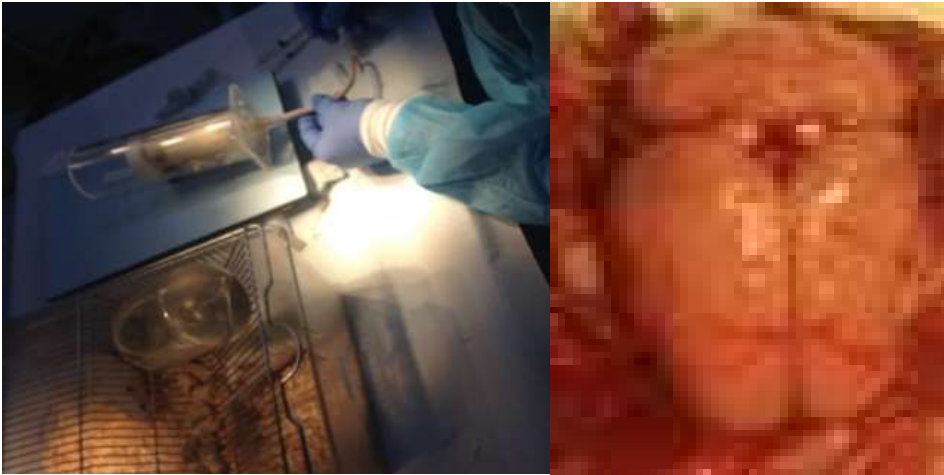
3.4.1. Farmakokinetik Çalışmalar

Elde edilen kan numuneleri heparinlenmiş tüplere aktarıldıktan sonra 10000 rpm’ de 4°C’ de 15 dakika santrifüjlendi. Elde edilen plazmadan 200 µL eppendorf tüplere alındı. Plazma üzerine 400 µL asetonitril, 200 µL metanol ve 200 µL distile su (iç standart içeren) eklendi. 10000 rpm’ de 4°C’ de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant filtreden süzülerek YPSK flakonuna alındı ve kandaki EH miktarı LC/MS yöntemi kullanılarak hesaplandı.

Beyin dokuları kontrollü olarak oda sıcaklığına getirildikten sonra cerrahi bir makasla uygun boyutu alınmış ve deney tüplerine alındı. Tüplere 1:2 a/a oranında su eklenerek dokular 6000 devirde 60 saniye homojenize edildi. Elde edilen homojenizattan 200 µL eppendorf tüplere alındı. Homojenizat üzerine 400 µL

² * In vivo çalışmalar SBÜ Gülhane Hayvan Deneyleri laboratuvarında yapılmıştır.

asetonitril, 200 μ L metanol ve 200 μ L distile su (iç standart sumatriptan içeren) eklendi. Tüpler 10000 rpm' de 4°C' de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant filtreden süzülerek YPSK viyaline alındı ve beyne geçen EH miktarı LC/MS yöntemi kullanılarak hesaplandı.



Resim 3.1. Ratlara ilaç uygulanması

Formülasyonların farmakokinetik parametreleri Microsoft Excel yazılımı PKSolver eklentisi kullanılarak gerçekleştirildi (145). EH'nin en yüksek plazma derişimi (Cmax) ve en yüksek plazma derişimine ulaşılması için geçen zaman (tmax) plazma profili gözlemlenerek ölçüldü. EH'nin her bir uygulama sonrası beyne ilaç hedefleme etkinliği (İHE) Eşitlik 5 formülü kullanılarak hesaplanmıştır. BHİ' nin yüksek olması daha iyi bir hedeflendirmenin göstergesidir (146).

Beyne ilaç hedefleme etkinliği, ilaç hedefleme etkinliği (İHE) olarak da bilinir. Zamanla beyne geçen madde oranını gösterir ve Eşitlik 6' daki gibi hesaplanır:

$$\%İHE = \frac{\left(\frac{AUC(i.n.beyin)}{AUC(i.n.kan)}\right)}{\left(\frac{AUC(i.v.beyin)}{AUC(i.v.kan)}\right)} \times 100 \quad \text{Eşitlik 5}$$

Burundan beyne doğrudan ilaç taşınma yüzdesi (İTY) ise aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$\%İTY = \frac{B_{i.n.} - B_x}{B_{i.n.}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 6}$$

$$B_x = (B(i.v.) / P(i.v.)) \times P(i.n.)$$

B_x : intranasal uygulama sonrası sistemik dolaşımdan kan beyin engeli üzerinden elde edilen beyin AUC oranı, B_{i.v.}: intravenöz uygulama sonrası elde edilen AUCbeyin değeri, P_{i.v.}: intravenöz uygulama sonrası elde edilen AUCkan değeri, B_{i.n.}: intranasal uygulama sonrası elde edilen AUC beyin değeri, P_{i.n.}: intranasal uygulama sonrası elde edilen AUC kan değeri (147).

3.4.2. Etkinlik Çalışmaları³

Migren hastalığında görülen baş ağrıları ve diğer belirtilerin tespitinde geliştirilen modeller, migren etki mekanizmasının aydınlatılmasıyla anlaşılmıştır. Bu modellerin ilkinin genel prensibi trigemino servikal etkileşimlerin modellenmesi ve trigemino vasküler sistemdeki enflamatuvar aktivasyondur. İkincisi ise nosiseptif sistem parçalarının nörojenik dural vazodilatasyon ve merkezi kontrol mekanizmaların elektrofizyolojik çalışmalar ile gösterilmesidir. Son olarak bazı özel anatomik ve fonksiyonel yapıların özel model moleküler biyoloji teknikleri ile ölçülmesi de

³ * Etkinlik çalışmaları Gülhane Eğt.Arş.Hst. Genetik AD. laboratuvarında yapılmıştır.

geliştirilen modeller arasındadır (148). Bu nedenle çalışmamızda c fos mRNA ve P maddesi miktarları ölçülmüştür.

3.4.2.1. RNA İzolasyonu

Rat beyinlerinden c fos mRNA ve P maddesi ölçümünde kullanılacak kısımlar alınarak RNASave® çözeltilisi içerisine üreticinin önerileri doğrultusunda konuldu - 80°C’de saklandı. Beyinlerin trigeminal nucleus caudalis (TNC) kısımlarından alınan 50 mg’lık kısımlar rotor-stator homojenizatör kullanılarak 60 s homojenize edildi. Daha sonra proteinaz K eklenerek 56°C’de 220 rpm’ de 30 dk çalkalayıcı içerisinde inkübasyona bırakıldı. Lizat filtreli tüplere alındı. 13000 g’de 30 saniye santrifüjlendi. Süzüntü atıldı. Filtre üzerinde kalan kısma 90 µL DNase inkübasyon tamponu ve 10 µL çalışma çözeltilisi eklendi. 15 dk. oda sıcaklığında beklendi. 500 µL yıkama tamponu I eklendi. 8000 g’ de 15 saniye santrifüjlendi. Süzüntü atıldı. 500 µL yıkama çözeltilisi II eklendi. 8000 g’ de 15 saniye santrifüjlendi. Süzüntü atıldı. 300 µL yıkama çözeltilisi II eklendi. 13000 g’ de 2 dakika santrifüjlendi. Süzüntü atıldı. 100 µL elüsyon tamponu eklendi. 8000 g’ de 1 dakika santrifüjlendi. Saf toplam RNA miktarı ve sağlıklı bir şekilde elde edilip edilmediği spektrofotometrik olarak incelendi.

3.4.2.2.c fos mRNA ve P Maddesi Geni Ekspresyon Ölçümü

Spektrofotometrik olarak belirlenen toplam RNA’ lardan genomik DNA eliminasyonu ve cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity® cDNA sentez kiti kullanılarak üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. 50 ng total RNA üzerine Random Hexamer Primer®, 600 pmol/µL’ den eklenerek son hacim 11.4 µL’ye getirildi. 10 dakika 65 °C’ de inkübasyona bırakıldı. Buz içinde soğutuldu. Üzerine dNTPs, DTT, Reverse Transcriptase® eklendi ve bu hazırlanan karışım 30 dakika 55°C’ de ve 5 dakika 85 °C’ de inkübasyona bırakıldı.

RNA ölçümü için cDNA elde edilen karışımlar buz içerisinde uygun tüplere alındı. Üzerine 4 µL PCR kalite su, 10 µL Light Cycler 480 Probes Master® ve 1 µL RealTime ready Assay® eklendi. Folyo ile kapatıldı. 2 dakika 1500 g’ de santrifüjlendi. Daha sonra PCR ile ölçümler yapıldı.

PCR ölçümlerinde c fos mRNA için “GAAGGGGCAAAGTAGAGCAG” *forward* ve “CAGCTCCCTCCTCCGATT” *reverse*, P maddesi ölçümü için “AGCCTCAGCAGTTCTTTGGA” *forward* ve “TCTGACCATGCCCCATAAAGA” *reverse* dizileri incelenmiştir.

Ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla referans gen olarak ACTB (Beta-Actin) seçildi. Reaksiyonlar üreticinin aşağıda belirtilen protokolüne bağlı kalınarak üç tekrar olacak şekilde planlandı. Miktar tayini için $\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanıldı.

Aşağıda verilen PCR protokolü kullanıldı.

- Pre-İnkübasyon
– 95 °C 10 dakika
- Amplifikasyon

– 95 °C	10 saniye	}	45 siklus
– 60 °C	30 saniye		
– 72 °C	1 saniye		
- Soğutma
– 40°C 30 saniye

Gen ekspresyonu Eşitlik 7’ de bulunan formüller yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\Delta CT = CT (\text{hedef gen}) - CT (\text{referans gen}) \quad \text{Eşitlik 7}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{hedef örnek}) - \Delta CT (\text{referans örnek})$$

$$\text{Exp} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.5. İstatistiksel Analizler

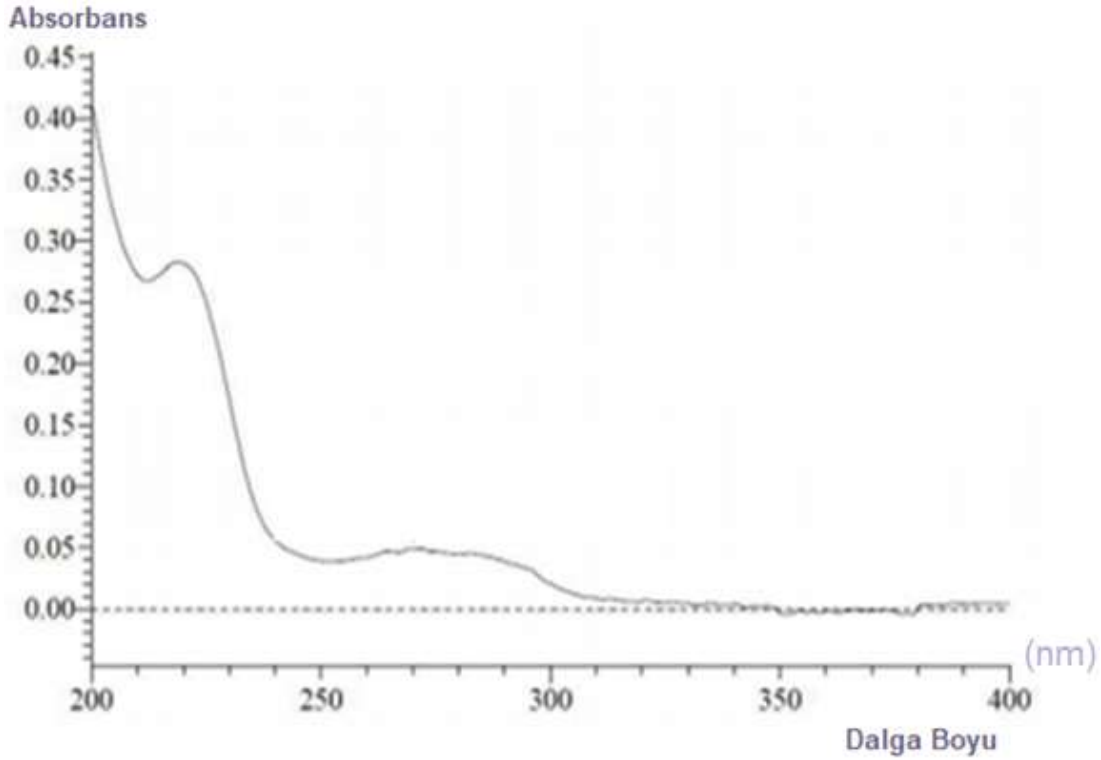
Tüm istatistiksel analizler, GraphPad Prism 6 yazılımı kullanılarak tek veya çok yönlü varyans analizi ile değerlendirildi ($P < 0.05$).

BULGULAR

4.1. Etken Maddeye Ait Bulgular

4.1.1. Etken Maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumu

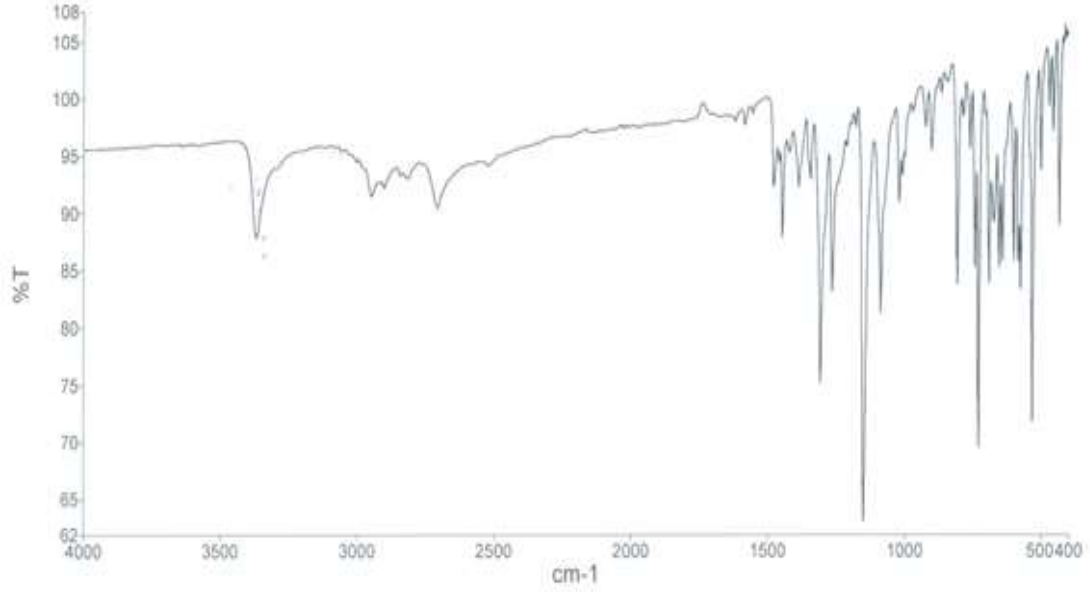
200-400 nm arası dalga boyunda taranan EH'nin 3 µg/mL derişimde, maksimum absorbens(0,29) gösterdiği dalga boyu 225 nm olarak bulundu. Söz konusu UV-spektrumu Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Eletriptan hidrobromürün dalga boyu taramasıyla elde edilen UV-spektrumu

4.1.2. Etken Maddenin Infrared (FT-IR) Spektrumu

Yöntem 2.1.2. bölümünde belirtildiği şekilde etken maddenin infrared spektrumu Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



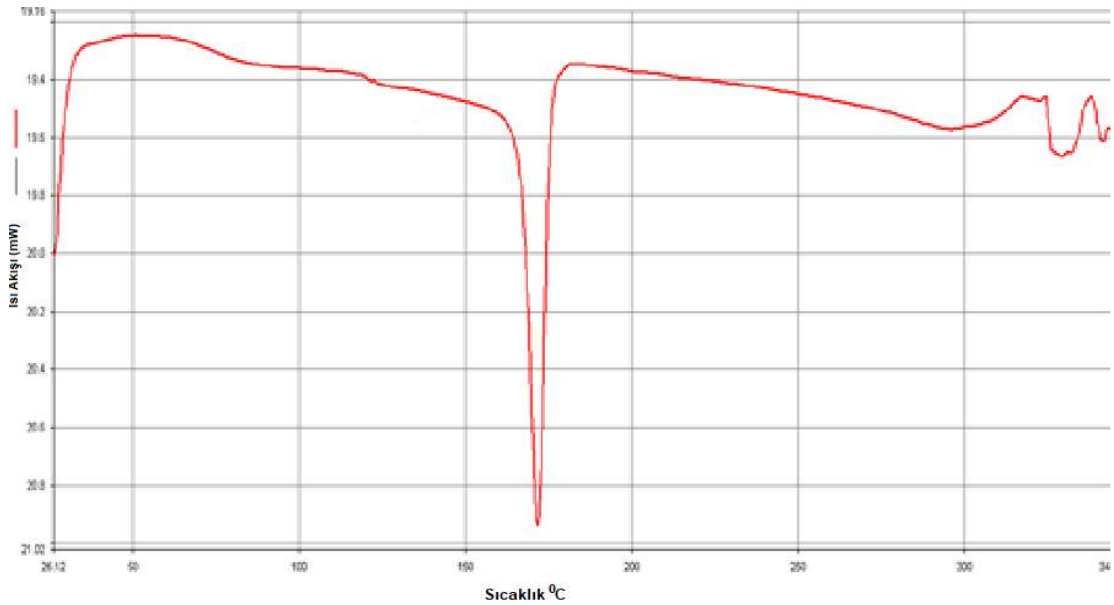
Şekil 4.2. Eletriptan hidrobromürün FT-IR spektrumu (%T: %transmittans, cm^{-1} : Dalga Sayısı)

4.1.3. Etken Maddenin Erime Derecesinin Tayini

Erime noktası tayin cihazında yapılan analizde Eletriptan Hidrobromürün erime derecesinin $170 \pm 1^\circ\text{C}$ olduğu saptandı.

4.1.4. Etken Maddenin Termal Analizi

Yöntem 2.1.4. bölümünde belirtilen şekilde yapılan çalışma sonucu elde edilen Eletriptan Hidrobromürün termal analiz grafiği Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

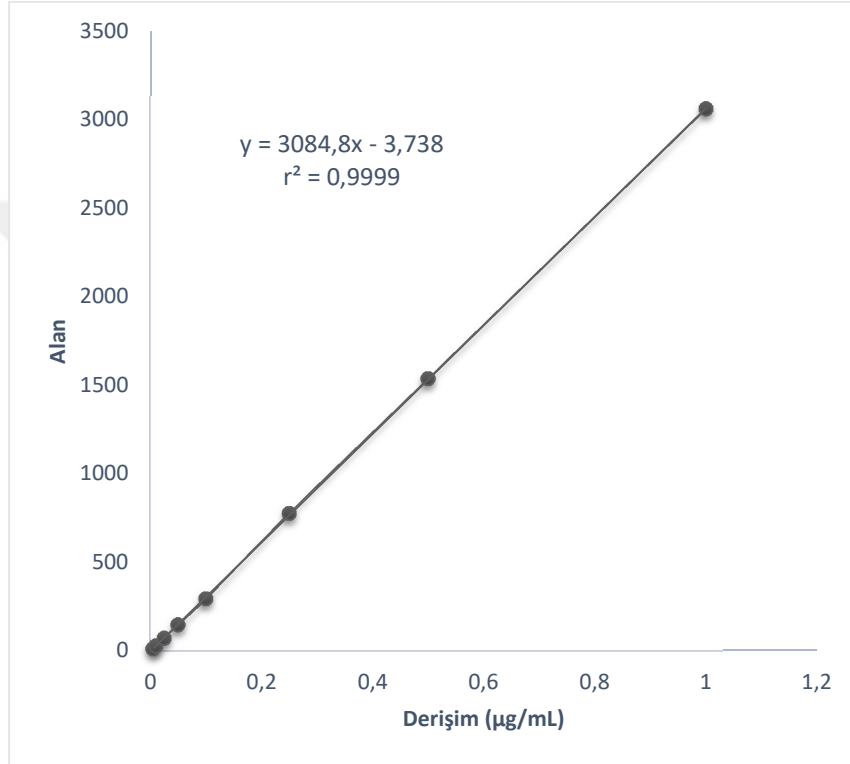


Şekil 4.3. Eletriptan hidrobromür termal analiz grafiği

4.1.5. Eletriptan Hidrobromürün Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

4.1.5.1. Doğrusallık

Eletriptan Hidrobromürün bidistile su içerisinde elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Her nokta için 3 değerın ortalaması kullanılmış, her örnek 3 defa okunmuştur.



Şekil 4.4. Eletriptan hidrobromürün distile suda YPSK kalibrasyon doğrusu ve denklemi (y: YPSK ile elde edilen pik alanı, x: Derişim (µg/mL) r^2 : Determinasyon katsayısı)

4.1.5.2. Doğruluk

EH'nin distile suda 3 farklı derişimde hazırlanan çözeltilerinin eğri altı alan değerleri okundu. Okunan değerler ve kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen % geri kazanım değerleri Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. YPSK metodu doğruluk değerleri

	1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	6. ölçüm	Ortalama	±SS	VK
Alan	13,800	13,600	14,100	13,700	13,600	13,900	13,783	0,177	1,285
Derişim	0,004	0,004	0,005	0,004	0,004	0,005	0,004	0,000	1,284
% Geri Kazanım	89,557	88,261	91,502	88,909	88,261	90,206	89,449	1,149	1,284
Alan	29,300	29,200	29,400	29,300	29,200	29,400	29,300	0,082	0,279
Derişim	0,010	0,009	0,010	0,010	0,009	0,010	0,010	0,000	0,279
% Geri Kazanım	95,025	94,701	95,349	95,025	94,701	95,349	95,025	0,265	0,279
Alan	73,800	73,700	73,800	74,200	73,400	73,600	73,750	0,243	0,330
Derişim	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,000	0,330
% Geri Kazanım	95,712	95,583	95,712	96,231	95,194	95,453	95,647	0,315	0,330

(n=3)

4.1.5.3. Kesinlik

Hazırlanan EH çözeltisinin, iki ayrı günde 225 nm’de YPSK ile verdiği alanlar Çizelge 4.2’de verilmiştir. Çözelti 6 defa değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. YPSK metodu kesinlik değerleri

		1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	6. ölçüm	Ortalama	±SS	VK
1. Gün	Alan	73,800	73,700	73,800	74,200	73,400	73,600	73,750	0,243	0,330
	Derişim	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,000	0,330
	% Geri Kazanım	95,712	95,583	95,712	96,231	95,194	95,453	95,647	0,315	0,330
2. Gün	Alan	74,000	73,900	73,800	73,400	73,700	73,500	73,717	0,211	0,287
	Derişim	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,024	0,000	0,287
	% Geri Kazanım	95,972	95,842	95,712	95,194	95,583	95,323	95,604	0,274	0,287

(n=6)

4.1.5.4. Tekrar Elde Edilebilirlik

Hazırlanan, 6 ayı EH çözeltisinin 225nm’de iki ayrıanalist tarafından uygulanması sonucu YPSK ile verdiği alanlar Çizelge 4.3’te verilmiştir.

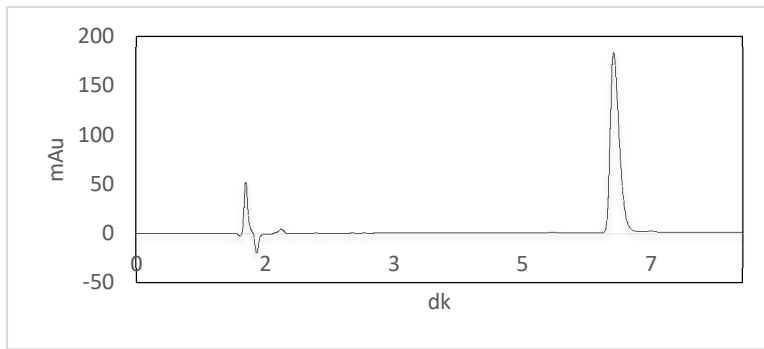
Çizelge 4.3: YPSK metodu tekrar elde edilebilirlik değerleri

		1. ölçüm	2. ölçüm	3. ölçüm	4. ölçüm	5. ölçüm	6. ölçüm	Ortalama	±SS	VK
1. Analist	Alan	29,300	29,200	29,400	29,300	29,200	29,400	29,300	0,082	0,279
	Derişim	0,010	0,009	0,010	0,010	0,009	0,010	0,010	0,000	0,279
	% Geri Kazanım	95,025	94,701	95,349	95,025	94,701	95,349	95,025	0,265	0,279
2. Analist	Alan	29,200	29,100	29,000	29,400	29,300	29,300	29,217	0,134	0,460
	Derişim	0,009	0,009	0,009	0,010	0,010	0,010	0,009	0,000	0,460
	% Geri Kazanım	37,880	37,751	37,621	38,140	38,010	38,010	37,902	0,174	0,460

(n=6)

4.1.5.5. Özgünlük

Kullanılan çözücülerin, polimerlerin, etken maddenin ve yüzey etken maddelerin enjekte edildiğinde ve 1.0mL/dk akışta, 25°C kolon fırını sıcaklığında, C8 kolon ile EH’nin miktar tayinini etkileyecek bir pik vermediği gözlenmiştir. EH’nin özgün piki Şekil 4.5’te gösterilmiştir.



Şekil 4.5. YPSK yöntemiyle 225 nm’de elde edilen eletriptan hidrobromür piki

4.1.5.6. Teşhis ve Tayin Sınırları

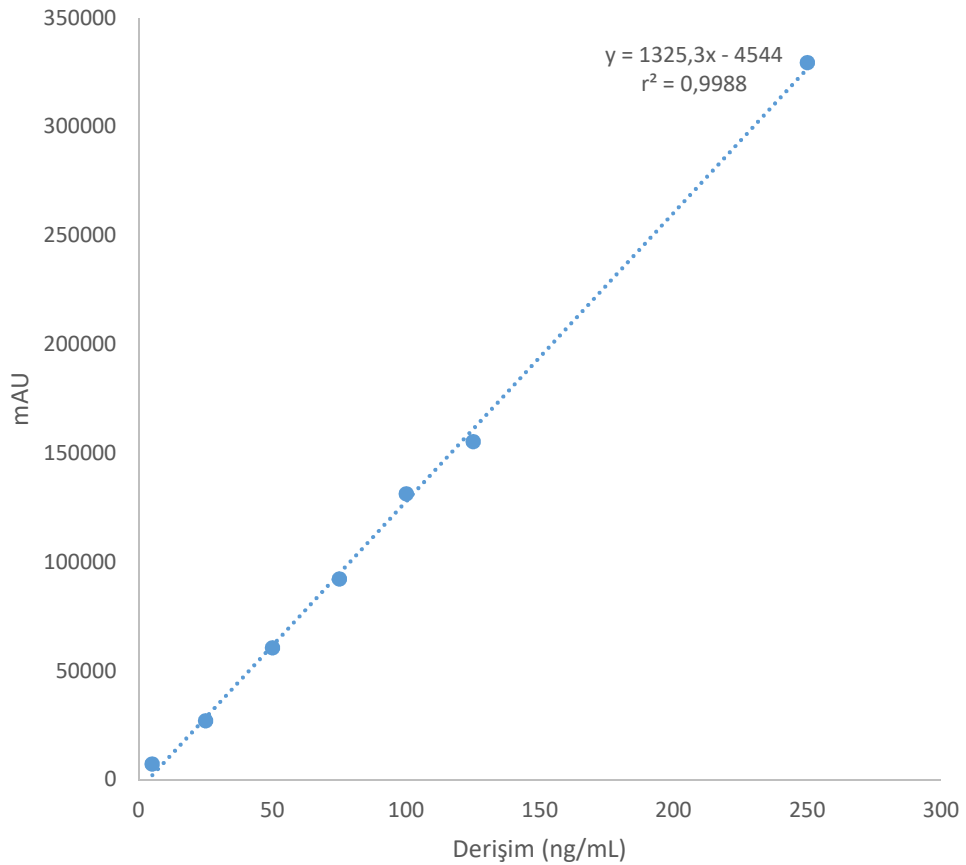
Aynı ortama ait kalibrasyon denklemi kullanılarak LOD değeri $0.28\mu\text{g/mL}$ ve LOQ değeri $0.86\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır.

4.1.6. Eletriptan Hidrobromürün Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini Yöntem Validasyonu

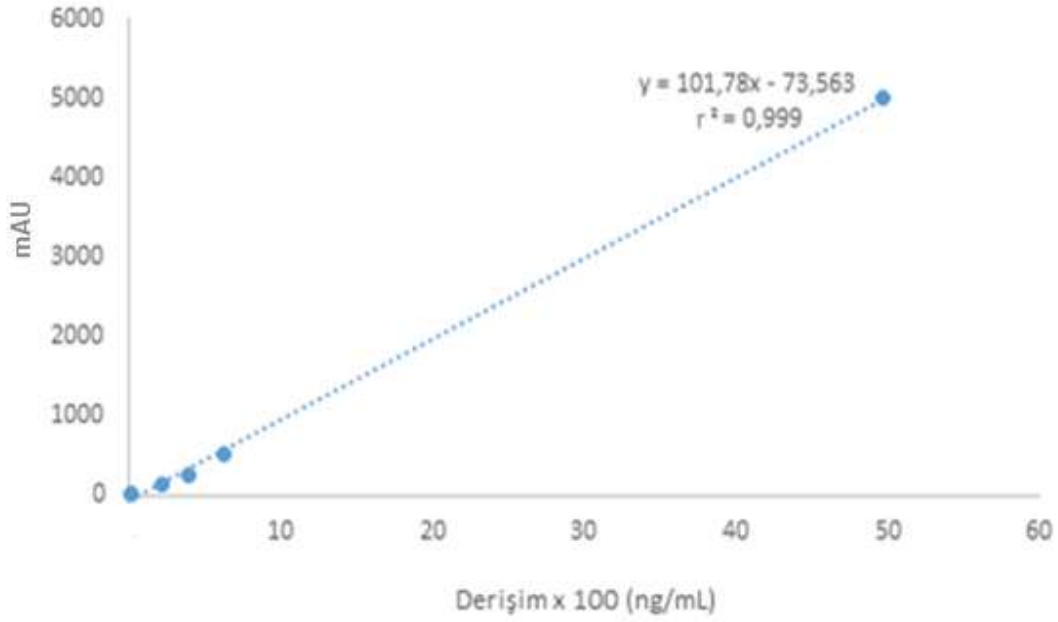
Yöntem bölümünde belirtilen şartlarda yapılan miktar tayini çalışmalarına ait validasyon bulguları aşağıda sunulmuştur.

4.1.6.1. Doğrusallık

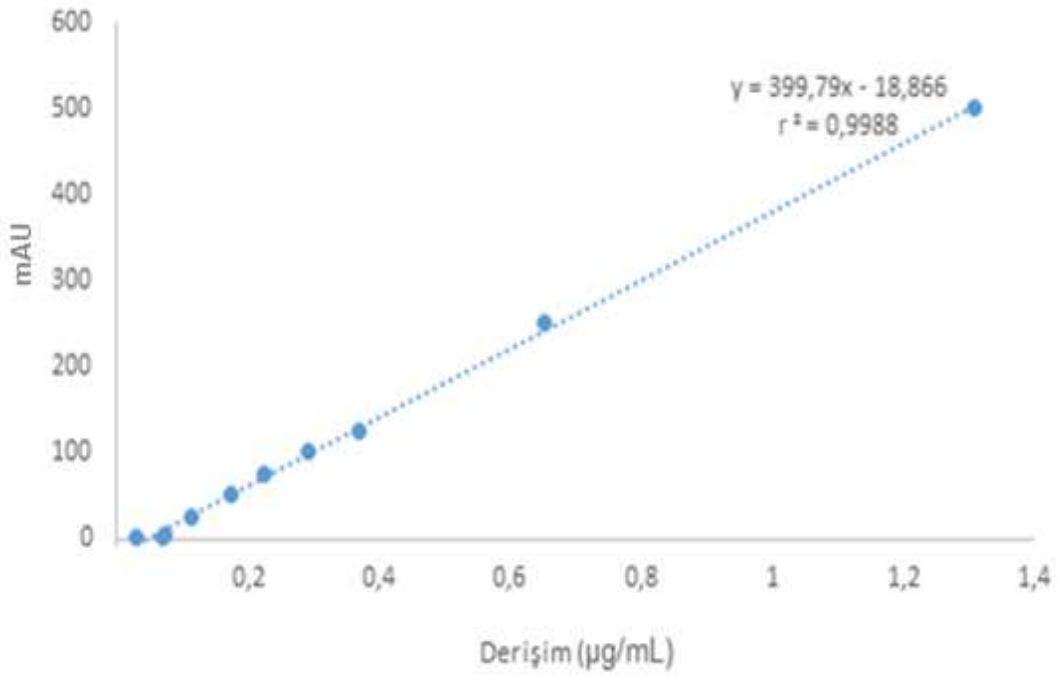
EH'nin plazma ve beyin içerisinde elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.6-4.8 'de gösterilmiştir. Her nokta için 3 değerın ortalaması kullanılmış, her örnek 3 defa okunmuştur.



