

**BEYNE HEDEFLENDİRİLMİŞ POLİSORBAT 80
KAPLI/ATORVASTATİN YÜKLÜ AMFİFİLİK PLGA-b-PEG
NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE İN-VİVO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**PREPARATION AND IN-VIVO EVALUATION OF
POLYSORBATE 80 COATED/ATORVASTATIN LOADED
AMPHIPHILIC PLGA-b-PEG NANOPARTICLES FOR
BRAIN TARGETING**

SONER ŞİMŞEK

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Kezban Ulubayram

Üye :.....
Prof. Dr. Gülberk Uçar

Üye :.....
Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Üye :.....
Prof. Dr. Murat Şen

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Ece'ye...

BEYNE HEDEFLENDİRİLMİŞ POLİSORBAT 80 KAPLI/ATORVASTATİN YÜKLÜ AMFİFİLİK PLGA-b-PEG NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE İN-VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Soner Şimşek

ÖZ

Amfifilik blok kopolimerik nanopartiküller (NP), kan beyin bariyerinden (KBB) penetre olabilmeleri, taşıdıkları etkin madde moleküllerini hedefe daha özgün olarak ulaştırabilmeleri, çözünürlüğü problem olan etkin maddeleri sorunsuz bir şekilde taşıyabilmeleri gibi üstün özelliklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemler olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı, polisorbata 80 kaplı ve Atorvastatin yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli(etilen glikol) (PLGA-b-PEG) nanopartiküllerini geliştirmek ve beyne hedefleme açısından polisorbata 80 kaplamanın göreceli avantajlarını incelemektir. Bu amaçla, Atorvastatin yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmış ve KBB'den penetre olabilmeleri için yüzeyleri polisorbata 80 ile kaplanmıştır. Polimer derişimi, polimerdeki PEG içeriğı ve polisorbata 80 kaplamanın partikül büyüklüğü, etkin madde yükleme etkinliğı ve nanopartiküllerden ilaç salımı özellikleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca formüle edilen nanopartiküllerin hücresel alımları ve beyne hedeflendirilmeleri sırasıyla in-vitro ve in-vivo deneylerle incelenmiştir. Formülasyon parametrelerine bağılı olarak nanopartikül boyutu 30-170 nm aralığındadır. Polimer kompozisyonundaki PEG miktarının % 15'ten % 5'e azalması, nanopartiküllerin boyutunu 69 nm'den 172 nm'ye artırmış ve etkin madde yükleme etkinliğini % 51'e çıkarmıştır. Diğer taraftan polisorbata 80 kaplama süresindeki artış ile etkin madde yükleme etkinliğı azalmıştır. Nanopartiküller, endotel hücreler tarafından etkili bir şekilde alınmıştır. Floresan boya ile işaretli nanopartiküllere ait ışımaya, sıçan beyinlerinde polisorbata 80 kaplı olan ve olmayan her iki formülasyonda da gözlenmiş ve enjeksiyondan 1 saat sonra maksimuma ulaşmıştır. Bu sonuçlar nanopartiküllerin KBB'yi aşabildiklerini göstermiştir. Sonuç olarak hazırlanan polisorbata 80 kaplı PLGA-b-PEG nanopartikülleri; Alzheimer hastalığı, inme, Parkinson hastalığı ve multipl skleroz gibi nörolojik rahatsızlıklar için umut verici nanosistemlerdir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, PLGA-b-PEG, polisorbata 80, Atorvastatin, beyne hedefleme

Danışman: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı ve Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

PREPARATION AND IN-VIVO EVALUATION OF POLYSORBATE 80 COATED/ATORVASTATIN LOADED AMPHIPHILIC PLGA-b-PEG NANOPARTICLES FOR BRAIN TARGETING

Soner Şimşek

ABSTRACT

Amphiphilic block copolymeric nanoparticles (NPs) are widely used in drug delivery systems because of their superior abilities including; penetrating through blood brain barrier (BBB), transporting the active molecules to their targets more precisely, delivering the drugs that have solubility problems without any issues. The objective of this study was to develop polysorbate 80 coated and Atorvastatin loaded poly(lactic-co-glycolic acid)-block-poly(ethylene glycol) (PLGA-b-PEG) nanoparticles and to investigate the relative advantages of polysorbate 80 coating on NPs for brain delivery of Atorvastatin. For this purpose, Atorvastatin loaded PLGA-b-PEG nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method and their surfaces were coated with polysorbate 80 to make them penetrate through the blood-brain barrier. The effects of polymers concentration, PEG content in polymer and polysorbate 80 coating on the particle size, drug loading efficiency and release behaviour of nanoparticles were investigated. Additionally, cellular uptake and brain targeting of formulated nanoparticles were investigated by in-vitro and in-vivo experiments, respectively. Particle sizes of the nanoparticles were in the range of 30-170 nm depending on formulation parameters. Decreasing PEG content from 15 % to 5 % (w/w) in polymer composition increased the nanoparticle size from 69 nm to 172 nm and improved the drug loading efficiency up to 51 %. On the other hand drug loading efficiency was decreased by increasing polysorbate 80 coating time. Nanoparticles were taken up by endothelial cells effectively. The presence of fluorescence was observed in rat brain both in nanoparticles and polysorbate 80 coated nanoparticles and reached the maximum point after 1 h post injection, which indicated that these nanoparticles could get across the BBB. It was concluded that prepared polysorbate coated PLGA-b-PEG nanoparticles are promising nanosystems for neurological disorders like Alzheimer's disease, stroke, Parkinson's disease and multiple sclerosis.

Keywords: Nanoparticles, PLGA-b-PEG, polysorbate 80, Atorvastatin, brain targeting

Advisor: Prof. Dr. Kezban ULUBAYRAM, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences and Department of Nanotechnology and Nanomedicine

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasında tüm bilgilerini ve imkanlarını bana cömertçe sunan ve yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kezban Ulubayram'a,

Yüksek lisansım boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen sayın hocam ve "canım ağabeyim" Dr. Ecz. Hakan Eroğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince tüm desteğini hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve tüm Nanoteknoloji ve Nanotıp ailesine,

Teknik destekleri ve yol gösterici yardımları için Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı adına AbD Başkanı Prof. Dr. Gülberk Uçar'a,

Yardımları ve güler yüzü için sayın hocam Doç. Dr. Nezire Saygılı'ya,

İn-vivo deneylerdeki destekleri için Veteriner Hekim Yrd. Doç. Dr. Barış Kürüm ve Metis Biyoteknoloji adına Muhittin Aksoy'a,

Çalışmamın her anında desteği ve dostluğuyla yanımda bulunan "büyük insan" Cem Bayram'a,

Yol gösterici tavsiyeleri ve yardımlarının yanında dostlukları için Yeliz Tunç ve Can Sarısözen'e,

Laboratuvarında sürekli yüzümü güldürdüğü ve tabi ki yardımları için Hülya Mutlu'ya,

AFM analizlerindeki desteği ve özverileri için izci kardeşim Tayfun Vural'a,

Aslında hep yanımda olan kardeşlerim Mehmet Özonur ve Emre Albayrak'a,

Hayatımdaki güzel yerlerini sürekli temiz tuttukları ve en zor zamanlarımda bile gülümsetebildikleri için İlker Çakır, Esra Kaplan, Gözde Tuncer, İnci Kazkayası, Arif Cengiz, Uğur İşçeviren ve Gökhan Ocak'a,

Her anımda, herşeyiyle yanımda olan Ece'me,

Ve karşılıksız sevgileri ve destekleri için canım annem ve babam başta olmak üzere minicik ailem Filiz, Hülya, Özden, Tolga, Cemal, Emre, Metin, Efsa, Naz ve Kağan'a...

sonsuz teşekkürler!

Ayrıca Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 09A301002 numaralı proje kapsamında desteklenen bu tez çalışmasına katkıları için ilgili birime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler	5
2.1.1. Lipozomlar	7
2.1.2. İmplant Sistemler	8
2.1.3. Mikro/Nano Partiküller	9
2.2. Beyne Etkin Madde Hedeflendirme	12
2.2.1. Kan Beyin Bariyeri ve Geçiş Mekanizmaları	13
2.2.1.1. Taşıyıcı Aracılı Transport	14
2.2.1.2. İyon Transportu	14
2.2.1.3. Aktif Efluks	15
2.2.1.4. Peptid ve Protein Transportu	15
2.2.1.5. Kaveol Aracılı Transport	16
2.2.2. PLGA Nanopartikülleri ile Beyne Etkin Madde Hedeflendirme Çalışmaları	17
2.2.3. Polisorbata 80'in Beyne Etkin Madde Hedeflendirmedeki Rolü	19
2.3. Atorvastatin	21
2.4. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	25
2.4.1. Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Genel Yöntemler	26
2.4.1.1. Püskürterek Kurutma	26
2.4.1.2. Aerosol Akış Reaktörü	27
2.4.1.3. Öğütme	27
2.4.1.4. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon	28
2.4.1.5. Çöktürme Teknikleri	29
2.4.1.5.1. Kontrollü Çöktürme	29
2.4.1.5.2. Sulu Faz İçerisine Buharlaştırma ile Çöktürme	31
2.4.1.5.3. Sıkıştırılmış Anti Çözücü İçerisine Çöktürme	32
2.4.1.5.4. Süperkritik Çözücü ile Hazırlama	33
2.4.1.5.5. Mikroemülsiyon Teknikleri	33
2.4.1.5.6. Sıvı İçerisine Spreyle Dondurma	34
2.4.2. PLGA ve PLGA-b-PEG Nanopartikülleri İçin Kullanılan Hazırlama Yöntemleri	34
2.4.2.1. Emülsiyon Tekniği	35
2.4.2.2. Çift Emülsiyon Tekniği	36
2.4.2.3. Tuzla Çöktürme	37
2.4.2.4. Çözücü Yer Değiştirme	37

3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Gereçler.....	39
3.1.1. Kimyasallar.....	39
3.1.2. Hücre Kültür Malzemeleri	40
3.1.3. Cihaz ve Aletler	41
3.1.4. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler.....	42
3.1.4.1. PLGA RG 503	42
3.1.4.2. PLGA RG 503H.....	42
3.1.4.3. PLGA-b-PEG RGP d 5055	42
3.1.4.4. PLGA-b-PEG RGP d 50105	43
3.1.4.5. PLGA-b-PEG RGP d 50155	43
3.1.5. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Yüzey Aktif Maddeler	43
3.1.5.1. Poli(vinil alkol)	43
3.1.5.2. Pluronic F68	43
3.1.5.3. Polisorbat 80	44
3.2. Yöntem.....	45
3.2.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması	45
3.2.1.1. Atorvastatin Stok Çözeltisi.....	45
3.2.1.2. Pluronic F68 Stok Çözeltisi.....	45
3.2.1.3. Polisorbat 80 Stok Çözeltisi.....	45
3.2.2. Atorvastatin'in İn-Vitro Miktar Tayini	45
3.2.2.1. Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması	45
3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu	46
3.2.2.2.1. Doğrusallık	46
3.2.2.2.2. Doğruluk.....	46
3.2.2.2.3. Kesinlik.....	46
3.2.2.2.4. Özgüllük	47
3.2.2.2.5. Duyarlılık	47
3.2.2.2.6. Kararlılık	48
3.2.3. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması	48
3.2.3.1. PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması	48
3.2.3.1.1. Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	48
3.2.3.1.2. Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	49
3.2.3.2. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	52
3.2.3.2.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	52
3.2.3.2.2. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Polisorbat 80 ile Kaplanması	52
3.2.3.2.3. Floresan İşaretli PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	53
3.2.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	53
3.2.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel	53
3.2.4.2. Nanopartiküllerin AFM Analizleri	55
3.2.4.3. FTIR Analizi.....	55
3.2.5. Nanopartikül Üretim Veriminin Hesaplanması	56
3.2.6. Atorvastatin Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	56
3.2.7. İn-Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları.....	57
3.2.8. Nanopartiküllerin Hücresel Alım Çalışmaları	57
3.2.9. Nanopartiküllerin İn-Vivo Sistemlerde İncelenmesi	58

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	60
4.1. Atorvastatin'in HPLC Yöntemi ile İn-Vitro Miktar Tayini.....	60
4.1.1. İn-Vitro Miktar Tayin Yönteminin Validasyonu	60
4.1.1.1. Doğrusallık	61
4.1.1.2. Doğruluk	61
4.1.1.3. Kesinlik	62
4.1.1.4. Özgüllük	63
4.1.1.5. Duyarlılık	64
4.1.1.6. Kararlılık	65
4.2. PLGA Nanopartikülleri.....	65
4.2.1. Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Hazırlanan PLGA Nanopartikülleri	65
4.2.2. Nanoçöktürme Yöntemi ile Hazırlanan PLGA Nanopartikülleri.....	67
4.3. PLGA-b-PEG Nanopartikülleri.....	69
4.3.1. PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonlarının Partikül Büyükliği ve Dağılımına Etkisi.....	70
4.3.2. Polisorbat 80 Kaplamanın Nanopartikül Büyükliği ve Dağılımına Etkisi	71
4.4. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Üretim Verimi.....	75
4.5. PLGA-b-PEG Nanopartikül Sistemlerinin AFM Analizleri	75
4.6. FTIR Analiz Sonuçları.....	83
4.7. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerden İn-Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları	86
4.8. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hücresel Alımları	88
4.9. Nanopartikül Sistemlerin Beyne Hedeflendirilmesinin İn-Vivo Değerlendirilmesi.....	93
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ApoE	Apolipoprotein E
ATR	Atorvastatin
BDNF	Beyin Kaynaklı Nörotropik Faktör
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EC	Endotel Hücre
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MS	Multipl Skleroz
PBS	Fosfat Tamponu
PCL	Poli (kaprolakton)
PEG	Poli (etilen glikol)
PGA	Poli (glikolik asit)
PLA	Poli (laktik asit)
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PLGA-b-PEG	Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri
PTS	Peptid Transport Sistemi
PVA	Poli (vinil alkol)
RES	Retikülo Endotelyal Sistem

SMC	Düz Kas Hücresi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
nm	Nanometre
μm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin kan plazmasındaki ApoE molekülleri ile etkileşiminin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.1. İlaç taşıyıcı sistemlerin etkisi	6
Şekil 2.2. Lipozomlar	8
Şekil 2.3. Beyin mikrovasküler yapısındaki dört temel hücre.....	13
Şekil 2.4. KBB'nin vücutta bulunduğu üç temel bölge	14
Şekil 2.5. KBB'den geçiş mekanizmaları-1	16
Şekil 2.6. KBB'den geçiş mekanizmaları-2	17
Şekil 2.7. Atorvastatin kalsiyumun moleküler formülü	22
Şekil 2.8. Statinlerin nöroprotektif etkileri	25
Şekil 2.9. Püskürterek kurutma cihazı ve üretilen nanopartiküller	26
Şekil 2.10. Nanokristal öğütme düzeneği	28
Şekil 2.11. Yüksek basınçlı piston homojenizatörünün çalışma mekanizması	29
Şekil 2.12. Kontrollü çöktürme tekniği	30
Şekil 2.13. Sulu faz içerisine buharlaşma ile çöktürme tekniği	31
Şekil 2.14. Sıkıştırılmış anti-çözücü içerisine çöktürme tekniğinde kullanılan püskürtücü başlık	32
Şekil 3.1. PLGA polimerlerinin moleküler yapısı.....	42
Şekil 3.2. PLGA-b-PEG kopolimerlerinin moleküler yapısı	42
Şekil 3.3. PVA'nın moleküler yapısı.....	43
Şekil 3.4. Poloksamer'in moleküler yapısı	44
Şekil 3.5. Polisorbat 80'in moleküler yapısı	44
Şekil 3.6. Zeta potansiyel	54
Şekil 4.1. Atorvastatin'e ait HPLC kromatogramı.....	60
Şekil 4.2. Atorvastatin'e ait kalibrasyon doğrusu	61
Şekil 4.3. Mobil faza ait kromatogram	63
Şekil 4.4. İn-vitro salım ortamına (PBS) ait kromatogram.....	64

Şekil 4.5. PBS içerisinde ilaç yüklü olmayan nanopartiküllere ait kromotogram	64
Şekil 4.6. % 5 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüleri	77
Şekil 4.7. % 10 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüleri	78
Şekil 4.8. % 15 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüleri	79
Şekil 4.9. % 5 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin boyut analizleri	80
Şekil 4.10. % 10 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin boyut analizleri	81
Şekil 4.11. % 15 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin boyut analizleri	82
Şekil 4.12. % 10 PEG içeren PLGA-b-PEG RGP d 50155 kopolimerine ait FTIR spektrumu.....	84
Şekil 4.13. Atorvastatin'e ait FTIR spektrumu.....	84
Şekil 4.14. Polisorbat 80'e ait FTIR spektrumu.....	85
Şekil 4.15. Nanopartiküllerin FTIR spektrumları	85
Şekil 4.16. Nanopartiküllerin İn-vitro salım sonuçları	87
Şekil 4.17. Düz kas hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri.....	89
Şekil 4.18. Endotel hücrelerin inverted faz kontrast mikroskop görüntüleri	90
Şekil 4.19. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbat 80 kaplı olmayan nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri [500 µg NP/kuyucuk]	90
Şekil 4.20. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbat 80 kaplı olmayan nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri [2500 µg NP/kuyucuk]	91
Şekil 4.21. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri [500 µg NP/kuyucuk]	92
Şekil 4.22. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri [2500 µg NP/kuyucuk]	93
Şekil 4.23. İn-vivo görüntüleme-1	96
Şekil 4.24. İn-vivo görüntüleme-2	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin formülasyonu	50
Çizelge 3.2. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan PLGA Nanopartiküllerinin formülasyonu.....	51
Çizelge 3.3. EC ve SMC hücre kültür ortamları	58
Çizelge 4.1. Analiz Yönteminin Doğruluk Bulguları	62
Çizelge 4.2. Tekrarlanabilirlik Sonuçları	62
Çizelge 4.3. Tekrar Elde Edilebilirlik Sonuçları	63
Çizelge 4.4. Kararlılık verileri	65
Çizelge 4.5. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerine ait boyut, yüzey yükü ve agregasyon sonuçları	66
Çizelge 4.6. Polimer ve yüzey aktif madde konsantrasyonunun nanopartikül boyutuna etkisi	67
Çizelge 4.7. Polimer ve yüzey aktif madde konsantrasyonunun polidispersite endeksine etkisi	68
Çizelge 4.8. Yüzey aktif madde konsantrasyonunun etkin madde yüklü olan ve olmayan partiküllerin boyutuna etkisi	68
Çizelge 4.9. Kullanılan diblok kopolimerdeki PEG oranının nanopartiküllerin boyutuna ve polidispersite endeksine etkisi	70
Çizelge 4.10. PLGA-b-PEG kopolimer konsantrasyonunun boyut ve PDI üzerine etkisi	71
Çizelge 4.11. Farklı PEG içeriğine sahip PLGA-b-PEG kopolimerle ile hazırlanan nanopartiküllerde Polisorbat 80 kaplamanın ortalama partikül boyutu, PDI, zeta potansiyel ve etkin madde yükleme etkinliği üzerine etkisi	74
Çizelge 4.12. Floresan İşaretli Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyelleri	89

GİRİŞ ve AMAÇ

Nanoteknolojinin sağlık alanındaki uygulamaları olarak tanımlanan nanotıp; hastalıkların teşhisi, tedavisi ve önlenmesinde kullanılan nanoboyuttaki teknolojileri ve işlemleri kapsamaktadır. Nanotıp alanının dünya genelinde öncelikli konuları nanodiagnostikler ve görüntüleme, rejeneratif tıp, taşıyıcı sistemler ve hedeflendirme olarak gösterilmektedir. Nanotıp, nanoteknolojinin sağladığı güç ile malzeme, aygıt/araç ve sistemleri moleküler ölçekte yapılandırarak, araştırma ve klinik uygulamalara elverişli yeni ürünleri ortaya çıkarmayı hedeflemektedir. Nanoteknoloji araştırmaları için sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan yatırımların 2002 yılında 500 milyon dolar ve 2004 yılında 850 milyon dolar civarında olması ve Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü'nin nanotıp alanında yapılan çalışmaların yararlarının ilk on yıl içerisinde açıkça görülebileceği yönündeki öngörülerini nanotıp alanındaki çalışmaların önemini açıkça vurgulamaktadır [1].