Şekil 4.6. Eletriptan hidrobromürün hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi (y: YPSK ile elde edilen pik alanı, x: Derişim ($\mu\text{g/mL}$) r^2 : Determinasyon katsayısı)



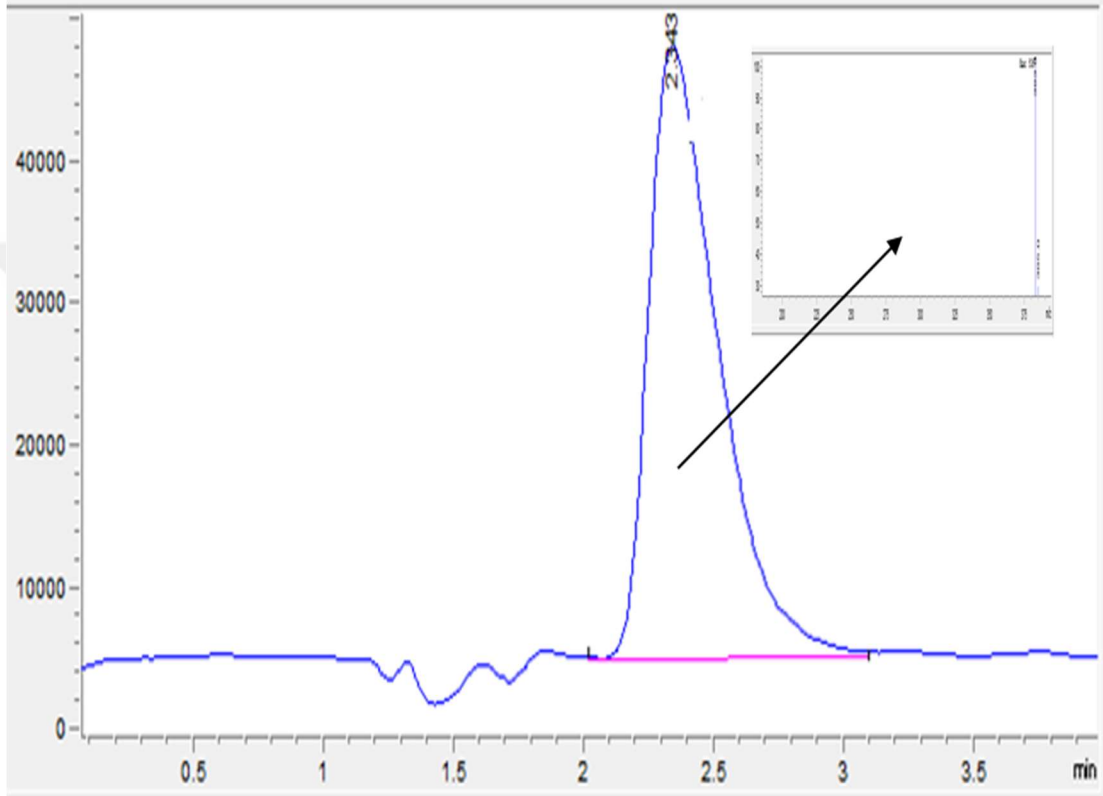
Şekil 4.7. Eletriptan hidrobromürün plazmadaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (y: YPSK ile elde edilen pik alanı, x: Derişim ($\mu\text{g/mL}$) r^2 : Determinasyon katsayısı)



Şekil 4.8. Eletriptan hidrobromürün beyindeki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (y: YPSK ile elde edilen pik alanı, x: Derişim ($\mu\text{g/mL}$) r^2 : Determinasyon katsayısı)

4.1.6.2. Özgünlük

Kullanılan biyolojik ortam ve etken maddelerin enjekte edildiğinde ve 1.0mL/dk akışta, 25°C kolon fırını sıcaklığında, C18 kolon ile EH'nin miktar tayinini etkileyecek bir pik vermediği gözlenmiştir. EH'nin özgün piki Şekil 4.9'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. LC-MS yöntemi ile elde edilen eletriptan hidrobromür piki

4.1.6.3. Teşhis ve Tayin Sınırları

Aynı ortama ait kalibrasyon denklemi kullanılarak *in vitro* yöntemine ait LOD değeri 0.12 ng/mL ve LOQ değeri 0.38ng/mL; plazma yöntemine ait LOD değeri 0.48 ng/mL ve LOQ değeri 1.47 ng/mL; beyin homojenizatı yöntemine ait LOD değeri 0.18 ng/mL ve LOQ değeri 0.55 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

4.1.7. Etken Maddeye Ait Organik/Su Fazı Dağılım Çalışmaları

10 mg EH'nin 8 mL su/2 mL diklorometan içerisine karıştırılması sonucu su fazındaki EH miktarı 9.28 ± 0.34 mg olarak tespit edilmiştir.

4.2. Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması

Polimerik nanopartiküller hazırlanırken, PLGA polimeri kullanılarak emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yönteminden faydalanıldı. Bu amaçla EH'nin hem Y/S hem de S/Y/S emülsiyonları hazırlanarak özellikleri incelendi.

4.2.1. Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi

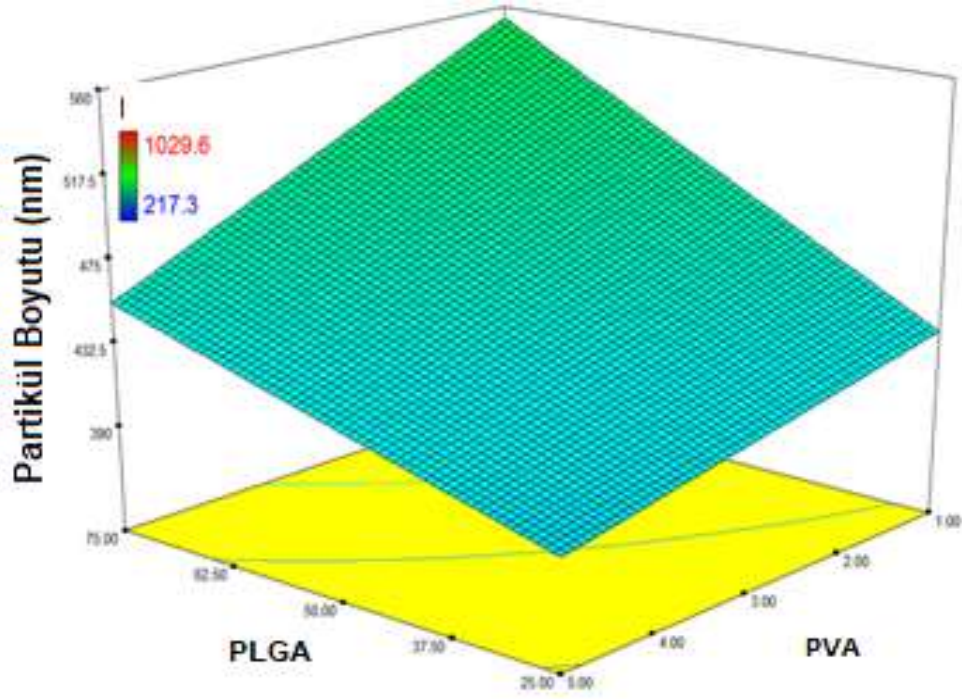
D-Optimal tasarım ile belirlenen parametrelerle Y/S emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yöntemiyle elde edilen partiküllerin büyüklükleri ve polidispersite indeksi Çizelge 4.5' de belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre belirlenen polimer, etken madde ve yüzey etken madde derişimleri ile sonikasyon zaman ve enerjisinin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi üzerine etkilerinin istatistik sonuçları Çizelge 4.4, Şekil 4.10-4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.4: D-Optimal tasarım ANOVA sonuçları

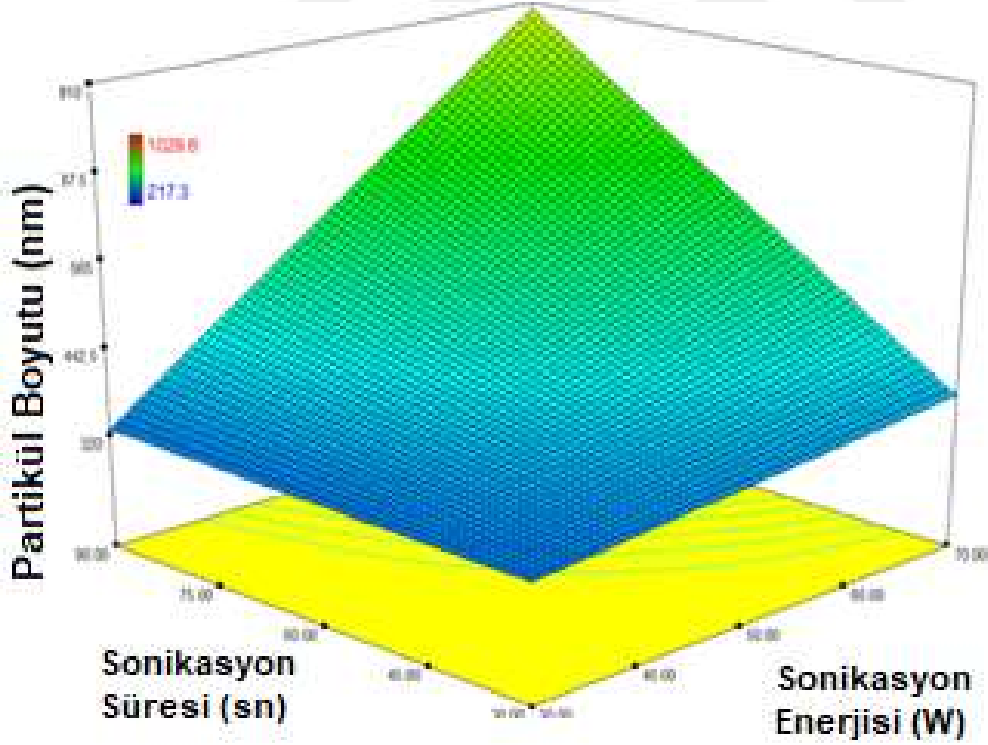
	Partikül Boyutu (Model: 2FI)				PDI (Model: Linear)					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value
Model	1131361.54	15	75424.10	9.84	< 0.0001	0.3800	5	0.0760	3.24	0.0204
X1-PLGA Kons.	47107.51	1	47107.51	6.14	0.0240	0.0250	1	0.0250	1.06	0.3120
X2-PVA Kons.	32755.52	1	32755.52	4.27	0.0543	0.0870	1	0.0870	3.71	0.0647
X3-EH Kons.	10037.22	1	10037.22	1.31	0.2684	0.0018	1	0.0018	0.078	0.7821
X4-Sonikasyon Enerji	398801.18	1	398801.18	52.01	< 0.0001	0.1800	1	0.1800	7.85	0.0093
X5- Sonikasyon Zamanı	294744.64	1	294744.64	38.44	< 0.0001	0.0740	1	0.0740	3.14	0.0874
X1*X2	4925.89	1	4925.89	0.64	0.4339					
X1*X3	8372.15	1	8372.15	1.09	0.3107					
X1*X4	51.05	1	51.05	0.01	0.9359					
X1*X5	8970.89	1	8970.89	1.17	0.2945					
X2*X3	5379.52	1	5379.52	0.70	0.4139					
X2*X4	7635.41	1	7635.41	1.00	0.3323					
X2*X5	8285.72	1	8285.72	1.08	0.3131					
X3*X4	24577.81	1	24577.81	3.21	0.0912					
X3*X5	27055.71	1	27055.71	3.53	0.0776					
X4*X5	241119.46	1	241119.46	31.44	< 0.0001					
Residual	130362.84	17	7668.40			0.6300	27	0.0230		
Lack of Fit	122972.17	13	9459.40	5.12	0.0635	0.5900	23	0.0260	2.62	0.1808
Pure Error	7390.67	4	1847.67			0.0390	4	0.0098		
Cor Total	1261724.38	32				1.0100	32			

Çizelge 4.5. S/Y emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yöntemiyle elde edilen partiküllerin büyüklükleri ve polidispersite indeksleri

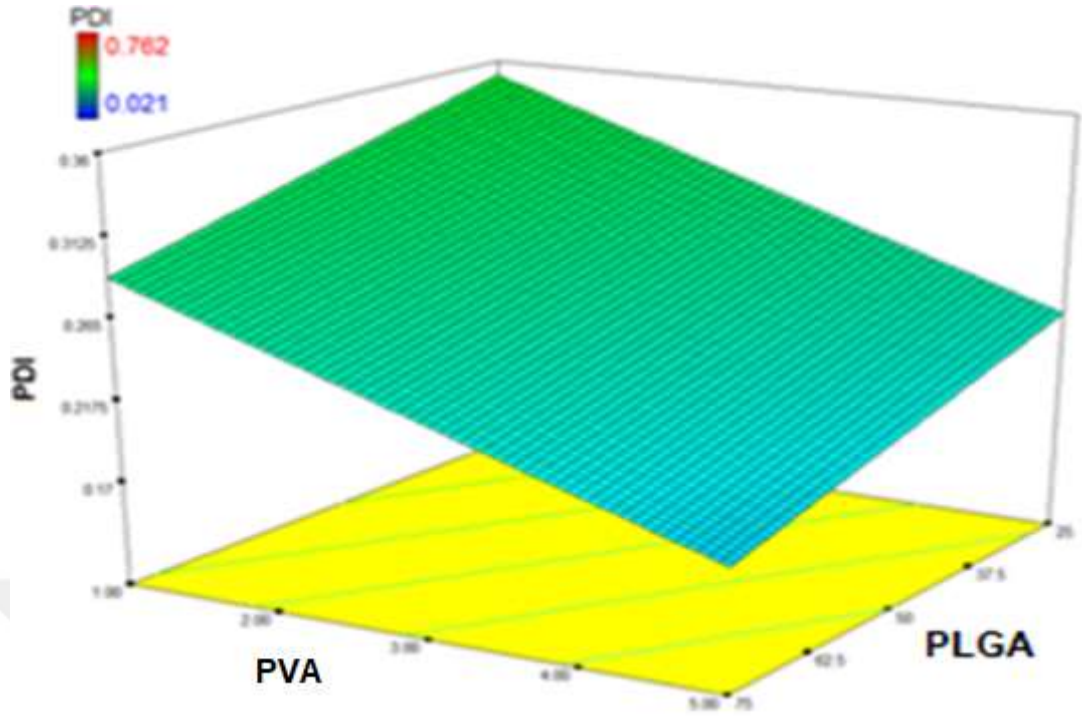
	X1:PLGA (mg)	X2:PVA (%)	X3:EH (mg)	X4: Sonikasyon Enerjisi (W)	X5:Sonikasyon Zamanı(sn)	Y1: Z-Ave (nm)	Y2: PDI
1	75.00	1.00	15.00	30.00	60.00	438.7±270.7	0.381
2	75.00	5.00	5.00	70.00	30.00	411.6±195.9	0.227
3	75.00	5.00	15.00	30.00	30.00	316.8±124.2	0.154
4	75.00	1.00	5.00	70.00	30.00	605.4±372.0	0.377
5	25.00	1.00	5.00	30.00	30.00	265.6±137.1	0.266
6	25.00	5.00	15.00	30.00	60.00	233.1±129.2	0.307
7	25.00	1.00	5.00	30.00	90.00	289.7±141.8	0.241
8	75.00	1.00	10.00	30.00	30.00	418.1±61.0	0.021
9	25.00	1.00	5.00	70.00	30.00	312.1±88.0	0.080
10	75.00	1.00	5.00	50.00	90.00	544.8±384.1	0.497
11	75.00	1.00	15.00	30.00	60.00	324.5±113.6	0.122
12	75.00	5.00	5.00	70.00	90.00	607.8±211.5	0.121
13	25.00	5.00	5.00	30.00	30.00	299.6±142.9	0.228
14	25.00	5.00	5.00	50.00	90.00	390.7±177.0	0.205
15	50.00	3.00	12.50	50.00	60.00	454.0±205.9	0.218
16	25.00	1.00	15.00	70.00	30.00	419.1±281.6	0.452
17	50.00	3.00	12.50	50.00	60.00	426.6±193.7	0.206
18	50.00	5.00	15.00	30.00	90.00	289.8±53.6	0.034
19	75.00	5.00	15.00	70.00	90.00	872.5±411.8	0.223
20	75.00	5.00	10.00	30.00	90.00	412.8±61.1	0.022
21	50.00	5.00	5.00	30.00	90.00	352.9±122.8	0.121
22	50.00	1.00	5.00	70.00	90.00	877.1±761.3	0.753
23	75.00	3.00	15.00	70.00	30.00	384.7±210.4	0.299
24	25.00	1.00	15.00	70.00	90.00	788.5±500.7	0.403
25	75.00	3.00	5.00	30.00	30.00	372.7±146.5	0.154
26	25.00	5.00	15.00	70.00	30.00	309.0±91.5	0.088
27	25.00	1.00	15.00	30.00	30.00	317.1±108.8	0.118
28	25.00	5.00	15.00	70.00	90.00	1029.6±898	0.762
29	75.00	5.00	15.00	30.00	30.00	289.0±87.6	0.092
30	50.00	1.00	15.00	30.00	90.00	331.0±170.4	0.265
31	25.00	5.00	5.00	30.00	30.00	284.9±110.2	0.150
32	25.00	5.00	5.00	70.00	60.00	360.8±193.7	0.288
33	25.00	5.00	15.00	50.00	30.00	217.3±106.7	0.241



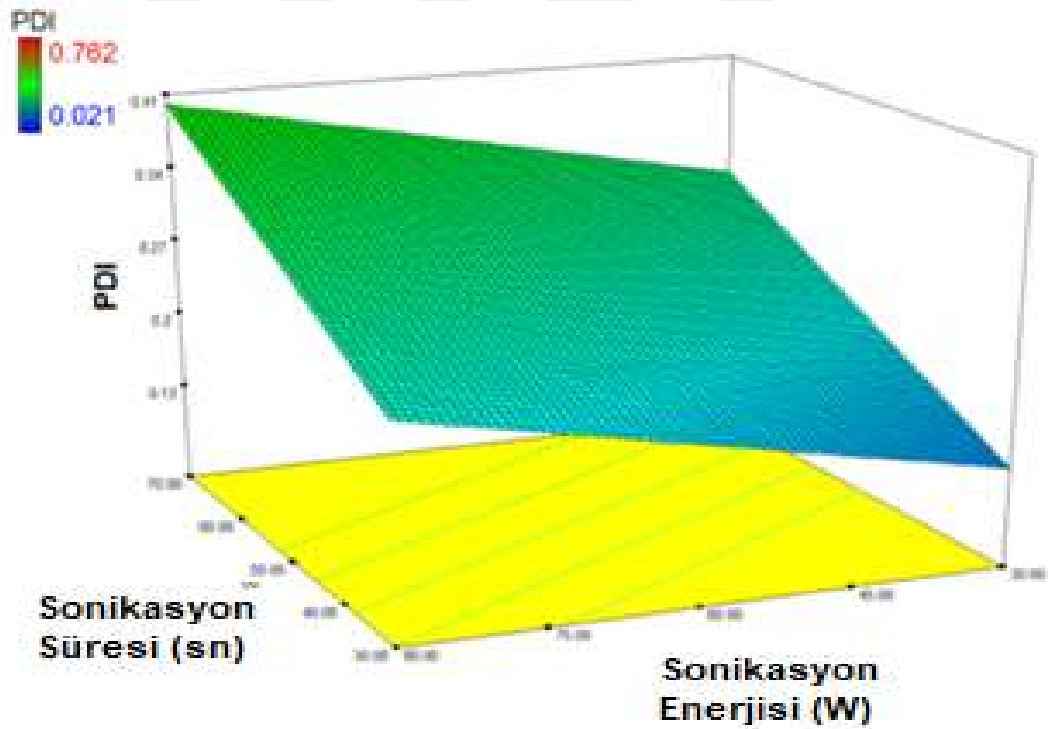
Şekil 4.10. Polimer ve stabilizan oranının partikül büyüklüğü üzerine etkisi



Şekil 4.11. Sonikasyon zamanı ve sonikasyon enerjisinin partikül büyüklüğü üzerine etkisi



Şekil 4.12. Polimer ve stabilizan oranının polidispersite indeksi üzerine etkisi



Şekil 4.13. Sonikasyon zamanı ve sonikasyon enerjisinin polidispersite indeksi üzerine etkisi

4.2.2. S/Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi

Çizelge 3.2’de deney parametreleri verilen yöntemle hazırlanan nanopartiküllerde farklı işlem parametrelerinin partikül üzerindeki etkileri aşağıda incelenmiştir.

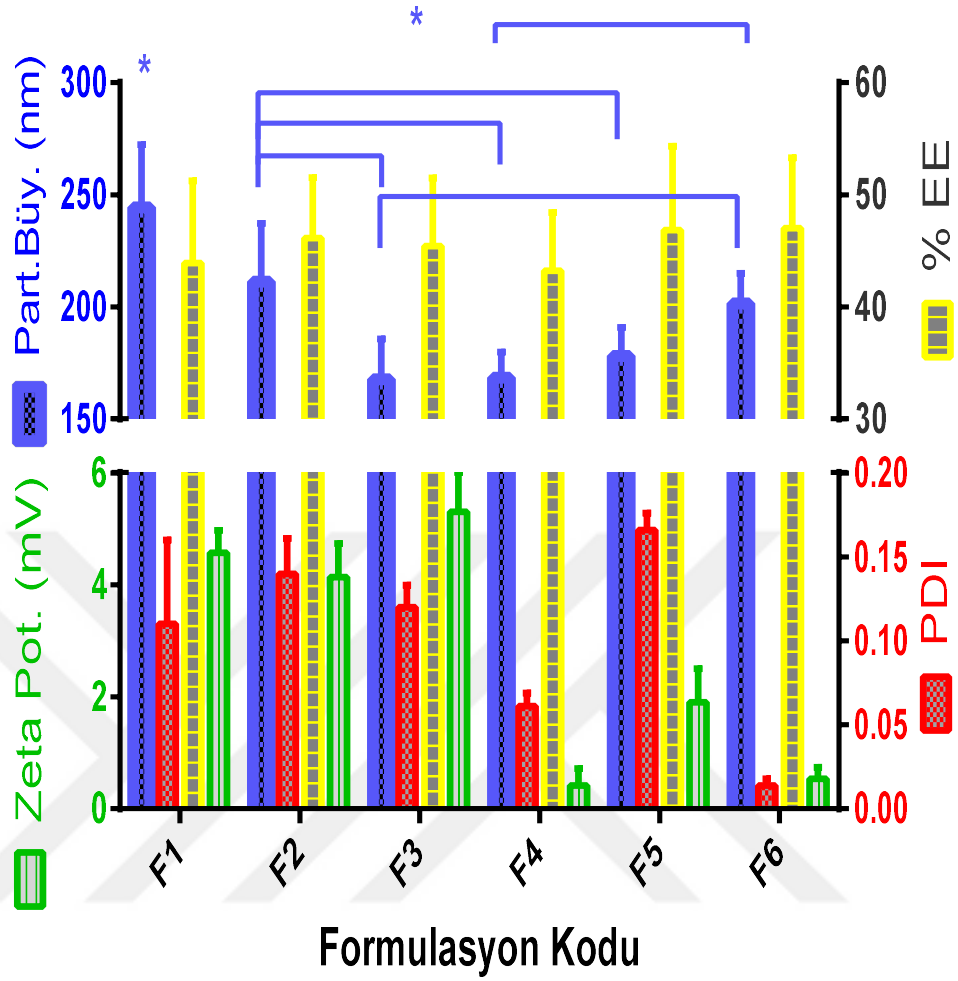
4.2.2.1. Etken Madde, Polimer, Stabilizan Derişiminin Nanopartikül Üzerine Etkileri

EH, PLGA ve stabilizan olarak kullanılan PVA’ nın farklı derişimlerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve etken madde enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri Çizelge 4.6’da ve Şekil 4.14’ te gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Etken madde, polimer ve stabilizan derişiminin nanopartikül üzerine etkileri

S.Nu.	PLGA Kons.	EM Kons	İç Faz PVA (%)	Dış Faz PVA (%)	Su faz pH	Prt. Büy. (nm)	PDI	% EE	Zeta Pot. (mV)
F1	90	1	1	1	7	244,3±28,1	0,110±0,050	43,89±7,34	-4,57±0,4
F2	60	1	1	1	7	211.2±26.0	0.140±0.021	46,12±5,42	-4,14±0,6
F3	90	5	3	3	7	167.6±18.1	0.120±0.013	45,40±6,11	-5,30±0,7
F4	90	1	3	3	7	168.4±11.4	0.061±0.008	43,24±5,19	-0,42±0,3
F5	60	1	3	1	7	178.2±12.5	0.166±0.010	46,84±7,49	-1,90±0,6
F6	90	1	1	3	7	201.5±13.6	0.014±0.004	47,02±6,28	-0,54±0,2

(n=3)

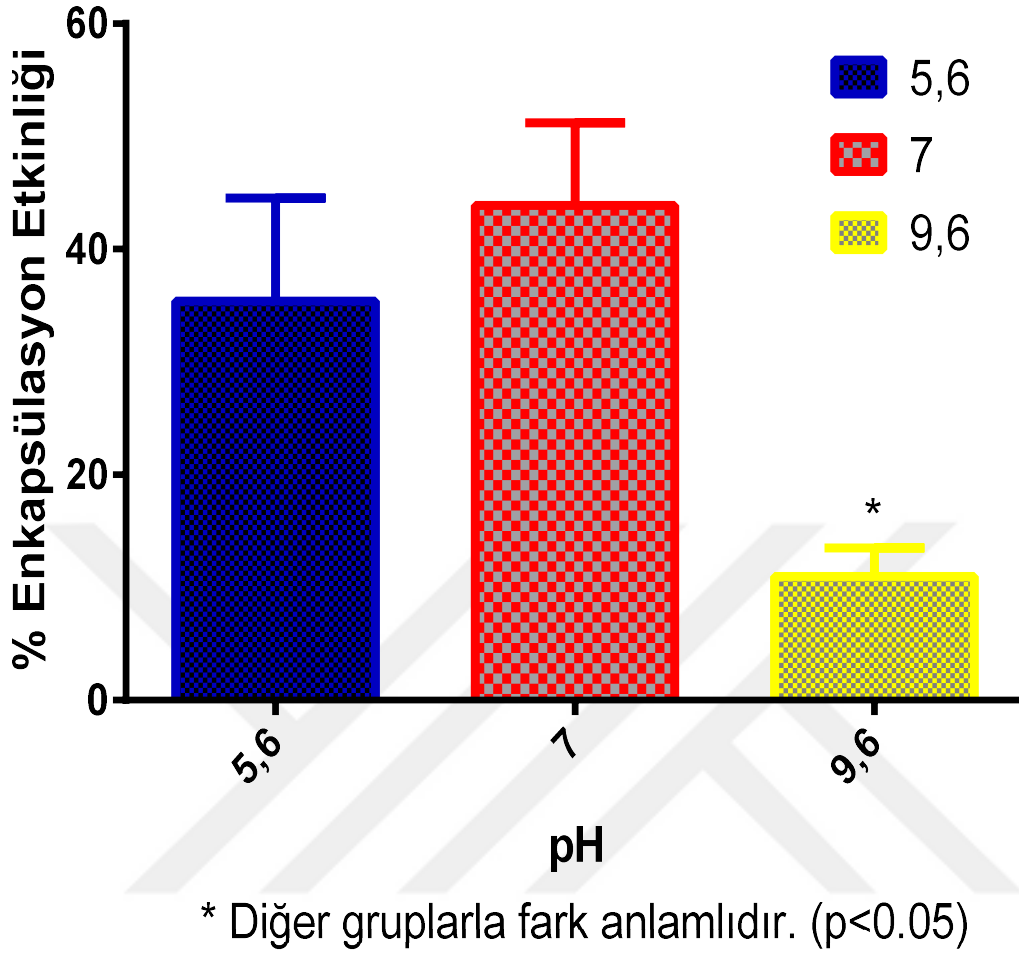


*Partikül Büyüklüğü için F1 ile tüm gruplar arası ve seçili gruplar için fark anlamlıdır ($p<0.05$)

Şekil 4.14. Formülasyon parametrelerinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, % enkapsülasyon etkinliği ve polidispersite indeksi üzerine etkileri

4.2.2.2. Su Fazı pH Değerinin Nanopartikül Yükleme Etkinliği Üzerine Etkisi

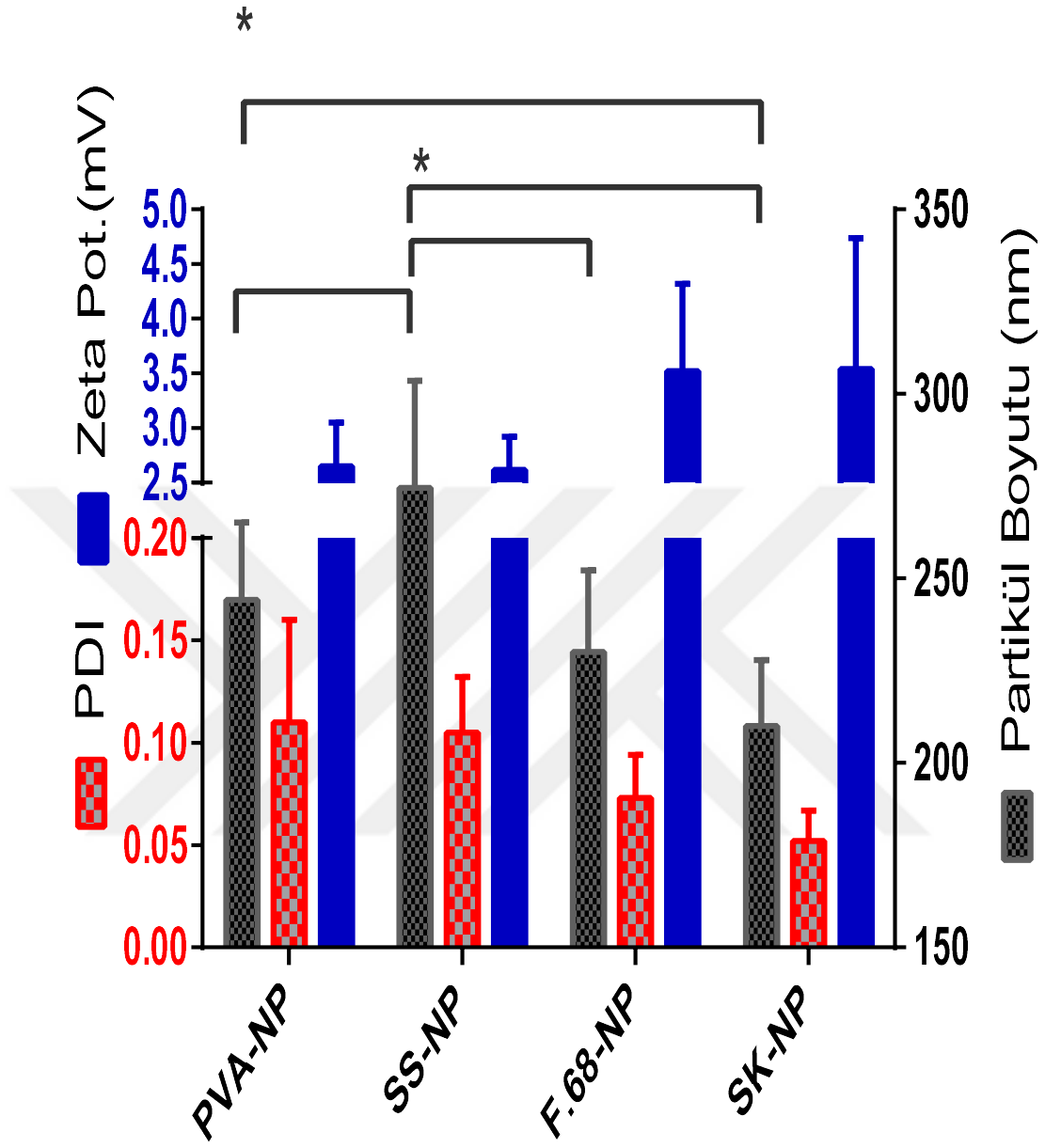
90 mg PLGA, 3 mg Eletriptan Hidrobromür, %1 iç su fazı ve %1 dış su fazında PVA oranları kullanılarak asitik, nötr ve bazik olarak seçilen 3 farklı pH değerinin (5.6, 7, 9.6) nanopartiküllere Eletriptan Hidrobromür yüklenmesi üzerine etkisi Şekil 4.15' de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Su fazı pH değerinin nanopartikül % enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

4.2.2.3. Yüzey Etken Maddenin Enkapsülasyon Etkinliği Üzerine Etkisi

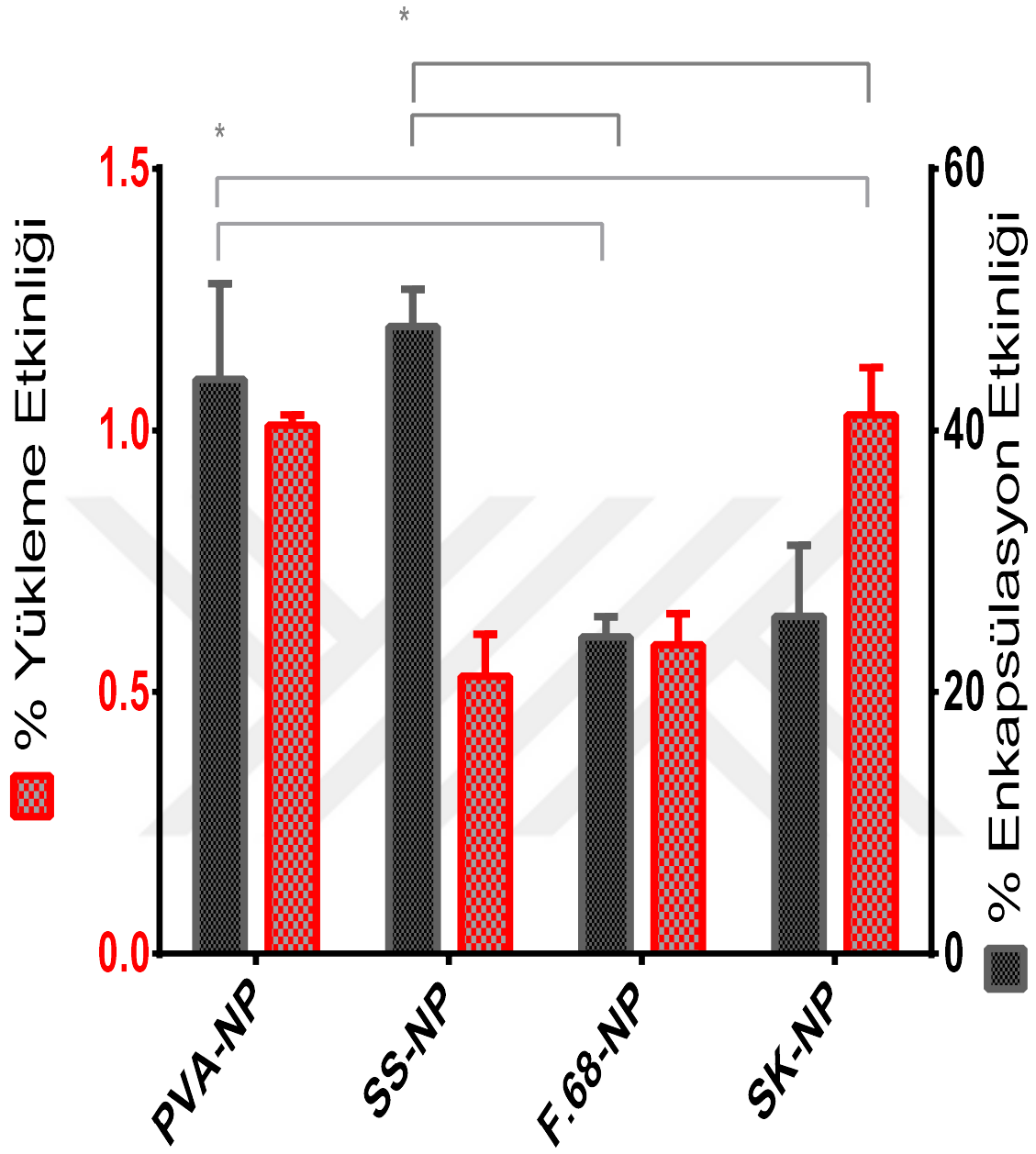
90 mg PLGA, 1 mg Eletriptan Hidrobromür, dış su fazında %1 PVA ve iç su fazında farklı yüzey etken maddeler kullanılarak nanopartiküllere Eletriptan Hidrobromür yüklenmesi üzerine etkileri incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.16-17'de sunulmuştur.



Stabilizan ve YEM Türü

* Seçili gruplar arası fark anlamlıdır (Partikül büyüklüğü) ($p < 0.05$).

Şekil 4.16. Yüzeyletken maddenin nanopartikül partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi üzerine etkisi



Stabilizan ve YEM Türü

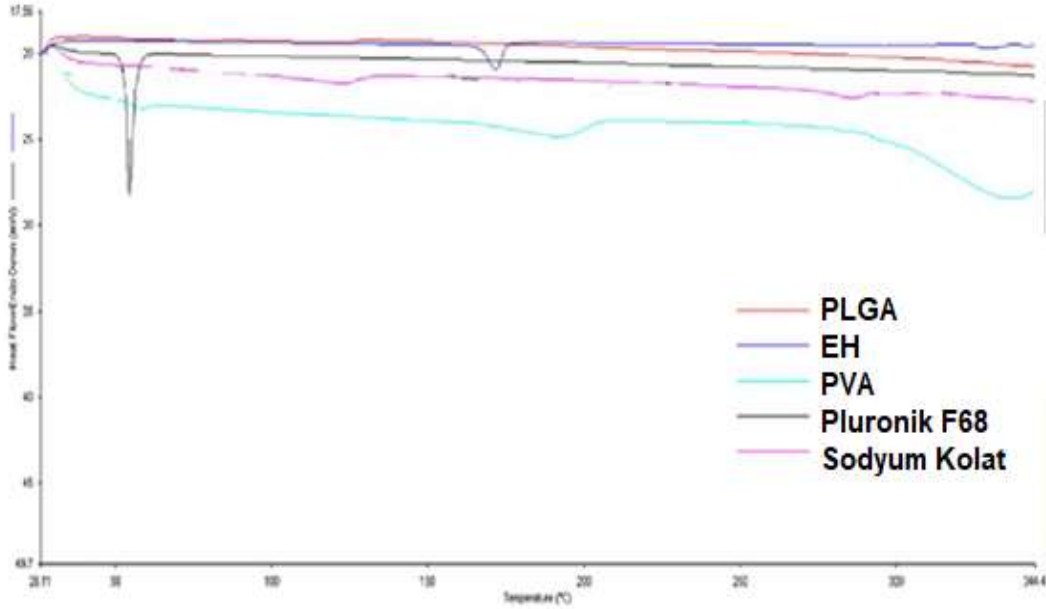
*: Seçili gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$)

Şekil 4.17. Yüzey etkenmaddenin nanopartikül enkapsülasyon ve yükleme özellikleri üzerine etkisi

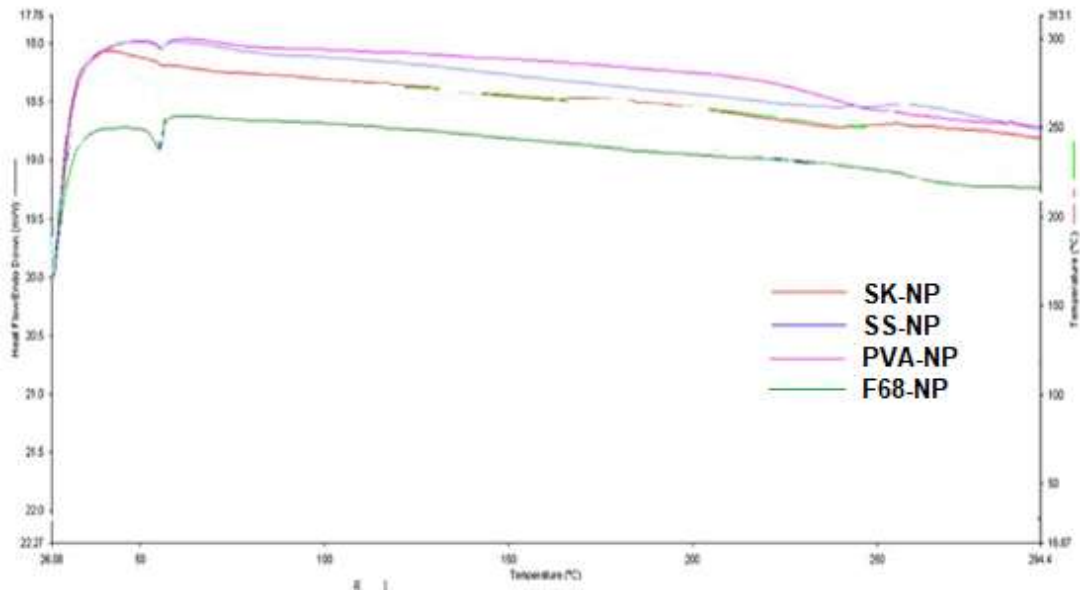
4.3. Nanopartikül Özellikleri

4.3.1. DTK Analizi

Etken madde ve kullanılan yardımcı maddelere ait termogramlar Şekil 4.18’ de, hazırlanan nanopartiküllere ait termogramlar ise Şekil 4.19’ da gösterilmiştir.



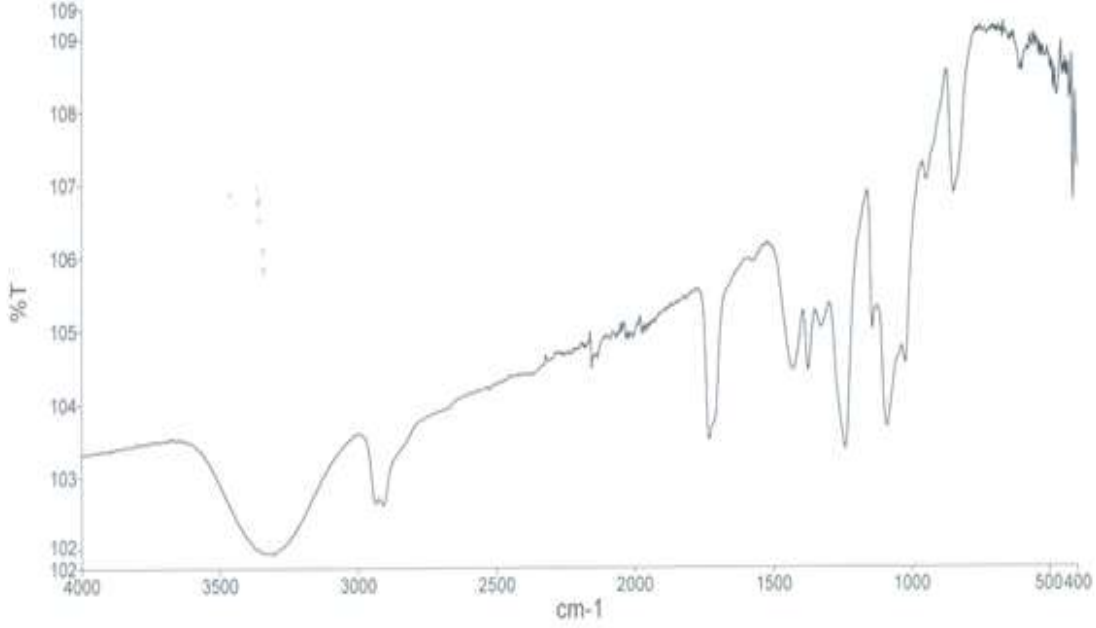
Şekil 4.18. Kullanılan etken madde ve yardımcı maddelere ait DTK termogramları.



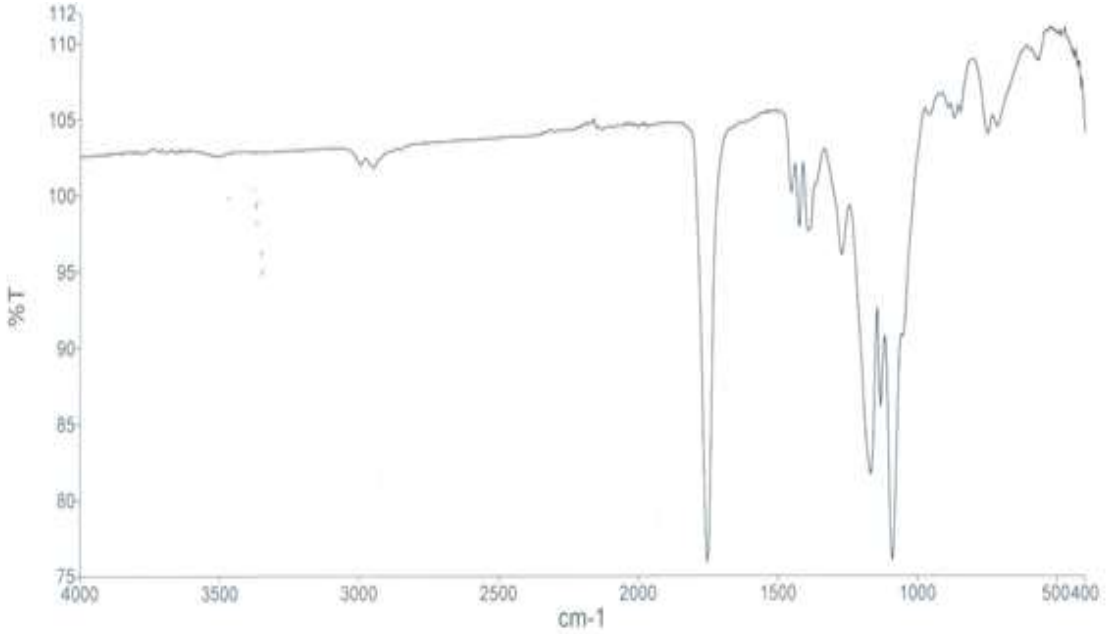
Şekil 4.19. Farklı YEM ve stabilizanlar ile hazırlanan nanopartiküllerin DTK termogramları

4.3.2. FT-IR Analizi

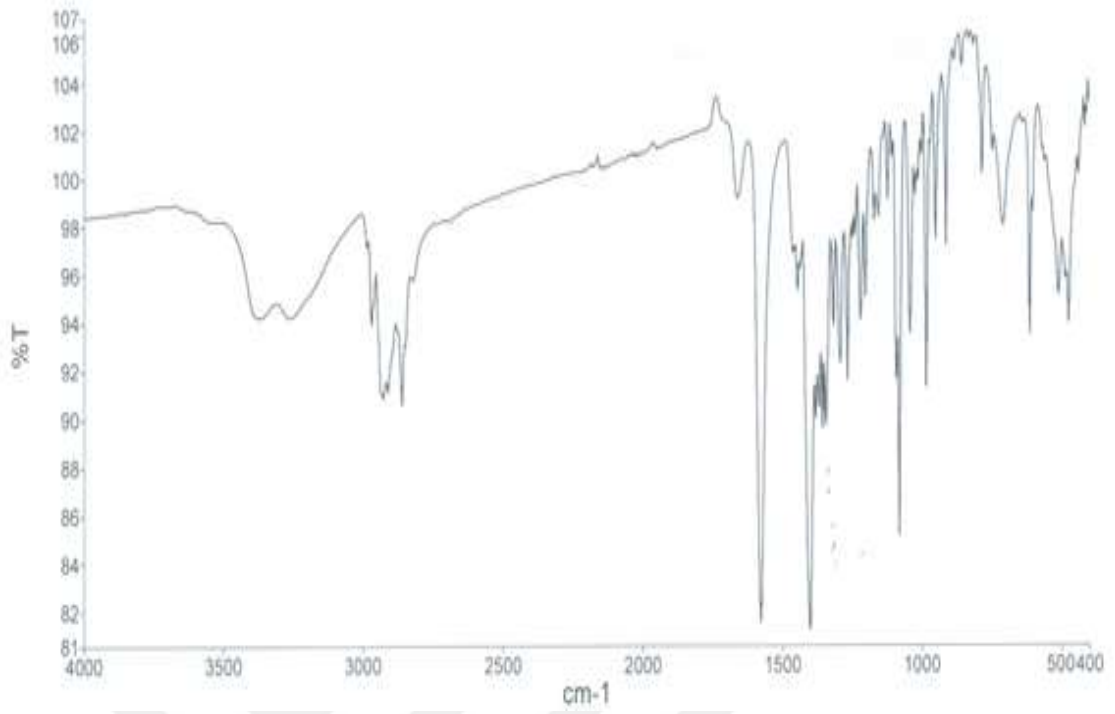
Etken madde ve kullanılan yardımcı maddelere ait FT-IR spektrumları Şekil 4.20-23' te, hazırlanan naopartiküllere ait spektrumlar ise Şekil 4.24-27' de gösterilmiştir.



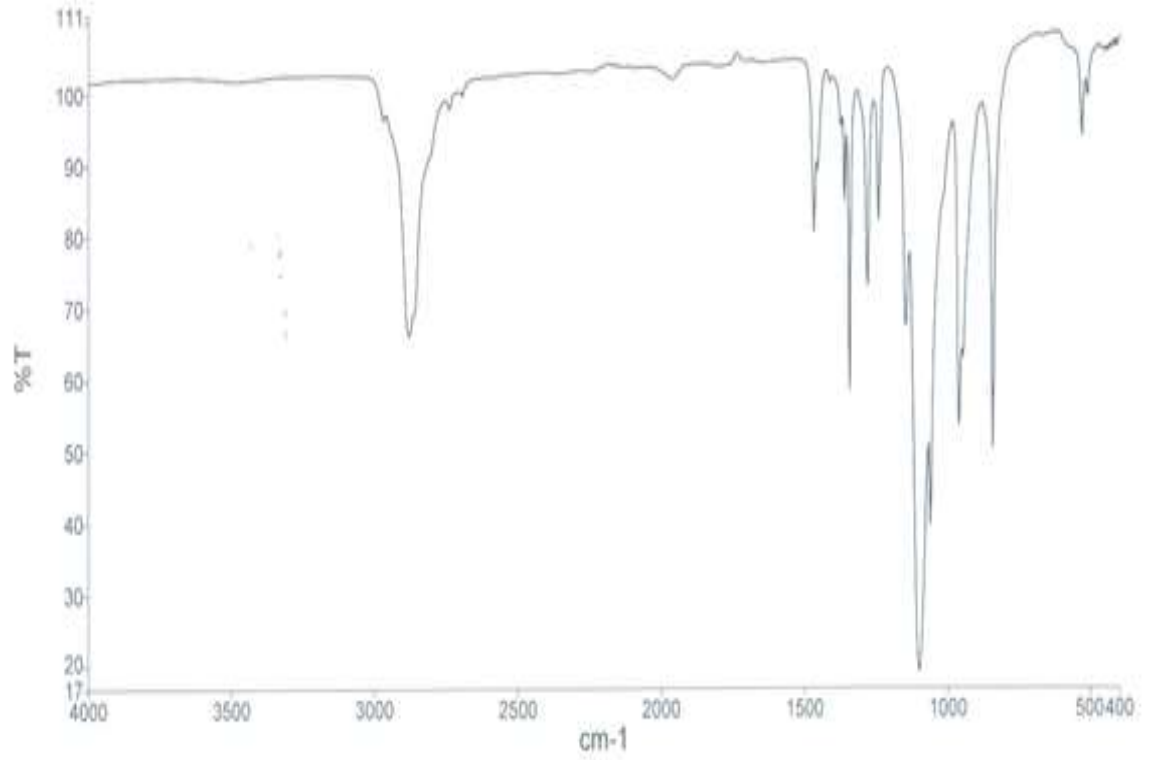
Şekil 4.20. PVA'nın FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm^{-1} : Dalga Sayısı)



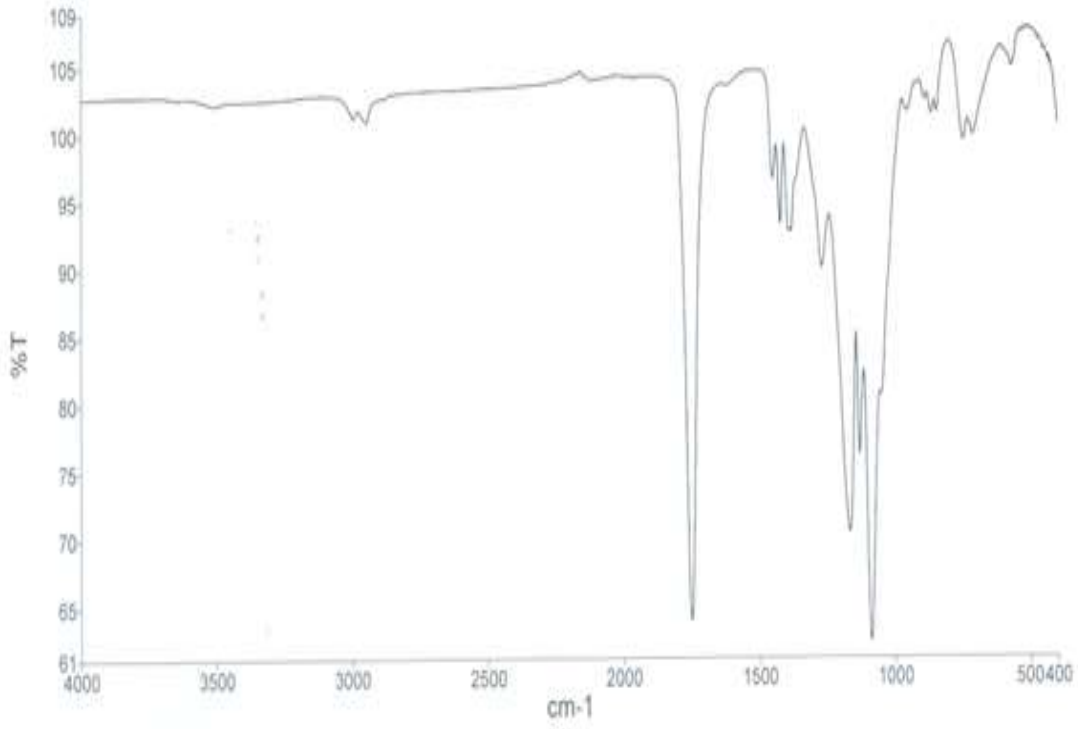
Şekil 4.21. PLGA'nın FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm^{-1} : Dalga Sayısı)



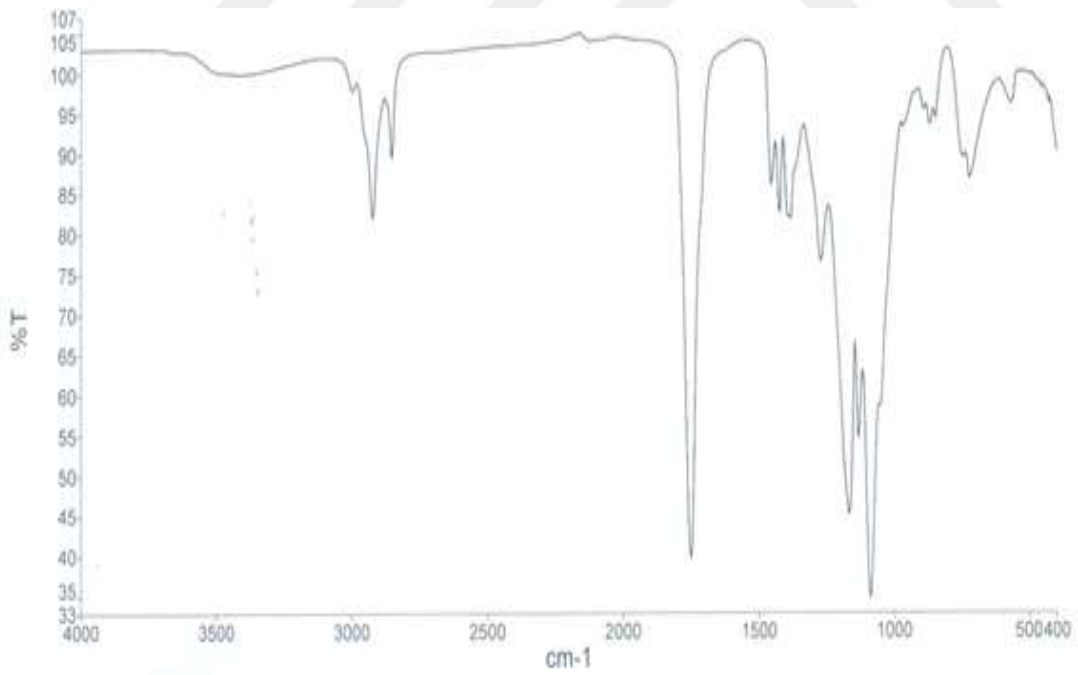
Şekil 4.22. Sodyum Kolatın FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm⁻¹: Dalga Sayısı)



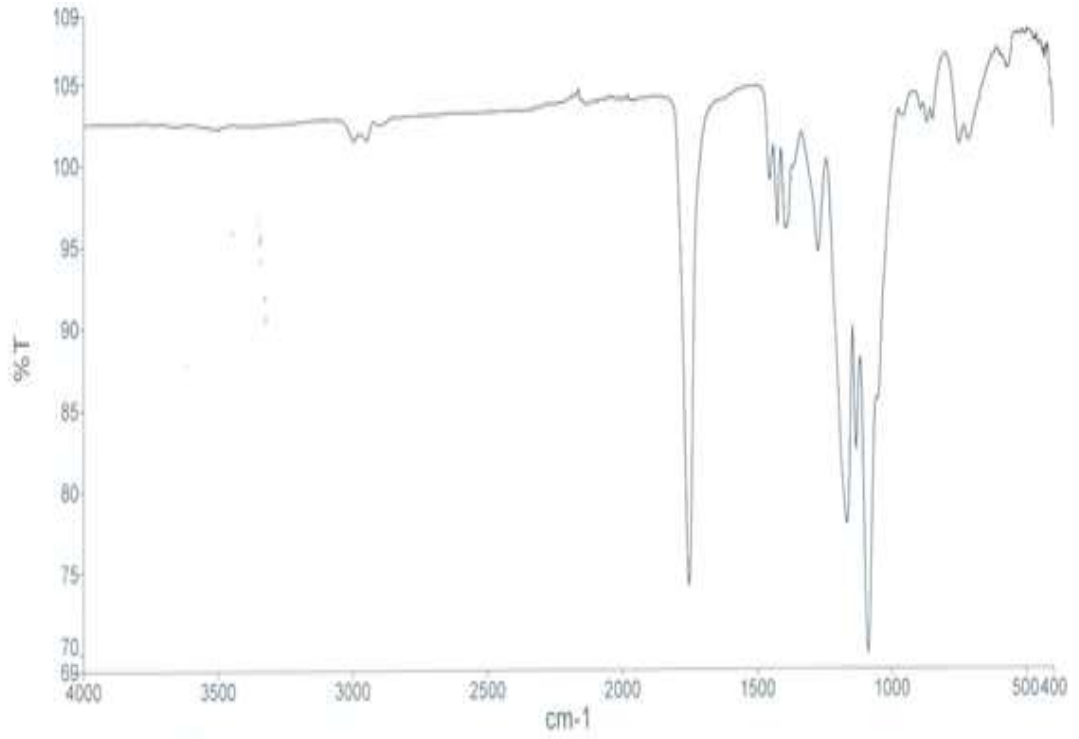
Şekil 4.23. Pluronic F 68' in FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm⁻¹: Dalga Sayısı)



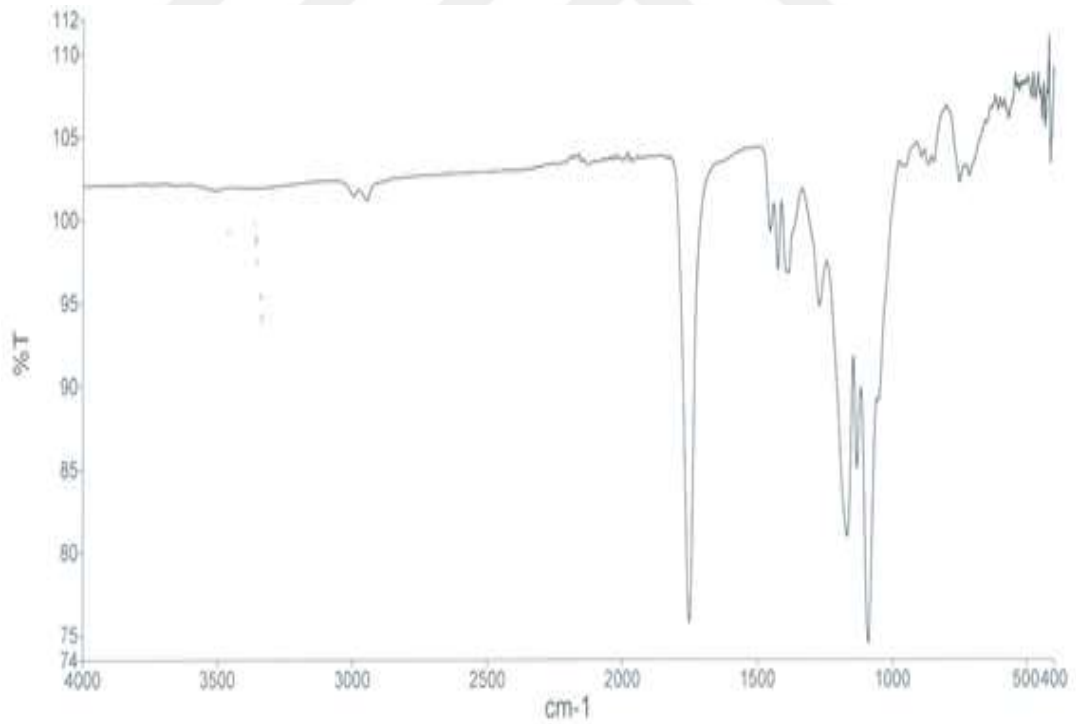
Şekil 4.24. PVA-NP' in FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm⁻¹: Dalga Sayısı)



Şekil 4.25. SS-NP' in FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm⁻¹: Dalga Sayısı)



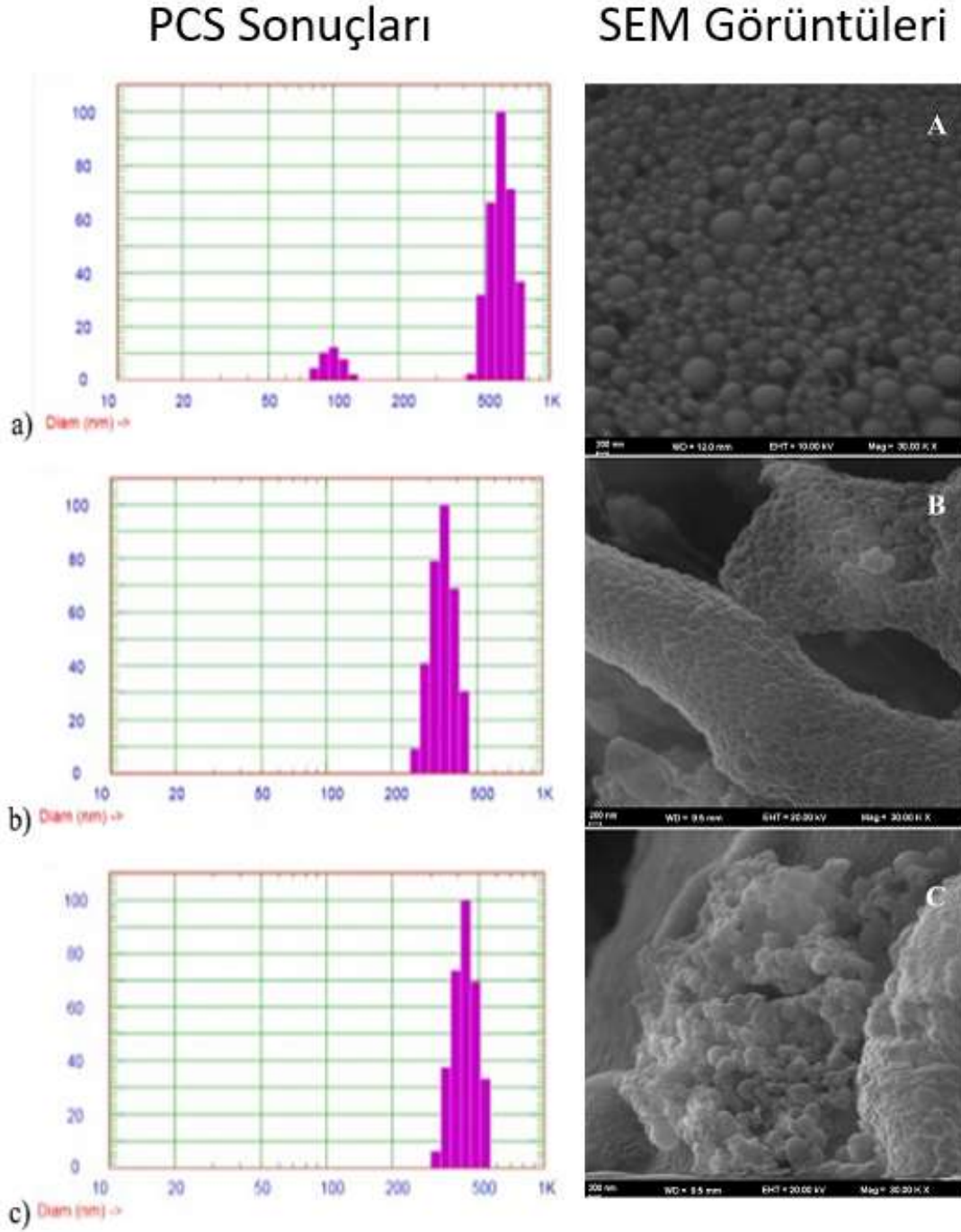
Şekil 4.26. F68-NP' in FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm⁻¹: Dalga Sayısı)



Şekil 4.27. SK-NP' nin FT-IR spektrumu (%T: Transmittans, cm⁻¹: Dalga Sayısı)

4.3.3. Elektron Mikroskobu Analizi

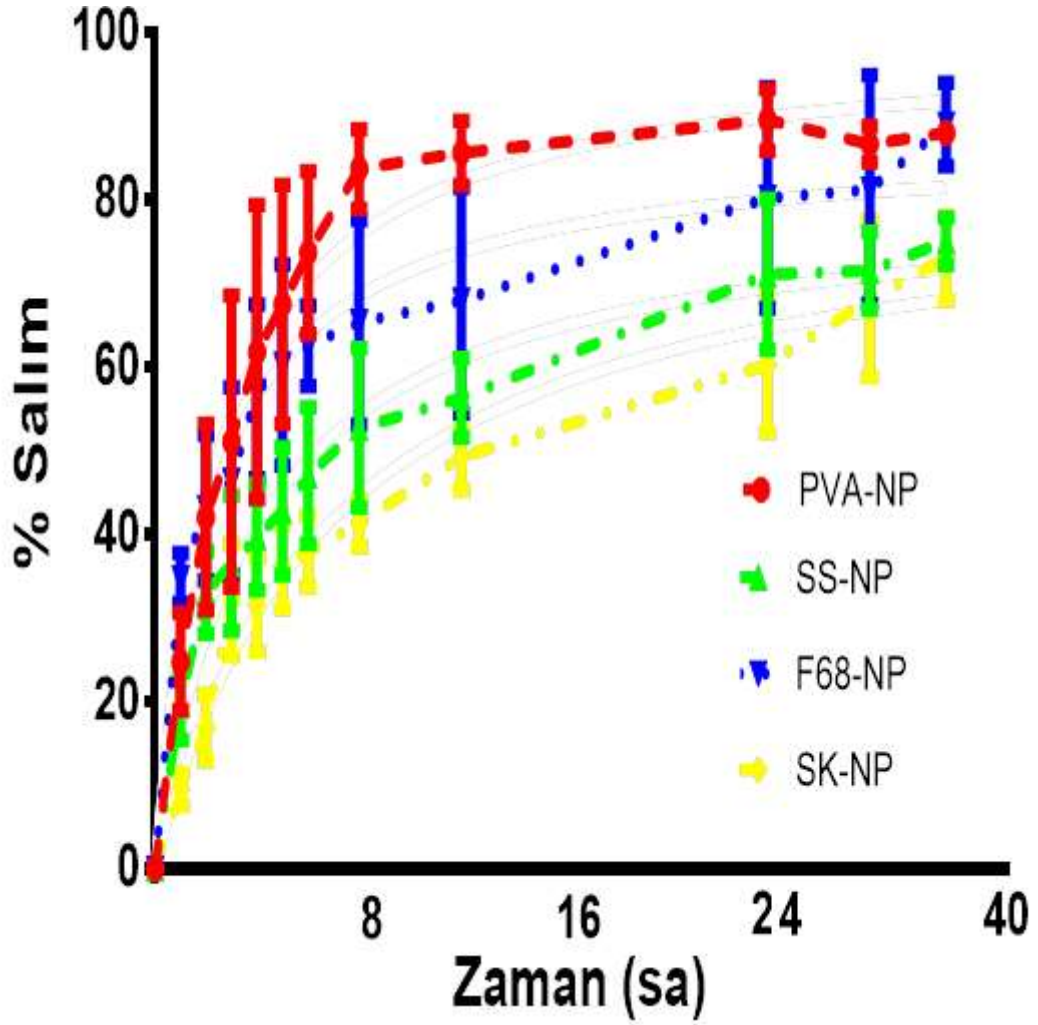
Yüzey karakterizasyonu amacıyla görüntülenen partiküller ve bu partiküllere ait PCS sonuçları Şekil 4.28’de gösterilmiştir.