Nanoteknolojinin yakın gelecekte hastalıkların teşhis, tedavi, izlenmesinde köklü çözümler ortaya koyacağı farklı otoriteler tarafından kabul edilmektedir [2-5]. Nanoprobalar ve nanoişaretleyiciler sayesinde tanı yöntemleri önemli ölçüde geliştirilmiş ve hassaslaştırılmıştır. Nanotıp sayesinde geliştirilen yöntemlerle tümör hücreleri, mutasyon geçirmiş genler tespit edilmekte, zayıf biyolojik sinyallerin güçlendirilmesiyle MRG (Manyetik Rezonans Görüntüleme) gibi görüntü sağlayan tekniklerde çözünürlük ve kontrast artışları sağlayarak tedaviye yönelik önemli bulgular elde edilebilmektedir.

Farmasötiklerin, terapötiklerin ve diyagnostiklerin rasyonel taşınımları ve hedeflendirilmeleri üzerine yapılan araştırmalar nanotıp bilimi içerisinde yer almaktadır [6]. Nanotıp sayesinde, multifonksiyonel nanoterapötikler geliştirilerek; aynı sistem içerisinde hedefleme, kontrollü ilaç salımı, teşhis edici moleküllerin inkorporasyonu ve tedavinin izlenmesi gibi yararların sağlanabilmesi mümkündür [2]. Diğer taraftan ilaç teknolojisinde karşılaşılan en büyük sorunlar arasında yer alan spesifik organa ya da dokuya ilaç hedeflendirilmesi, ilacın etki süresinin uzatılması, kan beyin bariyerinin (KBB) aşılması, ilacın lokalizasyonu, yan ve toksik etkilerinin azaltılması ve aynı zamanda görüntülenmesi sağlayan multi-fonksiyonel nanosistemlerin geliştirilmesi üzerine bütün dünyada yoğun bir çalışma başlamıştır. Bu nanosistemler arasında lipozomlar, miseller, nanoemülsiyonlar, polimerik ve lipit nanopartiküller, sıvı kristaller, nanokristaller, dendrimerler,

biyokonjugatlar, polimer-ilaç kovalent nanoyapı oluşturan ön ilaç yaklaşımları ve “self assembling” ilaç taşıyıcı sistemler bulunmaktadır. Nanosistemler ile hidrofilik ve hidrofobik ilaçlar, proteinler, aşular, biyolojik makromoleküller vb. yapılar enkapsüle edilerek etkin bir şekilde taşınabilir. Tümör dokularına, lenfatik sisteme, arteriyel duvarlara, akciğerlere, karaciğere, dalağa ve beyne hedeflendirilmeleri ve sistemik dolaşımda istenilen süre boyunca kalmaları sağlanabilmektedir. Nano ölçekteki üretim ve manipulasyonlarla akılcı ilaç tasarımının önü açılmaktadır.

Diğer taraftan santral sinir sisteminin kendini koruması için gerekli olan ve birçok maddenin geçişine izin vermeyen KBB; Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, santral sinir sistemi enfeksiyonları, multipl skleroz (MS) ve beyin tümörleri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan yöntemler için kısıtlama getirmektedir. İlaç taşıyıcı nanosistemler ile gerçekleştirilebilen girişimsel olmayan ilaç hedeflendirme teknikleri bu açıdan büyük değer yaratmaktadır [7]. Fonksiyonlandırılabilirliklerinin yanı sıra küçük boyutları nedeniyle KBB'yi geçebilen nanotaşıyıcılar ile nörodejenaratif hastalıklara karşı tedavi teknikleri geliştirilebileceği düşünülmektedir [8].

Bu tez çalışması kapsamında FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış bir polimer olan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli(etilen glikol) (PLGA-b-PEG) polimerleri kullanılarak KBB'yi aşmaya yönelik 100-200 nm aralığında partikül büyüklüğüne sahip nanosistemlerin hazırlanması hedeflenmiştir.

Amfifilik blok kopolimerler, su içerisinde kendiliğinden miseller oluşturarak nanometre ölçeğinde yapılara dönüşebilmektedir. Oluşan tüm miseller, bir çekirdek-kabuk yapısına sahiptir. Bu yapı, suda çözünmeyen bloklardan bir çekirdek ve hidrofilik bloklardan oluşan kabuk şeklindedir. Bu oluşumların ilaç taşınımı için gelecek vadeden sistemler olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [9-13]. Bu sistemlerde genel olarak hidrofobik ilaçlar çekirdeğe yüklenerek insan vücudundaki toksisiteyi azaltılır ve kan dolaşımında kalış süreleri artırılır [14]. Ayrıca bu nanoyapılı miseller, hücre membranına tutunma sağlayarak ilacın hücre altı kompartmanlara taşınımını sağlayabilmektedir [15-18].

Diğer taraftan statin grubundan Atorvastatin'in (ATR) model ilaç olarak nanoyapılara yüklenmesi planlanmıştır. Antihiperlipidemik ilaçlar grubundan olan

statinler, sahip oldukları nöroprotektif etkilerinden dolayı Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, inme ve MS gibi nörolojik hastalıkların tedavisinde potansiyel sahibidir. Bu ilaçların; nörotropik faktörlerin salımını uyardığı, nörojenezi ve sinaptojenezi artırdığı, nöroprotektif enzimleri aktive ettiği, nitrik oksit üretimini yükselttiği ve vasküler fonksiyonları iyileştirdiği öne sürülmektedir. Ancak bu ilaçların, karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda kontrendike olması, kas ağrısı ve gastrointestinal sistem sorunları gibi yan etkilerinin bulunması kullanımlarını kısıtlamaktadır [19]. Bu sistemik yan etkilerin, statinlerin nanopartikül formülasyonları ile spesifik dokulara taşınabilmesi ile elimine edilebileceği düşünülmektedir. Bu ilaç grubundan olan Atorvastatin, sentetik bir statin türevidir olup, antihiperlipidemik olarak en çok kullanılanlardan biridir.

Bu çalışmada uygun boyutta nanopartikül üretimi için ilk adım olarak PLGA polimerleri ile ön çalışmalar yapılması ve daha sonra amfifilik blok bir kopolimer olan PLGA-b-PEG'in kullanılması planlanmıştır. PLGA-b-PEG kopolimeri ile nanopartiküllerde PLGA blokları ile hidrofobik çekirdek ve PEG blokları ile hidrofilik yüzeyden oluşan nano yapıların oluşturulması tasarlanmıştır. Böylece yapıda bulunan PEG sayesinde nanopartiküllerin retikulo endotelial sistem (RES) tarafından tanınması engellenerek dolaşımda kalış süresi artacaktır.

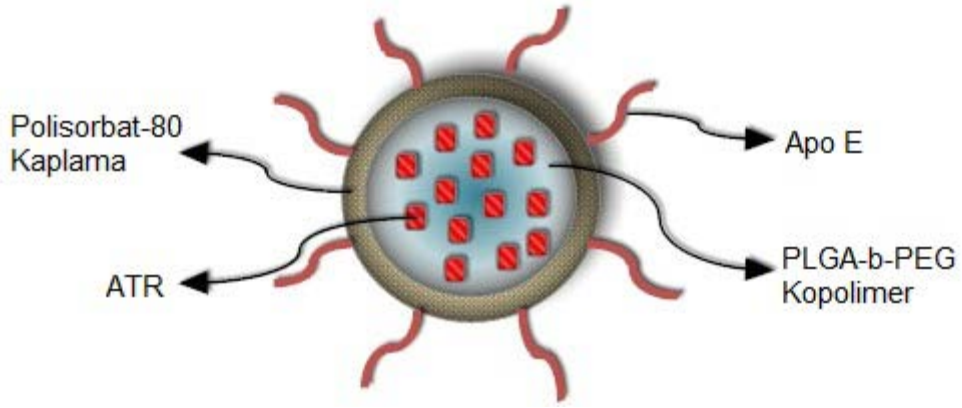
PLGA-b-PEG nanopartiküllere, yukarıda bahsedildiği gibi model etkin madde olarak antihiperlipidemik ilaçlar sınıfında bulunan ve nöroprotektif etkileri farklı araştırma grupları tarafından gösterilmiş olan [20-27] Atorvastatin molekülünün yüklenmesi planlanmıştır. Hazırlanması planlanan PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin yüzeyindeki hidrofilik grupların, nanopartiküllerin kan dolaşımında kalış süresini artırarak, hidrofobik çekirdeklerine yüklenmesi planlanan Atorvastatin'in KBB'den geçişinin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Daha sonra hazırlanması planlanan nanopartiküllerin KBB'yi aşarak beyin dokusuna ya da omurilik dokusuna geçişini sağlamak ve/veya artırmak amacı ile nanopartiküllerin yüzeyinin polisorbit 80 ile kaplanması planlanmıştır. Polisorbit 80 ile yüzey modifikasyonunun, kandaki Apolipoprotein E (ApoE) moleküllerinin nanopartiküllerin yüzeyine adsorpsiyonları yoluyla merkezi sinir sistemine geçişlerini kolaylaştırdığı, daha fazla etkin maddenin beyne geçişinde önemli rol oynadığı birçok çalışma ile gösterilmiştir [28, 29]. ApoE molekülleri adsorplanan

nanopartiküllerin, LDL (Düşük Dansiteli Lipoprotein) moleküllerini taklit ederek, endotel hücrelere taşındığı bilinmektedir [30].

Yüzey modifikasyonlarının ardından nanopartiküller floresan işaretlemeye tabi tutularak, nanopartiküllerin in-vitro hücre kültürü modelinde endotel hücrelere geçebilme potansiyelleri değerlendirilecektir. Son olarak hazırlanan nanopartiküler sistemlerin beyne geçişlerinin in-vivo uygulamalarla değerlendirilmesi planlanmıştır.

Tez çalışması kapsamında tasarlanan nanopartikül sistemi Şekil 1.1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin kan plazmasındaki ApoE molekülleri ile etkileşiminin şematik gösterimi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşınımı, ilaç etkin maddelerinin klinik yarar sağlamak üzere in-vivo olarak doğru zamanda doğru yerde olmalarını sağlayacak kimyasal ve biyolojik prensiplerin birlikte uygulanması olarak tanımlanabilir. İlaçlar hastaya uygulandığında, verilen doz içerisinde sadece çok küçük bir miktar etki bölgesine ulaşabilmekte, dozun kalan büyük kısmı yanlış dokular tarafından alınmakta, doğru doku tarafından hızlıca uzaklaştırılmakta ya da daha etki yerine ulaşmadan vücut tarafından metabolize edilmektedir. İlaç taşınımında amaç ilaç etkinliğini en üst düzeye taşıırken yan etkileri en az seviyede tutmaktır.

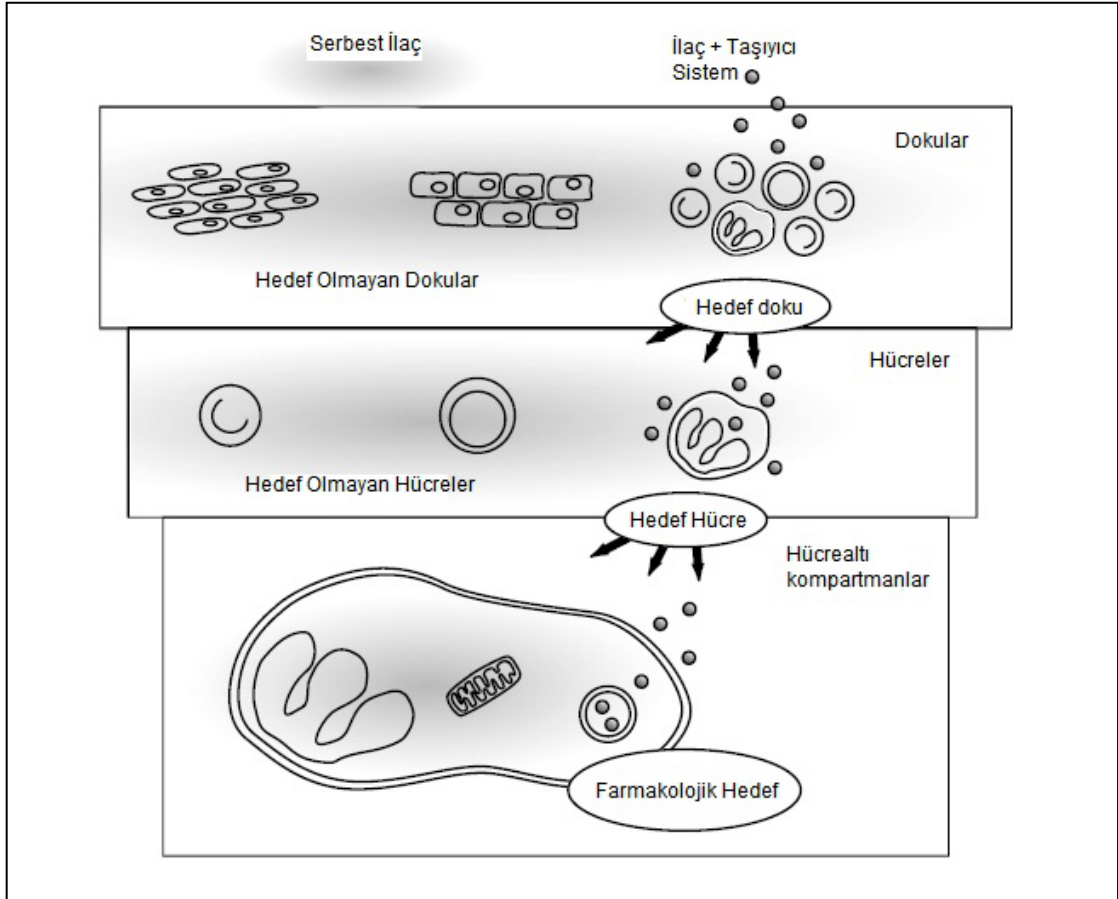
İlaç taşıyıcı sistemlerin serbest ilaca kıyasla daha uygun olup olmadığı ilacın şu özellikleri göz önünde bulundurularak tespit edilebilir; ilacın potensi (etki gücü), kararlılığı, çözünürlük özellikleri, ilaç molekülünün boyutu (moleküler ağırlığı) ve yüzey yükü. İlaç taşıyıcı sistemler bu parametrelere bağlı olarak birkaç molekül ilaçtan (immunokonjugatlar veya immunotoksinler) onlarca molekül ilaca (polimer konjugatları) kadar farklı sayıda ilacı taşıyabilir. İlaç taşıyıcı sistemin uygulanacak olan miktarı da bu konuda büyük önem taşımaktadır. Kullanılan etkin maddenin dozu ile orantılı olarak uygulanacak olan ilaç taşıyıcı sistemin miktarı da değişmektedir. Bu durumda, taşıyıcı sistemin vücuttaki parçalanma ürünleri, metabolizması, toksisitesi ve eliminasyonunun da dikkate alınması gerekmektedir.

Bir etkin maddenin ilaç taşıyıcı sistemde kullanılabilmesi için diğer bazı unsurların da dikkate alınması gerekmektedir. Örneğin etkin maddenin taşıyıcı sisteme inkorpore edilmesi için gereken prosedürlere yapı olarak uygun olması gerekmektedir. Bunun yanında taşıyıcı, etkin maddenin kararlılığını sağlamak ve metabolik yıkımdan korumak durumundadır. İlacın, istenilen salım süresi ve bölgesinde, istenilen hızda çözünmesi gerekmektedir. Taşıyıcı sistemle sunulan ilaç etkin maddesinin toksisitesi ve etki mekanizması dikkatli bir şekilde incelenmelidir [31].