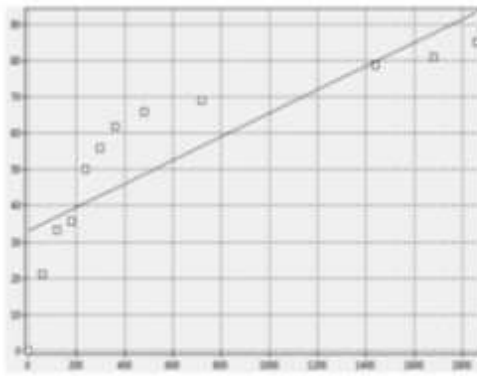
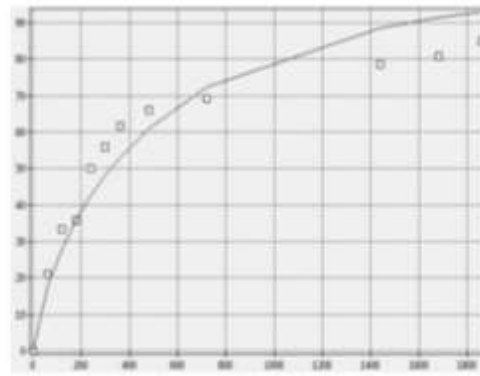
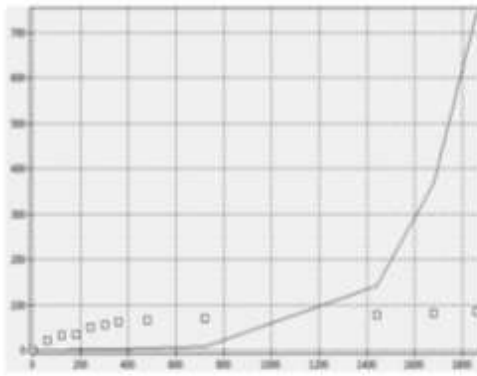
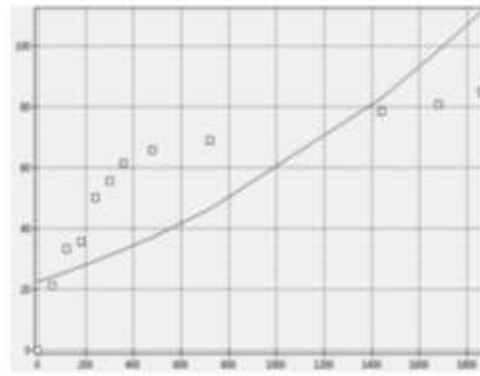
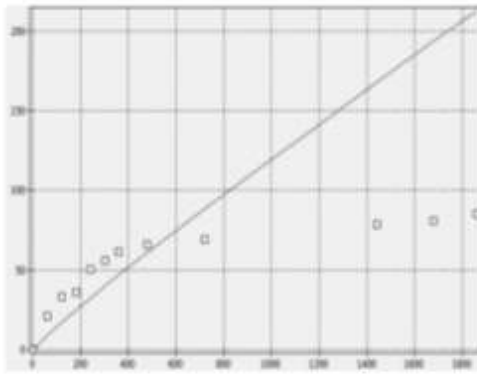
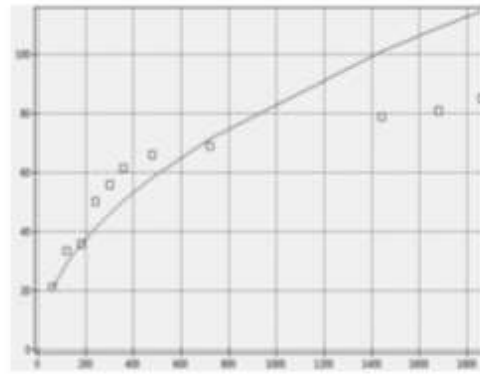
Şekil 4.28. Hazırlanan partiküllerin PCS sonuçları ve SEM görüntüleri

4.4. *In Vitro* Salım Çalışmaları

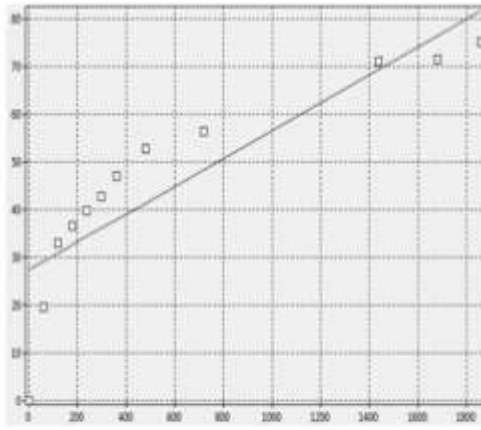
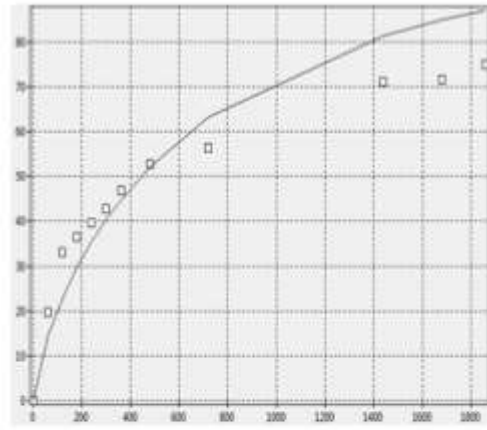
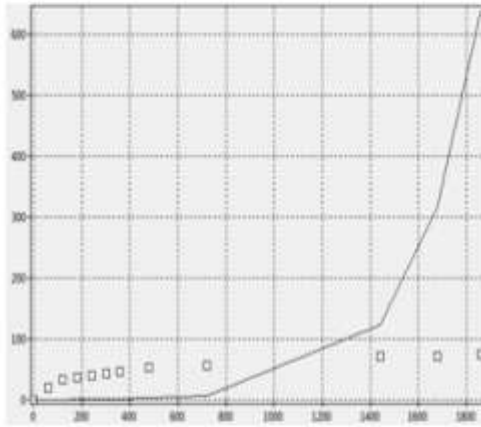
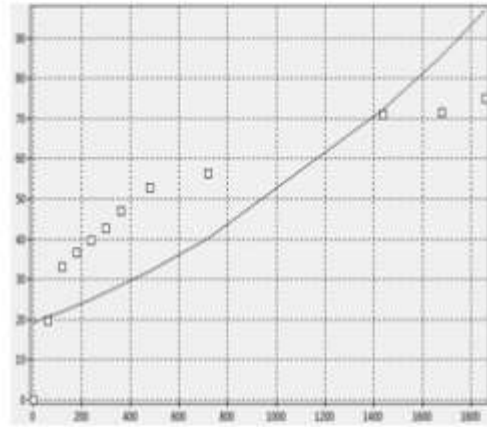
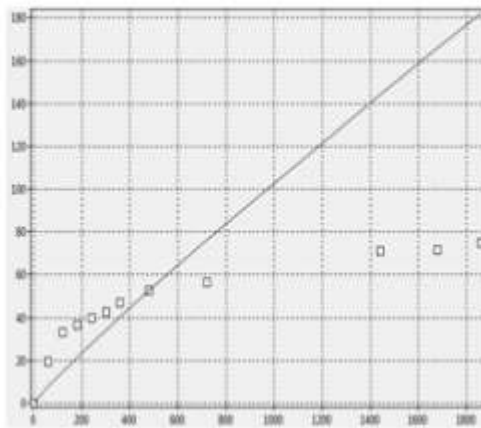
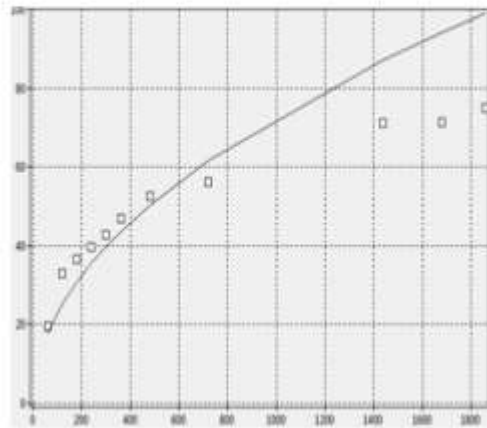
Çalkalayıcıda, 30 salınım/dk'da karıştırılarak, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24, 28, 36. saatlerde alınan örnekler sonucu elde edilen *in vitro* salım grafikleri Şekil 4.29'da gösterilmiştir. *In vitro* salım sonuçları kullanılarak hesaplanan salım kinetik sonuç değerleri Şekil 4.30-33 ve Çizelge 4.7' de gösterilmiştir.



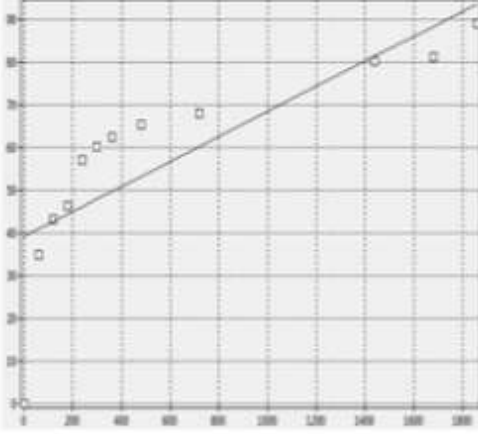
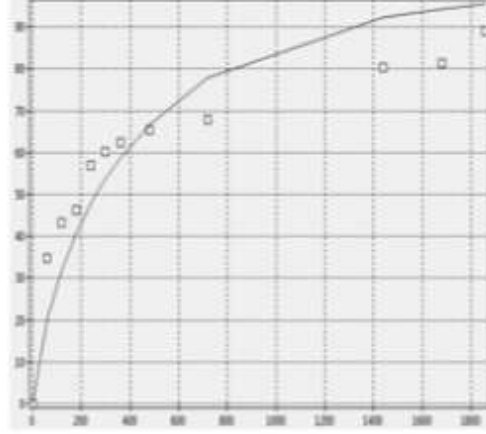
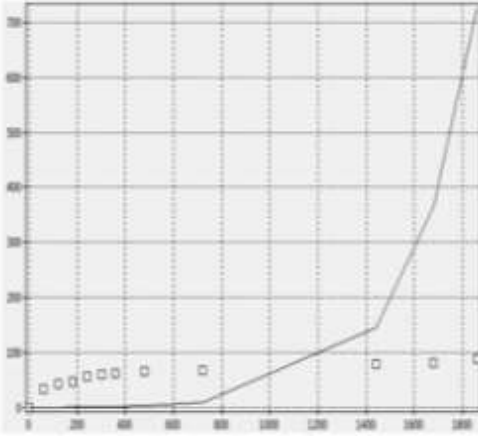
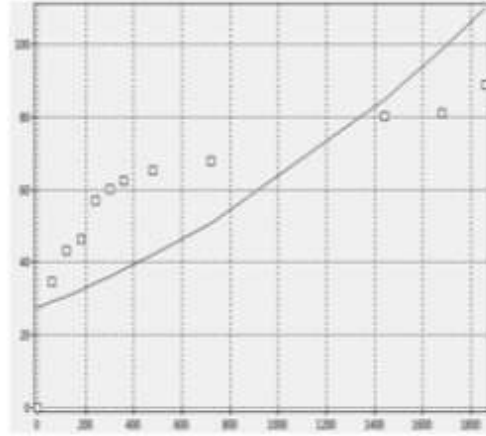
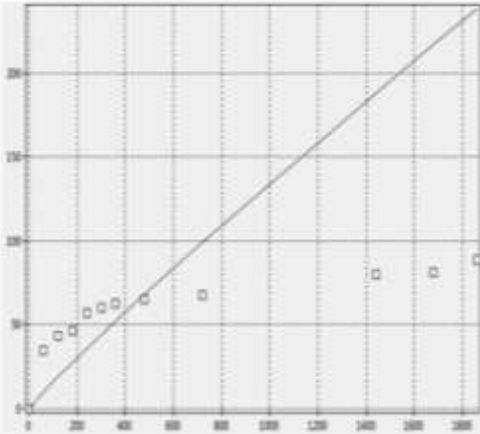
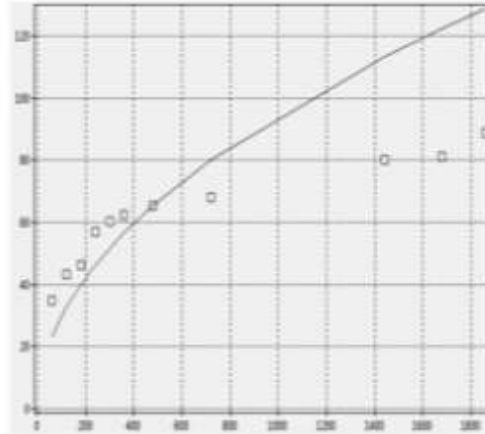
Şekil 4.29: Farklı yüzey etken maddelerin Eletriptan Hidrobromür-PLGA nanopartiküllerinin salımı üzerine etkisi

Sıfıncı Derece ($r^2= 0,6762$)Weibull ($r^2= 0,9991$)Birinci Derece ($r^2= 0,1114$)Hixson Crowell ($r^2= 0,3423$)Korsmeyer-Peppas ($r^2= 0,9940$)Higuchi ($r^2= 0,4252$)

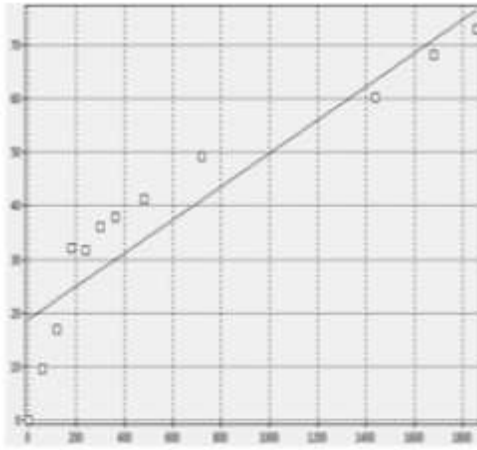
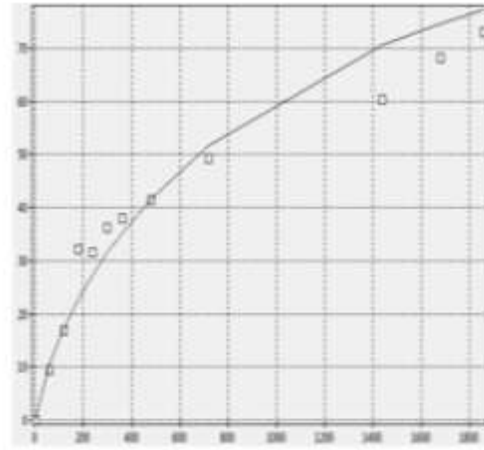
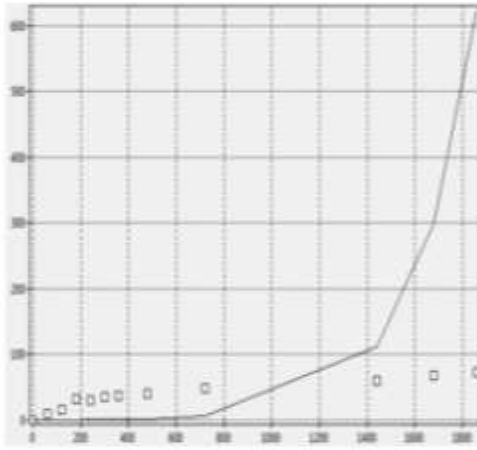
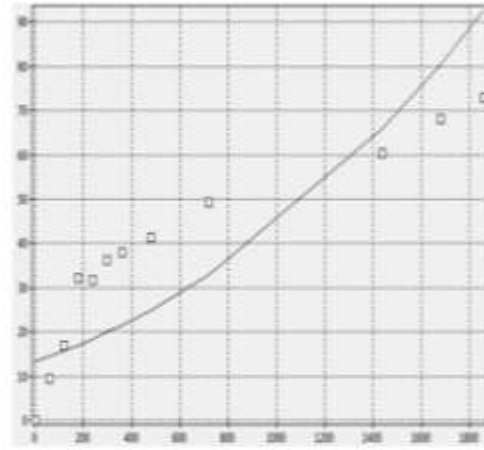
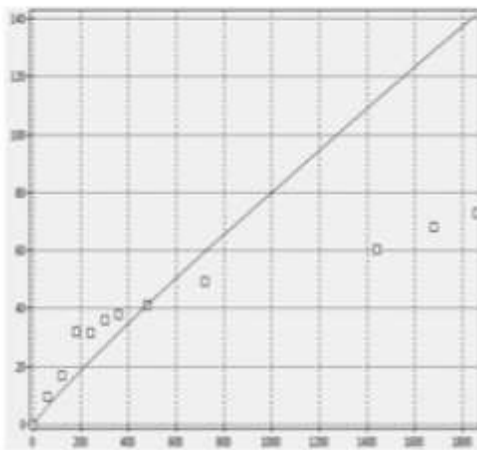
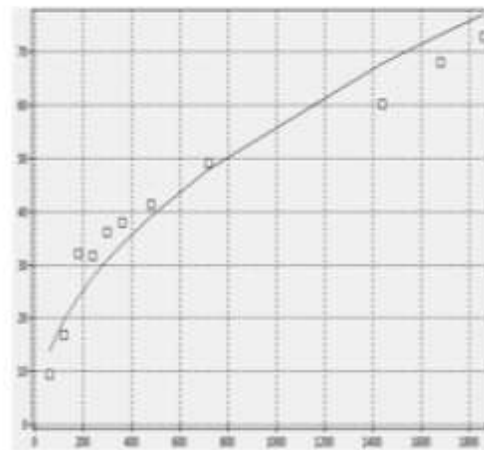
Şekil 4.30. PVA-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri

Sıfıncı Derece ($r^2= 0,7629$)Weibull ($r^2= 0,9987$)Birinci Derece ($r^2= 0,1118$)Hixson Crowell ($r^2= 0,3597$)Korsmever Peppas ($r^2= 0,9938$)Higuchi ($r^2= 0,5154$)

Şekil 4.31. SS-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri

Sıfıncı Derece ($r^2=0,6437$)Weibull ($r^2=0,9980$)Birinci Derece ($r^2=0,1046$)Hixson Crowell ($r^2=0,2812$)Korsmeyer-Peppas ($r^2=0,9915$)Higuchi ($r^2=0,7701$)

Şekil 4.32. Pluronic F68-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri

Sıfıncı Derece ($r^2= 0,8408$)Weibull ($r^2= 0,9983$)Birinci Derece ($r^2= 0,1233$)Hixson Crowell ($r^2= 0,4585$)Korsmeyer-Peppas ($r^2= 0,9965$)Higuchi ($r^2= 0,9347$)

Şekil 4.33. SK-NP formülasyonunun salım kinetik grafikleri

Çizelge 4.7. Formülasyonların salım kinetik parametreleri

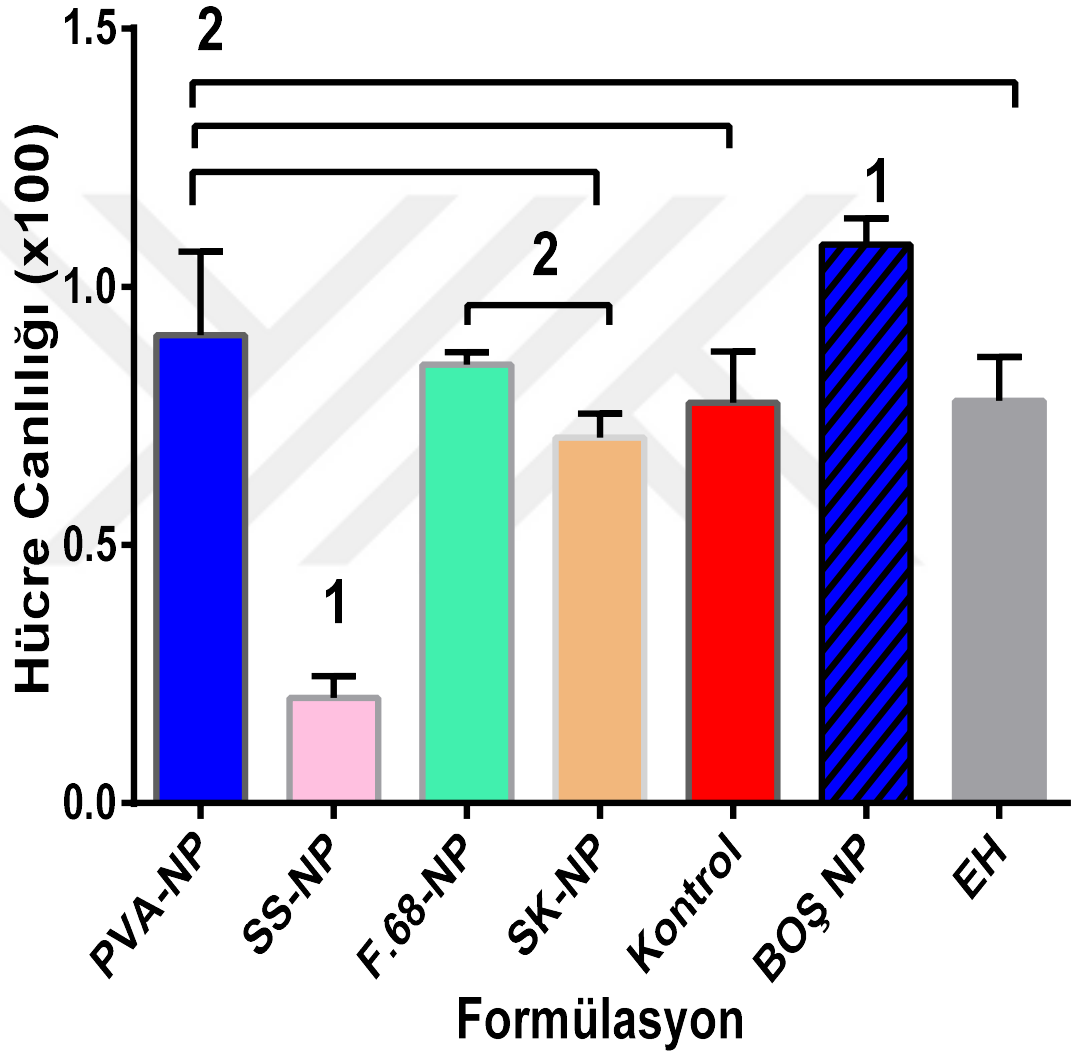
Kinetik	Eşitlik	Parametreler	Formülasyon			
			PVA-NP	SS-NP	F68-NP	SK-NP
Sıfıncı Derece	$F = kt + F_0$	r^2	0,6762	0,7629	0,6437	0,8408
		k	$3,24 \times 10^{-2}$	$2,92 \times 10^{-2}$	$2,93 \times 10^{-2}$	$3,11 \times 10^{-2}$
		*RMSE	14,2	10,3	13,8	8,58
Birinci Derece	$F = F_0 e^{kt}$	r^2	0,1114	0,1118	0,1046	0,1233
		k	1,004	1,004	1,004	1,004
		*RMSE	212	181	206	175
Korsmeyer Peppas	$F = kt^n$	r^2	0,9940	0,9938	0,9915	0,9965
		k	$2,06 \times 10^{-1}$	$1,84 \times 10^{-1}$	$2,28 \times 10^{-1}$	$1,49 \times 10^{-1}$
		n	$9,21 \times 10^{-1}$	$9,15 \times 10^{-1}$	$9,23 \times 10^{-1}$	$9,10 \times 10^{-1}$
		*RMSE	56,7	47,4	68,2	31,1
Weibull	m $= 1 - \exp\left[\frac{-(t^b)}{a}\right]$	r^2	0,9991	0,9987	0,9980	0,9994
		a	$1,17 \times 10^2$	$1,43 \times 10^2$	$1,01 \times 10^2$	$1,87 \times 10^2$
		b	0,761	0,754	0,764	0,747
		*RMSE	6,66	7,59	9,04	5,06
Hixson Crowell	$F^{\frac{1}{3}} = kt + F_0^{\frac{1}{3}}$	r^2	0,3423	0,3597	0,2812	0,4585
		k	$1,06 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$0,95 \times 10^{-3}$	$1,16 \times 10^{-3}$
		*RMSE	20,1	15,4	19,2	13,7
Higuchi	$F = k\sqrt{t}$	r^2	0,4252	0,5154	0,7701	0,9347
		k	0,938	0,821	0,510	0,510
		*RMSE	36,0	30,1	37,0	27,5

*RMSE: Ortalama Hata Kareleri Kökü

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. MTT Yöntemi İle Hücre Canlılığının Belirlenmesi

CaCo2 hücre hattı kullanılarak yöntem bölümünde belirtilen şekilde yapılan, PVA, SS,SK, F68 YEM ve stabilizanları kullanılarak hazırlanan EH içeren nanopartikül yapıları, etken madde (EH), PVA stabilizanı içeren boş nanopartiküllere ait hücre canlılığı sonuçları Şekil 4.34'te gösterilmiştir.



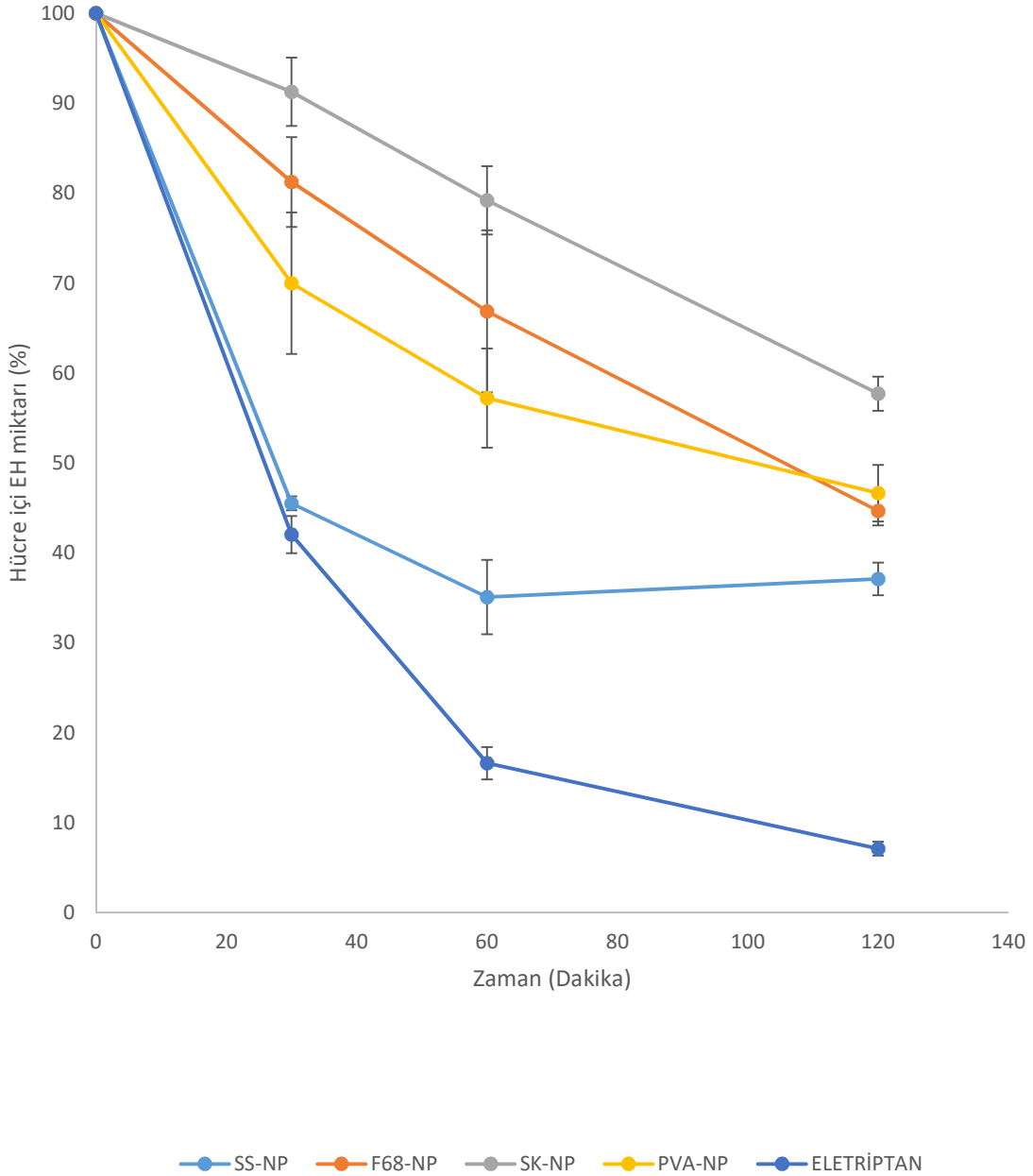
1 : Tüm gruplardan fark anlamlıdır ($p < 0.05$)

2 : Seçilen gruplar arası fark anlamlıdır ($p < 0.05$)

Şekil 4.34. Yüzey etkenmaddenin hücre canlılık üzerine etkileri

4.5.2. Eletriptan Hidrobromür veya Eletriptan HidrobromürYüklü Nanopartiküllerin P-gp ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

CaCo2 hücre hattı kullanılarak yöntem bölümünde belirtilen şekilde yapılan, PVA, SS,SK, F68 YEM ve stabilizanları kullanılarak hazırlanan EH içeren nanopartikül yapılarının ve EH çözeltisinin (Eletriptan) P-gp etkileşimlerine ait sonuçlar Şekil 4.35'te gösterilmiştir.



Şekil 4.35. Stabilizan Yüzey etkenmaddenin hücresel canlılık üzerine etkileri

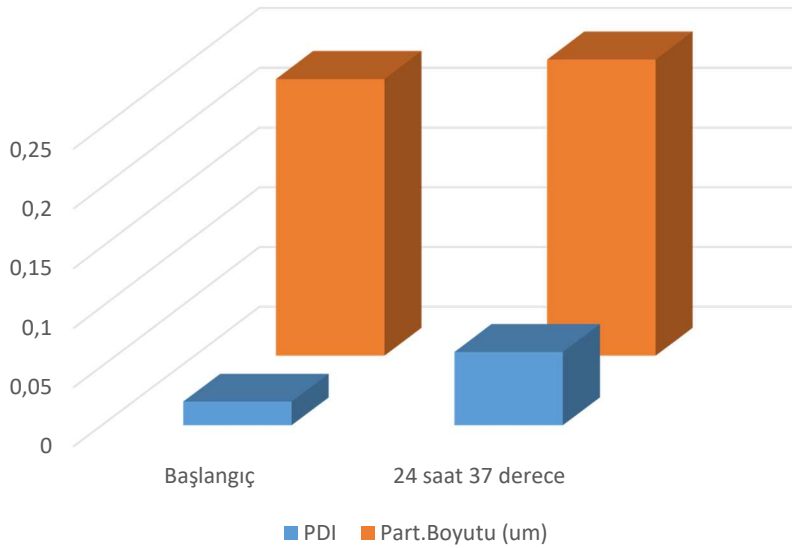
4.6. Stabilitenin İncelenmesi

Bölüm 3.3' te belirtilen şekilde farklı sıcaklık değerleri temel alınarak gerçekleştirilen ön stabilite çalışmalarına yönelik elde edilen bulgulardan başlangıç, 1. ay ve 3. ay' daki partikül büyüklüğü, etken madde miktarı ve polidispersite indeksi sonuçları Çizelge 4.8' de, partikül süspansiyonunun 24 saat 37°C' de bekletilmesi sonucu elde edilen partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları Şekil 4.36' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Başlangıç, 1. ay ve 3. aydaki partikül büyüklüğü, etken madde miktarı ve polidispersite indeksi sonuçları

Sıcaklık	25°C			4°C			-20°C		
	Başlangıç	1. Ay	3. Ay	Başlangıç	1. Ay	3. Ay	Başlangıç	1. Ay	3. Ay
Zaman									
PDI	0,02	0,66	2,30*	0,02	0,30	0,35*	0,02	0,04	0,05
Part.Boyutu (nm)	231	605	2851*	231	345	434*	231	234	238
Etken Madde Miktarı (%)	100		99,40	100		98,28	100		98,66

(* Fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05))

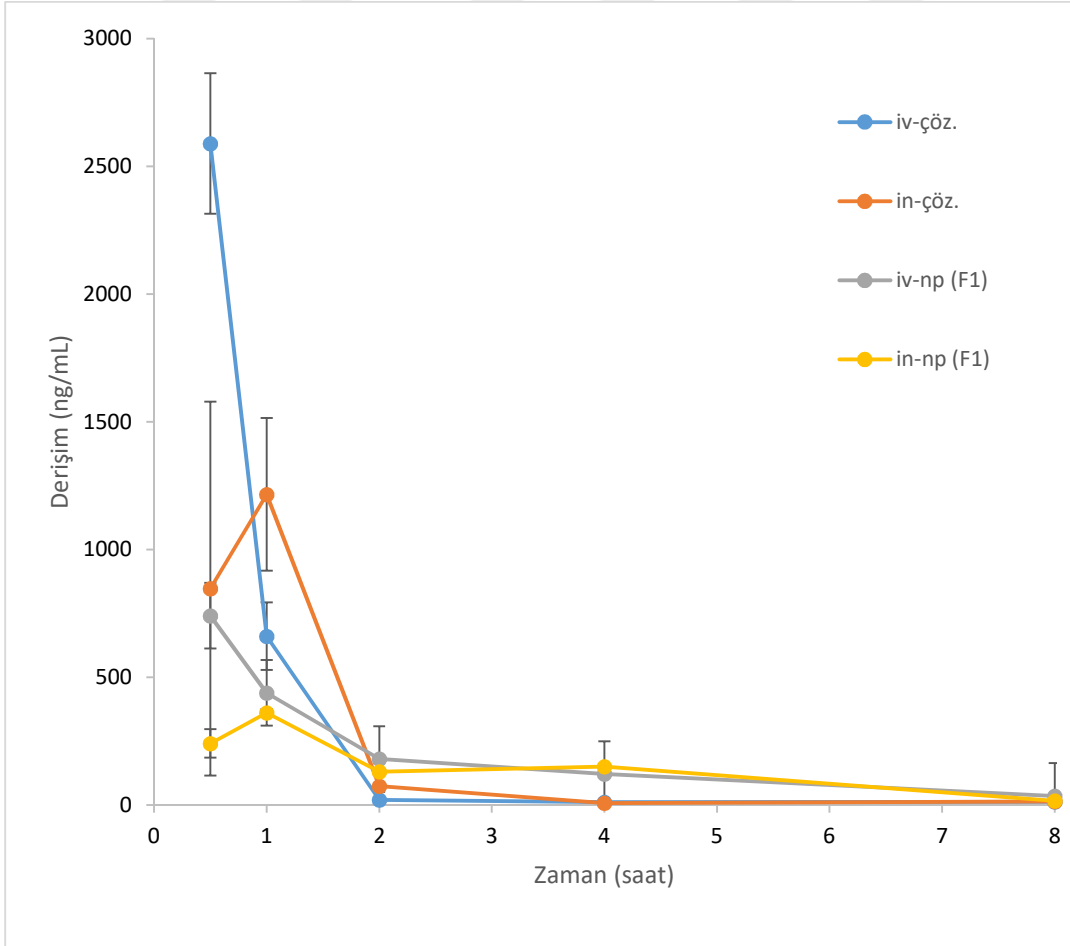


Şekil 4.36. Partikül süspansiyonunun 24 saat 37°C' de bekletilmesi sonucu elde edilen partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi sonuçları

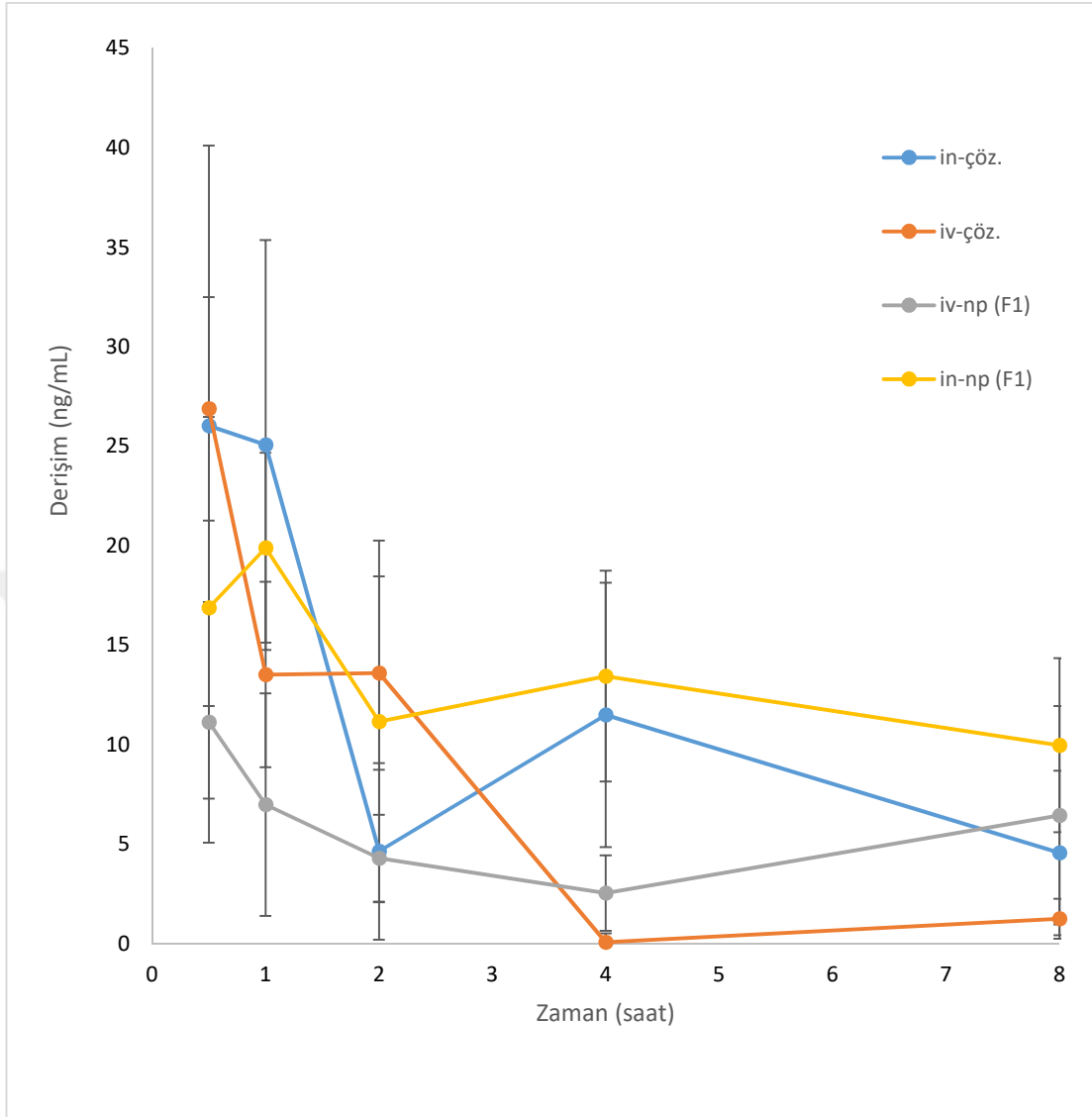
4.7. *In Vivo* Çalışmalar

4.7.1. Farmakokinetik Çalışmalar

EH yüklü nanopartikül veya EH çözelti formülasyonlarının yöntem bölümünde belirtildiği şekilde ratlara burundan veya kuyruk arterinden uygulanması sonucu 0., 30., 60., 120., 240. ve 480. dakikalarda alınan kan örneklerinden gerçekleştirilen kan ölçümleri Şekil 4.37’de; aynı zaman değerinde ratlar sakrifiye edildikten sonra ratlarda çıkartılan beyin dokularının homojenize edilmesiyle elde edilen ölçümler Şekil 4.38’de verilmiştir. Ayrıca bu ölçümler sonucu yöntem bölümünde verilen şekilde yazılım vasıtasıyla hesaplanan ratlarda bu dört uygulamaya ait elde edilen İHE ve İTY değerleri Çizelge 4.9, farmakokinetik parametrelere ait sonuçlar Çizelge 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.37. Ratlara uygulanan formülasyonların kan derişim-zaman grafikleri



Şekil 4.38. Ratlara uygulanan formülasyonların beyin derişim-zaman grafikleri

Çizelge 4.9. Çözelti ve NP uygulamasının İHE ve İTY değerleri

	Çözelti	Nanopartikül
% İHE	206,23	367,57
% İTY	51,51	72,79

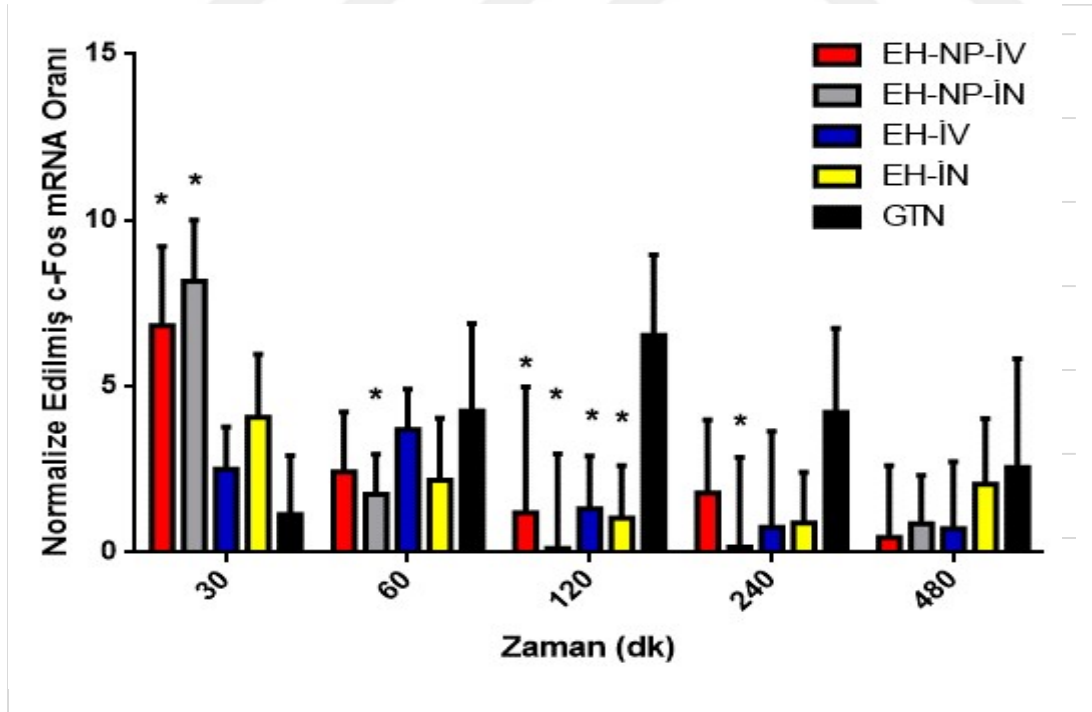
Çizelge 4.10. Eletriptan Hidrobromür çözeltisi ve nanopartiküllere ait farmakokinetik parametreler

		Cmax (ng/ml)	tmax (sa.)	t1/2 (sa.)	Kel (sa-1)	AUC 0-∞ (ng/ml.sa)
in_EH	Beyin	26,02±11,26	0,5	3,53±0,99	0,19±0,08	82,35±32,74*
	Kan	1215,56±299,1*	1	1,30±0,04	0,53±0,02	1497,10±199,2*
iv_EH	Beyin	26,87±5,61	0,5	1,40±0,19	0,49±0,08	60,01±11,30
	Kan	2588,74±274,99	0,5	2,12±0,96	0,62±0,54	4415,43±256,73
in_NP (F1)	Beyin	19,89±4,76	1	9,83±3,31	0,07±0,04	100,34±29,13*
	Kan	360,31±15,18*	1	1,70±0,21	0,41±0,05	1068,87±79,59*
iv_NP (F1)	Beyin	11,12±1,06*	0,5	13,03±2,11	0,21±0,05	42,13±10,92*
	Kan	740,44±5,57*	0,5	2,49±0,46	0,28±0,06	1714,18±47,88*

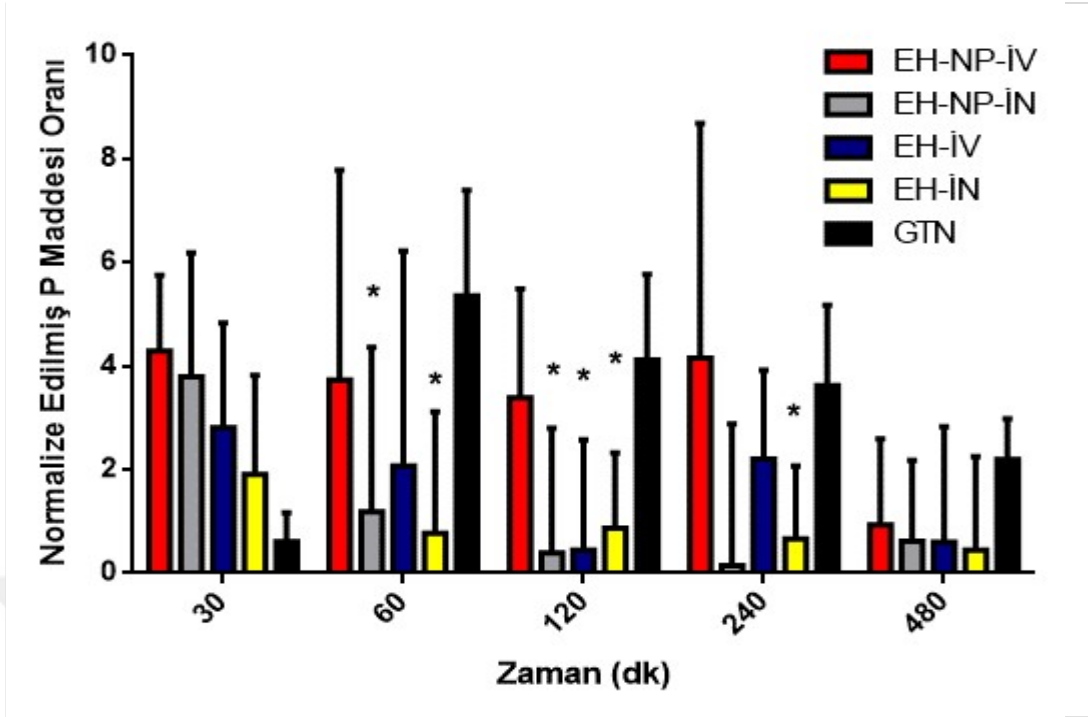
*intravenöz çözelti uygulamasından fark vardır (p<0.05)

4.7.1. Etkinlik Çalışmaları

EH formülasyonları farelere burundan veya damar yoluyla uygulanmış ve yöntem bölümünde açıklanan zaman noktalarında alınan beyin TNC kısımlarında c fos mRNA ve P maddesi ölçümleri yapılmıştır. F1 formülasyonunun damar yoluyla veilişi (A), F1 formülasyonunun burundan veilişi (B), EH çözeltisinin damar yoluyla veilişi (C) ve EH çözeltisinin burundan veilişi (D) sonucu elde edilen PCR verileri sonucu oluşturulan migren modeli için yalnızca gliseril trinitrat uygulanan (migren-kontrol) ratlardaki ölçümlere ait bulgular Şekil 4.39-4.40'da verilmiştir.



Şekil 4.39. c-fos mRNA ekspresyon düzeyleri (p<0.05)



Şekil 4.40. P maddesi ekspresyon düzeyleri ($p < 0.05$)

TARTIŞMA

Nazal yol uzun süredir nazal konjestiyon, sinüzit ve nazal enfeksiyon gibi hastalıkları tedavi etmekte lokal etki amaçlı kullanılmakta olup, ilerleyen teknoloji ve yapılan çalışmalar düşük molekül ağırlıklı etken maddeler, peptid ve protein yapılarının parenteral uygulanmasına alternatif olarak sistemik etki amaçlı kullanımını da sağlamıştır. Günümüzde sistemik etkili nazal yolla uygulanan birçok ilaç klinik kullanım için onaylanmıştır (149).

İlaçların beyne taşınmasında nazal yolun kullanımına dair çalışmalar önemli bir şekilde artmıştır. Endüstriyel ve akademik çalışmalarda burundan beyne ilaç uygulamalarındaki bu ilginin temel nedeni, makromoleküllerin % 100'ünün, küçük moleküllerin ise % 98' inin beyne geçişine izin verilmeyen kan beyin engeline uğramadan etken maddelerin beyne geçişi sağlanması, uygulanan etken maddenin gastrointestinal sisteme ve karaciğere uğramadan etkisinin artırılması, özellikle ağrı kesici ve anti-migren ilaçlarının etki başlangıç süresi hızlandırılması ve nazal yol kullanılarak sistemik yola ait diğer yan etkiler ortadan kaldırılmasıdır(150). Özellikle Anabilim Dalı Başkanlığımızda geçmiş yıllarda yapılan tez çalışmaları incelendiğinde nazal yolun, uygulanan ilaçların yan etkilerinin azaltılması ve ağrı durumunda kullanılan ilaçların etki başlangıç sürelerinin hızlandırılması amacıyla kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında nazal yol kullanılarak beyne ilaç geçişinin araştırılması konusu tezin amacı olarak seçilmiştir.

Kozlovskaya ve diğ. tarafından yayımlanan bir makalede 1970 yılları ile 2014 yılları arasında yapılan nazal yoldan beyne ilaç geçişi çalışmaları incelenmiş ve bu makaleler içerisinden sistemik uygulamayla karşılaştırılan çalışmalar (2346 makaleden 73 adedi) seçilerek birçok özellik yönünden birbiri ile kıyaslanmıştır. Taranan makalelerde burundan beyne ilaç geçişinin en çok çalışıldığı farmakolojik sınıflar sırasıyla nörodejeneratif rahatsızlıklar, psikiyatrik hastalıklar ve ağrıdır (150).

Burundan beyne ilaç geçişi çalışmaları incelendiğinde etken maddenin molekül ağırlığı ve pH 7.4' deki Log D (su yerine farklı pH değerinde çözücü kullanılarak hesaplanan dağılım katsayısı) değerlerinin önemli bir rol oynamakta olduğu gözlemlenmiştir. Seçilen EH etken maddesi 0.5 log D değeri ile Kozlovskaya ve diğ.

tarafından taranan makalelerin büyük kısmının çalışıldığı aralıkta ($MA < 500$ g/mol) olduğu tespit edilmiş ve bu fizikokimyasal özellikleri ile Eletriptan Hidrobromürün nazal uygulama sonrası beyne geçişinin araştırılmaya değer olduğu sonucuna varılmıştır(150).

5.1. Etken Maddenin Özelliklerine Yönelik Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmamızda etken madde olarak seçilen EH'nin fizikokimyasal özellikleri incelenmiş; etken maddenin UV spektrumu tayin edilmiş, istenen saflıkta olduğunun belirlenmesi amacıyla FT-IR, erime noktası ve DTK analizleri yapılmıştır. EH'nin distile suda alınan UV spektrumu bulgular bölümünde gösterilmiştir. Elde edilen UV spektrumları incelendiğinde maksimum absorpsiyon gösterdiği dalga boyu olarak 225 nm tespit edilmiştir. Bu sonuç literatür ile uyumludur (151).

EH'nin FT-IR spektrumu yöntem bölümünde açıklanan şekilde çekilmiş ve sonuçlar bulgular bölümünde gösterilmiştir. Çekilen infrared spektrumu (Şekil 4.2)ile maddenin açık kimyasal formülü kıyaslandığında, etken maddenin açık kimyasal formülünde görülen belirleyici kimyasal grupları ifade eden absorpsiyon bantlarının elde edilen infrared spektrumunda yer aldığı saptanmıştır. Çalışmada elde edilen 3369, 2949, 2708, 1445, 1342, 1305, 1263, 1149, 1086, 1019, 921, 899, 804, 726, 688, ve 651 cm^{-1} absorpsiyon bantlarının literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (152). Söz konusu FT-IR pikinde bulunan titreşimler ve bu bantların dalga sayıları Çizelge 5.1' de gösterilmiştir.

Etken maddenin erime noktasının tayin edilmesi amacıyla gereç ve yöntem kısmında belirtilen şekilde gerçekleştirilen analiz sonucunda EH'nin $171\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de eridiği saptanmıştır. Etken maddenin DTK termogramı incelendiğinde $170\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de gözlenen keskin endotermik pikin etken maddenin erime noktasını ifade ettiği $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' den sonraki ekzotermik pikin ise EH dekompozisyonunu gösterdiği saptanmıştır. Etken maddenin erime noktası ve DTK termogramı hakkında bilgi veren literatür incelendiğinde EH'nin erime noktasının 169-186 derece arası değiştiği ifade edilmiştir (153). İncelenen literatür ışığında erime noktası ve DTK analizi sonucunda elde edilen verilerin, kullanılan cihazların (erime noktası tayin ve DTK cihazları) özelliklerine bağlı olarak belirli bir aralık içerisinde değişkenlik gösterdiği ancak benzer

termogramların yapılan araştırmalara ait verilerde de tespit edildiği belirlenmiştir(153).

Çizelge 5.1. Eletriptan Hidrobromüre ait FT-IR titreşimleri ve dalga sayıları

Titreşim Tipi	Dalga Sayısı
N-H Gerilimi	3369
Alifatik C-H Gerilimi	2949
N ⁺ H Gerilimi	2708
C=C Gerilimi	1619
Alifatik C-H Bükülmesi	1445
O=S=O Asimetrik Gerilimi	1342, 1305
C-N Gerilimi	1263
O=S=O Simetrik Gerilimi	1149
Aromatik C-H Bükülmesi	804, 736
C-S Gerilimi	688, 651

Seçilen analitik yöntemin validasyonunun değerlendirilmesi amacıyla seçicilik, doğrusallık ve aralığı, doğruluk, kesinlik, teşhis ve tayin sınırı parametreleri incelenmiştir. Seçilen yöntemin etken maddeye özgülüğünün belirlenebilmesi için formülasyonda yer alan her bir yardımcı maddenin formülasyonda kullanıldıkları oranlardaki çözeltileri ile etken madde içermeyen nanopartikül formülasyonları hazırlanmış ve 200- 400 nm dalga boyları arasında UV spektrumları alınarak etken maddeye ait spektrumla karşılaştırılarak herhangi bir girişimin olmadığı, seçilen analitik yöntemin etken maddeye özgü olduğu kanıtlanmıştır.

Analitik yöntemin validasyonuna ilişkin olarak yukarıda belirtilen parametrelerden doğrusallık ve aralığının tespiti için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler incelenmiş, etken maddenin kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.4' te verilmiştir. Çalışılan ortam için gerçekeştirilen tayin sonucunda elde edilen verilerin doğrusallıklarının 1' e yakın oluşu (0.9999); y ve x değerlerinin ise düşük

oluşu elde edilen verilerin güvenilirliğini ve doğrusal bir ilişkinin varlığını göstermektedir.

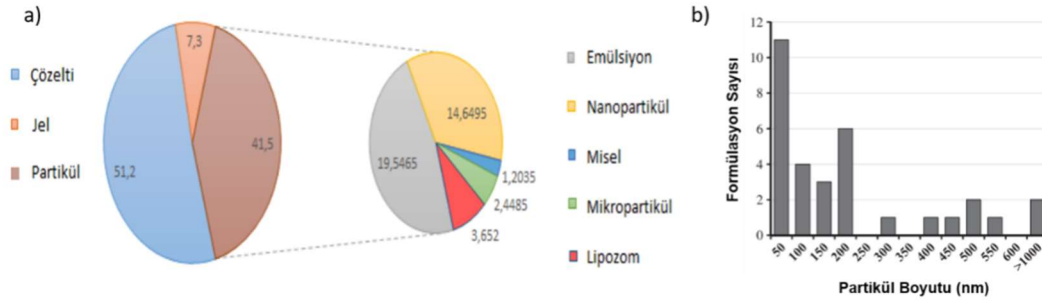
Yöntemin validasyonuna dair incelenen diğer parametreler ise doğruluk ve kesinliktir. Doğruluğun ve kesinliğin tespiti için elde edilen veriler Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’ de verilmiştir. Çalışılan ortam için gerçekleştirilen tayin sonucunda bulunan veriler varyasyon katsayısı değerinin % 2’ den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve çalışılan ortam için doğruluk kanıtlanmıştır [123]. Kesinlik, tekrarlanabilirlik değerlerinin varyasyon katsayısı değerinin % 2’ den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve çalışılan ortam için tekrarlanabilirliğin sağlandığı tespit edilmiştir. Tekrar elde edilebilirliğin tespiti için farklı analistlere ait veriler Çizelge 4.3’ te verilmiştir. Her bir analist için elde edilen 6 ölçüme ait verilerin varyasyon katsayısı değerinin % 2’ den küçük olma şartına göre yorumlanmış ve tekrar elde edilebilirlik kanıtlanmıştır[123].

Gerçekleştirilen analitik validasyon çalışmaları sonucunda, yöntemin doğrusallığı, doğruluğu ve kesinliği ispatlanmıştır. Son olarak etken maddenin çalışılan ortam içerisinde teşhis ve tayin sınırları da gereç ve yöntem bölümünde belirtilen ilgili denklemler yardımıyla hesaplandıktan sonra elde edilen veriler Bölüm 4.1.5.6’ da verilmiştir. Bir analitik yöntemin teşhis sınırı (LOD), ilgili deneysel yöntem kullanıldığında örnek içerisinde izlenebilecek en küçük analit miktarıdır [123]. Etken maddenin çalışma ortamı için LOD değeri $0.28\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır. Yöntemin tayin sınırı (LOQ) ise ilgili deneysel yöntem kullanıldığında kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik ile etken maddenin ölçülebilecek en düşük miktarıdır [123]. EH’nin çalışma ortamı için LOQ değeri $0.86\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır.

5.2. Formülasyon Seçimi

Beyne ilaç geçişi için nazal olarak uygulanan ilaçların yarısından fazlası basit çözelti formundadır. Ancak yapılan çalışmalarda çözelti, jel ve partiküler sistemler kıyaslandığında beyne en yüksek ilaç taşınma yüzdeleri partiküler sistemlerde tespit edilmiştir [136]. Bu nedenle burundan beyne ilaç geçişinde sıklıkla çalışılan partiküler sistemler kullanılmıştır. Diğer partiküler taşıyıcı sistemlerle kıyaslandığında en çok kullanılanlar emülsiyon ve nanopartiküllerdir (Şekil 5.1.a) (150). Bu çalışmalar incelendiğinde 200 nm ve altındaki partiküllerin daha çok emülsiyon sistemleri olduğu

tespit edilmiştir. Ayrıca incelenen literatürde [136] 250 nm boyutunda hiçbir çalışma bulunmamasından dolayı çalışmamızda yaklaşık 250 nm boyutlarında partiküllerin hazırlanması hedef alınmıştır (Şekil 5.1.b).



Şekil 5.1. Beyne nazal yolla ilaç uygulama şekilleri (a) ve uygulanan sistemlerin partikül büyüklükleri (b) (150).

Çeşitli hastalıkların tedavisi için geliştirilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımına yönelik çalışmalarda kullanılan nanopartikül hazırlama yöntemleri, araştırmanın amacına yönelik olarak değişebilmektedir. Amaç küçük boyutlu dar partikül dağılımına sahip nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi ise salting-out veya nanopresipitasyon teknikleri; yüksek bir enkapsülasyon etkinliği elde etmek ise emülsiyon-çözücü buharlaştırma veya emülsiyon-çözücü difüzyon teknikleri kullanılmaktadır (154-157). Nanopartikül hazırlama yönteminin belirlenmesinde etkili olan diğer parametreler ise çalışmada kullanılacak etken maddenin molekül ağırlığı, sudaki ve çeşitli organik çözücülerdeki çözünürlüğü gibi çeşitli fizikokimyasal ve polimerik materyalin organik çözücülerdeki çözünürlük özellikleridir. EH'ye ait hazırlanan nanopartikül sistemler incelendiğinde bugüne kadar niozom (158), katı lipid nanopartikül ve mikroemülsiyon (159) yapılarının hazırlandığı ancak bugüne kadar polimerik nanopartiküllerinin hazırlanmadığı tespit edilmiştir.

Emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yöntemi, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında en çok kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Yağ/Su emülsiyonu ve çoklu emülsiyonlar farklı emülsiyon tabanlı sistemler oluşturulabilir. Bu yöntemin ucuz, tekrarlanabilir ve düşük miktarlardan büyük serilere kadar nanopartikül hazırlanmasında kullanılabilir olmasından dolayı kullanım alanı geniştir.

Emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yönteminde enerji uygulanması amacıyla birçok cihaz mevcuttur. Manyetik ve mekanik karıştırıcılar, ultrasonik banyo ve prob homojenizatörler, yüksek devirli ve yüksek basınçlı homojenizatörler bu amaçla kullanılan cihazlardan birkaçıdır (160).