İdeal bir ilaç taşıyıcı sistem iki önemli özelliğe sahip olmalıdır;

- Hedef organ ya da dokuya ilacı etkin bir şekilde taşıyabilmek
- Etkin madde salımını kontrol edebilmek

İlacın hedeflendirilmesindeki temel amaç ilaç verimini arttırmak ve yan etkileri azaltmaktır. Örneğin kanser hücreleri üzerine etki göstermesi istenilen bir etkin maddenin diğer sağlıklı hücreleri de etkilemesi istenilmeyen bir durumdur ve bu nedenle spesifik olarak kanser hücrelerine hedeflendirilmesi, hem hastanın yaşam kalitesi açısından hem de diğer bazı toksik etkilerin azaltılması bakımından bu tür maddeler için yeni ilaç taşıyıcı sistemleri ön plana çıkartmaktadır. Bu sistemlerin uzun süreli etkin madde salımına imkan tanımaları sayesinde, özellikle intravenöz olarak kullanılan etkin maddeler için tekrarlayan doz uygulamasına bağlı olarak gözlenen hasta uyuncu ve tahriş unsuru gibi problemler de ortadan kaldırılmaktadır [32]. Bu konu ile ilgili şematik gösterim Şekil 2.1.1.'de açıklanmıştır.

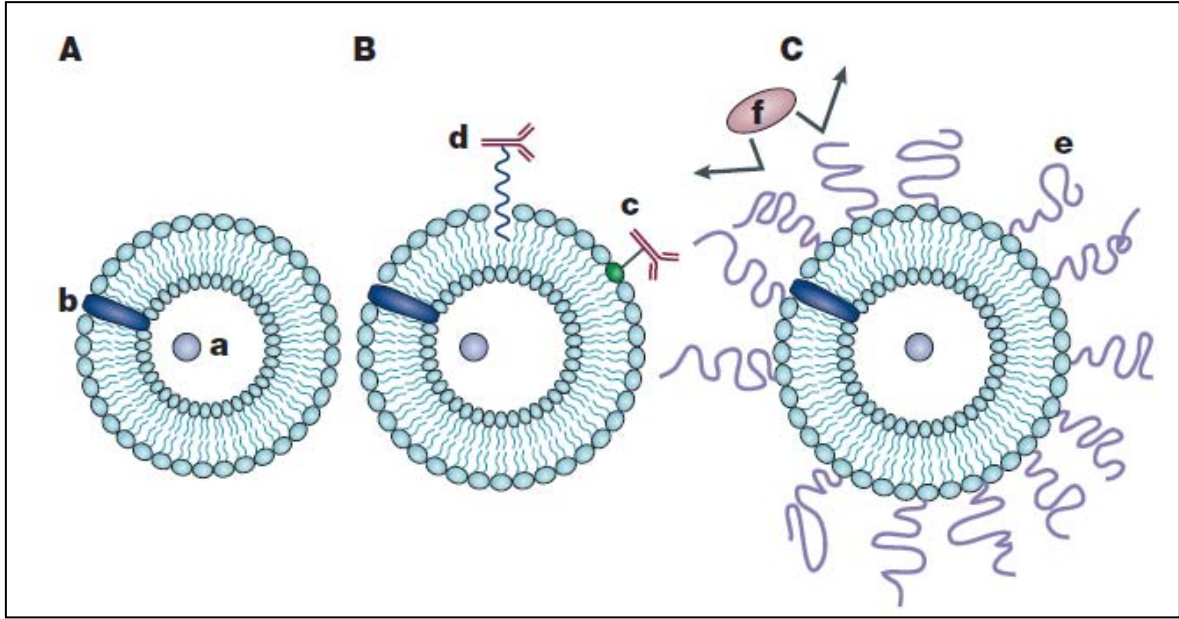


Şekil 2.1. İlaç taşıyıcı sistemlerin etkisi. İlaç taşıyıcı sistem içerisinde hapsedilmiş ilaç (siyah küreler) doku, hücre ve organel/reseptör düzeyinde hedefleme sağlarken, serbest ilaç uygulanması (koyu bölgeler) hedef olmayan bölgelerde de birikime neden olmaktadır [33].

Yukarıda belirtilen özelliklere sahip ilaç taşıyıcı sistemler arasında en çok uygulama alanına sahip olanlar, lipozomlar, mikro/nano partiküller ve implante sistemlerdir.

2.1.1. Lipozomlar

Bu sistemlerden lipozomlar, boyutları 300 nm ile 10 µm arasında değişen, yağ asitleri ve fosfolipidler kullanılarak elde edilen çift tabakalı yapıya sahip taşıyıcılardır. Farklı yağ asitleri kullanılarak bu çift tabakanın özellikleri değiştirilebilmektedir. Çift tabakanın oluşumu ise polar başlarını su fazına ve hidrofobik kuyruklarını birbirlerine doğru kendiliğinde çeviren yağ asidi zincirlerinin formasyonuna bağlıdır. İlaç etkin maddeleri bu sistemlerde sulu kısımda hapsedilebildiği gibi çift tabaka arasına da yerleştirilebilir. Bu yerleşim bölgesi ilacın fizikokimyasal özelliklerine ve yağ asidi tipine göre farklılık gösterebilmektedir. Fosfolipidler arasında en sık kullanılan fosfatidilkolindir ve bu yapıda bulunan kolesterol, lipozomal yapıya sağlamlık katmaktadır. Ayrıca kolesterol, lipid çift tabakanın hapsedilen ilacın geçirgenliğini azaltmaktadır. Lipozomal sistemlerin, lokal hastalıklar (göz, safra kesesi, akciğer) için uygun taşıyıcı sistemler oldukları gösterilmiştir. Boyutları 1 µm'ye kadar olanların, retikulo endotelial sistem tarafından vücuttan toplanarak karaciğer ve dalakta birikim gösterdikleri, 3 µm'den büyük olanlarınsa akciğerde toplandığı gösterilmiştir. Karaciğerde oluşum gösteren tümörlere karşı antineoplastik ajanlarla yüklü küçük boyutlu lipozomlar kullanılabilir. Monoklonal antikolar ile yüzeyleri modifiye edilebilen bu sistemlerde spesifik hedeflendirme de yapılabilmektedir. Ancak yine de bu sistemlerle ilgili problemler de yok değildir. Öncelikle bu yapılar vücutta makrofajlar tarafından temizlenmeye çalışılmaktadır. İkinci olarak bu yapılar kapiller endoteli ve bazal membranı aşmak zorundadırlar. Üçüncü olarak birçok hücre tipi, özellikle de tümör hücreleri, düşük endositoz yeteneğine sahiptir. Bilinen en dominant lipozom hücre etkileşimi endositoz olduğu için üçüncü problem büyük bir kısıtlama getirmektedir [34].



Şekil 2.2. Lipozomlar. A) Lipozomun sulu iç kısmına hapsedilen hidrofilik ilaç (a) ve lipozomal membrana yerleştirilen suda çözünmeyen ilaç (b). B) Hedefleyici ligand olarak monoklonal antikorun direkt olarak membran lipidlerine (c) veya hidrofobik bir örgü ile (d) lipozoma eklenmesi. C) Dolaşımda uzun süre kalmayı sağlayacak hidrofilik PEG benzeri kaplama (e) ve opsonizasyon proteini (f) [35].

2.1.2. İmplant Sistemler

İmplant sistemler, lokal olarak hedeflendirme ve ilacın etki bölgesinde uzun süreli salımını sağlamaya yönelik olarak kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadır. Bu sistemler özellikle oral yolla kullanılmayan ve uzun süre kullanılması gereken ilaçlarda, ardışık ve tekrarlayan uygulama yapılmasının önüne geçmek için kullanılmaktadır. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanıldığı etkin maddelere örnek olarak; insülin, heparin, steroidler, kemoterapötikler, antibiyotikler, kontraseptifler, analjezikler ve total parenteral beslenme çözeltileri verilebilir. Bu sistemler tamamen deri altında, subkütan olarak yerleştirilmiş olarak buldukları için küçük bir bası hissi dışında hastaya herhangi bir rahatsızlık vermemekte ve enfeksiyon riski oluşturmamaktadır. Ancak implantın özelliklerinden ve vücutta kalış süresinden ileri gelen bazı fizyolojik ve biyokimyasal cevaplar ortaya çıkabilir. Bu da sentetik malzemelerin plazma proteinlerini, enzimleri, pıhtılaşma faktörlerini, plateletleri, lökositleri ve eritrositleri etkilemesinden kaynaklanır. Bu sistemlere örnek olarak peristaltik pompalar verilebilir. Özellikle şeker hastalarında kullanılan bu sistemler, ilaç salım hızı dışarıdan radyo frekanslı bir operatörle kontrol edilen, minik birer ilaç pompasıdır.

Buna benzer yapılarda ozmotik pompalar ve miniozmotik pompa sistemleri de mevcuttur. İnsülin hastalarının yanı sıra kontrasepsiyon amaçlı olarak da yaygın bir şekilde kullanılan bu sistemler ilaç taşıyıcı sistemler arasında biyoparçalanır olabilmeleri ile de göze çarpmaktadır [34].

2.1.3. Mikro/Nano Partiküller

Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler; boyutları nedeniyle hücre membranından yüksek derecede geçiş sağlamaları ve bu nedenle kendilerine konjuge edilen ya da kompleksleştirilen ilaç moleküllerinin hücresel alımlarını artırmaları, artırılmış penetrasyon ve uzatılmış kalış süreleri gibi özelliklerinin bulunması, tam olarak programlanabilen ilaç ya da benzeri biyolojik aktif madde salımı sağlamaları, düşük toksisite, artırılmış biyoyararlanım sağlamaları ve aşağıda bahsedilen diğer özellikleri nedeniyle hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli yapılardır.

Nanopartiküller, daha büyük olan mikropartiküler yapılara kıyasla intravenöz kullanıma daha uygun olmaları açısından üstünlük sağlarlar. Vücuttaki en küçük kapillerler 5-6 µm çapındadır. Kan dolaşımına girecek olan partiküllerin emboliye neden olmamaları için 5 µm'den küçük olmaları ve agregat oluşturmamaları gerekmektedir. Bu boyutun çok daha altında üretilebilen ve farklı amaçlara uygun olarak fonksiyonlandırılabilen nanopartiküller, intravenöz kullanımı olan ilaç etkin maddeleri için damar tıkanma riski olmaksızın kullanılabilirler [36]. Direkt olarak damar içine ilaç verilmesi sayesinde, gastrointestinal sistemde oluşacak ilaç kaybı elimine edilerek daha az miktarda ilaç etkin maddesi vücuda verilebilmekte ve olası gastrointestinal sistem yan etkileri ile karşılaşılmamaktadır. Ayrıca oral yolla ilaç kullanamayacak yaşlı, bebek ve çeşitli engelleri olan kişiler gibi hastalar da intravenöz yolla kullanılacak ilaçlara ihtiyaç duyabilmektedir. Bu açılarından bakıldığında, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler kan yoluyla verilmesi mümkün olmayan ilaç etkin maddeleri için de uygun taşıyıcılar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin, birçok ilacın in-vivo etkinliğini güçlendirdiği yapılan çalışmalar neticesinde açıkça ortaya konulmuştur. Günümüzde halihazırda kullanımda bulunan ve sürekli geliştirilmekte olan nanopartiküler ilaç taşıyıcı ve/veya hedeflendirici sistemler üstün özellikleri ile göze çarpmaktadır. Bu sistemlerin amacı; uygulamayı takiben ilaç degradasyonunu minimize etmek,

istenmeyen yan etkilerin önüne geçmek, ilaç biyoyararlanımını ve patolojik bölgede yoğunlaşan ilaç fraksiyonunu artırmaktır.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler genel olarak şu özellikleri sağladıkları için, ideal ilaç taşıyıcıları olarak nitelendirilmektedirler [37]:

- Ucuz ve kolay hazırlanabilme
- Biyoparçalanır ve biyouyumlu olma
- Küçük parçacık boyutu
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesi
- Kan dolaşımında uzun süre kalabilme
- Etki istenen bölgede toplanabilme
- İlacı kontrollü olarak salabilme
- Kararlılık sorunu olmama

İlaç taşınımında bu denli avantajlar sunabilen nanopartiküler sistemlerin hazırlanabilmesi için birçok sentetik polimer yaygın olarak kullanılmakla birlikte en çok kullanılan sentetik polimerler poli(kaprolakton) (PCL), poli(laktikasit) (PLA), poli(glikolikasit) (PGA) ve bunların ko-polimeri olan PLGA'dır. Bunun yanında PLA, poli(etilen glikol) (PEG) ve poli(aminoasit)'lerin blok kopolimerleri nanopartikül ve misel benzeri yapılar oluşturmak için kullanılırlar. Bu polimerler biyouyumlulukları ve doğal yollardan absorbe edilebilirlikleri ile bilinirler. Ek olarak, degradasyon ve buna bağlı olarak ilaç salım hızları PLA veya PCL'nin PGA'ya oranları yani hidrofilit/hidrofobisite özellikleri değiştirilerek manipule edilebilirler [36]. Bu değişiklikler sonucu bu yapıların kontrollü ilaç salımı ya da implant malzemesi olarak kullanımları uygun hale gelmektedir.

Polimerik nanoparüküllerin hazırlanmasında ayrıca kitosan ve aljinatlar gibi doğal ve poli(alkilsiyanoakrilat)lar, poli(anhidrit)ler ve poliesterler gibi sentetik polimerler kullanılmaktadır. Poliesterler olarak tabir edilenler arasında PCL, PLA ve PLGA bulunmaktadır. PLA ve PLGA, sayılanlar arasında nano ve mikroküre üretiminde en çok kullanılan polimerlerdir. Tahmin edilebilir biyoparçalanma kinetikleri ve uygun mekanik özellikleri sayesinde PLGA doku mühendisliğinde de kullanım için biçilmiş kaftandır. PLGA'nın sulu bir ortama maruz bırakılmasıyla birlikte ester bağları hidroliz olmakta ve polimerin parçalanması gerçekleşmektedir. Parçalanmış yapıdan laktik asit ve glikolik asit metabolizma ve nefes verme yollarıyla

atılmaktadır. Bu parçalanma sırasında pH'nın düşmesiyle birlikte iç kısımda hapsedilmiş ilaç molekülleri kararlılıklarını kaybedebilmektedir [38].

PLA, PGA ve PLGA gibi güçlü hidrofobik özellikleri olan biyoparçalanır poliesterlerin getirdiği bazı kısıtlamalar, bu polimerlerin omurgalarına inkorpore edilen PEG sayesinde aşılabilmektedir. PEG, toksik olmayışı, hidrofilitesi ve esnekliği sayesinde mükemmel biyouyumluluğa sahip bir biyomalzemedir. Normal polimerler gibi çapraz bağlı sistemlerle karşılaştırıldıklarında bu PLGA-b-PEG kopolimerlere makromoleküler ilaç etkin maddelerinin inkorpore edilmesi daha kolay gerçekleşebilmektedir. Ayrıca, bu blok kopolimer sistemleri mükemmel biyouyumluluk ve kontrollü degradasyon özelliği göstermektedirler. İçerisindeki PEG'e ait olan hidrofilik özellik nedeniyle su ile etkileşme ve şişme özellikleri kazanan bu yapıların parçalanma hızı özellikleri, içerdikleri PEG oranı değiştirilerek ayarlanabilmektedir. İçerikteki PEG moleküllerinin önce hızla su alıp şişmeleri polimerik yapıda bir erozyona neden olmakta ve ardından denge durumunda yavaşça hidrasyon gerçekleşmekte ve faz ayrımına bağlı parçalanma bu şekilde gerçekleşmektedir.

Bu yapıların kan uyumluluk testleri, mitokondriyal aktiviteye etkileri, hücre canlılığı testlerinin yanında kardiyovasküler cihaz olarak kullanıldıklarında hücre hatlarına olan etkileri in-vitro olarak incelenmiştir. Sonuç olarak orta-yüksek derece arasında kan uyumluluğu ve genel olarak düşük seviyede sitotoksikite göstermişlerdir. İn vivo biyolojik yanıt çalışmalarında da çok düşük bir enflamasyon göstermişlerdir. Damar içi olarak verilen küresel partiküller de herhangi bir nekroz ya da kas dokusu hasarına neden olmamış ve implante edildiklerinde de normal bir cevap ve iyileşme zamanı sağladıkları gözlenmiştir. Bu nedenlerle bu kopolimerler uygun taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için uygun malzemeler olarak nitelendirilmektedirler.

Bu sistemlerden protein ve peptid yapılı etkin maddelerin salımının iki şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir. Bunlardan ilki içerideki bağlantılar arasındaki sulu poröz yapılar boyunca difüzyon ve ardından salımda daha çok dikkat çeken polimerik matriksin erozyonu şeklinde olmaktadır. Por difüzyonu;

- Etkin madde yükleme etkinliği,
- Etkin madde boyutu,

- Etkin maddenin polimer matriksindeki dağılımı,
- Fizikokimyasal özellikler,
- Çözünürlük ve
- Dağılım sabiti parametrelerinden etkilenmektedir.

Matriks erozyonu ise enzimatik olmayan bir hidroliz yıkımıdır ve polimerik matriksin moleküler ağırlığının azalmasına neden olmaktadır [39].

Tüm bu polimerlerden oluşturulacak nanopartiküllerin üretim metotları kullanılacak polimerin doğasına ve ilacın özelliklerine göre değişim göstermektedir. Burada en önemli iki husus, kullanılacak yöntem sonunda ilaç etkin maddesinin, özellikle de proteinler ve DNA kullanılıyorsa biyolojik aktivitesinin azalmaması ve hazırlanacak partiküllerin boyutlarının veriliş yoluna uygun olması gereklilikleridir. Örneğin inhalasyon yoluyla verilecek olanların 3 µm civarında, intravenöz verilecek olanların mikron altı seviyede ve endositoz yoluyla hücrelere alınması gereken partiküllerin 100 nm'nin altında olması gerekmektedir [38].

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler şu özellikleri ile ön plana çıkmaktadırlar:

- Matriks içerisine ilacın hapsedilmesi sayesinde uzatılmış ilaç etki süresi
- Tümör bölgelerine hedeflendirilmiş ilaç biyodağılımının düzenlenmesi
- Terapötik genlerin ve oligonükleotidlerin hücrelere yerleştirilmesi
- İlaç etkin maddesinin mide barsak kanalında optimum absorpsiyonunu sağlanması
- İlacın vücut içerisinde sadece uygun sıcaklık, pH veya aktif enzim varlığında serbestleşmesinin sağlanması [40].

Genel bir tanımlama ile nanopartiküllerin hazırlanmasında etkin madde sentetik veya doğal bir matriks yapı içerisine hapsedilmekte (nanokapsül), ya da hazırlanan nanopartikül yüzeyine adsorbe ettirilmekte veya polimerik yapı içerisinde dağıtılarak matriks yapı oluşturmaktadır [41].