Ultrasonik homojenizatörler yüksek hassasiyet, hızlı ve dalgalı basınç akışı ile türbülans ve kavitasyon etkileri ile büyük damlacıkları küçük parçacıklara ayırabilirler (161-164). Ultrasonik problar ucuz ve kolay kullanılabilir olması, küçük ve büyük hacimlerde çalışma imkanı sağlaması nedeniyle nanopartikül hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Emülsiyon oluşturmak için ultrasonik dalgalar numune üzerine birkaç saniyeden birkaç dakikaya kadar değişen aralıklarda uygulanır. Enerjinin devamlı uygulanması yüksek miktarda ısınmaya yol açar ve bu durumlarda küçük patlamalarla (*burst*) cihaz çalıştırılır (160). Damlacık boyutu cihazın homojenizasyon zamanı ve enerjisi artırılarak küçültülebilir. Düşük ve orta ölçekli viskozluğa sahip sıvılardan emülsiyon oluşturmada en uygun yöntem ultrasonik prob kullanımındır (165, 166)

Oluşturulan emülsiyonlardan çözücü uçurma farklı yöntemlerle yapılabilir. Bu yöntemler içerisinde basıncın düşürülmesi ile organik çözücünün uçurulması sonucu atmosfer basıncında uçurmaya göre daha pürüzsüz ve küçük yapıli partiküller elde edilir. Birçok çalışmada basıncın düşürülmesi ile organik çözücünün uçurulması sonucu daha yüksek yükleme etkinliğine sahip partiküller elde edilmiştir (167). Bu nedenle çalışmamızda çözücü, geri çeviren soğutucu yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Belirlenen bu kriterler ve parametreler ışığında çalışmamızda hedeflenen partikül boyutu ve yükleme etkinliği ile etken maddenin fizikokimyasal özellikleri gözönüne alındığında, 250 nm partikül büyüklüğü elde edilebilmesi ve yüksek bir enkapsülasyon etkinliği sağlayabilmesi açısından Mottaleb veLamprecht tarafından gerçekleştirilen emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi ile formülasyonların hazırlanmasına karar verilmiştir (168). Çalışmamızda polimer olarak PLGA kullanılması öngörülmüştür. PLGA biyobozunur ve biyoyumlu polimerler içerisinde ilaçların kontrollü salımında en çok kullanılan polimerdir (169). Musumeci ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada rodamin yüklü kitosan, PLA ve PLGA

nanopartikülleri hazırlanmış ve bu nanopartiküllerin koku bölgesi hücreleri tarafından emilim özellikleri konfokal mikroskop yardımıyla ölçülmüştür (170). PLGA nanopartiküllerinin emilimi 1 saat sonunda PLA ve Kitosan nanopartiküllerine göre daha yüksek bulunmuş ve bu artış 2-4 saat devam etmiştir. PLGA kullanılarak nanopartiküller etkin bir şekilde hem yağ/su hem de su/yağ/su emülsiyon yöntemleriyle hazırlanabilirler (171). Bu amaçla EH'nin organik/su fazı dağılım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Organik faz olarak PLGA polimerinin etken madde ile birlikte çözünebildiği ve polimerik nanopartikül hazırlanmasında yer alabilen Diklorometan kullanılmıştır. Yöntem kısmında belirtilen ekstraksiyon sonucu bölüm 4.1.7' te gösterildiği üzere EH'nin büyük kısmı su fazında yer almış ancak bir bölümünün organik fazda yer alması ve etken maddenin suda çözünürlüğünün organik fazdaki çözünürlüğüne oranla daha sınırlı olması nedeniyle (EH'nin sudaki çözünürlüğü 20 °C'de 4 mg/mL'dir (172).) hem su/yağ hem de su/yağ/su çoklu emülsiyonları hazırlanmasına karar verilmiştir. Bu amaçla öncelikle su/yağ emülsiyonu oluşturma çözücü uçurma yöntemi ile EH- PLGA nanopartikülleri hazırlanması ve PLGA' nın sıcaklıkla bozunur özelliğinden dolayı bu yöntemde istenen 250 nm partikül boyutunda düşük polidispersite indeksine sahip partiküllerin hazırlanabilirlikleri araştırılmıştır. Ultrasonik prob ile enerji uygulanması esnasında sıcaklıkla bozunmanın önüne geçilebilmesi için enerji uygulanması buz banyosu içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra EH'nin S/Y/S emülsiyonları hazırlanmıştır. S/Y/S çoklu emülsiyonları hidrofilik biyolojik etken maddelerin hapsedilmesinde en uygun yöntemdir (173). Bu yöntem iki basamaklı olarak gerçekleşmektedir(174). Öncelikle iç su fazı yağ fazı içerisinde genellikle yağda çözünebilir bir yüzey etken madde yardımıyla hapsedilerek S/Y emülsiyonları oluşturulur. Daha sonra bu faz dış su fazı ile homojenize edilerek son emülsiyon hazırlanır. Emülsiyon damlacıklarının boyutları yüzey etken madde tipi ve derişimi, homojenizasyon koşulları ile değiştirilebilir (160).

Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimer özelliklerinin, kullanılan yüzey etken maddenin ve diğer faktörlerin beyne ilaç geçişinde nanopartikül boyutu kadar önemli olduğu literatürde açıklanmıştır (175-181). Nanopartikül üretm yöntemi de ayrıca etkinliği, güvenilirliği, biyodağılımı etkileyen faktördür. İlaç yüklü PLGA

nanopartikülleri biyoyumlu yapıları nedeniyle nanopartikül hazırlamada kullanılmaktadır [197].

Polimerik nanopartiküller polimer ve etken madde üretim yöntemine göre çözünür, enkapsüle olur, yüzeye tutunur, eklenir veya kimyasal olarak bağlanırlar. Bu işlemlerdeki ana hedef ilacın istenen yer ve sürede etkisini sağlamaktır. Polimerik nanopartikül hazırlanma yöntemleri göz önüne alındığında emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yöntemi ve stabilizan (PVA) kullanımı ön plana çıkmaktadır (182). PVA kullanımının nedeni diğer yüzey etken maddelere göre daha küçük ve monodispers nanopartikül elde edilebilmesidir. Ancak emülsiyon oluşturma işleminden sonra fazla miktarın ortamdan uzaklaştırılması zordur. Ayrıca PVA literatüre göre biyolojik olarak bozunmaz (183). Ayrıca yüksek oranda PVA kalıntısı içeren nanopartiküllerin hücrel emilimleri de düşüktür (184). Bu amaçla PVA yerine farklı yüzey etken madde içeren birçok araştırma yapılmıştır. Potansiyel etkileri göz önüne alındığında yüzey etken madde seçiminin önemli olduğu ve bu nedenle PLGA ile birlikte nanopartikülleri hazırlanan SK, SS ve F68 kullanılarak nanopartiküller üzerinde etkinlikleri çalışmamızda incelenmiştir.

5.3. Nanopartikül Formülasyonlarının Değerlendirilmesi

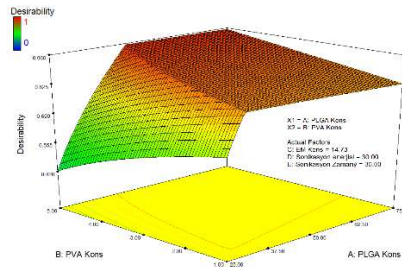
5.3.1. Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi ile Elde Edilen Partiküllerin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda belirlenen partikül boyut aralığı ve dar partikül boyut dağılımına sahip nanopartikül formülasyonlarının su/yağ emülsiyonu oluşturma çözücü uçurma yöntemiyle geliştirilmesi araştırılmıştır. Ayrıca polimer (PLGA), etken madde ve yüzey etken madde (PVA) derişimi ile sonikasyon süre ve enerjisinin partikül boyutu ve polidispersite indeksi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla D-optimal tasarım kullanılmıştır. D-Optimal tasarım kullanılmasının nedeni, bu yöntem ile araştırmacılara bağımsız değişkenler ile cevap ve etkileşimlerin sağlıklı bir şekilde açıklanması imkanı verilmesidir. Farklı değişkenlerin optimizasyonu için çok fazla deney yapılması gerekmektedir. Ancak sınırlı zaman ve kaynakların varlığında Box-Behnken ve Merkezi Kompozit tasarımların kullanımı uygun değildir. Bu durumlarda D-optimal tasarım seçilen modele göre uygun kombinasyonu seçeceğinden en uygun modeldir (185). Çalışmada yalnızca Y/S emülsiyonu üzerine etkileşimlerin

açıklanması için 5 faktör ve 3 seviyeli bir tasarımın 243 farklı formülasyon ile gerçekleştirileceğinden dolayı bu yöntemle 33 formülasyonla tüm etkilerin gösterilmesi hem zaman hem de kaynaklar bakımından daha etkin bulunmuştur.

Yapılan incelemede istenen partikül boyutunda tek emülsiyon oluşturmak için uygun parametreler 25-75 mg PLGA (50:50), %1-5 PVA olarak tespit edilmiştir. Etken maddenin diklorometan içerisinde yüksek çözünürlük özellik göstermesinden dolayı çalışmada etken madde derişimi 5-15 mg aralığında tutulmuştur. Bu seçimin nedeni EH'nin etkinliği kanıtlanmış en düşük dozu olan 10 mg değerinin tasarımın orta seviye değeri olarak gözlenmesinin istenmesidir. Sonikasyon zamanı ve enerjisi tespit edilirken belirlenen polimer ve yüzey etken madde derişimleri ile ön çalışma yapılmış mevcut cihazın çalışma aralığı ile nanopartiküllerin oluştuğu ve istenen partikül boyutuna yakın dar partikül boyut dağılımı gösterilen sonikasyon süresi (30-90 sn) ve sonikasyon enerjisi (30-70 W) faktör seviyeleri olarak belirlenmiştir(135). Ayrıca tasarım sonuçlarına istenen 250 nm ve düşük polidispersite indeksi değerleri istenen parametreler olarak girildiğinde bu yöntemle çok yüksek bir olasılıkla ihtiyaç duyulan partiküllerin elde edilebileceği tespit edilmiştir (Şekil 5.2).

Tasarlanan formülasyonların % enkapsülasyon etkinliği incelendiğinde tüm formülasyonların enkapsülasyon etlinliklerinin %10' un altında olduğu saptanmıştır. Yetersiz yükleme etkinliği nedeniyle bulgular kısmında sonuçlar verilmemiştir. Bunun nedeni sudaki yüksek ilaç çözünürlüğünün nanopartikül içerisinde etken maddenin enkapsülasyonu engellemesidir. Enkapsülasyonu istenen maddelerin derişimine göre nanopartiküller içerisine difüzyonu beklenir. EH'nin sudaki çözünürlüğü sonucu etken madde su fazında kalmış bu nedenle düşük enkapsülasyon etkinliği gözlenmiştir (186).



Şekil 5.2. Tasarım sonuçlarının arzulanan parametre değerlerini karşılama oranları.

5.3.2. S/Y/S Emülsiyon Oluşturma Çözücü Uçurma Yöntemi ile Elde Edilen Partiküllerin Değerlendirilmesi

Etken maddenin suda çözünürlüğünden dolayı S/Y/S emülsiyonları hazırlanmıştır. Nanopartikül tasarımı için etken madde, PLGA (50:50), yüzey etken madde (PVA) derişimi, dış faz stabilizan (PVA) derişimi ve su fazı pH değerlerinin partikül boyutu, yükleme etkinliği ve zeta potansiyel değeri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu değerler seçilirken yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucu 250 nm değerine yakın partikül boyutuna sahip nanopartikül oluşmasını sağlayan değerler baz alınmıştır. Etken madde derişimi için 1-5 mg alt ve üst seviyeleri seçilmiştir. Bunun nedeni EH'nin sudaki çözünürlük değeridir (4 mg/mL) (172). pH değerleri seçilirken EH'nin dipolar yapısı göz önünde bulundurulmuş ve pH 5.6, 7 ve 9.6 değerleri seçilmiştir.

Farklı yüzey etken maddelerin nanopartikül özellikleri, hücre toksisitesi ve diğer hücre davranışlarını değiştirdikleri bilinmektedir (160). Daha önce PLGA (50:50) polimerik nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan farklı yüzey etken maddelerin hazırlanan nanopartikül yapıları üzerine etkilerini araştırmak amacıyla F68 (187), SK (188), SS, (189) seçilmiş ve PVA ile kıyaslamaları yapılmıştır. Bu yüzey etken maddelerin incelenen literatür verileri de göz önünde bulundurularak farklı derişimleri ile nanopartiküller hazırlanmış ve hazırlanan nanopartiküllerden 250 nm partikül boyutuna yakın olan en dar partikül boyut dağılımı gösteren formülasyonlar PVA ile hazırlanan nanopartiküller ile karşılaştırılmak üzere değerlendirilmeye alınmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri incelendiğinde polimer, etken ve yüzey etken madde derişimleri değişikliklerinin partikül üzerine etkileri bulgular kısmında gösterilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Benzer çalışmalar incelendiğinde her bir parametrenin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri anlamlı sonuç vermesine rağmen (190) bizim çalışmamızda literatür ile uyumlu etki görüldüğü ancak bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Çalışmada gözlenen farklı parametrelerin farklı oranlarının düşük etkilerinin nedeni belirli bir partikül büyüklüğü amacıyla çalışmanın yapılması ve buna bağlı olarak kullanılan madde derişimlerinin seviyelerinin sınırlı olmasıdır. Oranlardaki bu küçük değişikliklerin nanopartiküller üzerine etkileri de

sınırlı olması nedeniyle elde edilen partikül yükleme etkinlikleri arası farklar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Dış ve iç su fazının pH değerinin nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri bulgularında gösterilmiştir. Yükleme etkinlikleri su fazında en yüksek olarak pH 7' de tespit edilmiş ve daha sonra sırasıyla pH 5.6 ve en düşük değer olarak da pH 9.6' da bulunmuştur. Su fazının pH değerindeki değişimin etken maddenin iyonizasyon ve çözünürlüğü üzerine etki ettiği bilinmektedir. Etken maddenin çözünürlüğündeki bu değişim maddenin enkapsülasyon miktarını da değiştirmektedir (191).EHyapısı nedeniyle yükleme etkinliği en yüksek pH 7' de tespit edilmiştir. Sulu çözelti pH değerinin yanı sıra tampon eklemek de farklı fazların osmotik basıncı üzerine etki ederek yükleme etkinliğini değiştirir (192). Hazırlanan nanopartiküllerde su fazına kalsiyum klorür eklenerek bu özellik incelenmiş ancak kullanılan santrifüj kuvvetinin yeterli olmaması nedeniyle nanopartiküller saflaştırılamamış ve enkapsülasyon etkinlikleri mevcut şartlar ile ölçülememiştir.

Nanopartikül yapıları kullanılan yüzey etken madde yapısından etkilenir. Sulu faza eklenen hidrofilik yüzey etken maddeler ilaç enkapsülasyon etkinliğini düşürürler (193). Çalışmamızda en yüksek enkapsülasyon etkinliği organik fazda çözünen SS ile elde edilmiştir.

5.3.3. Partikül Boyut ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi

Kolloidal sistemlerde partikül boyutu, salım ve biyoyararlanım gibi parametreleri etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Eğer sistemdeki tüm partiküller aynı boyutlu olursa yapı monodispers olur ve tercih edilen durum budur. Ancak bu duruma ulaşmak çok zordur. Nanopartiküler sistemlerde ise monodispers sistemlere ulaşmak pratikte çok zor ve etkin olmamasından dolayı polidispersite indeksi düşük yapılar da monodispers sistemler olarak adlandırılır ve literatürde bu değer 0.1'in altıdır (160). Partikül boyut dağılımı potansiyel stabilite ve sistemin performansı hakkında bilgi verir (194, 195). Partikül boyut dağılımı tubular ve grafik formunda verilebilir.

Çalışmamızda hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları foton korelasyon spektroskopisi ile tayin edilmiş ve elde edilen veriler bulgular kısmında gösterilmiştir. Nanopartiküler sistemlerde formülasyon partikül boyutunun tekdüzeliği polidispersite indeksi değeri ile ifade

edilmektedir. Polidispersite indeksi partikül çapının log normal dağılım genişliği ile tanımlanmaktadır (196). Y/S emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yöntemi ile elde edilen nanopartikül formülasyon grubunda incelenen parametrelerden etken madde derişiminin arttırılmasının partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadağı ($p>0.05$) belirlenmiştir. İncelenen diğer bir parametre polimer derişimidir. Yapılan çalışmada PLGA derişimindeki değişiklik partikül boyutunu anlamlı bir şekilde değiştirirken ($p<0.05$) partikül büyüklük dağılımı üzerine etkisi anlamlı değildir ($p>0.05$). Ancak partikül boyut dağılımı ile polimerderişimi arasındaki ilişki herhangi bir model ile açıklanamamaktadır. Kullanılan yöntemde PLGA oranının arttırılması partikül boyutunda artmaya neden olur. Emülsifikasyon işleminde kayma dayanıklılığında yüksek viskoz direnç oluşması nedeniyle daha yüksek derişimlerde daha büyük partiküller ortaya çıktığı belirtilmiştir (197).

Yüzey etken madde miktarı emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yönteminde damlacıkların bir araya gelmesini önlemede önemli bir rol alır. Yüzey etken madde derişimindeki artış partikül boyutunda düşüşe neden olur. Dış faz PVA oranındaki artışın partikül boyutunu ve polidispersite indeksi değerini düşürdüğü bildirilmiştir [146]. Her ne kadar çalışmamızda PVA oranının partikül boyutu üzerine etkisi gösterildiyse de etkiler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Nanopartiküllerin partikül boyutu ve polidispersite indeksi uygulanan enerji miktarındaki artış ile düşüş gösterir (198).Çalışmamızda enerji artışı hem ultrasonik probun çalışma süresi hem de çalışma enerjisindeki değişim ile sağlanmaktadır. Y/S emülsiyonlarının partikül boyutu hem sonikasyon zamanı hem de sonikasyon süresinden anlamlı bir şekilde etkilenmektedir ($p<0.05$).

S/Y/S emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yönteminde kullanılan işlem parametreleri incelendiğinde sadece dış su fazındaki PVA oranının partikül boyutu üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermiştir ($p<0.05$). Ancak diğer parametrelerin partikül boyutu üzerine etkili olmamalarının nedeni deney tekrarı sayısının az ($n=3$) ve çalışılan faktör değerlerinin hedef 250 nm' den çok uzaklaşmamak adına birbirine yakın olmasındandır. Değerler birbirinden farklı olmasına rağmen sonuçlar istatistiksel olarak anlamsızdır. Yapılan ölçümler sonucu

90 mg PLGA, EH'ninsudaki çözünürlüğü gözönüne alınarak 3 mg etken madde, % 1 Dış faz PVA (pH 7) ön plana çıkan formülasyon olmuştur.

Farklı yüzey etken maddelerin hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri üzerine etkileri incelendiğinde istatistiksel olarak tüm sonuçların farklarının anlamsız olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). Tüm nanopartikül formülasyonları karşılaştırıldığında 250 nm değerine en yakın nanopartiküllerin PVA kullanılarak hazırlandığı gözlenmiştir (Çizelge 4.6).

5.3.4. Zeta Potansiyel

Zeta potansiyel nanopartikül çözeltilerinde stabilite hakkında fikir veren yöntemlerden biridir. Nanopartikül yüzeyindeki yüksek elektrik yükleri partiküller arası yüksek itme gücüyle agregasyonu önler (199). Negatif veya pozitif değerdeki yüksek zeta potansiyel verileri nanopartiküler sistemin stabilitesinin uygunluğunu ifade etmektedir (200).

Hazırlanan formülasyonların yüzey yüklerinin belirlenebilmesi ve çalışmada incelenen çeşitli formülasyon ve işlem parametrelerinin nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri üzerine olan etkilerinin değerlendirilebilmesi amacıyla elde edilen tüm formülasyonlarda zeta potansiyel analizi gerçekleştirilmiş ve her bir formülasyon için elde edilen ortalama zeta potansiyel değeri, standart sapma değerleri ile birlikte Çizelge 4.6 ve Şekil 4.14'te verilmiştir.

Pozitif yüklü nanopartiküllerin negatif yüklü olanlara göre ilaç hedeflemesinde daha büyük avantajları vardır. Bunun nedeni hücrelerin negatif yüklü olmasıdır. Ancak özellikle lipozomlar üzerine yapılan çalışmalarda pozitif ve negatif yüklerin lipozomların tedavi edici etkilerini dakikalardan saatlere kadar arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak pozitif yüklü lipidler FDA tarafından sitotoksitesileri yüksek olduğundan kullanımı istenmemektedir (201). Pozitif yüklü partiküllerin kullanımı sitotoksitesiyi arttırdığından dolayı çalışmamızda PLGA kullanılmıştır.

Partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliklerinin ölçümü sonrası çalışmamıza devam etmek amacıyla yöntem olarak seçilen S/Y/S emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yöntemi kullanılarak hazırlanan nanopartiküller incelendiğinde elde edilen zeta potansiyel değerlerinin koruyucu koloit eklenmeden 0-(-5) mV arasında ve

negatif yüke sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Negatif yükün PLGA' nın yanında PVA' nın nanopartikül yüzeyinde bulunan iyonize karboksil grubundan ileri geldiği de düşünülmektedir (184). Bazı emülsiyonlar tek tabaka nanoemülsiyon oluşturarak sterik bir engel sağlayarak da stabiliteyi artırır. Genel bir kural olarak ± 30 mV üzeri değerler iyi, ± 60 mV üzeri değerler ise mükemmel stabiliteyi gösterir. Çok küçük değerler ise hızlı agregasyonu gösterir [185]. Ancak bu bilgi yalnızca düşük molekül ağırlıklı yüzey etken maddeler için geçerlidir. Yüksek molekül ağırlıklı yüzey etken maddeler ise daha önce belirtildiği gibi sterik stabilizasyon sağlarlar. Bu durumlarda ± 20 mV veya çok daha düşük değerler yeterli stabilizasyon sağlarlar. Ayrıca partiküller arası mesafe yüksek molekül ağırlıklı yüzey etken madde kullanımı ile artar. Bu şekilde ölçülen zeta potansiyel düşer. Partikül yüzeyinde yüksek yük bulunan durumlarda bile bu durum geçerlidir. Düşük zeta potansiyele rağmen partiküller stabildir (202). Ancak Musumeci ve diğ. tarafından yapılan çalışmada düşük zeta potansiyel değerine sahip PLGA nanopartiküllerinin daha yüksek (-30 mV PLA ve +30 mV kitosan) zeta potansiyel değerine sahip nanopartiküllerden koku bölgesinden emiliminin daha yüksek olduğu bulunmuş ve bunun nedeninin hücre membranının negatif yüke sahip olmasına bağlı olarak veziküler taşıma anında negatif yükteki kaybın zeta potansiyelde düşmeye neden olmasına bağlamışlardır (170). Azalmaya bağlı olarak düşük yüklerde partikülün yükü hücre ile itmeye neden olacak ve elektrostatik kuvvetler içe alım mekanizasını diğer faktörlere istinaden daha az etkileyecektir. Bu nedenle nanopartikül formülasyonuna koruyucu koloit eklenmesine karar verilmiş ve kalsiyum klorür eklenmesinden sonra elde edilen nanopartiküllerin (F13) zeta potansiyel değeri değişerek -20.17 ± 1.2 mV olarak tespit edilmiştir (139).

5.3.5. FT-IR ve DTK Çalışmaları

Çalışmada etken madde olarak kullanılan EH'nin, PLGA 50:50 ve farklı yüzey etken maddeler kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında, polimer, etken ve diğer yardımcı maddelerin etkileşimlerinin incelenebilmesi amacıyla DTK ve FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül karakterizasyonunda kullanılan infrared örnekleme teknikleri potasyum bromür pellet tekniği, ATR tekniği, infrared görüntüleme tekniği vb. şeklinde gruplandırılmaktadır. Potasyum bromür pellet tekniği partiküler yapının tamamının karakterizasyonuna imkan sağlarken, ATR

tekniki ile partiküllerin sadece yüzey karakterizasyonu gerçekleşmekte, radyasyonun numune içerisine sınırlı penetrasyonu nedeniyle partiküler yapının tamamen ve derinlemesine karakterizasyonu yapılamamaktadır(203). Yapılan inceleme neticesinde nanopartikül FT-IR spektrumunun PLGA spektrumuna benzer olduğu ancak PVA ve etken maddeyi içeren piklerin düşük titreşim seviyesinde 3300 ve 2850 cm^{-1} dalga sayısında varlığı tespit edilmiştir. PLGA polimerine ait olan diğer bantlar ise 1400-1500 cm^{-1} bant aralığında yer alan üçlü laktik ve glikolik asit transmisyon pikleri (204), ile 1050-1250 cm^{-1} bant aralığında yer alan C-O gerilimleridir. Ayrıca 1700-1800 cm^{-1} karbonil (-C=O) gerilimi ve 2850-3000 cm^{-1} -CH, -CH₂, -CH₃ gerilimleri polimerin karakteristik gruplarıdır (196). Formülasyonlarda kullanılan yüzey etken madde olan PVA' nın yapılan çalışmada gözlenen karakteristik absorpsiyon piki olarak 3400-3350 cm^{-1} aralığında yer alan -OH grubu tespit edilmiştir. EH'nin nanopartikül içerisine hapsedilmesi FT-IR analiziyle açıklanabilirliği literatür verileriyle uyumludur (152, 153).

EH, PLGA, yüzey etken maddeler, fiziksel karışım ve nanopartikül formülasyonlarına ait DTK termogramları Şekil 4.18' de gösterilmiştir. Etken madde 170⁰C' de keskin bir pik göstermiş ve saf PLGA 60 ⁰C'de endotermik pik ve daha sonra camsı geçiş özelliği göstermiştir. EH yüklü PLGA nanopartikülleri önce 60 ⁰C'de endotermik pik (polimer entalpisini karşılayan) özellik göstermiş ve bu sonuç enkapsülasyon işleminin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir (205)

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan yüzey etken maddelerin termogramları Şekil4.19'da gösterilmiştir. Bu termogramlar incelendiğinde benzer termogramlar elde edilmiş ve her yüzey etken maddeye ait karakteristik pikler nanopartikül formülasyonlarında da gözlenmiştir.

5.3.6. Morfolojik Özellikler

Çalışmada nanopartikül formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla farklı cihazlardan faydalanılmıştır. Partikül yapılarının morfolojik değerlendirilmesi taramalı elektron mikroskobu yardımıyla yapılmıştır. Emülsiyon oluşturma çözücü uçurma yönteminden farklı partikül büyüklüğü dağılımına sahip üç formülasyonun elektron mikroskobu görüntüleri çekilmiştir(F8,

F25, F28) (Şekil 4.28). Gerçekleştirilen analizler sonucu tüm nanopartikül formülasyonların morfolojik özellikleri başarılı bir şekilde gözlemlenebilmiştir.

5.3.7. Eletriptan Hidrobromür Salımının Değerlendirilmesi

Nanopartiküllerden salım değerleri incelendiğinde, farklı yüzey etken madde kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının salım değerlerinin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Ancak tüm formülasyonlardan salım temelde başlangıçta ani salım ve daha sonra sabit hızda salım olarak görülmüştür. Salımdaki farklılıklar kullanılan yüzey etken maddelerin farklı hidrofilik lipofilik özellikleri nedeniyle oluşturdukları farklı engel özelliklerin olduğu düşünülmektedir. Salım kinetik özelliklerinden dolayı ortaya çıkan şişmenin de yardımcı olduğu mekanizmayla suda çözünen yapılı etken madde difüzyon ile beraber şişme ve daha sonra kırılan globüllerden salım özelliği göstermektedir. Bu yapılarda kullanılan yüzey etken madde önemli bir rol alır (206). Ayrıca yüzey etken maddelerin dış yüzeyindeki stabilizan görevlerine ek olarak nanopartikül içerisindeki diğer yapılar ile etkileşim sağlayarak ilaç salınımını yavaşlatıcı etki gösterebilirler. Bu etki yüzey etken madde tipi ve derişimi ayarlanarak değiştirilebilir(206). EHSalımının matematiksel olarak değerlendirilebilmesi için kullanılan modeller içerisinde seçilen sıfırıncı derece, birinci derece, Weibull, Korsmeyer Peppas, Hixson Crowell ve Higuchi kinetiklerinden hesaplanan salım özelliklerine en iyi uyum sağlayan kinetik Weibull kinetiği olarak tespit edilmiştir. Nanopartiküllerde salım özellikleri birçok çalışmada incelenmiş ve bu salım özelliklerine en iyi uyum gösteren modeller çeşitlilik göstermiştir. Örneğin Dillen ve diğ.(207) tarafından hazırlanan nanopartiküller Higuchi salım kinetiği özelliklerine en iyi uyumu gösterirken Aksungur ve diğ. (141) tarafından yapılan çalışmada en iyi uyum gösteren kinetik Weibull olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda tespit edilen sonuçlara göre tüm formülasyonlar Weibull dağılımına uyum sağlamaktadır. Bunun nedeni hem en yüksek r^2 değerlerinin hem de en küçük ortalama hata kareleri kökünün Weibull dağılımında tespit edilmesidir(208). Ancak her bir formülasyon Weibull dağılımına uyum sağlasa da farklı şekil faktörü (b) değerine sahiptir (Çizelge 4.7). Üssel “b” değeri polimerik yapılı matris sistemlerden taşınma mekanizmasını gösteren önemli bir değerdir. $b \leq 0,75$ olduğu durumda sistem Fick difüzyonu özelliği gösterirken 0,75- 1 arası değer alması Fick difüzyonu ile şişme kontrollü salımın beraber olduğu kombine bir mekanizmayı işaret

eder (209). Tespit edilen salım sonuçlarına göre EH- PLGA nanopartikülleri Fick difüzyonu ile Fick difüzyonu/ şişme kombinasyonu şeklinde salım göstermektedir.

5.4. Hücre Kültürü

Hücre kültür çalışmaları yapılmadan önce, deneylerde kullanılması düşünülen maddelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmeli, deneylerde kullanılacak etken ve yardımcı miktarları buna göre seçilmelidir. Sitotoksisite testi sonucu hücresel canlılık oranları % 50 nin üzerinde olmalıdır(210). Çalışmamızda kullanılan SS hariç tüm maddelerin canlılık oranı %50 nin üzerinde bulunmuştur (Şekil 4.34). Ancak yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucu sitotoksisite göstermeyen SS derişimi ile nanopartiküller hazırlanamadığından uygun derişim ile çalışmaya devam edilmiştir.

Bu çalışmada hücre tabakalarının ve sıkı kavşakların oluşturduğu engel özelliklerinin intestinal ve nazal epitele çok benzediği bildirilmesi ve burundan geçiş özelliklerinin incelendiği çeşitli çalışmalarda kullanılması nedeniyle Caco-2 (*human colon adenocarcinoma*) hücre hattı kullanılmıştır (211).

Hücresel canlılığın değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan yöntem MTT testidir. Bu kalorimetrik yöntemin esası, sarı renkli çözünebilir özellikteki boyanın, metabolik olarak aktif durumdaki hücrelerin mitokondrilerindeki süksinat dehidrogenaz enzimi ile koyu mavi renkli formazana dönüşürülmesidir. Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür[120].

Caco-2 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen MTT testi ile hazırlanan etken madde çözültisi ve farklı yüzey etken maddeler ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları karşılaştırılmıştır. Çalışma uzun süreli etkinin tespit edilmesi amacıyla 48 saat olarak planlanmıştır. Test sonuçları 48 saat hücrelerin canlı kalabildiğini göstermiştir.

EH'nin CaCO-2 hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmalarında çalışmamızda uygulanan dozun sitotoksik olmadığı bulunmuş ancak toksik dozla ilgili herhangi bir veri verilmemiştir (212).

Kullanılan farklı yüzey etken maddeler ile hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksisiteleri incelendiğinde en yüksek canlılığı PVA ve F68 ile hazırlanan

nanopartiküller göstermiştir. Schöler ve diğ. tarafından yapılan çalışmada farklı yüzey etken maddelerin sitotoksosite üzerine etkileri incelenmiş ve F68 ile hazırlanan yapıların sitotoksitesi SK ile hazırlananlardan fazla bulunmuş ve bunun nedeninin F68'in daha iyi sterik stabilizasyon göstermesi olarak açıklanmıştır (213).

5.4.1. Eletriptan Hidrobromür veya Eletriptan Hidrobromür Yüklü Nanopartiküllerin P-gp ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

Farklı formülasyonlara ait hücresel emilim sonrası geri atılan EH miktarları incelendiğinde hücresel geri atılımı en çok azaltan formülasyonun SK kullanılarak hazırlanan nanopartiküller olduğu tespit edilmiştir. Hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonları Eletriptan Hidrobromürün hücre dışına atılımını azaltmıştır. Kullanılan yüzey etken madde yapısındaki değişim P gp ile EH-PLGA nanopartikülleri arası etkileşimi değiştirmektedir. Dong ve diğ.(144) tarafından farklı stabilizanların P gp ile etkileşimi farklı bulunmuştur.

5.5. Formülasyonun Stabilesinin İncelenmesi

Nanopartikül formülasyonunun (F1) lyofilize haldeki formunun farklı sıcaklıklarda 3 ay bekletilmesi sonucu elde edilen veriler incelendiğinde sadece -20⁰C'de bekletilen formülasyonun partikül büyüklüğü arasında anlamlı bir fark bulunmadığı; 4⁰C ve 25⁰C' de bekletilen formülasyonların ise anlamlı bir şekilde değiştiği tespit edilmiştir (p<0.05). Aynı formülasyon polidispersite açısından değerlendirildiğinde sadece -20⁰C'de üç aylık stabilite testi sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir değere ulaşmamıştır (p<0.05). Diğer sıcaklıklarda polidispersite değeri 0,2 değerinin üzerine çıkarak partikül büyüklüğü dağılımı yaygınlaşmış ve polidispers bir dağılım oluşmuştur. Bu durum partikül yapısında sıcaklığın etkisiyle agregasyon meydana geldiğini göstermektedir (214). Polidispersite indeksi değerinde gözlenen artış nanopartikül yapısının partikül büyüklüğü dağılımının genişlediğinin kanıtıdır. Benzer çalışmalar incelendiğinde kullanılan polimerik materyal cinsine göre saklama sıcaklığının değiştiği gözlenmiştir. Çalışmamızda -20⁰C'nin en iyi stabilite göstermesinin nedeni saf PLGA'nın saklama koşulunun bu sıcaklık olmasıdır. Lemoine ve diğ. (215) tarafından yapılan bir çalışmada farklı laktik:glikolik asit oranına sahip PLGA'nın farklı sıcaklıkta bekletilerek stabiliteleri incelenmiş 12 ay sonunda polimer degradasyon hızları belirlenmiştir. -16⁰C' de degradasyon hızının

yavaş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hazırlanan nanopartiküllerin süspende hale getirilip biyolojik ortama uygulanmasından sonra partikül yapısındaki değişikliklerin tespit edilebilmesi amacıyla 24 saatlik çözelti stabilite testi yapılmıştır. Deney koşullarının biyolojik ortamı taklit edebilmesi için ortam sıcaklığı 37°C' ye ayarlanmıştır. 24 saat bu ortamda bekletilen partiküllerin, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinde anlamlı bir değişiklik tespit edilememiş ($p>0.05$) ve sonuç olarak uygulanan partiküllerin biyolojik ortamda stabil olduğu varsayılmıştır.

5.6. *In Vivo* Çalışmalar

Burundan beyne ilaç geçişi çalışmaları genel olarak fare ve rat kullanılarak yapılmıştır. Bunun nedeni rat koku bölge alanı ile insan koku bölgesi alanı arası benzerliklerdir (1). Bilimsel çalışmalarda % 78.4' lük kullanım oranı nedeniyle çalışmamızda hayvan modeli olarak rat seçilmiştir.

Trigeminal sinirler nazal boşlukta koku bölgesi ve solunum epiteli ile içiçe geçmiş haldedir. Bu nedenle trigeminal bölge, nazal ilaç uygulamalarında rol aldığı düşünülen önemli bir yoldur. Santral sinir sistemi ile pons bölgesinden bağlantısı vardır. Koku ve trigeminal bölgeler ile beyne ilaç uygulamasının bu şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir (150).

Bu yollara ek olarak ilaçlar beyne kan damarları ve lenfatik sistem kullanılarak dolaylı yoldan da taşınabilir (Şekil 5.3). Beyne ilaç geçişinin ölçülmesi amacıyla birçok formül tanımlanmıştır. Bu formüller içerisinde İlaç Hedeflendirme Etkinlik Yüzdesi (% İHE) (intranazal ilaç uygulamasıyla elde edilen beyinde biriken ilaç miktarı ile sistemik uygulama ile elde edilen beyinde biriken ilaç miktarının kıyaslanması) ve Burundan Beyne Taşınan İlaç Yüzdesi (% BTİ) (koku ve trigeminal bölge ile beyne ulaşan ilaç yüzdesi) en çok kullanılanlardır (150).

Burundan beyne ilaç geçişi çalışmalarında genellikle farmakokinetik profiller gösterilmiştir. % 10' luk kısımda ise farmakolojik aktivite üzerine çalışmalar yapıldığı bildirilmiştir (150).

Nazal uygulama sonrası ilaçların beyne taşınması doğrudan veya dolaylı yollardan olur. Nazal yolla uygulanan ve çeşitli mekanizmalar ile dışarı atılmayan

ilaçların, koku bölgesi ve trigeminal bölge kullanılarak doğrudan veya sistemik dolaşıma katılarak dolaylı olarak beyne geçişi sağlanır (150).

5.6.1. Farmakokinetik Çalışmalar

İntranazal ve intravenöz uygulama sonrası kan ve beyindeki EH miktarları incelendiğinde intranazal uygulama sonrası beyin dokusundaki etken madde miktarının yükseldiği gözlenmiştir. Ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Ayrıca EH yüklü nanopartiküllerin nazal yolla uygulanması intravenöz yolla uygulamaya göre beyinde daha yüksek derişime ulaşılmasını sağlamıştır ($p>0.05$). Farklı formülasyonlara ait kan/beyin etken madde oranları hesaplanmış ve Şekil 4.37-4.38' de gösterilmiştir. EH'nin PLGA nanopartikülleri içerisinde nazal uygulanması sonucu elde edilen madde miktarı EH çözeltisine göre daha yüksektir. Bu sonuç kan burundan beyne ilaç uygulanmasının etkinliğini göstermektedir (216).

EH'nin PLGA nanopartikülleri içerisinde intravenöz uygulanması sonucu kanda Cmax değerine 30. dakikada ulaşılmış ve daha sonra gittikçe azalan bir grafik gözlenmiştir (Şekil 4.37). Buna karşın EHyüklü nanopartiküllerin intranazal uygulanması sonucu yavaş ve düşük bir emilim gözlenmiş ve 1. saat sonunda Cmax değerine ulaşılmıştır. Elde edilen Cmax değeri intravenöz uygulamaya göre çok daha düşüktür ($p<0.05$). Ancak beyne geçen etken madde profilleri incelendiğinde nanopartiküllerin hem intravenöz hem de intranazal uygulanması sonucu Cmax değerlerine 30. dakika sonunda ulaşıldığı ve intranazal uygulama sonucu tespit edilen Cmax değerinin intravenöz uygulamaya göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç EH'ninnazal yoldan uygulanmasının beyin dokusuna geçişini hızlandırdığı şeklinde ifade edilebilir (217). Ancak tam tersi olarak EH'nin intranazal uygulanmasının kan derişimleri hem çözelti hem de intravenöz nanopartikül uygulamasına göre daha düşüktür ($p<0.05$). Dolayısıyla beyne ilaç hedeflendirmede intranazal uygulamanın intravenöz yola göre etkin bir yol olduğu belirtilebilir (217).

İntranazal ve intravenöz uygulama sonucu beyin ve kan derişimlerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle hesaplanan Cmax, tmax, Kel, AUC gibi farmakokinetik parametreler Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. EH yüklü PLGA nanopartiküllerin beyindeki farmakokinetik parametreleri incelendiğinde geçişin çözelti formuna göre

daha yavaş olduğu ancak daha yüksek oranda ve daha uzun süre geçiş sağlandığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni PLGA gibi polimerlerin mukosilyer klirens özelliklerini azaltması ve normal şartlarda hemen atılacak formülasyonların nazal bölgede kalış süresini arttırması olarak açıklanmıştır (217).

Literatürde açıklandığı gibi nazal mukozadan beyne ilaç geçişi üç ana yolla gerçekleşir. Bu yollar, ilacın kan dolaşımına katılması ve daha sonra KBE kullanılarak beyne geçmesini sağlayan sistemik yolak; nazal mukoza epitelinden koku ve trigeminal sinirler kullanılarak beyne ilaç geçişinin sağlandığı lenfatik yollardır (6). Çalışmamızda, EH'nin bu yollardan hangisini kullanarak burundan beyne geçişinin sağlandığını tespit edilmesi için hem intravenöz hem de intranazal uygulaması gerçekleştirilmiştir. İHE ve İTY değerleri hesaplanarak koku ve trigeminal yolla beyne doğrudan geçen ilaç miktarı saptanmış ve EH yüklü nanopartiküllerin ve çözeltinin İHE değerleri Çizelge 4.9' da verilmiştir.

Yüksek İHE değeri ilacın burundan beyne doğrudan geçişinin sağlandığının göstergesidir (218). Nanopartiküllerin intranazal uygulaması sonucu İTY değeri çözelti formunun aynı yolla uygulanmasına göre artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Nanopartikül formülasyonlarının uygulanması sonucu daha yüksek burundan beyne geçiş sağlanması literatür ile uyumludur (147, 219). Bu sonuç nanopartiküllerin yüzey yükü veya diğer özellikleri sonucu kazandıkları adeziv özellikleri ile nazal bölgede daha uzun kalması ve sıkı kavşakların kullanılarak beyne ilaç geçişinin arttırılması şeklinde açıklanabilir (217). Ayrıca bu nanopartiküller sağladıkları enkapsülasyon sonucu kimyasal ve biyolojik degradasyon ile P gp ile sağlanan dışarı atım mekanizmalarını da önlerler (220). Bu nedenlerle PLGA nanopartiküllerinin intranazal uygulanması sonucu EH'nin beyne geçişi ve hedeflendirilme etkinliği arttırıldığı sonucuna ulaşılabilir.

5.6.2.Etkinlik Çalışmaları

Diğer modellerin daha çok davranış gözlenmesi ve periferik etkilerin aydınlatılması amacıyla kullanılması ve tezimizdeki asıl amacın santral sinir sistemindeki etkinliğin ölçülmesi olması nedeniyle çalışmamızda beyinde c-fos-mRNA ve P maddesi ölçülmesi yaklaşımı model olarak seçilmiştir. Fos geni diğer genlerin transkripsiyonunu düzenleyen fos proteini oluşmasını sağlayan genidir (221).

Hızlı aktivasyonu nedeni ile ani-erken cevap genleri arasında yer alır. Fos protein aktivitesi spinal dorsal hornda nosisepsiyonu gösteren bir işaretleyicidir (222). Migren araştırmalarında fos immunoreaktivitesi nosisetif yolakların tanımlanmasında zararlı stimulanlara oluşturulan cevaplarda aktive olan nöronların aydınlatılmasında kullanılır. Bu çalışmaların büyük kısmı trigeminovaküler sistemdeki nöron aktivasyonunda uygulanmıştır. Bu şekilde migren patofizyolojisinin anlaşılmasında büyük aşama kaydedilmiştir (223).

Çalışmamızda gliseril trinitrat subkütan enjeksiyonu kullanılmasının nedeni ise nitrik oksitin uygulanması sonrası migren benzeri başağrılarına ve migren atağı geçiren hastalara benzer semptomlara neden olmasıdır (224, 225). GTN infüzyonu trigeminoservikal komplekste fos protein ekspresyonuna neden olur (226).

Diğer tüm modeller gibi fos ekspresyonunun ölçülmesinin de bazı kısıtlamaları vardır. Bunların en önemlisi kullanılan modelin yalnızca fos proteinini inhibe etme riskidir. Bu nedenle çalışmamızda P maddesi düzeyi de ölçülmüştür.

P maddesi trigeminal sensör nöronlarından salınır ve plazma ekstrasvazyon ve vazodilatasyonu sağlar. Ağrının santral iletiminde rol alır. Kranyal dokulardaki nörojenik inflamasyon ve trigeminal bağlantılı ağrı NK₁ reseptörlerinde etkili P maddesi ile bağlantılıdır (227).

Çalışmamızda farklı tedaviler uygulanan ratların TNC bölgelerinde c-fos-mRNA ve P maddesi transkript seviyelerinin ölçümünde qPCR kullanılmıştır. Bunun nedeni çalışmamızda ağrı ile ilişkili bölge olarak TNC seçilmesi ve nosisepsiyon işareti olarak c-fos kullanımımızdır. GTN subkütan enjeksiyonu sonrası c-fos mRNA ve P maddesi seviyelerinde artış görülmüştür. Bu artış zamana bağlı olarak değişmektedir. EH'nin nanopartikül içerisinde veya çözelti olarak intravenöz ve intranazal uygulaması sonrası TNC bölgesinde ölçülen c-fos mRNA ve P maddesi değerlerinde ise EH'ye bağlı olarak inhibisyon gözlenmiştir. Bu durum literatür ile uyumludur(228).

Ratlarda ağrı gözlenemez, bu nedenle c-fos gibi biyoişaretler ile ölçülmek zorundadır. Çalışmamızdaki GTN enjeksiyonu sonrası c-fos mRNA sonuçları incelendiğinde 30. dakikadaki c-fos mRNA ve Pmaddesi değerlerinin çok düşük

olduğu ve RNA seviyelerinin 1.saatten itibaren yükseldiği gözlenmiştir (Şekil 4.39 ve Şekil 4.40). Bunun nedeni c-fos geninin pik oluştuğusunun yaklaşık 30-40 dk sürmesi ve sonuç fos proteini oluşumunun yaklaşık 2 saat olmasıdır (229).

İnsanlarda GTN uygulaması sonucu indüklenen başağrısının sumatriptan gibi antimigren ilaçlarla düşürüldüğü bildirilmiştir (230). Sumatriptan benzeri EH'nin de benzer mekanizmalar ile etki sağladığı bilinmektedir. Daha önce EH'nin nanopartikül uygulaması yapılmadığından ya da bu iki RNA etkinliği migren hastalığında farmakolojik olarak incelenmediğinden sumatriptan ile ilgili literatür incelenmiş ve EH'nin bu etkinliğinin santral nöron aktivasyonunu inhibe ederek gösterdiği tespit edilmiştir (228).

EH'nin hem intravenöz hem de intranasal olarak çözelti ve nanopartikül süspansiyonu halinde uygulanması sonucu trigeminal bölgede c fos mRNA ve P Maddesi seviyelerinin değiştiği tespit edilmiştir. Bu etkiler uygulama yolu ve formülasyon şekline göre farklılık göstermiş ancak tüm uygulamaların 120. Dakikada etkinliği istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). c fos mRNA'nın nöron aktivasyonunda kabul edilen bir işaretleyici olduğu bilinmektedir (221). Elde edilen sonuçlara göre farklı uygulamalar trigeminal ganglionda bir bölümü nosiseptif olan farklı elektriksel uyarılmaya neden olmuştur. PCR sonuçlarında gözlenen GTN ile indüklenen c fos mRNA ekspresyon seviyelerinin EH tarafından düşürülmesi aynı zamanda kullanılan etken maddenin migrende etkinliğini göstermektedir. Böylece periferik anti migren etkilerinin yanında beyine geçen EH'nin nosiseptif etkiyi inhibe ederek santral bölgede anti migren etki de gösterdiği tespit edilmiştir. Shephard ve ark. Tarafından yapılan çalışmada elektriksel stimülasyon sonrası trigeminal etki endojen nörokinin reseptör ailesinden olan P maddesi vasıtasıyla taşınır. Nosiseptif nöronların aktivasyonunun göstergesi olan c fos mRNA ifadesi periferik olarak P maddesi üzerinden gerçekleşmektedir (231). Çalışmamız sonucunda etki hem p maddesi hem de c fos mRNA seviyeleri ile kanıtlanmıştır. Ancak aynı dozun farklı uygulanması ile etki değişmektedir. Buzzi ve Moskowitz tarafından 100 µg/kg sumatriptan uygulaması ile dural ekstrasvatta %70'lik bir üretim kaybı gözlenirken dozun 1000 µg/kg' a çıkartılmasıyla etki anlamlı bir şekilde değişmediği (%66) tespit edilmiştir (232). C fos mRNA düzeyleri incelendiğinde yine doz farkı ile değişimin

anlamli olmadigi bulunmüstür. Ancak aynı deney KBE harabiyeti sonucu yapıldığında etki anlamli düzeyde artmıştır. Sonuç olarak sumatriptanın KBE' ni geçememesinin bu farklılığın temel nedeni olduğu bildirilmiş ve triptan türevi ilaçların santral etkinliği gösterilmiştir. EH, KBE' ni geçebildiği bilinen bir etken maddedir. Bu nedenle hem çözelti formunda hem de nanopartikül uygulaması ile c fos mRNA ve P maddesi seviyesinde değişime neden olmuştur. Daha önce öne sürülen ancak henüz kanıtlanamayan trigeminal sinirlerden P maddesi salımının inhibisyonu ile dural kan ekstrasatının önüne geçilmesi bu çalışma ile de gözlenmiş ve EH' nin nanopartikül içerisinde nazal yol ile uygulanması ile bu blokaj en üst seviyeye çıkmıştır (233). Farklı uygulama ve formülasyon tiplerinin gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde ise gen ekspresyonunun farklı zamanlarda farklı uygulamalarda değiştiği gözlenmiştir. Ekspresyon profili genel olarak beyinde ölçülen EHMiktarı ile bağlantılı bulunmuştur.

SONUÇLAR

Nörolojik bir bozukluk olan ve Türkiye’de 15-55 yaş grubunda kadınlarda % 21.8 ve erkeklerde %10.9 oranında gözlenen migren, tekrarlanan ve iş gücü kaybına yol açan bir hastalıktır. Santral ve periferik olarak trigeminovasküler sistemin aktivasyonu, kalsitonin geni ile ilişkili peptid (CGRP) ve P maddesi gibi vasoaktif nöropeptidlerin salımına ve böylece vazodilatasyona, kan damarlarında steril inflamasyona ve ağrı sinyali iletimine neden olmaktadır. Migrenin bu etkilerinin EH’nin nazal ve intravenöz uygulamaları ile önlenmesi üzerine karşılaştırılmasının amaçladığı bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

Etken madde olarak kullanılan EH’nin PLGA polimeriyle nanopartiküllerinin başarı ile hazırlanabildiği tespit edilmiştir.

EH yüklü nanopartiküllerin boyutlarının polimer derişimi, yüzey etken madde derişimi ve hazırlama esnasında uygulanan enerji miktarına göre değiştiği tespit edilmiştir.

EH yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yüzey etken madde ve stabilizanların miktarının nanopartikül hazırlanmasında ve oluşan nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde etkin bir rolü olduğu; bu amaçla PVA, SS, F68 ve SK kullanılabileceği belirlenmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan nanopartiküllerin CaCo-2 hücre dizisi üzerinde gösterdikleri sitotoksikite tayini sonucunda nanopartikül hazırlanmasında kullanılan farklı yüzey etken maddelerin sitotoksikiteyi değiştirdiği bu maddelerden SS ve SK sitotoksikiteyi artırırken, F68 ve PVA’nın sitotoksikiteyi düşürdüğü tespit edilmiştir.

EH’nin bir geri atım proteini olan P-gp substratı olduğu CaCo-2 hücre dizisi ile yapılan çalışmalarla tekrar gösterilmiş ve EH’nin PLGA nanopartikülleri içerisine hapsedilmesiyle geri atımının inhibe edildiği gözlenmiştir.

Hücre dizisinden etken maddenin geri atımının inhibe edilmesi amacıyla hazırlanan nanopartiküllerin, geri atımı inhibe etmesinin içerdiği yüzey etken madde özelliğine göre değiştiği tespit edilmiştir.

Hayvan deneyi çalışmalarında kullanılmasına karar verilen F1 kodlu formülasyonun hücre hatları üzerinde sitotoksik etkilerini ve etken maddenin P-gp tarafından geri atılmasını en aza indiren nanopartikül formülasyonu olduğu belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen ön stabilite çalışmaları sonucunda F1 formülasyonunun -20°C' de 3 ay stabil olarak saklanabileceği tespit edilmiştir.

EH'nin Wistar Albino ratlara uygulanması sonucu ratların kan ve beyine geçenEH miktarının geliştirilen LC-MS yöntemiyle tayin edilebildiği tespit edilmiştir.

EH'nin, PLGA nanopartikülleri içerisinde uygulanmasıyla beyne ilaç hedefleme etkinliğinin arttığı tespit edilmiştir.

EH'nin Wistar Albino ratlara hem çözelti hem de F1 formülasyonu içerisinde, intravenöz ve intranazal uygulanması sonucu kan ve beyne geçen etken maddenin farmakokinetik parametreleri tespit edilmiş ve kanda en yüksek AUC değerinin intravenöz çözelti uygulaması ile elde edildiği gözlenirken, beyinde en yüksek AUC değerinin ise nanopartiküllerin intranazal uygulanması ile elde edildiği tespit edilmiştir.

EH'nin Wistar Albino ratlara çözelti ve F1 formülasyonu içerisinde, intravenöz ve intranazal uygulanması sonucu beyin TNC kısmındaki c-fos mRNA ve P maddesi düzeylerinin tespit edilebildiği ve etken madde uygulanmasının bu parametrelerde değişime neden olduğu belirlenmiştir.

Literatürde belirtilen GTN subkütan enjeksiyonunun çalışmamızda kullanılan ratların P maddesi ve c fos mRNA seviyelerini arttırdığı ve bu nedenle uygulamanın literatürde belirtildiği gibi ratlarda migren oluşturmada uygun bir model olduğu tespit edilmiştir.

Beyinde en yüksek AUC değeri bulunan F1 formülasyonunun hem P maddesi hem de c fos mRNA seviyelerinde en yüksek değişime neden olduğu tespit edilmiştir.

Özellikle *in vivo* migren etkinlik çalışması yapılan F1 kodlu nanopartikül formülasyonunun burun içine uygulanmasının; kontrollü bir şekilde salım yaparak

hasta uyuncunu arttıracığı, sistemik tedaviye bağı yan etkilerle olası ilaç etkileşimlerini azaltacağı ve beyine etken madde geçişini arttırarak migren ağrıları üzerinde etki sağlayacağı düşünölmektedir.

Sonuç olarak, yukarıda belirtilen ideal formölasyonun (F1), *in vitro* bulguları, *in vivo* farmakokinetik ve etkinlik çalışmaları göz önüne alındığında; migren tedavisi için uygun bir formöl olduğu tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

1. Al-Ghabeish, M.I., Drug transporters in the nasal epithelia and their contribution in drug delivery. 2014.
2. Illum, L., Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000. 11(1): p. 1-18.
3. Kristensson, K., Sorting signals and targeting of infectious agents through axons: an annotation to the 100 years' birth of the name "axon". *Brain research bulletin*, 1996. 41(6): p. 327-333.
4. Benedict, C., et al., Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology*, 2007. 86(2): p. 136-142.
5. Hanson, L.R. and W.H. Frey, Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC neuroscience*, 2008. 9(3): p. S5.
6. Dhuria, S.V., L.R. Hanson, and W.H. Frey, Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2010. 99(4): p. 1654-1673.
7. Thorne, R., et al., Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*, 2004. 127(2): p. 481-496.
8. Skipor, J., et al., Local vascular pathway for progesterone transfer to the brain after nasal administration in gilts. *Reprod Biol*, 2003. 3(2): p. 143-59.
9. Lassen, L., et al., CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia*, 2002. 22(1): p. 54-61.
10. McCormack, P.L., and Gillian M. Keating., *Eletriptan*. *Drugs*, 2006. 66(8): p. 1129-1149.
11. Jain, K., Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system. *Neurodegenerative Diseases*, 2007. 4(4): p. 287-291.
12. Kandel, E.R., et al., *Principles of neural science*. Vol. 4. 2000: McGraw-hill New York.
13. *Central Nervous System*. 2017; Available from: <http://www.derivativesinvesting.net/article/280863466/3-eso-nervous-endocrine-reproductive-systems/>.
14. Ramachandran, V.S., *Encyclopedia of the Human Brain, Four-Volume Set*. 2002: Academic Press.
15. Nowinski, W.L., Introduction to brain anatomy, in *Biomechanics of the Brain*. 2011, Springer. p. 5-40.
16. Ehrlich, P., *Über das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine far-benanalytische Studie*. Hirschwald-Verlag, Berlin, Germany 1885.
17. Goldmann, E.E., *Die äussere und innere skeretion des Gesunden organismus im lichte der" Vitalen Färbung"*. 1909: H. Laupp'schen Buchhandlung.

18. E.E., G., Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Abh. Preußischen Akad. 1913.
19. Nabeshima, S., et al., Junctions in the meninges and marginal glia. *Journal of Comparative Neurology*, 1975. 164(2): p. 127-169.
20. Nau, R., F. Sorgel, and H. Eiffert, Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clinical microbiology reviews*, 2010. 23(4): p. 858-883.
21. Kaplan, M.S. and J.W. Hinds, Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science*, 1977. 197(4308): p. 1092-1094.
22. Luskin, M.B., Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*, 1993. 11(1): p. 173-189.
23. Temple, S. and A. Alvarez-Buylla, Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Current opinion in neurobiology*, 1999. 9(1): p. 135-141.
24. Lochhead, J.J. and R.G. Thorne, Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. 64(7): p. 614-628.
25. Ghose, A.K., et al., Knowledge-based, central nervous system (CNS) lead selection and lead optimization for CNS drug discovery. *ACS chemical neuroscience*, 2011. 3(1): p. 50-68.
26. He, C., et al., Blood-brain barrier-penetrating amphiphilic polymer nanoparticles deliver docetaxel for the treatment of brain metastases of triple negative breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 2017. 246: p. 98-109.
27. Aller, S.G., et al., Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, 2009. 323(5922): p. 1718-1722.
28. Summerfield, S.G., et al., Central nervous system drug disposition: the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007. 322(1): p. 205-213.
29. Yang, H., Nanoparticle-mediated brain-specific drug delivery, imaging, and diagnosis. *Pharmaceutical research*, 2010. 27(9): p. 1759-1771.
30. Wilhelm, I., C. Fazakas, and I.A. Krizbai, In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2011. 71(1): p. 113-28.
31. Patel, T., et al., Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. 64(7): p. 701-705.
32. Felgenhauer, K., Protein filtration and secretion at human body fluid barriers. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 1980. 384(1): p. 9-17.
33. Fischer, H., R. Gottschlich, and A. Seelig, Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. *The Journal of membrane biology*, 1998. 165(3): p. 201-211.
34. Kastin, A.J. and V. Akerstrom, Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999. 289(1): p. 219-223.

35. Smith, K.R. and R.T. Borchardt, Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin, and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Pharmaceutical research*, 1989. 6(6): p. 466-473.
36. Clark, D.E., Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood–brain barrier penetration. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1999. 88(8): p. 815-821.
37. Norrby, S.R., Role of cephalosporins in the treatment of bacterial meningitis in adults: overview with special emphasis on ceftazidime. *The American journal of medicine*, 1985. 79(2): p. 56-61.
38. Nau, R., F. Sörgel, and H.W. Prange, Lipophilicity at pH 7.4 and molecular size govern the entry of the free serum fraction of drugs into the cerebrospinal fluid in humans with uninflamed meninges. *Journal of the neurological sciences*, 1994. 122(1): p. 61-65.
39. Welch, K. and M.B. Segal, *Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid*. 1987: Churchill Livingstone.
40. Mindermann, T., W. Zimmerli, and O. Gratzl, Rifampin concentrations in various compartments of the human brain: a novel method for determining drug levels in the cerebral extracellular space. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1998. 42(10): p. 2626-2629.
41. de Lange, E.C. and M. Danhof, Considerations in the use of cerebrospinal fluid pharmacokinetics to predict brain target concentrations in the clinical setting. *Clinical pharmacokinetics*, 2002. 41(10): p. 691-703.
42. Pardridge, W.M., Blood–brain barrier delivery. *Drug discovery today*, 2007. 12(1): p. 54-61.
43. Breedveld, P., J.H. Beijnen, and J.H. Schellens, Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci*, 2006. 27(1): p. 17-24.
44. Ting, C.-Y., et al., Concurrent blood–brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment. *Biomaterials*, 2012. 33(2): p. 704-712.
45. Garg, T., et al., Current strategies for targeted delivery of bio-active drug molecules in the treatment of brain tumor. *Journal of drug targeting*, 2015. 23(10): p. 865-887.
46. Blanchette, M. and D. Fortin, Blood-brain barrier disruption in the treatment of brain tumors. *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols*, 2011: p. 447-463.
47. Tiwari, S.B. and M.M. Amiji, A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Current Drug Delivery*, 2006. 3(2): p. 219-232.
48. Arica, B., et al., Biodegradable bromocryptine mesylate microspheres prepared by a solvent evaporation technique. I: Evaluation of formulation variables on microspheres characteristics for brain delivery. *Journal of microencapsulation*, 2002. 19(4): p. 473-484.
49. Arica, B., et al., Carbidopa/levodopa-loaded biodegradable microspheres: in vivo evaluation on experimental Parkinsonism in rats. *Journal of controlled release*, 2005. 102(3): p. 689-697.

50. Barbu, E., et al., The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain barrier. *Expert opinion on drug delivery*, 2009. 6(6): p. 553-565.
51. Kreuter, J., Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 2001. 47(1): p. 65-81.
52. Sawyer, A.J., J.M. Piepmeier, and W.M. Saltzman, New methods for direct delivery of chemotherapy for treating brain tumors. *Yale J Biol Med*, 2006. 79(3-4): p. 141-152.
53. Schröder, U. and B.A. Sabel, Nanoparticles, a drug carrier system to pass the blood-brain barrier, permit central analgesic effects of iv dalargin injections. *Brain research*, 1996. 710(1): p. 121-124.
54. Xie, Y., et al., Transport of nerve growth factor encapsulated into liposomes across the blood–brain barrier: in vitro and in vivo studies. *Journal of controlled release*, 2005. 105(1): p. 106-119.
55. Visser, C.C., et al., Targeting liposomes with protein drugs to the blood–brain barrier in vitro. *European journal of pharmaceutical sciences*, 2005. 25(2): p. 299-305.
56. Bharali, D.J., et al., Organically modified silica nanoparticles: a nonviral vector for in vivo gene delivery and expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(32): p. 11539-11544.
57. McKenzie, J.L., et al., Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials. *Biomaterials*, 2004. 25(7): p. 1309-1317.
58. Spector, R., Nature and consequences of mammalian brain and CSF efflux transporters: four decades of progress. *Journal of neurochemistry*, 2010. 112(1): p. 13-23.
59. Löscher, W. and H. Potschka, Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*, 2005. 2(1): p. 86-98.
60. Jones, A.R. and E.V. Shusta, Blood–brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharmaceutical research*, 2007. 24(9): p. 1759-1771.
61. Pardridge, W.M., Drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2012. 32(11): p. 1959-1972.
62. Miller, D.S., B. Bauer, and A.M. Hartz, Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 2008. 60(2): p. 196-209.
63. Zastre, J.A., et al., Up-regulation of P-glycoprotein by HIV protease inhibitors in a human brain microvessel endothelial cell line. *Journal of neuroscience research*, 2009. 87(4): p. 1023-1036.
64. Hurko, O. and J.L. Ryan, Translational research in central nervous system drug discovery. *NeuroRx*, 2005. 2(4): p. 671-682.
65. Frey, W.H., Intranasal delivery: bypassing the blood-brain barrier to deliver therapeutic agents to the brain and spinal cord. *Drug Deliv Technol*, 2002. 2(5): p. 46-49.
66. Dhanda, D.S., et al., Approaches for drug deposition in the human olfactory epithelium. *Drug Deliv Technol*, 2005. 5(4): p. 64-72.

67. Thorne, R.G., et al., Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain research*, 1995. 692(1): p. 278-282.
68. Chapman, C.D., et al., Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharmaceutical research*, 2013. 30(10): p. 2475-2484.
69. Shapiro, W.R., D.F. Young, and B.M. Mehta, Methotrexate: distribution in cerebrospinal fluid after intravenous, ventricular and lumbar injections. *New England Journal of Medicine*, 1975. 293(4): p. 161-166.
70. Ransohoff, R.M. and B. Engelhardt, The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 2012. 12(9): p. 623-635.
71. Vyas, T.K., et al., Intranasal drug delivery for brain targeting. *Current drug delivery*, 2005. 2(2): p. 165-175.
72. Schipper, N.G., J.C. Verhoef, and F.W. Merkus, The nasal mucociliary clearance: relevance to nasal drug delivery. *Pharmaceutical research*, 1991. 8(7): p. 807-814.
73. Hoang, V.D., et al., Characterization of human nasal primary culture systems to investigate peptide metabolism. *International journal of pharmaceutics*, 2002. 238(1): p. 247-256.
74. Lee, V.H., A. Yamamoto, and U.B. Kompella, Mucosal penetration enhancers for facilitation of peptide and protein drug absorption. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 1991. 8(2): p. 91-192.
75. Tengamnuay, P. and A.K. Mitra, Bile Salt–Fatty Acid Mixed Micelles as Nasal Absorption Promoters of Peptides. II. In Vivo Nasal Absorption of Insulin in Rats and Effects of Mixed Micelles on the Morphological Integrity of the Nasal Mucosa. *Pharmaceutical research*, 1990. 7(4): p. 370-375.
76. Mukosilyer Yapı. 2018; Available from: <http://sinusitisunderstood.blogspot.com.tr/p/pathophysiology-of-sinusitis.html>.
77. Agarwal, V. and B. Mishra, Recent trends in drug delivery systems: intranasal drug delivery. 1999.
78. Vyas, T., S.B. Tiwari, and M.M. Amiji, Formulation and physiological factors influencing CNS delivery upon intranasal administration. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2006. 23(4).
79. Kublik, H. and M. Vidgren, Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Advanced drug delivery reviews*, 1998. 29(1): p. 157-177.
80. Huang, C.H., et al., Mechanism of nasal absorption of drugs II: absorption of L-tyrosine and the effect of structural modification on its absorption. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1985. 74(12): p. 1298-1301.
81. Bodor, N. and P. Buchwald, Brain-targeted drug delivery. *American Journal of Drug Delivery*, 2003. 1(1): p. 13-26.
82. Doelker, E. Crystalline modifications and polymorphism changes during drug manufacture. in *Annales pharmaceutiques francaises*. 2002.