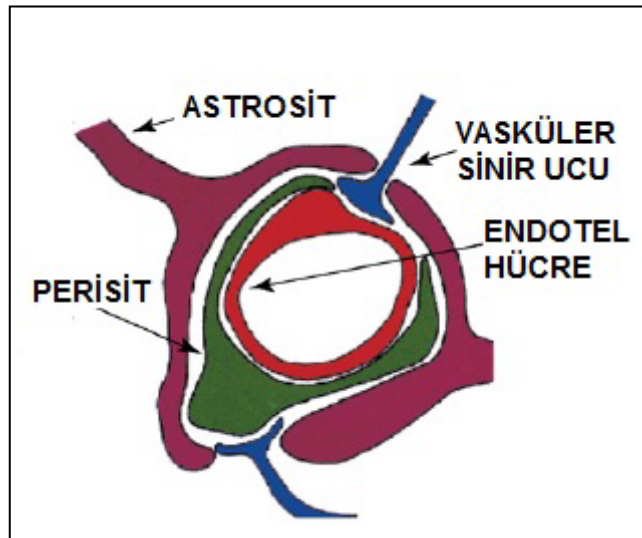
2.2. Beyne Etkin Madde Hedeflendirme

KBB'nin içermiş olduğu sıkı kavşaklar nedeniyle beyne ilaç hedeflendirmek oldukça zor bir süreçtir. Bu alandaki çalışmalara geçmeden önce KBB'nin tanınmasında yarar vardır.

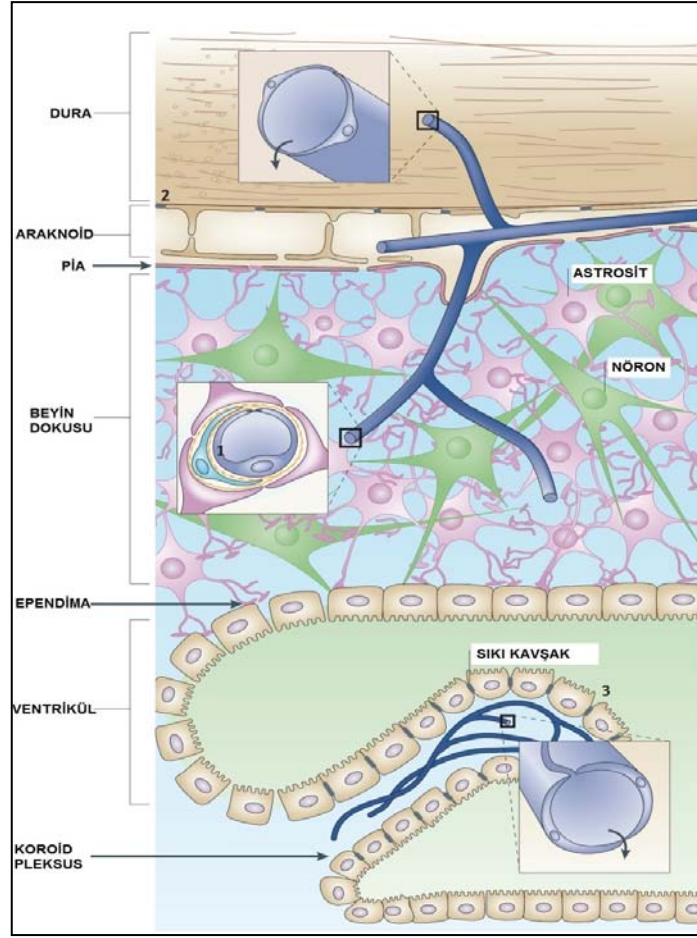
2.2.1. Kan Beyin Bariyeri ve Geçiş Mekanizmaları

KBB 1900'lü yılların başında varlığı düşünölmeye başlanan ve o yıllarda beyni vücuda giren zararlılara karşı koruduğu düşünölen fiziksel bir bariyer olarak kabul edilmekteydi. Günümüzde bu bariyerin plazma komponentlerinin, kırmızı kan hücrelerinin ve lökositlerin beyne girişini engelleyen bir yapı olduğu bilinmektedir. İskemik hasara, intraserebral hemorajiye, travmaya, nörodejeneratif proseslere, enflamasyona ya da vasköler bozukluklara bağlı olarak bu yapıların beyne geçmesi, sinaptik ve nöral fonksiyonları bozucu nörotoksik ürünlerin oluşumuna yol açmaktadır. KBB, sıkıca konuşlanmış olan beyin endotel hücrelerinden oluşmaktadır ve kan ve beyin arasındaki serbest alışverişı engellemektedir [42]. KBB ayrıca santral sinir sistemi bozuklukları için kullanılan ilaçlar için de büyük bir engel oluşturmaktadır. Rekombinant peptidler, proteinler, genetik vektörler gibi büyük moleküllu ilaçların hiçbiri ve küçük moleküllu ilaçların da yaklaşık % 98'i bu bariyeri geçememektedir. İstisnai olarak 400 Daltondan küçük lipofilik maddeler, bu bariyerden lipid aracılı difüzyon ile geçebilmektedir [43].

Sıkı kavşaklar tarafından geçirgenliği kontrol edilen KBB'den hidrofilik bir ilacın geçebilmesi için, hücrelerarası endotelial duvarı aşabilmesi gerekir. KBB boyunca hücrelerarası bu çift yönlü geçiş 5 temel yolla gerçekleştirilebilir. Bunlar, taşıyıcı aracılı transport, iyon transportu, aktif efluks transport, reseptör aracılı transport ve kaveol (caveolae) aracılı transporttur [42].



Şekil 2.3. Beyin mikrovasköler yapısındaki dört temel hücre [43].



Şekil 2.4. KBB'nin vücutta bulunduğu üç temel bölge. 1) Araknoid epitelyumda 2) Meningslerin orta katmanı olarak 3) Serebrospinal sıvının salgılandığı koroid pleksus epitelyumunda [44].

2.2.1.1. Taşıyıcı aracı transport

Heksozlar (glukoz ve galaktoz), nötral, temel ve asidik aminoasitler, monokarboksilik asitler (laktat, piruvat), nükleozidler (adenozin, guanozin, üridin), pürinler (adenin, guanin), aminler (kolin) ve vitaminler bu özel taşıyıcılı transport sistemi sayesinde KBB'yi aşarak santral sinir sistemine girebilmektedir. Bu maddelerin derişim gradyanları genellikle kandan beyne doğru şeklindedir. Bu taşınımın düzenlenmesi beynin ihtiyaçlarına ve maddelerin kandaki düzeylerine göre sağlanmaktadır.

2.2.1.2. İyon transportu

Beyinde yüksek bir mitokondri yoğunluğu bulunmaktadır ve bu nedenle sodyum pompası (Na^+ , K^+ ATPaz) gibi ATP-bağımlı taşıyıcılar için enerjiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu pompa, abluminal membranda bulunmaktadır ve beyne sodyum

alıp, dışarıya potasyum verilmesini kontrol etmektedir. $Na^+ K^+ 2Cl^-$ transport mekanizması da luminal membranda bulunmakta ve kandan sodyum, potasyum ve klorür iyonlarının beyin endoteline geçişini kontrol etmektedir. Ayrıca sodyum-hidrojen değiştiricisi luminal membranda ve klorür-bikarbonat değiştiricisi membranın her iki tarafında da bulunmaktadır ve endotelin hücre içi pH'sını ayarladıkları için kritik öneme sahiptir. Sodyum girişi sırasında kalsiyum çıkışını da kontrol eden bir pompa daha vardır. Patolojik durumlarda ve gerektiğinde kalsiyumun girişini de sağlayabilmektedir.

2.2.1.3. Aktif Efluks

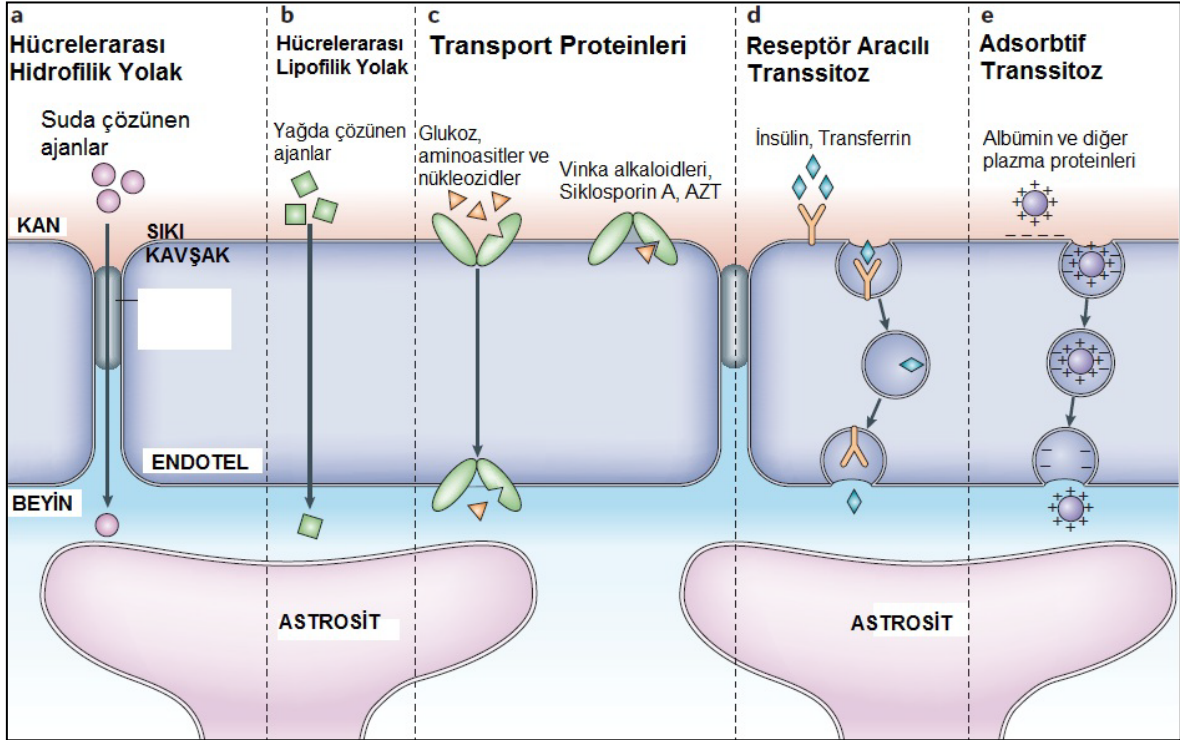
Moleküllerin beyin endotelinden dışarıya atılımı olarak tanımlanabilen efluks luminal membranda başlamaktadır. Çoklu ilaç direnci taşıyıcısı P-glikoproteini de ATP bağımlı bir efluks pompasıdır ve alınan toksik lipofilik metabolitlerin hızlı uzaklaştırılmasından sorumludur. Beyinde bulunan bu pompalar, birçok ilacın beyne girmesini engellemek ve/veya beyinden uzaklaştırılmasını sağlamak için birlikte çalışma potansiyeline de sahiptir.

2.2.1.4. Peptid ve protein transportu

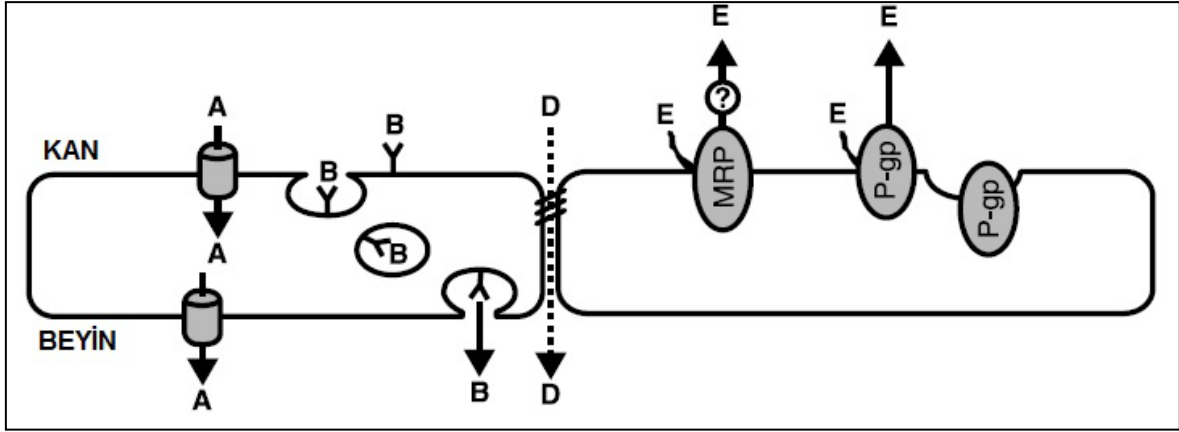
KBB'deki endotelial hücreler; arjinin-vazopressin, enkefalinler, luteinleştirici hormon salan hormon ve bazı sitokin ve kemokinler gibi nöroaktif peptidler için çeşitli transport sistemleri eksprese etmişlerdir. Peptid transportu sistem (PTS) 1 ve 2; enkefalinlerin beyinden kana geçişlerinde rol oynamaktadırlar. PTS 3, T peptidini beyne ve PTS 4, luteinleştirici hormon salan hormonu her iki yönde taşımaktadır. Bariyerdeki V1 vazopresinerjik reseptörler, arjinin-vazopressinin beyne alımını gerçekleştirmektedir. Transferrin, LDL, immunoglobulin G, insulin ve insulin benzeri büyüme hormonu gibi büyük proteinler; KBB'yi reseptör aracılı transport sistemleri aracılığıyla aşmaktadır [42]. Reseptör aracılı transport sistemleri ilaç hedeflendirme için bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır ve bu taktik "Truva Atı" olarak anılmaktadır. Normalde KBB'yi geçemeyen etkin maddeler KBB reseptörlerinden birine (transferrin, insulin gibi) karşı olan monoklonal antikor ile işaretlenerek KBB'yi geçmeleri sağlanabilmektedir [43].

2.2.1.5. Kaveol aracılı transport

Nanometre mertebesinde kaviteler olarak da bilinen kaveoller; endositoz, transsitoz ve KBB'deki lipid bazlı mikro bölgelerdeki sinyalizasyon ile hücrelerarası geçirgenliği kontrol etmektedir. Kaveoler membranlar; transferrin, insulin, albumin, serüloplazmin, LDL, HDL ve interlökin-1 için reseptörler içermektedir [42].



Şekil 2.5. KBB'den geçiş mekanizmaları-1: a) Polar ilaçlar gibi suda çözünen moleküller sıkı kavşaklar tarafından engellenmektedir, b) Yağda çözünen maddeler için endotel üzerinde geniş bir geçiş alanı mevcuttur, c) Endotel üzerinde belli moleküller için taşıyıcı proteinler bulunmaktadır. Bunların bazıları (P-glikoproteini) enerji bağımlı olabilir. Bazıları da şekilde verilen örnekler (AZT: Azidotimidin) gibi efluks pompası görevi görmektedir, d) Bazı moleküller de reseptör aracılı endositoz veya transitoz ile taşınmaktadır, e) Albümin gibi plazma proteinleri düşük bir geçiş özelliğine sahip olmakla birlikte, kationizasyonları sonucu adsorbe olarak geçebilmektedirler. Santral sinir sistemi hedefli kullanılan birçok ilaç b bölümündeki geçiş mekanizmasını kullanmaktadır ancak ilaç hedeflendirme çalışmaları için b,c,d,e bölümlerindeki tüm mekanizmalar kullanılabilir [44].



Şekil 2.6. KBB'den geçiş mekanizmaları-2: A ve B)Nütrient ve hormonlar gibi hidrofilik maddeler için hem luminal hem de abluminal bölgede bulunan taşıyıcılar vardır. D)Hidrofilik maddelerin çok küçük bir kısmı hücrelerarası sıkı kavşaklar arasından difüze olabilmektedir. E) Bazı efluks pompaları sayesinde lipofilik maddelerin beyne girişi engellenmektedir [45].

2.2.2. PLGA Nanopartiküleri ile Beyne Etkin Madde Hedeflendirme Çalışmaları

Nanometre boyutundaki ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi son zamanlarda üzerinde en fazla araştırma yapılan konulardandır. Hedeflenen alana ulaşılmca nanopartiküller, içerdikleri etkin maddeyi ya hücrenin dışına ya da hücrenin içine girerek istenilen konumlarda serbestleştirebildikleri bilinmektedir [46]. Küçük moleküller hücre zarını geçebilirler fakat büyük moleküllerin (nükleik asit, büyük moleküllü etkin madde vb.) nanopartiküler yapılar içerisine yüklenerek hücreler tarafından alınması gerekir. PLGA nanopartiküllerinin genellikle hücre içerisine endositoz ile alındığı ve ilacı saldırdığı düşünülmektedir. PLGA nanopartiküllerine floresan işaretçiler takılarak bunların hücre içerisine alınmasıyla ilgili çok sayıda mikroskobik çalışma yapılmıştır [47].

Gerçekleştirilen bir çalışmada PLGA nanopartiküllerinin hücre yüzeyine lipofilik işaretleyiciler aktararak işlev gösterdiği tartışılmıştır [48]. Bir başka çalışmada da, polimerik misellerdeki lipofilik işaretleyicilerin lipofilik ortama aktarıldığı üzerine iddialar mevcuttur [49]. Bu bulgular da misel bazlı ilaç salım sistemleriyle ilgili yerleşmiş düşünceleri sarsmaya başlamıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise PLGA nanopartiküllerinin alımının gözlemlenmesi için Nil kırmızısı adı verilen floresan bir boya bu partiküllere hapsedilmiş, bu partiküller mezotelyal hücrelerle ve bazı kanser hücre hatlarıyla inkübe edilerek hücre içinde floresan

boyanın gözlenmesi konusunda deneyler yapılmıştır. Sonuçların konfokal ve CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy) mikroskopisiyle alındığı bu deneyler sonucunda; PLGA nanopartiküllerinin hücreler tarafından alınmadığı ve ilacın ekstraselüler olarak ya da hücrelerle bağlantı kurup doğrudan hücre içine verildiği sonuçları elde edilmiştir [47].

Literatürde nanopartiküller ile beyne etkin madde hedeflendirme üzerine yoğun olarak çalışıldığı göze çarpmaktadır. Costantino ve ekibinin yaptığı çalışmalarda; normalde KBB'yi aşamayan PLGA nanopartiküllerinin, yapılan peptidik yüzey modifikasyonları ile bu engeli aşabildikleri gösterilmiştir. Burada kullanılan peptidler sentetik opioidlere benzeyen kısa peptidlerdir [50]. Yüzeyleri PEG ile modifiye edilen nanopartiküller daha düşük fagositoz edilebilme özelliği göstermektedirler ki bu durum nanopartiküllerin daha uzun süre kan dolaşımında kalmasını sağlamaktadır. Oponizasyon adı verilen ve nanopartiküllerin makrofajlar tarafından vücuttan uzaklaştırılmaya çalışıldığı mekanizmanın, nanopartikül yüzeyinde bulunan PEG molekülleri sayesinde geciktirilmesi sonucu, nanopartiküler kontrollü salım sistemleri oluşturulabilmektedir [51]. Lu ve ekibinin 2005'te yaptığı bir diğer çalışmada da, albumin bağlı nanopartiküllerin KBB'yi geçtiği; özellikle de katyonik albumin bağlı nanopartiküllerin bu bariyerde bulunan sıkı kavşaklara bir miktar toksisite göstermekle birlikte bu bariyeri 7-8 kat daha fazla aştığı gösterilmiştir [52]. Ayrıca Kim ve ekibi aljinat hidrojel içerisine koyulan PLGA nanopartiküllerinden model ilaç olarak alınan deksametazon salımının 3 hafta kadar sürdüğünü yapılan in-vitro salım çalışmaları sonucu ortaya koymuştur [53].

Khuller ve Pandey, antitüberküloz ilaçları PLGA nanopartikülleri içine enkapsüle edip fare modellerinde bu nanopartikülleri beyne hedeflendirme üzerinde çalışmışlardır. Farelere oral olarak verilmiş bu partiküller tek doz uygulama ile 5-8 gün boyunca plazmada, 9 gün boyunca beyinde tespit edilmiştir. Sonuçta serbest ilaca oranla iyileştirilmiş farmakokinetik özellikler ve yüksek bir bağlı biyoyararlanım sağlanmıştır. Ayrıca Mycobacterium tuberculosis ile enfekte edilmiş farelerde 10 günde 1 olmak üzere sadece 5 oral doz uygulaması ile tam bir iyileşme sağlanmıştır [54].

2.2.3. Polisorbat 80'in Beyne Etkin Madde Hedeflendirmedeki Rolü

Bazı yüzey aktif maddelerin nanopartiküller üzerine kaplanmasıyla KBB'nin aşılabilirdiği, bu görev için de polisorbat 80 adlı yüzey aktif maddenin en etkin madde olduğu bilinmektedir. Polisorbat 80 ile yüzey modifikasyonunun, dolaşım sisteminde bulunan ApoE moleküllerinin nanopartikül yüzeyine adsorpsiyonunu sağladığı ve böylece KBB tarafından tıpkı LDL gibi algılandıkları, LDL molekülüne ihtiyaç duyan beyin tarafından alımlarının bu taklit yoluyla gerçekleştiği düşünölmektedir [28]. Bu alımın endotel hücrelerdeki LDL reseptörlerine bağı gelişen bir endositoz olduğu ve ApoE moleküllerinin partiküllere bağlanması için tüm polisorbat tiplerinin kullanılabilir olduğu belirlenmiştir [29].

KBB'yi geçemediği bilinen antitumoral bir ajan olan Doksorubisin, poli (bütilsiyanoakrilat) nanopartiküllerine yüklenmiş ve bu partiküllerin yüzeyi polisorbat 80 kaplanarak hayvan modellerinde denenmiştir. Sonuçlara göre, serum fizyolojik içerisindeki ilacın, polisorbat 80 çözeltisi içindeki ilacın ya da yüzeyi polisorbat 80 kaplı olmayan ilaç yüklü nanopartiküllerin hiçbirinin KBB'yi geçemediği; ancak ilaç yüklü ve yüzeyi polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin beyin hücrelerine kadar ulaşırp hücreler tarafından alındığı ortaya çıkmıştır [55].

Ayrıca, polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin yalnızca KBB'yi aşmakla kalmadığı, bu kaplamanın nanopartiküllerin beyin kan damarları endotel hücreleri tarafından da alımını arttırdığı bilinmektedir. Yapılan in-vitro hücre kültürü çalışmasında polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin, kaplı olmayanlara kıyasla bu hücreler tarafından 20 kat daha fazla alındığı kanıtlanmıştır [56].

KBB'yi geçemediği bilinen opioid agonisti bir ilaç olan loperamid, polisorbat 80 kaplı nanopartiküllere yüklenmiş ve KBB'yi aşabildiğinin bir göstergesi olarak vücutta yarattığı analjezik etki ölçölmüştür. Sadece polisorbat 80 çözeltisi içerisindeki serbest loperamid çok kısa süren ve hafif etkili bir analjezi sağlarken, polisorbat 80 kaplı polimerik nanopartiküllere yüklü loperamid'in verilmesini takiben çok daha uzun süreler boyunca daha güçlü analjezik etkiler elde edilmiştir. İlaç yüklü ancak polisorbat 80 kaplı olmayan nanopartiküller ise hiçbir analjezik etki gösterememiştir [57]. Polisorbat 80 kaplamanın etkisi farklı etkin madde ve polimerler kullanılarak da kanıtlanmıştır [51].

Polisorbat 80 kaplı nanopartiküller içerisinde de boyuta bağımlı olarak santral sinir sistemine geçişte farklılıklar göze çarpmaktadır. 2006 yılında yapılan bir çalışmada; polisorbat 80 kaplı polimerik nanopartiküllere; beyin tümörü tedavisinde kullanılan ancak KBB'yi geçemediği için intratekal enjeksiyonla verilen Metotreksat enkapsüle edilmiş ve farklı boyutlarda (70, 170, 220, 345 nm) üretilen nanopartiküllerden salınan ilaç miktarları, beyin dokusundan ve serebrospinal sıvıdan alınan örneklerle karşılaştırılmıştır. Kaplı olmayan ilaç yüklü nanopartiküllerin ve ilaç çözeltisinin KBB'yi aşmadığı, polisorbat 80 kaplamanınsa santral sinir sistemine ilaç taşımada ciddi bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur. 170, 220 ve 345 nm boyutlarında üretilenler arasında KBB'yi aşmak açısından anlamlı bir fark bulunmazken, 70 nm boyuta sahip nanopartiküllerin çok daha fazla ilacı beyne taşıdığı ortaya koyulmuş, sonuç olarak 100 nm'den küçük ve polisorbat 80 kaplı polimerik nanopartiküllerin beyne ilaç hedeflemede başarılı olduğu belirtilmiştir [58].

Sun ve ekibi, 2004 yılında yaptıkları çalışmada, polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin beyne ilaç taşınması için kullanılabildiğini göstermişlerdir. İn-vivo çalışmalarda bu kaplamanın, beyin mikrodamarlarının endotel hücreleri ile etkileştiği gözlenmiştir. FITC-dekstran floresan boya ile işaretlenmiş bu kaplı nanopartiküllerin beyin dokusuna geçtiği, floresan mikroskop ile gösterilmiştir [59].

KBB'yi geçebilen bir antidepresan olan amitriptilin de polisorbat 85 kaplı polimerik nanopartiküller ile verildiğinde beyin dokusunda çok daha yüksek düzeylerde gözlenebilmiştir. Bu açıdan KBB'yi zaten geçebilmekte olan ilaçlardan daha etkin bir şekilde yararlanabilmek için de bu hedefleme yöntemi uygun bulunmaktadır [60].

Diğer taraftan nanopartiküllerin hücre içine alımlarında, erken endozomal safha sonrası geri atılanlar hariç, ileri endozom oluşumu sonrası hücre içine ilerledikleri ve burada içlerine hapsedilen ilaçları tıpkı bir ilaç rezervuarı görevi görerek kontrollü bir şekilde saldıkları bilinmektedir [61]. Tam olarak aydınlatılmamış olsa da nanopartikül aracılı beyne ilaç taşınmasının mekanizmaları şu olasılıklar üzerindedir:

- Beyin kan damarlarında artmış nanopartikül tutulumu ve kapiller duvarlara adsorpsiyonun kombinasyonu sonucu yüksek bir derişim

gradyanı oluşmasını takiben endotelial hücre tabakasından geçiş mümkündür.

- Genel bir sürfaktan etkisi nedeniyle endotelial hücre membran lipidleri çözünüp sıvılaşmakta, sonuçta KBB boyunca geçiş artmaktadır.
- Nanopartiküller, sıkı kavşakların arasında bir açılmaya neden olmaktadır. Serbest ilaç da partikülden salınıp bu açıklıktan geçmekte ya da partikül kendisi geçecek kadar bir açılmaya neden olmaktadır.
- Nanopartiküller endotelial hücreler tarafından endositozla alınmaktadır. Ardından ilaç salımı bu hücrelerde gerçekleşmekte ve beyne geçmektedir.
- Nanopartiküller, endotelial hücre tabakasından transitozla geçmektedir.
- Kaplama ajanı olarak polisorbata 80 kullanıldığında, partiküllerin dışarıda kalmasını sağlayan efluks sistem (özellikle de P glikoproteini) inhibe edilmektedir.
- Ya da tüm bu mekanizmaların farklı kombinasyonları aynı anda gerçekleşmektedir [62].

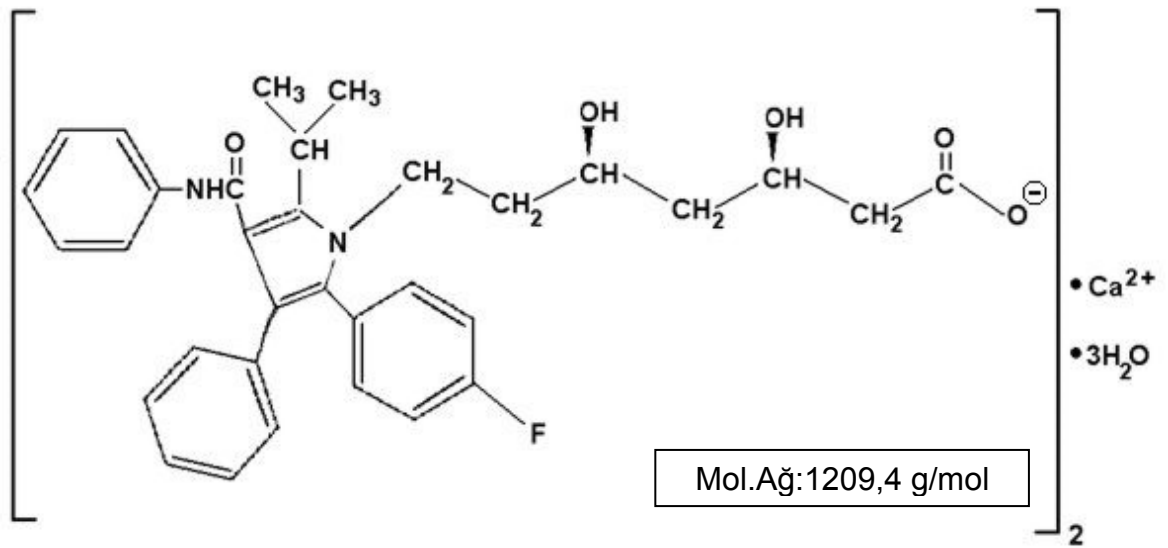
Literatürde görüldüğü gibi KBB'yi aşmaya yönelik mekanizmaların tam olarak açıklanamamış olması nedeniyle beyne hedeflendirmede farklı sistemler üzerinde yoğun çalışmalar devam etmektedir.

2.3. Atorvastatin

Statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) redüktaz inhibisyonu yapan, hiperkolesterolemiye karşı kullanılan ilaç grubudur. Statinler plazma kolesterol düzeyini düşürmede bilinen etkili bir ilaç grubudur. Ateroskleroz oluşumunu yavaşlatmanın yanı sıra oluşmuş olan ateroskleroza da geri çevirici özellikleri ile dikkat çekmektedirler. Bu ilaçlar endojen kolesterol sentezindeki kilit enzimlerden birini inhibe ettikleri için önemlidirler. Lovastatin, Pravastatin ve Simvastatin fungal fermentasyonla elde edilirken, Fluvastatin, Serivastatin ve Atorvastatin sentetik olarak üretilmektedir. Serivastatin, rabdomyoliz etkisiyle akut renal yetmezliğe neden olduğu ve 31 kişinin ölümüne neden olduğu için piyasadan çekilmiştir. Tüm statinlerin hedef organı karaciğerdir. Pravastatin oldukça hidrofilik özellik gösterirken, Fluvastatin orta derecede hidrofilik özellik, Lovastatin, Simvastatin ve Atorvastatin hidrofobik özellik göstermektedir. Etki mekanizmaları, HMG-KoA'yı mevalonik asite çeviren HMG-KoA redüktaz enziminin inhibisyonu

dolayısıyla kolesterol sentezini durdurmaktadır, zira mevalonik asit vücutta kolesterol prekürsörü olarak bilinen moleküldür. Halk arasında kötü kolesterol olarak bilinen ve hepatositlerde oluşan kolesterolü ihtiyacı olan hücrelere taşıyan LDL miktarını da düşürürler. Kas ve karaciğer toksisitesi gibi yan etkiler barındıran bu ilaç grubu, aterom plaklarının gelişimini yavaşlatmaları, oluşmuş olanların gerilemesini sağlamaları, yenilerinin oluşumunu engellemeleri ve kolesterol düşürücü etkileriyle en etkili antihiperkolesterolemik ilaçlardandır [63].

Antihiperlipidemik ilaçlar olarak bilinen statinler klinikte yaygın olarak kolesterol düşürücü ilaçlar olarak kullanılmalarına karşın, nöroprotektif etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, inme ve MS gibi nörolojik hastalıklara karşı kullanılabilecekleri düşünülen ilaçlardır. Bu ilaç molekülleri; nörotropik faktörlerin salımını indükleyen, nörojenezi ve sinaptogenezi artıran, nöroprotektif enzimleri aktive eden, nitrik oksit üretimini artıran ve dolayısıyla vasküler fonksiyonları iyileştiren etkilere sahiptir.



Şekil 2.7. Atorvastatin kalsiyumun moleküler formülü [64].

Atorvastatin, preserebral aterosklerotik plaklar ve antitrombotik mekanizmalar üzerindeki muhtemel etkileri ile iskemik felç durumlarının oluşumunu önleyebilmektedir. Bu önlemenin ötesinde, deneylerde oluşturulan felçli hayvan modellerinde daha önceden oluşturulmuş olan enfarkt boyutunu da küçülttüğü gösterilmiştir. Bu grup ilaçlar ayrıca endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimini

artıran ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz enzimini (iNOS) de inhibe etmektedir ki bu yollar sayesinde nöroprotektif etkiler sağlanabilmektedir. Serebral damarlardaki eNOS aktivitesinin korunması sayesinde buradaki kan akımı uygun şekilde devam ettirilebilmekte ve nörolojik kayıp önlenabilmektedir. Statinler ayrıca, serebral iskemiyeye eşlik eden enflamatuvar sitokin cevaplarını da azaltmak yoluyla beyinde antioksidan etkiler göstermekte ve buradaki oksidatif stres durumunun iyileştirilmesini sağlamaktadırlar. Sonuç olarak statinler, bu antitrombotik etkileri ve preserebral aterosklerotik plaklara karşı azaltıcı ve önleyici etkileri ile ciddi bir nöroprotektif etki potansiyeli barındırmaktadırlar [65].

Atorvastatin'in nöroprotektif etki mekanizmasını kavramak amacıyla kısmi felç oluşturulmuş fareler incelenmiştir. Aynı zamanda bu oluşumda major görev yaptığı düşünülen anjiyojenik bir faktör olan Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor = VEGF) ve Beyin Kaynaklı Nörotropik Faktör (Brain-derived Neurotrophic Factor = BDNF) molekülleri in-vitro hücre kültürü modellerinde araştırılmıştır. Oluşturulan felçli hayvanlar 14 gün boyunca Atorvastatin ile tedavi edilmiş ve kontrol grubuna kıyasla çok büyük bir fonksiyonel geri kazanım göstermiştir. İncelendiğinde, Atorvastatin'in iskemik bölgede VEGF ve BDNF miktarlarını yükselttiği farkedilmiştir. Anjiyojenezi işaret eden; migrasyon nöronlarının, gelişen nöronların ve sinaptofisin-pozitif hücrelerin sayısının arttığı yine Atorvastatin ile tedavi edilen hayvanlarda gözlenen bir değişimdir. Fare beyin endotel hücreleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında da Atorvastatin ile muamele edilen hücrelerde VEGF ve BDNF miktarlarının arttığı gösterilmiştir. Sonuçta Atorvastatin'in,

- Nörojenezi ve nöronal plastisiteyi arttırdığı, iskemik bölgelerde VEGF ve BDNF ekspresyonunu yükselttiği,
- Endotel hücre proliferasyonunu arttırdığı,
- Nöral hücre migrasyonunu arttırdığı,
- Migrasyonu kontrol eden BDNF miktarını arttırdığı kanıtlanmıştır [66].

2007 yılında yapılan bir çalışmada, gelişmekte olan beyinde nöral progenitör hücrelerin kendini yenilemesini kontrol eden "Notch" hücrelerarası bölgenin regülasyonunu sağlayan Presenilin 1 molekülüne Atorvastatin'in etkisi incelenmiştir. Serebral hasara uğratılan yaşlı farelerden Atorvastatin verilen grupta yeni oluşan nöroblast sayısının ve Presenilin 1 miktarının arttığı gösterilmiştir.

Çalışma sonunda yaşlı farelerdeki nöral projenitör hücre sayısının, Presenilin 1'e bağlı artışı kanıtlanmıştır [67].

Alzheimer hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada da, 1 yıl boyunca Atorvastatin verilen hastalar incelenmiştir. 6 ay sonunda, Atorvastatin kullanan grupta kavrama ve hatırlama performansının yükseldiği gösterilmiştir. Bu güçlü etki 1 yıl boyunca devam etmiştir ve hafif-orta şiddetli Alzheimer hastalarının yaşam kalitesinin yükseldiği belirtilmiştir [68].