83. Raw, A.S., et al., Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs). *Advanced drug delivery reviews*, 2004. 56(3): p. 397-414.
84. Chien, Y., K. Su, and S. Chang, Nasal drug delivery and delivery systems. *Nasal Systemic Drug Delivery*. New York, NY: Marcel Dekker Inc, 1989. 239.
85. Shin, B.S., et al., Nasal absorption and pharmacokinetic disposition of salmon calcitonin modified with low molecular weight polyethylene glycol. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 2004. 52(8): p. 957-960.
86. Yu, S., et al., Nasal insulin delivery in the chitosan solution: in vitro and in vivo studies. *International journal of pharmaceutics*, 2004. 281(1): p. 11-23.
87. Suzuki, Y. and Y. Makino, Mucosal drug delivery using cellulose derivatives as a functional polymer. *Journal of controlled release*, 1999. 62(1): p. 101-107.
88. Shimpi, S., B. Chauhan, and P. Shimpi, Cyclodextrins: application in different routes of drug administration. *Acta pharmaceutica*, 2005. 55(2): p. 139-156.
89. Marple, B., P. Roland, and M. Benninger, Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 2004. 130(1): p. 131-141.
90. Waterman, K.C., et al., Stabilization of pharmaceuticals to oxidative degradation. *Pharmaceutical development and technology*, 2002. 7(1): p. 1-32.
91. Szabadka, H., Clinical observations with Paxirasol nasal spray. *Therapia Hungarica (English edition)*, 1991. 40(1): p. 31-36.
92. Corbo, D.C., J.-c. Liu, and Y.W. Chien, Drug absorption through mucosal membranes: effect of mucosal route and penetrant hydrophilicity. *Pharmaceutical research*, 1989. 6(10): p. 848-852.
93. Mustafa, F., et al., Chain length-dependent effects of alkylmaltosides on nasal absorption of enoxaparin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2004. 93(3): p. 675-683.
94. Minn, A., et al., Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier. *Journal of drug targeting*, 2002. 10(4): p. 285-296.
95. Juliano, R.L. and V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1976. 455(1): p. 152-162.
96. Gül, I.G., G. Eryılmaz, and K.O. Karamustafaloğlu, P-glikoprotein ve Tedaviye Dirençteki Rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 2016. 8(1): p. 19-31.
97. Srivalli, K.M.R. and P. Lakshmi, Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. 48(3): p. 353-367.
98. Kara, Z.P., et al., ABC taşıyıcı proteinleri: Sirkadiyan ritimler ve cinsiyete bağlı farklılıklar. 2013.
99. Amin, M.L., P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights*, 2013. 7: p. 27-34.

100. Yu, L.X. and J. Woodcock, FDA pharmaceutical quality oversight. *Int J Pharm*, 2015. 491(1-2): p. 2-7.
101. Punay, N.C. and J.R. Couch, Antidepressants in the treatment of migraine headache. *Current pain and headache reports*, 2003. 7(1): p. 51-54.
102. Pusztai, L., et al., Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. *Cancer*, 2005. 104(4): p. 682-691.
103. Malingre, M., et al., Co-administration of GF120918 significantly increases the systemic exposure to oral paclitaxel in cancer patients. *British journal of cancer*, 2001. 84(1): p. 42.
104. Van Asperen, J., et al., Enhanced oral bioavailability of paclitaxel in mice treated with the P-glycoprotein blocker SDZ PSC 833. *British journal of cancer*, 1997. 76(9): p. 1181.
105. Salminen, T., A. Pulli, and J. Taskinen, Relationship between immobilised artificial membrane chromatographic retention and the brain penetration of structurally diverse drugs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 1997. 15(4): p. 469-477.
106. Ong, S., et al., Membrane partition coefficients chromatographically measured using immobilized artificial membrane surfaces. *Analytical chemistry*, 1995. 67(4): p. 755-762.
107. Kansy, M., F. Senner, and K. Gubernator, Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of medicinal chemistry*, 1998. 41(7): p. 1007-1010.
108. Ottaviani, G., S. Martel, and P.-A. Carrupt, Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *Journal of medicinal chemistry*, 2006. 49(13): p. 3948-3954.
109. Passeleu-Le Bourdonnec, C., et al., Methodologies to assess drug permeation through the blood-brain barrier for pharmaceutical research. *Pharmaceutical research*, 2013. 30(11): p. 2729-2756.
110. Wang, W., W.L. Dentler, and R.T. Borchardt, VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2001. 280(1): p. H434-H440.
111. Fischer, S., et al., Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1999. 276(4): p. C812-C820.
112. Bénistant, C., et al., Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: effect of the coculture with astrocytes. *Journal of lipid research*, 1995. 36(11): p. 2311-2319.
113. Sobue, K., et al., Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neuroscience research*, 1999. 35(2): p. 155-164.
114. Janzer, R.C. and M.C. Raff, Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 1987. 325(6101): p. 253-257.
115. Cecchelli, R., et al., In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Advanced drug delivery reviews*, 1999. 36(2): p. 165-178.

116. Ball, K., et al., Development of a physiologically based pharmacokinetic model for the rat central nervous system and determination of an in vitro–in vivo scaling methodology for the blood–brain barrier permeability of two transporter substrates, morphine and oxycodone. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2012. 101(11): p. 4277-4292.
117. Nicolazzo, J.A., S.A. Charman, and W.N. Charman, Methods to assess drug permeability across the blood-brain barrier. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2006. 58(3): p. 281-293.
118. Di, L., et al., Comparison of blood–brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2009. 98(6): p. 1980-1991.
119. Muldoon, L.L., et al., Immunologic privilege in the central nervous system and the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2013. 33(1): p. 13-21.
120. Sperling, R.A., C.R. Jack, and P.S. Aisen, Testing the right target and right drug at the right stage. *Science translational medicine*, 2011. 3(111): p. 111cm33-111cm33.
121. Valcour, V., et al., Central nervous system viral invasion and inflammation during acute HIV infection. *Journal of Infectious Diseases*, 2012. 206(2): p. 275-282.
122. Brem, S.S., et al., Central nervous system cancers. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 2011. 9(4): p. 352-400.
123. Hansen, E.K. and M. Roach, Handbook of evidence-based radiation oncology. *Handbook of Evidence-Based Radiation Oncology 2nd Edition*, 2007: p. 711.
124. Somand, D. and W. Meurer, Central nervous system infections. *Emergency medicine clinics of North America*, 2009. 27(1): p. 89-100.
125. Shlosberg, D., et al., Blood–brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nature Reviews Neurology*, 2010. 6(7): p. 393-403.
126. Piedad, J.C.P., H.E. Rickards, and A.E. Cavanna, What patients with Gilles de la Tourette syndrome should be treated with deep brain stimulation and what is the best target? *Neurosurgery*, 2012. 71(1): p. 173-192.
127. Sandi, C., et al., Prolonged treatment with pimelic o-aminobenzamide HDAC inhibitors ameliorates the disease phenotype of a Friedreich ataxia mouse model. *Neurobiology of disease*, 2011. 42(3): p. 496-505.
128. Ellrichmann, G., et al., Efficacy of fumaric acid esters in the R6/2 and YAC128 models of Huntington's disease. *PloS one*, 2011. 6(1): p. e16172.
129. McComsey, D.F., et al., Novel, broad-spectrum anticonvulsants containing a sulfamide group: pharmacological properties of (S)-N-[(6-chloro-2, 3-dihydrobenzo [1, 4] dioxin-2-yl) methyl] sulfamide (JNJ-26489112). *Journal of medicinal chemistry*, 2013. 56(22): p. 9019-9030.
130. Aksel, S., Başağrısı Epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Neurology*, 2003. 1(2): p. 94-97.

131. Burstein, R. and M. Jakubowski, Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization. *Annals of neurology*, 2004. 55(1): p. 27-36.
132. McKenzie, I. and V. Pitman, Safety, tolerability, and efficacy of eletriptan (40 mg–80 mg) for long-term treatment of migraine [abstract no. P 3054]. *Eur J Neurol*, 2000. 7(Suppl. 3): p. 118.
133. Pharmacopeia, U., The United States Pharmacopeia, USP 30/The National Formulary, NF 25. Rockville (MD): US Pharmacopeial Convention. 2007, Inc.
134. Medicines, E.D.f.t.Q.o., European pharmacopoeia. 2008, Strasbourg, France: European Directorate for the Quality of Medicines, Council of Europe, Strasbourg, France.
135. Esim, O., et al., Development of assay for determination of eletriptan hydrobromide in loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017. 142: p. 74-83.
136. Shabir, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*, 2003. 987(1): p. 57-66.
137. Guideline, I.H.T., Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 2005. 1.
138. Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *International journal of pharmaceutics*, 2005. 290(1): p. 137-144.
139. Cohen-Sela, E., et al., A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Journal of controlled release*, 2009. 133(2): p. 90-95.
140. Mendyk, A. and R. Jachowicz, Unified methodology of neural analysis in decision support systems built for pharmaceutical technology. *Expert Systems with Applications*, 2007. 32(4): p. 1124-1131.
141. Aksungur, P., et al., Development and characterization of Cyclosporine A loaded nanoparticles for ocular drug delivery: Cellular toxicity, uptake, and kinetic studies. *Journal of controlled release*, 2011. 151(3): p. 286-294.
142. LIANG, Y.j. and X.t. SHUAI, FG020326-loaded nanoparticle with PEG and PDLLA improved pharmacodynamics of reversing multidrug resistance in vitro and in vivo. *Acta pharmacologica sinica*, 2007. 28(6): p. 913-920.
143. Li, P.-Y., et al., Poly (L-lactide)-vitamin E TPGS nanoparticles enhanced the cytotoxicity of doxorubicin in drug-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biomacromolecules*, 2010. 11(10): p. 2576-2582.

144. Dong, X., et al., Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. *Cancer research*, 2009. 69(9): p. 3918-3926.
145. Zhang, Y. and P. Solver, An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine* 99.3. 2010.
146. Wang, F., X. Jiang, and W. Lu, Profiles of methotrexate in blood and CSF following intranasal and intravenous administration to rats. *International journal of pharmaceutics*, 2003. 263(1): p. 1-7.
147. Zhang, Q., et al., Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. *International journal of pharmaceutics*, 2004. 275(1): p. 85-96.
148. Bergerot, A., et al., Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. *European Journal of Neuroscience*, 2006. 24(6): p. 1517-1534.
149. Illum, L., Nasal drug delivery—recent developments and future prospects. *Journal of controlled release*, 2012. 161(2): p. 254-263.
150. Kozlovskaya, L., M. Abou-Kaoud, and D. Stepensky, Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *Journal of controlled release*, 2014. 189: p. 133-140.
151. Shelke, S., et al., Development and Validation of UV Spectrophotometric Method of Eletriptan Hydrobromide in Bulk and Pharmaceutical Formulation.
152. Preetam, A., et al., Crystallographic studies of eletriptan hydrobromide: α -Form, β -form and its physicochemical characterisation. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2013. 570(1): p. 128-147.
153. Kommavaram, P., A. Maruthapillai, and K. Palanisamy, Identification and quantitative determination of eletriptan hydrobromide polymorphs: Thermal, diffractometric and spectrometric studies. *Journal of Taibah University for Science*, 2015. 9(4): p. 586-593.
154. Kreuter, J., Evaluation of nanoparticles as drug-delivery systems. 1. Preparation methods. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 1983. 58(7): p. 196-209.
155. Fessi, H., et al., Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceutics*, 1989. 55(1): p. R1-R4.
156. Brannon-Peppas, L., Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 1995. 116(1): p. 1-9.
157. Budhian, A., S.J. Siegel, and K.I. Winey, Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content. *International journal of pharmaceutics*, 2007. 336(2): p. 367-375.
158. Shalini, M., M.H. Ali, and P. Lakshmi, Formulation and evaluation of elastic niosomes of eletriptan hydrobromide. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2016. 7(4): p. 1679.

159. Shelke, S., et al., Thermoreversible nanoethosomal gel for the intranasal delivery of Eletriptan hydrobromide. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2016. 27(6): p. 103.
160. McClements, D.J., Nanoparticle-and microparticle-based delivery systems: Encapsulation, protection and release of active compounds. 2014: CRC Press.
161. Jafari, S.M., Y. He, and B. Bhandari, Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *Journal of Food Engineering*, 2007. 82(4): p. 478-488.
162. Kentish, S., et al., The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2008. 9(2): p. 170-175.
163. Leong, T., et al., Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2009. 16(6): p. 721-727.
164. Walstra, P., Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science*, 1993. 48(2): p. 333-349.
165. Hatkar, U.N. and P.R. Gogate, Process intensification of anti-solvent crystallization of salicylic acid using ultrasonic irradiations. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2012. 57: p. 16-24.
166. Jiang, T., et al., Enhanced dissolution rate and oral bioavailability of simvastatin nanocrystal prepared by sonoprecipitation. *Drug development and industrial pharmacy*, 2012. 38(10): p. 1230-1239.
167. Izumikawa, S., et al., Preparation of poly (l-lactide) microspheres of different crystalline morphology and effect of crystalline morphology on drug release rate. *Journal of controlled release*, 1991. 15(2): p. 133-140.
168. Abdel-Mottaleb, M.M., et al., Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012. 82(1): p. 151-157.
169. Jain, R.A., The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. *Biomaterials*, 2000. 21(23): p. 2475-2490.
170. Musumeci, T., et al., Nose-to-Brain Delivery: Evaluation of Polymeric Nanoparticles on Olfactory Ensheathing Cells Uptake. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2014. 103(2): p. 628-635.
171. Feczko, T., J. Tóth, and J. Gyenis, Comparison of the preparation of PLGA–BSA nano-and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2008. 319(1): p. 188-195.
172. Kusumba, V.G., et al., Novel Hemioxalate Salt of Eletriptan. 2008, Google Patents.
173. Cournaire, F., et al., Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions: comparison of the performances of systems prepared with medium-chain-triglycerides and fish oil. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004. 58(3): p. 477-482.
174. Aserin, A., Multiple emulsion: technology and applications. Vol. 1. 2008: John Wiley & Sons.
175. Sahni, J.K., et al., Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. *Journal of controlled release*, 2011. 152(2): p. 208-231.

176. Todoroff, J. and R. Vanbever, Fate of nanomedicines in the lungs. *Current opinion in colloid & interface science*, 2011. 16(3): p. 246-254.
177. Reis, C.P., et al., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2006. 2(1): p. 8-21.
178. Neha, B., B. Ganesh, and K. Preeti, Drug delivery to the brain using polymeric nanoparticles: a review. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*, 2013. 2(3): p. 107-132.
179. Aktaş, Y., et al., Development and brain delivery of chitosan- PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjugate chemistry*, 2005. 16(6): p. 1503-1511.
180. Vauthier, C. and K. Bouchemal, Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 2009. 26(5): p. 1025-1058.
181. Torchilin, V.P., Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. 64: p. 302-315.
182. Mu, L. and S.-S. Feng, PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel: effects of the emulsifier and drug loading ratio. *Pharmaceutical research*, 2003. 20(11): p. 1864-1872.
183. Birnbaum, D.T., J.D. Kosmala, and L. Brannon-Peppas, Optimization of preparation techniques for poly (lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 2000. 2(2): p. 173-181.
184. Sahoo, S.K., et al., Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *Journal of Controlled Release*, 2002. 82(1): p. 105-114.
185. Varshosaz, J., et al., Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles using D-optimal experimental design. *Pharmaceutical development and technology*, 2012. 17(2): p. 187-194.
186. Bodmeier, R. and J.W. McGinity, Polylactic acid microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by the solvent evaporation technique. II. Some process parameters influencing the preparation and properties of microspheres. *Journal of microencapsulation*, 1987. 4(4): p. 289-297.
187. Nihant, N., et al., Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. Effect of primary emulsion stability. *Pharmaceutical research*, 1994. 11(10): p. 1479-1484.
188. Quellec, P., et al., Protein encapsulation within poly (ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release properties. *Journal of biomedical materials research*, 1999. 47(3): p. 388-395.
189. KÜÇÜKTÜRKMEN, B., U.C. ÖZ, and A. Bozkir, In Situ Hydrogel Formulation for Intra-Articular Application of Diclofenac Sodium-Loaded Polymeric Nanoparticles. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017. 14(1): p. 56-64.
190. Naik, J., et al., Development of sustained release micro/nanoparticles using different solvent emulsification technique: A review. *Int J Pharm Bio Sci*, 2012. 3(4): p. 573-590.

191. Govender, T., et al., PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *Journal of Controlled Release*, 1999. 57(2): p. 171-185.
192. Herrmann, J. and R. Bodmeier, The effect of particle microstructure on the somatostatin release from poly (lactide) microspheres prepared by a W/O/W solvent evaporation method. *Journal of controlled release*, 1995. 36(1-2): p. 63-71.
193. Wan, L.S., P.W. Heng, and L. Chan, Surfactant effects on alginate microspheres. *International journal of pharmaceutics*, 1994. 103(3): p. 267-275.
194. McClements, D.J., *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. 2015: CRC press.
195. Friberg, S., K. Larsson, and J. Sjoblom, *Food emulsions*. 2003: CRC Press.
196. Mu, L. and S.-S. Feng, Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol®). *Journal of Controlled Release*, 2002. 80(1): p. 129-144.
197. Ravivarapu, H.B., K. Burton, and P.P. DeLuca, Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000. 50(2): p. 263-270.
198. Iwata, M. and J. McGinity, Preparation of multi-phase microspheres of poly (D, L-lactic acid) and poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) containing a W/O emulsion by a multiple emulsion solvent evaporation technique. *Journal of microencapsulation*, 1991. 9(2): p. 201-214.
199. Sawant, K.K. and S.S. Dodiya, Recent advances and patents on solid lipid nanoparticles. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 2008. 2(2): p. 120-135.
200. Kumar, M., et al., Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 2004. 4(7): p. 876-881.
201. Honary, S. and F. Zahir, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2013. 12(2): p. 265-273.
202. Quaglia, F., et al., The intracellular effects of non-ionic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles in the delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 2009. 30(3): p. 374-382.
203. van de Weert, M., et al., Lysozyme distribution and conformation in a biodegradable polymer matrix as determined by FTIR techniques. *Journal of controlled release*, 2000. 68(1): p. 31-40.
204. Liu, M., et al., Characterization and release of triptolide-loaded poly (d,l-lactic acid) nanoparticles. *European Polymer Journal*, 2005. 41(2): p. 375-382.
205. Jose, S., et al., Carboplatin loaded Surface modified PLGA nanoparticles: Optimization, characterization, and in vivo brain targeting studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. 142: p. 307-314.
206. Jager-Lezer, N., et al., Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. *Journal of Controlled Release*, 1997. 45(1): p. 1-13.

207. Dillen, K., et al., Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 2006. 314(1): p. 72-82.
208. Adibkia, K., et al., Piroxicam nanoparticles for ocular delivery: physicochemical characterization and implementation in endotoxin-induced uveitis. *Journal of drug targeting*, 2007. 15(6): p. 407-416.
209. Papadopoulou, V., et al., On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International journal of pharmaceutics*, 2006. 309(1): p. 44-50.
210. Ingels, F., et al., Simulated intestinal fluid as transport medium in the Caco-2 cell culture model. *International journal of pharmaceutics*, 2002. 232(1): p. 183-192.
211. Mao, S., et al., Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells. *Pharmaceutical research*, 2005. 22(12): p. 2058-2068.
212. Cheng, Z., et al., Hydrophilic anti-migraine triptans are substrates for OATP1A2, a transporter expressed at human blood-brain barrier. *Xenobiotica*, 2012. 42(9): p. 880-890.
213. Schöler, N., et al., Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *International journal of pharmaceutics*, 2001. 221(1): p. 57-67.
214. De, S. and D.H. Robinson, Particle size and temperature effect on the physical stability of PLGA nanospheres and microspheres containing Bodipy. *Aaps Pharmscitech*, 2004. 5(4): p. 18-24.
215. Lemoine, D., et al., Stability study of nanoparticles of poly (ϵ -caprolactone), poly (d, l-lactide) and poly (d, l-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*, 1996. 17(22): p. 2191-2197.
216. Gao, X., et al., UEA I-bearing nanoparticles for brain delivery following intranasal administration. *International journal of pharmaceutics*, 2007. 340(1): p. 207-215.
217. Md, S., et al., Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: pharmacodynamic, pharmacokinetic and scintigraphy study in mice model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013. 48(3): p. 393-405.
218. Wang, X., N. Chi, and X. Tang, Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2008. 70(3): p. 735-740.
219. Seju, U., A. Kumar, and K. Sawant, Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in vitro and in vivo studies. *Acta biomaterialia*, 2011. 7(12): p. 4169-4176.
220. Mistry, A., S. Stolnik, and L. Illum, Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *International journal of pharmaceutics*, 2009. 379(1): p. 146-157.
221. Morgan, J.I. and T. Curran, Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual review of neuroscience*, 1991. 14(1): p. 421-451.
222. Hunt, S.P., A. Pini, and G. Evan, Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 1987. 328(6131): p. 632-634.

223. Kaube, H., et al., Expression of c-Fos-like immunoreactivity in the caudal medulla and upper cervical spinal cord following stimulation of the superior sagittal sinus in the cat. *Brain research*, 1993. 629(1): p. 95-102.
224. Afridi, S., H. Kaube, and P. Goadsby, Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs. *Pain*, 2004. 110(3): p. 675-680.
225. Sances, G., et al., Reliability of the nitroglycerin provocative test in the diagnosis of neurovascular headaches. *Cephalalgia*, 2004. 24(2): p. 110-119.
226. Tassorelli, C. and S.A. Joseph, Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain research*, 1995. 682(1): p. 167-181.
227. May, A. and P.J. Goadsby, Substance P receptor antagonists in the therapy of migraine. *Expert opinion on investigational drugs*, 2001. 10(4): p. 673-678.
228. Ramachandran, R., et al., A naturalistic glyceryl trinitrate infusion migraine model in the rat. *Cephalalgia*, 2012. 32(1): p. 73-84.
229. Bullitt, E., Somatotopy of spinal nociceptive processing. *Journal of Comparative Neurology*, 1991. 312(2): p. 279-290.
230. Iversen, H.K. and J. Olesen, Headache induced by a nitric oxide donor (nitroglycerin) responds to sumatriptan. A human model for development of migraine drugs. *Cephalalgia*, 1996. 16(6): p. 412-418.
231. Jessell, T.M. and L. Iversen, Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature*, 1977. 268(5620): p. 549.
232. Buzzi, M.G. and M.A. Moskowitz, The antimigraine drug, sumatriptan (GR43175), selectively blocks neurogenic plasma extravasation from blood vessels in dura mater. *British journal of pharmacology*, 1990. 99(1): p. 202-206.
233. Shepherd, S., et al., Comparison of the effects of sumatriptan and the NK1 antagonist CP-99,994 on plasma extravasation in dura mater and c-fos mRNA expression in trigeminal nucleus caudalis of rats. *Neuropharmacology*, 1995. 34(3): p. 255-261.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Özgür EŞİM
 Doğum yeri ve tarihi : Eskişehir 19.01.1984
 Uyuşuğu : Türkiye Cumhuriyeti
 Medeni durumu : Evli
 Askerlik durumu : Muaf
 İletişim adresi ve telefonu : Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık
 Bilimleri Merkezi Ankara 0 312 304 6076
 e-posta: ozgur.esim@sbu.edu.tr
 Yabancı dili : İngilizce



II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	GATA Ecz.Bil.Mrk.F.Teknoloji AD.	2011
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2005
Lise	Işıklar Askeri Lisesi	2001

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)

IV- Mesleki Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2005-2006	GATA	Eczacı
2006-2008	Shh.İkm.Bkm.Mrk.K.lığı	Stok Kontrol A.
2008-2009	Gn.Kur.Bşk.lığı	Proje Sb.
2009-2011	GATA Ecz.Bil.Mrk.	Yük.Lis.Öğr.
2011-2012	Sivas As.Hst.	Başeczacı
2012-2013	Kabil As. Hst.	Eczacı
2013-2013	Fiz.Ted.ve Rehab.Mrk.	Başeczacı
2013-2016	GATA Ecz.Bil.Mrk.	Doktora Öğr.
2016-devam ediyor	Sağlık Bilimleri Üniversitesi	Arş.Gör.

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Eşim Özgür, Savaşer Ayhan, Köse Özkan Cansel, Bayrak Ziya, Taş Çetin, Özkan Yalçın (2018). Effect of polymer type on characteristics of buccal tablets using factorial design. Saudi Pharmaceutical Journal, 26(1), 53-63., Doi: 10.1016/j.jsps.2017.10.013 (Yayın No: 4172717)
2. Kurbanoğlu Sevinç, Eşim Özgür, Köse Özkan Cansel, Savaşer Ayhan, Özkan Yalçın, Özkan Sibel Aysıl (2017). Determination Of Dihydroergotamine Via LC Method Coupled with Fluorescence Detection in Pharmaceutical Film Preparations. Revue Roumaine de Chimie, 62, 517-523. (Yayın No: 3681355)
3. Eşim Özgür, Savaşer Ayhan, Kurbanoğlu Sevinç, Köse Özkan Cansel, Özkan Sibel Aysıl, Özkan Yalçın (2017). Development of assay for determination of eletriptan hydrobromide in loaded PLGA nanoparticles. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 142, 74-83. 10.1016/j.jpba.2017.05.002 (Yayın No: 3681325)
4. Köse Özkan Cansel, Kurbanoğlu Sevinç, Eşim Özgür, Savaşer Ayhan, Özkan Sibel Aysıl, Özkan Yalçın (2016). Simultaneous Determination and Drug Dissolution Testing of Combined Amlodipine Tablet Formulations Using RP LC. Chromatographia, 79(17-18), 1143-1151., Doi: 10.1007/s10337-016-3125-x (Yayın No: 2992369)
5. Köse Özkan Cansel, Eşim Özgür, Kurbanoğlu Sevinç, Savaşer Ayhan, Özkan Sibel Aysıl, Özkan Yalçın (2016). Development of a Suitable Dissolution Method for the Combined Tablet Formulation of Atorvastatin and Ezetimibe by RP LC Method. Current Drug Delivery, 13(3), 424-432., Doi: 10.2174/1567201813666151201185206 (Yayın No: 2992309)

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. Safi Aimal, Köse Özkan Cansel, Eşim Özgür, Bayrak Ziya, Taş Çetin, Savaşer Ayhan, Özkan Yalçın (2016). Büyük Hacimli Parenteral Çözeltilerde Donmanın Stabilité Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Gülhane Tıp Dergisi, 58(3), 261-265., Doi: 10.5455/Gülhane.175308 (Kontrol No: 3532101)

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. Antifungal Etkili Bir Termosensitif Jel Formülasyonunun Geliştirilmesi Kontrol ve Analizlerinin Ratlarda Değerlendirilmesi AR 2015 55 , Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, (Araştırmacı), 16/11/2015 - 01/06/2016
2. Rosuvastatin ve Ezetimib içeren kombine ilaç dozaj formların analizine yönelik kromatografik ve elektrokimyasal yöntemlerin geliştirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, (Araştırmacı) 04/07/2017 (Devam Ediyor)
3. Akut Migren Atakları Tedavisinde Dihidroergotamin Mesilat İçeren Dil Altı Polimerik Film Dozaj Formlarının Geliştirilmesi In Vitro ve In Vivo Değerlendirilmesi, TÜBİTAK projesi, (Bursiyer) (214S655) 15/05/2015 - 27/12/2017
4. Beyine nazal yolla ilaç taşıyıcı bir formülasyon geliştirilmesi, in vitro ve rat hayvan modelinde değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, (BAP 2017-006) (Araştırmacı) 24.05.2017 (Devam Ediyor)

EK 1. Tezden Türetilmiş Yayınlar

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 142 (2017) 74–83



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba



Development of assay for determination of eletriptan hydrobromide in loaded PLGA nanoparticles

Ozgun Esim^a, Ayhan Savaşer^{a,*}, Sevinc Kurbanoglu^b, Cansel K. Ozkan^a, Sibel A. Ozkan^{b,*}, Yalcin Ozkan^a^aUniversity of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Technology, Çağlayan Campus, 06018 Ankara, Turkey
^bAnkara University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Tandogan, 06100 Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2017

Received in revised form 28 April 2017

Accepted 1 May 2017

Available online 2 May 2017

Keywords:

Eletriptan hydrobromide

Drug delivery

Liquid chromatography

Nanoparticle synthesis

ABSTRACT

Eletriptan Hydrobromide is a serotonin 5-HT₁ receptor agonist and it used for the treatment of migraine headaches with or without aura. Even if the drug is well absorbed after oral administration, it has some drawbacks like first pass metabolism and decrease in bioavailability after migraine attacks. Encapsulation of drug into polymeric nanoparticles is one of the methods for protecting the drug against degradation. The present work described a preparation of Eletriptan Hydrobromide loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using o/w single emulsion solvent evaporation method, in order to determine the factors affecting the physicochemical properties of the nanoparticles on the particle size of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. D-Optimal design is used. Moreover, novel, simple, sensitive, selective, and fully validated chromatographic technique for the quantification of Eletriptan Hydrobromide from Eletriptan Hydrobromide loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles was developed. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) concentration, sonication time and sonication energy were found as significant factors ($p < 0.05$) on particle size of nanoparticles. Limit of detection and limit of quantification values were calculated as 0.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.96 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Eletriptan Hydrobromide is a second generation triptan class drug designated as R-3-[(1-methyl-2-pyrrolidinyl) methyl]-5-[2-(phenyl sulfonyl) ethyl]-1-indole mono hydrobromide with a molecular weight of 463.40 g/mol. It is used to treat migraine but not prevention. Eletriptan Hydrobromide is readily soluble in water and methanol and well absorbed after oral administration [1]. Following oral administration plasma peak levels occurs after 1.5 h and mean absolute bioavailability is approximately 50% in healthy subjects. Even though the drug is well absorbed after oral administration, it undergoes first pass metabolism leading to reduce the oral bioavailability of approximately 50%. After migraine attack, mean bioavailability also falls approximately 30% and T_{max} increases to 2.8 h. It has a half-life of 4 h which is short for migraine with a characteristic recurrent headaches last 4–72 h [2].

Currently, Eletriptan Hydrobromide is available in oral formulations. Yet, due to problems like twice in a day administration, side effects at higher doses and gastrointestinal effects like first pass metabolism, tablet dosage form may not be the ideal route of administration. In order to enhance the bioavailability and reduce the side effects, it is beneficial to use prolonged release formulations or other routes [3].

Over the past few years there has been a great interest to patient-friendly and compliant dosage forms. Nano and micro sized particles are examples of these dosage forms and can be used as sustained release preparations which provide constant and prolonged action with reduced gastrointestinal toxic effects. In addition, these systems allow drug applications other than oral route. Taken into account the possibility to enhance the drug action and reduced side effects, Eletriptan Hydrobromide micro and nano-sized drugs have been developed as described in the literature aiming to apply the drug to various administration types [3,4]. However no method was found for the Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles of Eletriptan Hydrobromide.

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) is a highly used polymer in medical industry due to its number of advantages over other poly-

* Corresponding authors.

E-mail addresses: ayhan.savaser@hsu.edu.tr (A. Savaşer), ozkan@pharm.acy.ankara.edu.tr (S.A. Ozkan).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.022

0731-7025/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

EK 2. Etik Kurul Raporu

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA



31 Ocak 2017

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜLHANE KARARI

Toplantı Tarihi : 31.01.2017
 Toplantı Sayısı : 2017-1
 Etik Kurul Kayıt Numarası : Etik-2017/01
 Karar Numarası : 17/02
 Araştırma Yürütücüsü : Doç.Dr.Ayhan SAVAŞER
 Onaylanan Hayvan Türü Ve Sayısı : Rat-72 Adet
 Etik Onayı Geçerlilik Süresi : 36 Ay

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Bilimleri Merkezinden Doç.Dr.Ayhan SAVAŞER'in 31.01.2017 gün ve ETİK-2017/01 no'lu "Eletriptanın Beyine geçişinin artırılması amacıyla hazırlanan Nano boyutlu taşıyıcı sistemlerin ratlarda incelenmesi ve in vitro model ile korelasyonu" isimli çalışmaya Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Gülhane Yönergesi 'ne göre oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile uygun / ~~uygun değildir~~ karar verilerek kabul edilmiştir. ~~Kabul edilmemiştir.~~


 Prof.Dr.Ömer AZAL
 SBU Hayvan Deneyleri Yerel
 Etik Kurulu Gülhane Başkanı

ÇALIŞMA EKİBİ :
 Doç.Dr.Ayhan SAVAŞER
 Uzm.Ecz.Özgür EŞİM