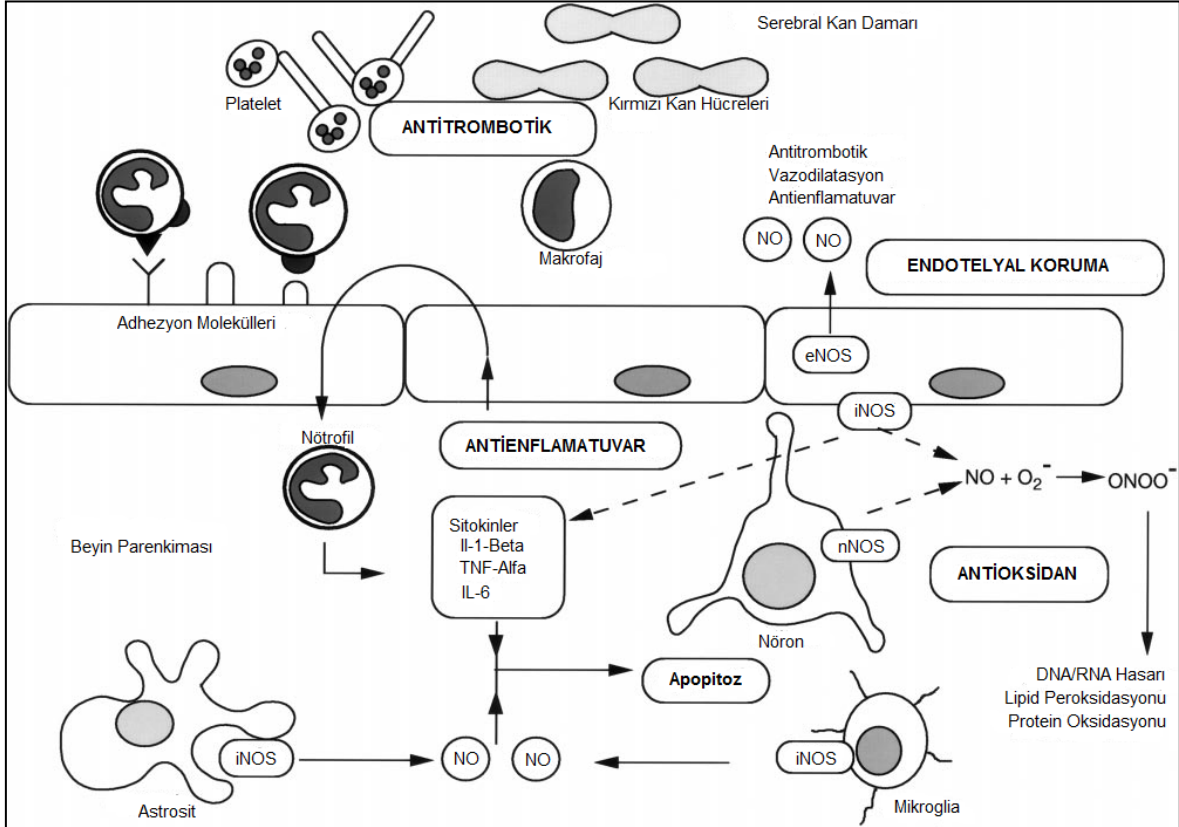
9 yıl süren ve yaklaşık 6000 gönüllünün katıldığı bir çalışmada, statinlerin ve diğer kolesterol düşürücü ilaçların Alzheimer hastalığı gelişmesi açısından etkisi incelenmiştir. Araştırma süresi sonunda yaklaşık 600 kişide Alzheimer hastalığı geliştiği belirlenmiştir. Gönüllü grubundan statinler dışında kalan kolesterol düşürücü ilaçlardan kullananlar ile ilaç kullanmayanlar arasında herhangi bir fark bulunmazken; statin grubu ilaç kullanan hastalarda Alzheimer gelişme olasılığının çok daha düşük olduğu ortaya koyulmuştur. Daha lipofilik olan statinlerin KBB'yi aşma eğilimlerinin fazla oluşu nedeniyle daha etkili olacağı düşüncesi ise negatif sonuçlanmış, lipofilisiteden bağımsız olarak statinlerin Alzheimer gelişim riskini azalttığı ortaya koyulmuştur [69].

MS hastalarında yapılan çalışmalarda, 9 ay süren Atorvastatin tedavisi sonunda (yapılmış en uzun soluklu Statin-MS çalışması); yüksek doz Atorvastatin'in bu hastalarda tolere edilebildiği ve manyetik rezonans görüntüleme incelemeleri sonucu hastalığa karşı yarar sağladığı gösterilmiştir [70].

Statinler immunomodülatör, proenflamatuvar ve antienflamatuvar özellikleri sayesinde MS hastalığında yeni bir ilgi alanı oluşturmaktadırlar. Deneysel otoimmün ensefalomyelit hastalığında da etki göstermektedirler. Yapılan bir çalışmada MS hastalarında Simvastatin'in ciddi bir yarar sağladığı da bilinmektedir [71].

Bir başka çalışmada da MS'in bir hayvan modeli çalışması olarak sıçanlarda alerjik ensefalomyelit oluşturulmuştur. Hastalık oluşturulmuş hayvanlarda hastalığın bir belirteci olarak beyin dokusunda nitrik oksit sentaz, tümör nekroz faktörü ve interferon miktarı artmıştır. Bununla birlikte Lovastatin ile tedavi edilen grupta bu belirteçlerin miktarı önemli ölçüde azalmıştır [72].

Farklı araştırma grupları tarafından son yıllarda yapılan çalışmalarda, iskemik ve travmatik beyin hasarı sonrasında [22, 73, 74], MS'in demiyelinizasyona neden olan tipi olarak bilinen ensefalomyelit gibi otoimmün hastalıklarda [75] ve immun regülasyonla ilgili yollarda [76] ve Alzheimer hastalığında [77] kullanımına yönelik incelemeler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.8. Statinlerin nöroprotektif etkileri. Statinler endotelial fonksiyonları korur ve antiinflamatuvar, antioksidan ve antitrombotik etkileri nedeniyle serebral iskemi ve reperfüzyon durumlarında nöroprotektif etkiler gösterirler. (NO: Nitrik oksit, nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz, O_2^- : süperoksit anyonu, $ONOO^-$: Peroksinitrit) [65].

2.4. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlama yönteminin seçiminde, kullanılan polimerin yapısı ve etkin maddenin çözünürlüğü belirleyici olmaktadır. Nanopartikül hazırlama yöntemleri olarak önceleri monomerlerin çeşitli ortamlarda polimerizasyonuna dayanan yöntemler kullanılırken günümüzde ise, tam olarak karakterize edilmiş, önceden sentezlenmiş polimer veya doğal makromoleküllerin dispersiyonuna dayalı yöntemler geliştirilmiştir [50].

2.4.1. Nanopartikül Hazırlanmasında Kullanılan Genel Yöntemler

2.4.1.1. Püskürterek Kurutma (Spray-drying)

Yeni bir teknik olmamakla birlikte, çözücünün uzaklaştırılması için kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde çözücünün hızla uzaklaştırılması sayesinde çözücü içerisinde önceden çözündürülmüş olan aktif farmasötik içerik ve stabilizatörler çökmeye uğrar. Bu teknikle çalışabilmek için etkin madde/maddelerin çalışılan sıcaklıkta (120-150°C) stabil olması gerekmektedir. Ayrıca suda çözünmeyen ilaçlar için de organik çözücüler kullanılmaktadır ve bu sıcaklıklarda bu çözücüler patlayıcı olabilmektedir [78]. Literatürde bu teknik kullanılarak düşük çözünürlüğe sahip bir ilaç etkin maddesi olan 5-fenil-1,2-ditiyol-3-tiyon'un biyoyararlanımı maltodekstrin adlı taşıyıcıya yüklenerek artırılmaya çalışılmıştır [79]. Yine bu teknikle üretilen polibutilsiyanoakrilat ve jelatin nanopartikülleri yaklaşık 200 nm boyutlarında üretilmiş ve akciğere yönelik kullanım için kuru inhalasyon tozu olarak elde edilmiştir. İnhaler ile kullanılabilmesi için toz laktoz üzerine eklenen bu nanopartiküller akciğer epiteline vardıklarında derhal laktozdan ayrılmakta ve ilaç etkin maddesinin salımı başlamaktadır [80].



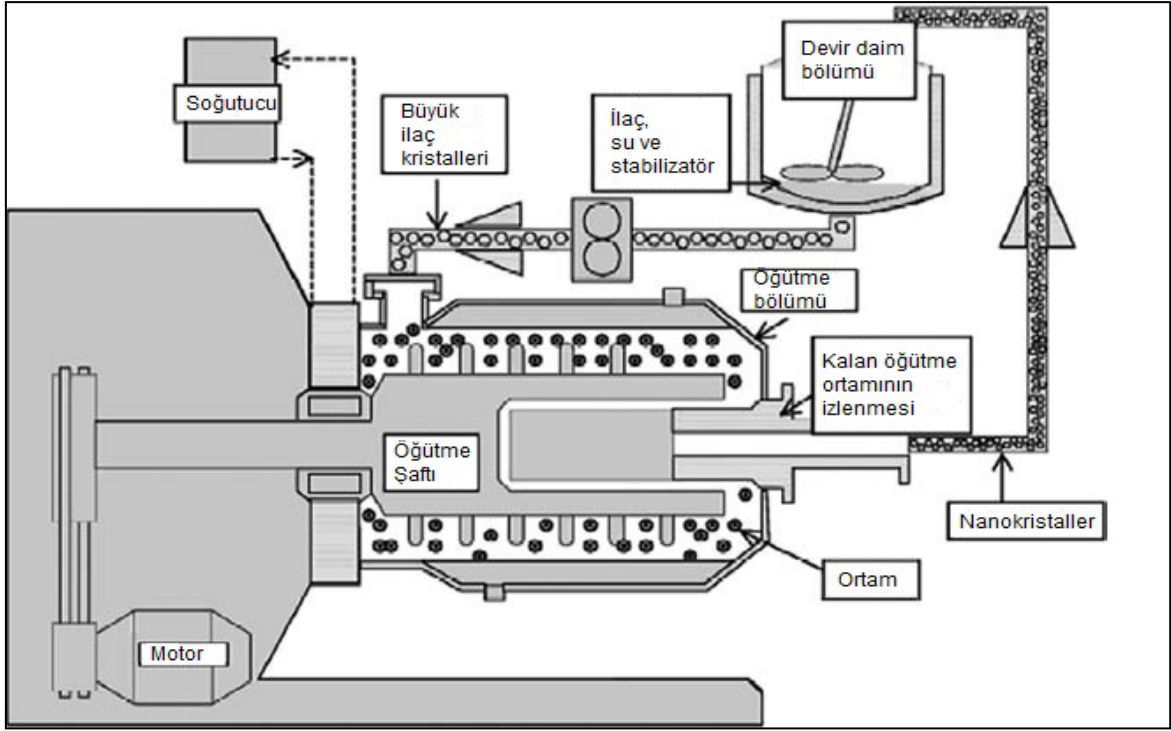
Şekil 2.9. Püskürterek kurutma cihazı ve üretilen nanopartiküller [81].

2.4.1.2. Aerosol Akış Reaktörü

Bu metod, püskürterek kurutma ile aynı temel prensibe dayanır. İlaç ve stabilizatörler biyoyumlu bir organik çözücü içerisinde çözdürülür ve inert bir gaz ile birlikte atomize edilir. Oluşan damlacıklar ısıtılmış bir bölmeden geçirilirken hızlı bir buharlaştırma sonucu nanopartiküller oluşur. Bu işlemde çözücü tipi, atomlaştırıcı tipi ve çözelti derişimi anahtar parametrelerdir. 120°C'nin altında üretilenler 40°C'de üretilenlerle bir fark göstermezken, 160°C'nin üzerinde üretilenler çok hızlı evaporasyona bağlı olarak çok daha küçük ve poröz bir yapıya sahip olmaktadır. Kısacası morfoloji ve kristaliteyi değiştirmek adına reaktör duvar sıcaklığı 40–200°C arasında değiştirilebilmektedir. Atomlaştırıcının oluşturduğu damlacıklar mutlaka nano boyutta olmalıdır zira çöken partiküllerin boyutu direkt olarak damlacık boyutu ile ilişkilidir. Bu teknik, dar bir partikül boyutu dağılımı yakalanmasına olanak vermektedir [82].

2.4.1.3. Öğütme

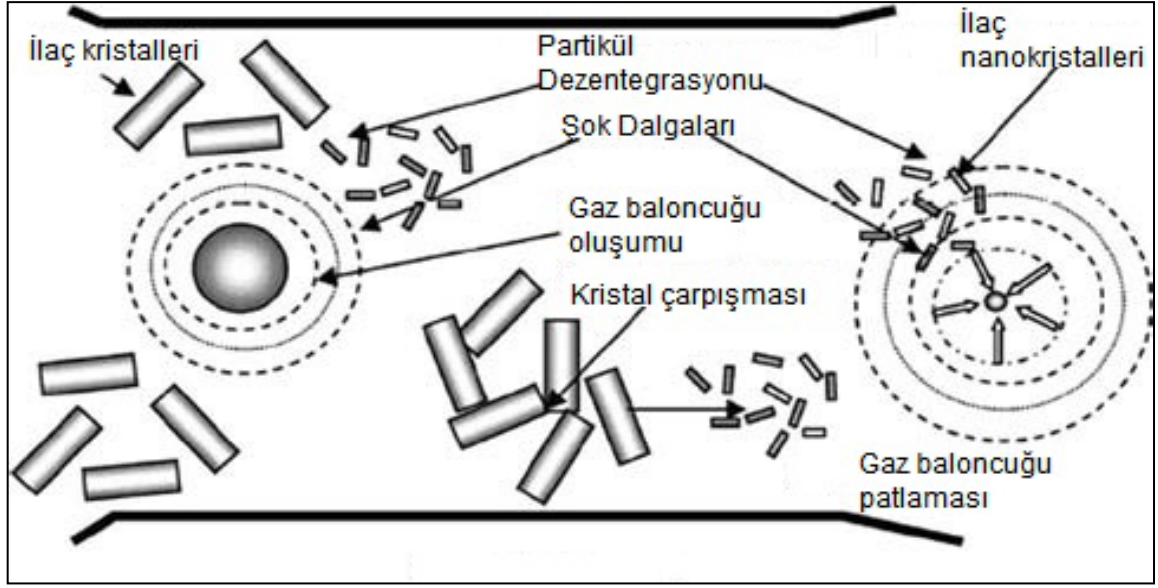
Konvansiyonel kuru öğütme teknikleri ile ancak 1-10 mm arası partiküller üretilebilmektedir. Ayrıca kuru öğütme sırasında ortaya çıkan ısı, etkin maddenin ve eksipyanların kararlılıkları açısından sakınca oluşturmakla birlikte partiküllerin büyümesine ve agregasyonuna da zemin hazırlamaktadır. Bu nedenle ıslak öğütme tekniği geliştirilmiştir [83]. Polimer çözeltisi içerisinde dağılmış bulunan mikropartiküller bu değirmende yüksek enerjili kuvvetler sayesinde parçalanmaktadır. Öğütme ortamı cam, zirkonyum oksit ya da yüksek derecede çapraz bağlanmış polistiren rezinden oluşabilmektedir. Burada sıcaklık soğutucu sistem tarafından kontrol edilmekte ve 200 nm'den küçük nanopartiküller üretilebilmektedir. Bu yöntemle dar bir boyut dağılımına ve seriden seriye iyi bir tekrar üretilebilirliğe ulaşılabilmektedir. Öğütme ortamı olarak kullanılan malzemeler toksisiteye neden olabileceğinden polistiren rezin kullanılarak bu ihtimal azaltılmaktadır [84].



Şekil 2.10. Nanokristal öğütme düzeneği [84].

2.4.1.4. Yüksek Basıncılı Homojenizasyon

Bu teknik öğütme tekniğine benzemekle birlikte bu kez süspansiyondaki partikülleri parçalamak için yüksek basınçlı homojenizasyon kullanılmaktadır. Burada 2000 bar basınca kadar pistonlu homojenizatörler kullanılmaktadır [85]. Daha önceden öğütülerek mikropartikül haline getirilmiş ilaç dar bir açıklıktan yüksek basınçla geçirilerek homojenizatöre alınmaktadır. Homojenizatör haznesindeki sulu taşıyıcı kaynamakta ve gaz oluşturmaktadır. Hazne terkedilirken taşıyıcının patlaması yüksek bir parçalama ve kavitasyona neden olmaktadır ve mikropartiküller bu güç sayesinde nanopartiküllere dönüşmektedir. Bu teknikte kullanılan en önemli parametre homojenizasyon sırasında oluşan basınçtır. Ayrıca optimum sonucu almak adına, homojenizatöre gelen partiküllerin sistem içindeki dönüşümünde siklus sayısı da ayarlanmaktadır. Örneğin daha küçük partiküller elde edebilmek için siklus sayısı artırılabilir [86].



Şekil 2.11. Yüksek basınçlı piston homojenizatörünün çalışma mekanizması [87].

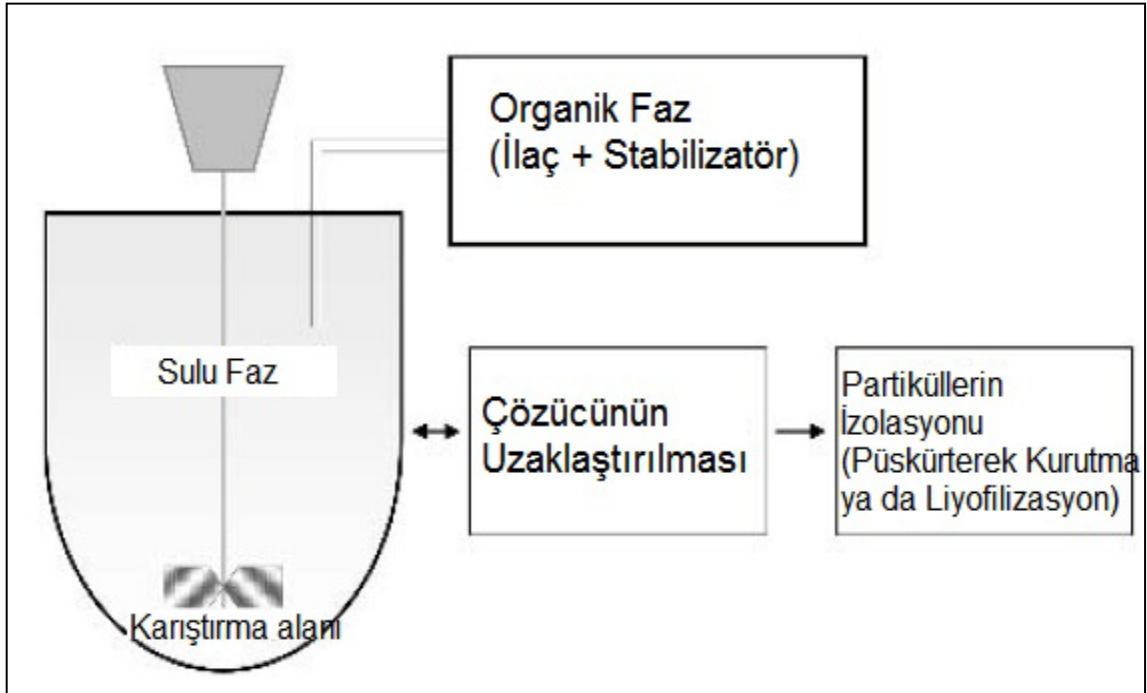
2.4.1.5. Çöktürme Teknikleri

Bu proseslerden her biri, etkin maddenin bir çözücü içerisinde doğru çözdürülmesini ve ardından bir anti-çözücü içerisinde çöktürülmesini ya da bu çözücünün evaporasyonunu gerektirmektedir. Prosesler birbirinden, çözücü/anti-çözücü tipi, sıcaklık ve basınç gibi parametreler nedeniyle farklılaşmaktadır. Yüzey aktif maddeler ve stabilizatörler çözücü ve anti-çözücünden birine ya da her ikisine de eklenebilmektedir [78].

2.4.1.5.1. Kontrollü Çöktürme

Etkin madde ve stabilizatörlerden oluşan nanopartikül dispersiyonlarının başarılı bir şekilde hazırlanmasını sağlayan bu yöntem "The Dow Chemical Company" tarafından geliştirilmiştir [88]. Yöntemde, etkin madde ve stabilizatörler suyla karışabilir bir çözücü içerisinde çözdürülmekte, ardından kontrollü bir şekilde sulu bir faz içerisinde dağıtılmaktadır. Dağıtmanın ardından organik çözücünün etkin maddeyi çözücü gücü artık ortadan kaldırılmıştır. Kendisine çözücü ortam bulamayan etkin madde de çökmekte ve partiküller oluşturulmaktadır. Stabilizatörlerin partikül yüzeyine adsorpsiyonu ile partiküller büyümektedir. Çözücü vakum distilasyonu ile uzaklaştırıldıktan sonra partiküller elde etmek için liyofilizasyon ya da püskürterek kurutma teknikleri uygulanabilmektedir. Çözücü tipi, sıcaklık, stabilizatör tipi bu yöntemde önemli parametreler olarak göze

çarpmaktadır. Sıcaklığın artırılması ile partikül boyutu artacağı gibi bimodal boyut dağılımlarına da sebep olabilmektedir. Çok az miktarda kalıntı çözücünün kaldığı bu yöntemde 200 nm'nin altında nanopartiküller kolaylıkla üretilebilmektedir. Partikül boyutundaki azalma direkt olarak yüzey alanda artmaya; böylece suda çözünürlüğü düşük olan ilaç etkin maddelerinin çözünürlüklerinde iyileşmeye neden olmaktadır. Bu yöntemle nanopartikül üretiminde ölçek büyütme de kolayca sağlanabilmekte ve kilogramlar mertebesinde üretim yapılabilir [78]. Temel olarak bu yöntemle dayanan bir üretimle ortaya çıkarılan ortalama 50 nm büyüklüğündeki çinko oksit nanopartikülleri de çözelti derişimi, pH ve yıkama çözeltisi parametrelerinde yapılan değişiklikler sonucu incelenmiştir [89]. Başka bir çalışmada da bu yöntemle üretilen ve boyutlarının 50 nm civarında olduğu tespit edilen kalay oksit nanopartiküllerinin spesifik özelliklere sahip olduğu ortaya konulmuştur. Normal SnO₂ tozu 5 m²g⁻¹ yüzey alanına sahipken, SnO₂ nanopartiküllerinde bu yüzey alanı 19 m²g⁻¹ olarak belirlenmiştir ve böylece; yüksek reaktiviteye sahip yeni bir malzeme elde edilmiştir [90].



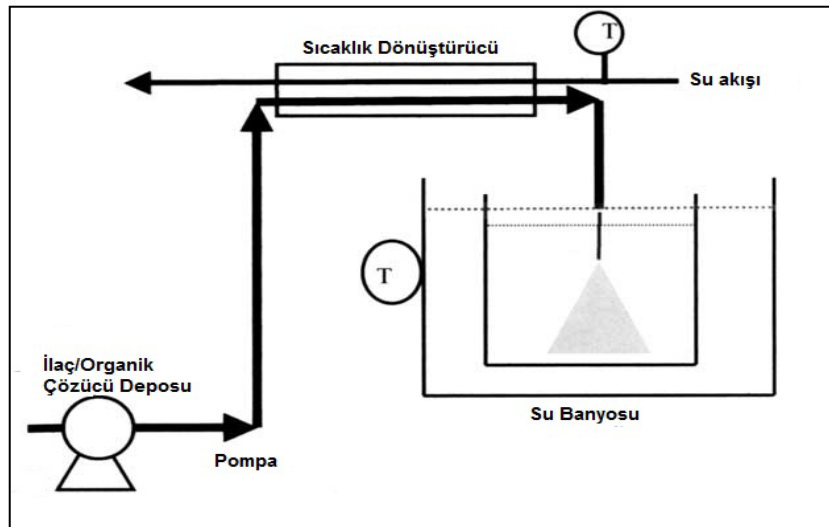
Şekil 2.12. Kontrollü çöktürme tekniği [88].

2.4.1.5.2. Sulu Faz İçerisine Buharlaştırma ile Çöktürme

Bu teknikte, hidrofobik etkin madde sulu faz ile temasta bulunan ve kaynama noktasının üzerinde veya yakınında buharlaşan organik çözücüye bağlı olarak çökmeye uğramaktadır. İlacın dissolüsyon hızını arttırmak üzere etkin madde yüzeyi hidrofilik stabilizatörlerle kaplanmaktadır. Diklorometan gibi organik bir çözücü içerisinde hazırlanan etkin madde çözeltisi ısıtılır ve püskürtücü bir başlıktan ısıtılmış sulu faz içerisine püskürtülür. Organik çözücünün bu ortamda hızlı bir şekilde buharlaşması ile bir süpersatürasyon oluşmakta ve ilacın nanopartiküller şeklinde çökmesini takiben kolloidal bir süspansiyon elde edilmektedir [91].

Yapılan bir çalışmada düşük çözünürlük özelliklerine sahip Siklosporin A etkin maddesi için aynı yöntem kullanılmış ve 60 nm ile 300 nm arasında partikül boyutuna sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Uygun partikül boyutu elde etmek için farklı tipte hidrofilik stabilizatörler kullanılmıştır. Bu çalışmada sıcaklığın artırılmasıyla buharlaşma hızının arttığı ve buna bağlı olarak partikül boyutunun küçüldüğü gösterilmiştir [92].

Bir başka çalışmada da yine stabilizatör etkisinin itrakonazol adlı antifungal özellikteki etkin madde için nanopartikül boyutu, ıslanabilirliği ve dolayısıyla çözünürlüğü üzerine etkisi araştırılmış ve polisorbitat 80 ve poloksamer 407 yüzey aktif maddelerinin birlikte kullanılmasının en uygun sonucu verdiği gösterilmiştir [93].



Şekil 2.13. Sulu faz içerisine buharlaştırma ile çöktürme tekniği [91].

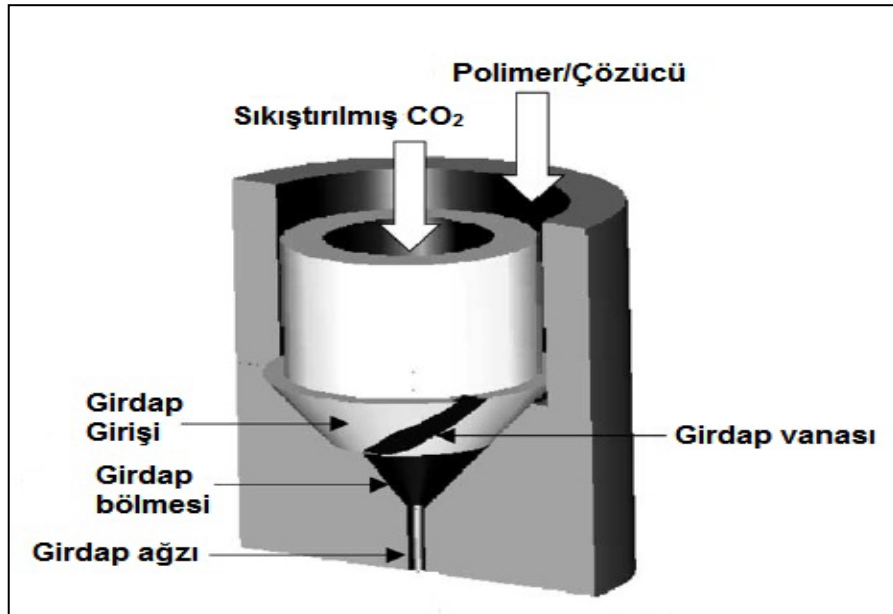
2.4.1.5.3. Sıkıştırılmış Anti-Çözücü İçerisine Çöktürme

Bu teknikte, anti-çözücü olarak CO₂ kullanılmaktadır. Çözünürlük özellikleri zayıf olan etkin madde çözeltisi, sıkıştırılmış CO₂ içeren bir bölmeye atomizerle püskürtülmektedir. Bu sırada mikronize damlacıklar oluşmaktadır. Kullanılan çözücüler sıvı CO₂ ile karışabilir olduğundan, bu karışma sırasında mikrodamlacıklar kurumaktadır. Mikro ve nanopartiküllerin oluşumu burada aynı anda gerçekleşmekte olan iki yönlü iki etkiden ileri gelmektedir:

- Organik çözücünün sıvı CO₂ içine ekstrakte olması
- Damlacıklar içerisine CO₂ diffüzyonu

Bu kütle transferi, atomizasyon verimine ve sıkıştırılmış sıvı CO₂ ile damlacıklar arasındaki karışma/dağılma fenomenine bağlı bulunmaktadır. Partikül aglomerasyonunu minimize etmek veya kurutma zamanını azaltmak için yüksek transfer hızlarına ihtiyaç duyulmaktadır [94]. Bu yöntem, kontrollü ilaç salımı sağlayan nanopartiküllerin üretimi için uygun bir yöntem olarak gösterilmektedir.

PLA polimeri kullanılarak ve sprey başlığı modifiye edilerek yapılan bir çalışmada 200 nm civarında boyuta sahip nanopartiküller üretilebilmiştir. Sahip oldukları keskin boyut dağılımının sebebi, sprey başlığının, karışmayı, gazların karışması benzeri bir şekilde gerçekleştirmek üzere girdap yaratacak tipte modifiye edilmiş olması olarak gösterilmektedir [95].



Şekil 2.14. Sıkıştırılmış anti-çözücü içerisine çöktürme tekniğinde kullanılan püskürtücü başlık [95].

2.4.1.5.4. Süperkritik Çözücü ile Hazırlama

Bu yöntemde çözücü olarak süperkritik CO₂ kullanılmakta ve atmosfer basıncındaki bir bölmeye atomizer ile verildiğinde CO₂ hızlı basınç değişimi nedeniyle ortamdan uzaklaşmakta ve içerisinde çözünmüş halde bulunan etkin madde çökmeye uğramaktadır. Bu yöntemde kısıtlayıcı faktör, kullanılacak etkin maddenin sıvı CO₂ içerisinde çözünebilir özellikte olması zorunluluğudur. Oluşturulacak partiküllerin boyutu; sıcaklık, basınç, püskürtme başlığı geometrisi ve çözelti derişimi gibi parametreler değiştirilerek ayarlanabilmektedir [78].

Partikül boyutunun aşırı büyümesi ve aglomerasyonu engellemek için polisorbata 80 gibi bir yüzey aktif maddenin çözeltisi içerisine de püskürtme yapılabildiği gösterilmiştir [96]. Başka bir çalışmada da gümüş sülfid nanopartikülleri bu yolla üretilmiş ve bu kez de albumin içeren bir çözeltiye püskürtme yapılmış, oluşan monodispers nanopartiküllerin albumin proteini ile başarılı bir şekilde kaplanabildiği gösterilmiştir. Üretilmiş olan bu nanopartiküllerin yaklaşık 10-20 nm civarında olması da dikkat çekici bir husustur [97]. Bu yöntemle 200 nm civarında üretilen nanopartiküllerin, katı kosolvanlar kullanılarak 120 nm civarında üretilmesi de literatürde yer alan bir modifikasyondur [98].

2.4.1.5.5. Mikroemülsiyon Teknikleri

Nanopartikül dispersiyonları hazırlamak için yağlı ve sulu fazları aynı anda içeren (yağ/su veya su/yağ) emülsiyonlar kullanılmaktadır. Bu koloidal emülsiyonlar, yağlı ve sulu fazlar ile etkileşerek damlacıkların büyümesini ve agregasyonu engelleyecek yüzey aktif madde ve polimerler içerirler. Bu emülsiyonlar nanopartiküllerin ve katı lipid nanopartiküllerin üretimi için kullanılmaktadır.

Bu teknikte kullanılacak olan organik çözücünün biyouyumluluğu kullanılacak organik çözücü tipi açısından bir sınırlama getirmektedir. Su/yağ tipi emülsiyon sistemleri kullanıldığında etkin madde/polimer organik faz içerisinde çözündürülmekte ve sulu faz içerisine difüze olmaya başladığında çökme işlemi gerçekleşmektedir [78].

Bu teknik kullanılarak, platin-rutenyum alaşımı şeklinde nanopartiküller üretilmiş ve 2.5–4.5 nm civarında dar bir boyut dağılımına sahip oldukları gösterilmiştir. Oda sıcaklığında metanol oksidasyonu gerçekleştirmek üzere kullanılan bu nanopartiküller çok yüksek katalitik aktivite göstermektedirler [99]. Katı lipid

nanopartikül üretiminde oda sıcaklığında katı halde bulunan lipidler kullanılmak istenildiğinde, bu lipidler erime derecesinin üzerine ısıtılmakta, yüzey aktif maddeler ve sulu faz da aynı sıcaklığa getirilmektedir. Ardından bu karışım erimiş lipit üzerine yavaşça eklenmektedir. Bu işlemin sonunda termodinamik olarak kararlı ve saydam görünümlü bir emülsiyon elde edilmektedir. Daha sonra bu karışım, 2-3°C civarına soğutulmuş su üzerine damlatılmakta ve katı lipid nanopartiküller elde edilmektedir. Bu üretim tekniğinde büyük tanklar kullanılarak ölçek büyütülmesi de başarılı olarak gerçekleştirilmiştir [100].

2.4.1.5.6. Sıvı İçerisine Spreyle Dondurma

Bu yöntemde, etkin madde ya da makromolekül, aktif içeriğin işlem sırasında bozulmasını engelleyen kriyoprotektanlar ve stabilize edici maddeler ile birlikte bir sprey ile sıvı nitrojen gibi kriyojenik bir sıvı içerisine püskürtülmektedir. Mikronize tozlar bu şekilde elde edilmekte ve bu mikronize tozların arasındaki ağ örgüsünde nano yapılar oluşmaktadır [78].

Yapılan bir çalışmada, danazol etkin maddesinin bu teknikle 100 nm civarında boyuta sahip amorf yapıları partikülleri üretilmiştir. Saf etkin maddenin 2 dakika içerisinde % 30'u çözünürken, üretilen nanopartiküllerin % 95'inin çözünmesi düşük çözünürlük özelliklerine sahip etkin maddelerin bu teknikle üretildiklerinde daha uygun farmasötik özellikler kazanabileceklerini düşündürmektedir [101].

2.4.2. PLGA ve PLGA-b-PEG Nanopartikülleri İçin Kullanılan Hazırlama Yöntemleri

PLA ve PLGA polimerlerinden peptid, protein ve aşı gibi ilaçların taşınımını sağlayabilen ve kullanılan polimerin özelliğine göre günler, haftalar hatta aylarca sabit bir hızda içeriğini ortama salabilen enjekte edilebilir mikropartiküller üretilmektedir. Ancak boyutlarının büyük olması nedeniyle bu partiküller sistemik dolaşımla ya da mukozal membran üzerinden hedef dokulara direkt olarak hedeflendirilememektedir. Özellikle oral alımı takiben, ancak 500 nm'den küçük olanlar gastrointestinal mukoza yüzeyindeki mezenterden ve M hücrelerinden geçerek sistemik dolaşıma ilaç taşıyabilmektedir. Bu nanopartiküller, mikropartiküllerin üretimi için kullanılan tekniklerle ancak daha küçük damlacık boyutu elde etmek üzere modifiye edilerek üretilebilmektedir [102].

Bu çalışmada kullanılan PLGA ve PLGA-b-PEG kopolimerleri ile nanopartikül hazırlamaya yönelik yöntemler; aşağıdaki başlıklar altında açıklanmıştır.

2.4.2.1. Emülsiyon Tekniği

Bu teknikte su içinde yağ (Y/S) tipi emülsifikasyon kullanılmaktadır. Öncelikle, polimer su ile karışmayan ve uçucu olan bir organik çözücü içerisinde çözüldürülmektedir. Etkin madde, bu çözeltiye eklenerek bir karışım oluşturması sağlanmaktadır. İçerisinde uygun miktarda emülsifiye edici ajan bulunan su fazı ile etkin madde-polimer-çözücü karışımı sabit karıştırma hızı ve sıcaklığı koşullarında Y/S tipi bir emülsiyon oluşturmak üzere karıştırılmaktadır. Ardından yağ damlacıkları elde edilmek üzere çözücü buharlaştırma (evaporasyon) ya da ekstraksiyon yöntemlerinden biri ile uzaklaştırılmaktadır. Oluşan nanopartiküller yıkandıktan sonra santrifüjle ya da filtrasyonla toplanmaktadır. Liyofilizatörle kurutulduktan sonra enjeksiyona hazır partiküller elde edilmektedir.

Ekstraksiyon metodunda çözücünün henüz buharlaşmadan başka bir sulu dispersiyona difüzenmesi sağlanmaktadır. Burada çözücünün uzaklaştırılmasının hızı, çözücü/ekstraksiyon ortamı oranına, bunların sıcaklığına ve çözünürlük özelliklerine göre değişmektedir. Buharlaştırma tekniğindeki çözücünün uzaklaştırılması hızı ise, çözücü, polimer ve dispersiyon ortamının çözünürlük parametrelerine, basınca ve sıcaklığa bağlıdır ve bu hızın sonucuna bağlı olarak partikül karakteristikleri direkt olarak etkilenmektedir. Çözücünün çok hızlı uzaklaştırılması lokal patlamalara, dolayısıyla poröz yapılı nanopartiküllerin oluşumuna neden olabilmektedir. Ekstraksiyon metoduyla çözücü daha kolay ve hızlı uzaklaştırılmakta ve buna bağlı olarak daha poröz partiküller elde edilebilmektedir [102].

Bu yöntemin en önemli dezavantajı suda çözünürlüğü iyi ve orta derecelerde olan etkin maddelerin düşük derecede enkapsüle edilebilmesidir. Burada ilaç etkin maddesi yağlı iç fazdan sulu dış faza difüze olmakta ve mikrokristal fragmentler oluşturmakta, ardından polimer yüzeyinde toplanmaktadır. Sonuçta hidrofilik etkin madde düşük oranda enkapsüle edilmekte ve yüzeyde bulunan ilaç kristalleri salım sırasında bir patlama etkisiyle bir anda yüksek miktarda ilaç salımına (burst release) neden olmaktadır. Bu nedenlerle bu yöntem, salisilik asit gibi hidrofilik ilaçlardan ziyade, steroidler gibi lipofilik özellikteki ilaçlar için uygun bulunmaktadır. Bu etkiyi ortadan kaldırmak için lipofilik ilaçlar ve polimer suyla karışabilir bir

organik fazda (asetonitril gibi) çözüldürüldükten sonra yine bir başka organik faz içerisinde (mineral yağ gibi) yağda çözünebilen bir yüzey aktif madde (örn. Span) yardımıyla emülsifiye edilmekte, organik çözücü buharlaştırıldıktan sonra yağ fazı n-hekzan benzeri bir çözücü ile yıkanmakta ve partiküller elde edilmektedir. Bu yöntem Y/Y ya da S/Y tipi emülsiyon yöntemi olarak da bilinmektedir [103].

Partiküllerin üretimini etkileyen faktörler, aşağıdaki şekilde sıralanabilmektedir:

- Enkapsüle edilecek etkin maddenin fizikokimyasal yapısı ve çözünlülük özellikleri,
- Polimer derişimi, bileşimi ve moleküler ağırlığı,
- Etkin madde/polimer oranı,
- Kullanılan organik çözücü, emülsifiye edici ajanın yapısı ve derişimi,
- Sıcaklık,
- Karıştırma ve emülsifikasyon süresi,
- Disperse fazın ve sürekli fazın hacimsel oranları ve viskoziteleri [102].

2.4.2.2. Çift Emülsiyon Tekniğı

Bu yöntem; protein, peptid ve aşilar gibi hidrofilik özellikteki etkin maddelerin enkapsülasyonu için kullanılan ve S/Y/S tipi emülsiyon sistemleri oluşturularak gerçekleştirilen bir yöntemdir. S/Y tipi ilk emülsiyonu oluşturmak üzere hidrofilik etkin maddeyi içeren bir sulu faz, polimeri (PLGA) içeren organik faza kuvvetli karıştırma ortamında eklenmektedir. Oluşan bu emülsiyon, çoklu emülsiyonu oluşturmak üzere yüzey aktif madde içeren daha büyük hacimdeki su fazına yine karıştırma ortamında yavaşça eklenmektedir. Tıpkı tekli emülsiyon sistemlerinde olduğu gibi çözücü, buharlaştırma ya da ekstraksiyon ile uzaklaştırılmaktadır. Nanopartiküllerin elde edilmesi de yine benzer şekilde yıkamayı takiben santrifüj, filtrasyon ya da eleme yöntemleriyle sağlanmaktadır [102]. Bu yöntemle üretilen PLGA-b-PEG kopolimeri nanopartiküllerinin 200 nm civarında oldukları ve model proteini uygun bir şekilde enkapsüle ettikleri, başta hızlı bir ilaç salımının ardından kontrollü bir salım sağladıkları gösterilmiştir. PEG ile kaplı bu nanopartiküllerin kanda daha uzun süre kalmalarına protein enkapsülasyon etkinliklerinin PLGA nanopartiküllerinden daha düşük olduğu da göze çarpmaktadır [104]. Bir başka çalışmada da antikanser ilaç olan sisplatin bu yöntemle PLGA-b-PEG kopolimeri

nanopartiküllerine yüklenmiş ve 120 saat boyunca kontrollü bir şekilde tüm ilacın salındığı gösterilmiştir [105].

2.4.2.3. Tuzla Çöktürme (“Salting Out”)

Çok sık olarak kullanılmamakla birlikte bu yöntemde, etkin madde ve polimer su ile karışabilen bir çözücüde çözündürülmektedir. Ardından “salting out” ajanı ve stabilizatör içeren su fazına karıştırma ortamında eklenmektedir. “Salting out” ajanı etkin maddenin ve polimerin su içerisindeki çözünürlüklerini azaltmaktadır. Organik çözücü su fazına difüze olduğunda dışarıda kalan polimer ve etkin madde su içerisinde de çözünemeyince nano boyutta partiküller oluşturmaktadır. Bu yöntemin sonunda, “salting out” ajanının ortamdan uzaklaştırılması amacıyla bir saflaştırma basamağı mutlaka bulunmalıdır [106].

2.4.2.4. Çözücü Yer Değiştirme (Nanoçöktürme)

Bu teknikte etkin madde, polimer ve tercihen bir stabilizatör (fosfolipidler gibi) su ile karışabilen bir çözücü (aseton ya da etanol gibi) içerisinde çözündürülür. Bu karışım, PVA ya da poloksamerler gibi stabilizatörler içeren sulu bir faza manyetik karıştırma ortamında eklenir ya da enjekte edilir. Burada çözücünün hızlı difüzyonu nedeniyle nanopartiküller anında oluşmaktadır. Çözücü ise daha sonra düşük basınçlı ortamda uzaklaştırılmaktadır. Çözücünün yer değiştirmesi sırasında oluşan yüzeyler arası türbülans partikül formasyonunun asıl mekanizması olarak gösterilmektedir. Bu yöntemin kısıtlayıcı parametresi suyla karışabilir çözücüler kullanılması zorunluluğudur ki ancak bu şekilde spontan emülsifikasyon oluşturacak hızda bir difüzyon hızı elde edilebilir. Ayrıca sadece bu tip çözücülerde kullanılacak ilaçlarla çalışılabilme zorunluluğu da bulunmaktadır. Hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonu için de uygun bir yöntem olmamakla birlikte, lipofilik etkin maddelerle yüksek enkapsülasyon etkinlikleri elde edilmektedir [107].

Hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyon etkinliklerini arttırmak için yapılan bir çalışmada prokain adlı hidrofilik özellikteki lokal anestetik etkin madde PLGA nanopartiküllerine nanoçöktürme tekniği ile enkapsüle edilmiş ve bu çalışmada üretim ortamının pH'sının düzenlenmesi, prokain hidroklorür tuzu yerine prokain dihidratın kullanılmasının, ortama kaprilik ve laurik asit gibi yağ asitlerinin eklenmesinin partikül boyutu ve morfolojisini bozmadan ilacın enkapsülasyon etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir [108].

Nanoçöktürmenin incelendiği diğer bir çalışmada da üretim parametrelerinin partikül boyutuna etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara göre kullanılan çözücünün su ile karışabilirlik özelliği arttıķa partikül boyutunun azaldığı bildirilmiştir. Değerlendirilen çözücülerin suyla karışabilirlikleri sırasıyla şu şekilde azalmaktadır: dimetilformamid>aseton>asetonitril>tetrahidrofurana. Buna göre aynı yöntemde sadece çözücüler değiştirildiğinde en küçük partiküller (70-100 nm) dimetilformamid ile elde edilirken en büyükleri (200 nm civarı) tetrahidrofurana ve asetonitril ile elde edilmiştir. Sabit polimer derişiminde çözücü/su oranının partikül boyutuna etkisi incelendiğinde kesin bir korelasyonun bulunmadığı, her çözücü için farklı bir optimum çözücü/su oranı olduğu gösterilmiştir. Ancak polimer derişiminin boyuta etkisi incelendiğinde polimer derişimi arttıķa partikül boyutunun da arttığı sonucuna varılmıştır. Model çözücüde polimer derişimi 10 katına çıkarıldığında partikül boyutunun 69 nm'den 165 nm'ye yükseldiği gösterilmiştir [109].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA, 50:50) RESOMER RG 502	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA, 50:50) RESOMER RG 502 H	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA, 50:50) RESOMER RG 503	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA, 50:50) RESOMER RG 503 H	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
Poli(laktik-ko-glikolikasit)-Poli(etilenglikol) kopolimeri,(PLGA-PEG, 50:50, %5 PEG) RESOMER RGP d 5055	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
Poli(laktik-ko-glikolikasit)-Poli(etilenglikol) kopolimeri, (PLGA-PEG, 50:50, %10 PEG) RESOMER RGP d 50105	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
Poli(laktik-ko-glikolikasit)-Poli(etilenglikol) kopolimeri, (PLGA-PEG, 50:50, %15 PEG) RESOMER RGP d 50155	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. (Almanya)
Aseton	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Asetonitril	Sigma & Aldrich, Inc. (A.B.D.)
Metanol	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Diklorometan	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Etil asetat	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Hidroklorik asit (HCl)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Polisorbat 80 (Tween 80)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Sodyum oleat	Sigma & Aldrich, Inc. (A.B.D.)
Poli(vinil alkol) (PVA)	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)
Pluronic F88	Sigma & Aldrich, Inc.(Almanya)

Pluronic F68	Mediatech Inc. (A.B.D.)
Atorvastatin Kalsiyum	Dr. Reddy's Lab. Inc. (Hindistan)
Sodyum klorür (NaCl)	Carlo Erba Reagents (İtalya)
Potasyum dihidrojenfosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Disodyum hidrojenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Potasyum klorür	Merck & Co, Inc. (Almanya)
Sodyum azid (NaN ₃)	Sigma & Aldrich, Inc. (A.B.D.)
Nil Kırmızısı	Sigma & Aldrich, Inc. (A.B.D.)

3.1.2. Hücre Kültür Malzemeleri

Dulbecco'nun minimum esansiyel ortamı DMEM (4.5 g/L)	Biochrom, Almanya
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biochrom, Almanya
Penisilin-Streptomisin (10.000 U/10.000µg/mL)	Biochrom, Almanya
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Almanya
Tripsin-EDTA (%0.25/%0.02 w/v)	Biochrom, Almanya
PBS w/Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺	Biochrom, Almanya
PBS w/o Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺	Biochrom, Almanya
Heparin (5000 U/mL)	Biochrom, Almanya
Kollajen A (1 mg/mL)	Biochrom, Almanya
Heparin	Biochrom, Almanya
Pipetler (2, 5, 10, 25 mL)	Greiner, Almanya
24 kuyucuklu pleytler	Greiner, Almanya
25 ve 75 cm ² 'lik flasklar	Greiner, Almanya

3.1.3. Cihaz ve Aletler

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Dionex Ultimate 3000 (Almanya)
Partikül Boyutu ve Zeta potansiyel Ölçüm Cihazı	Malvern Zetasizer Nano-ZS (İngiltere)
Santrifüj	Eppendorf 5430 R (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3002 (Almanya)
Vakumlu Evaporatör	Büchi Rotavapor R114 (İsviçre)
pH metre	inoLab (Almanya)
Terazi	Mettler-Toledo PB303-S (İsviçre)
Vakum Etüvü	Nüve EV018 (Türkiye)
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert (Almanya)
İnverted Mikroskop	Leica DMIL (Almanya)
CO ₂ İnkübatörü	Thermo Scientific HeraCell (??)
Ultrasonik Su Banyosu	Bandelin Sonorex (Almanya)
Ultraturaks	PRO Scientific Inc. (A.B.D.)
Ultrasonik prob	Sonics and Materials Inc. (A.B.D.)
AFM	AFM, Nanomagnetics Inst., UK
FTIR	Thermo Fischer Scientific Inc.
İn-vivo Görüntüleme Sistemi	Kodak CareStream Health Inc. In-vivo Imaging System FX Pro (A.B.D.)

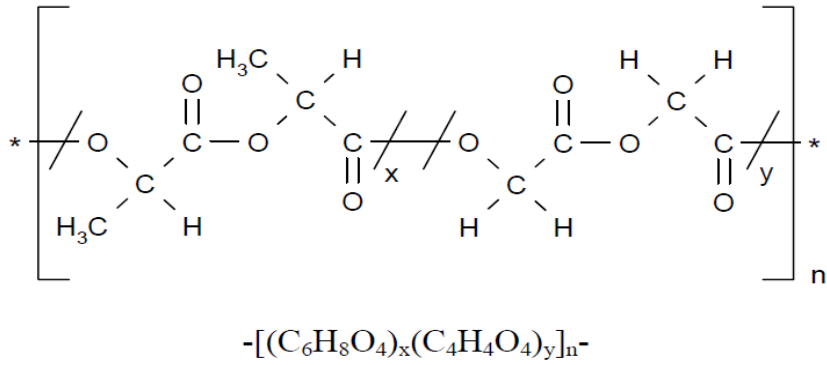
3.1.4. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

3.1.4.1. PLGA RG 503

PLGA RG 503 polimerinin içerisindeki PLA:PGA oranı 50:50'dir. Moleküler ağırlığı 24000-38000 arasında olan PLGA RG 503 polimerinin alkil ester uçları bulunmaktadır.

3.1.4.2. PLGA RG 503H

PLA:PGA oranı 50:50 olan PLGA RG 503H polimerinin moleküler ağırlığı 24000-38000 arasındır ve serbest karboksilik asit uçları bulunmaktadır.

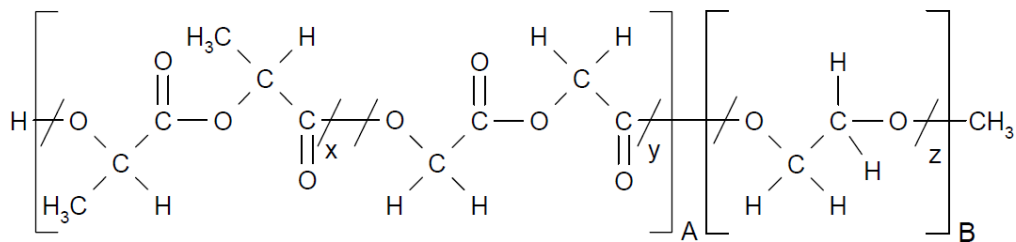


Şekil 3.1. PLGA polimerlerinin moleküler yapısı [110].

3.1.4.3. PLGA-b-PEG RGP d 5055

PLA:PGA oranı 50:50 olan PLGA-b-

PEG RGP d 5055 polimerinin içerdiği PEG oranı % 3-7 (ortalama %5) arasındadır ve bu polimer PLGA ve PEG diblok kopolimeri şeklinde bulunup, yapısal formülü Şekil 3.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. PLGA-b-PEG kopolimerlerinin moleküler yapısı [110].

3.1.4.4. PLGA-b-PEG RGP d 50105

PLGA-b-PEG RGP d 50105 polimerinin içeriğindeki PLA:PGA oranı 50:50'dir. Bu polimerin yapısındaki PEG oranı % 8-12 (ortalama %10) arasında olup, PLGA ve PEG diblok kopolimeridir.

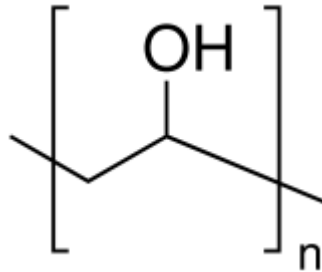
3.1.4.5. PLGA-b-PEG RGP d 50155

PLGA-b-PEG RGP d 50155 polimerinin içeriğindeki PLA:PGA oranı 50:50'dir. Bu polimerin yapısındaki PEG oranı % 13-17 (ortalama %15) arasında olup, PLGA ve PEG diblok kopolimeridir.

3.1.5. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Yüzey Aktif Maddeler

3.1.5.1. Poli(vinilalkol) (PVA)

Suda çözünebilir sentetik bir polimer ve emülsifiye edici ajan olan PVA'nın molekül ağırlığı 31000-50000 arasındadır ve kimyasal yapısı Şekil 3.3.'de gösterilmiştir [111].

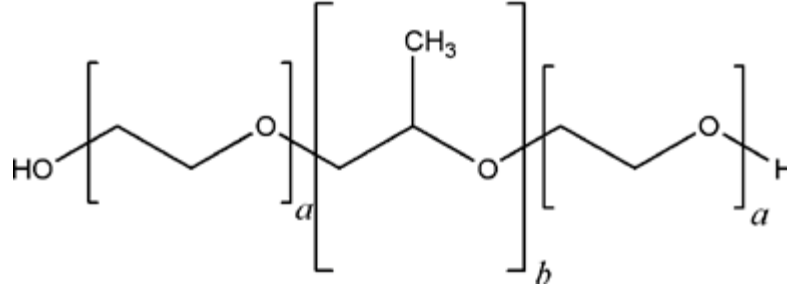


Şekil 3.3. PVA'nın moleküler yapısı

3.1.5.2. Pluronic® F68

Amfifilik bir yüzey aktif madde olan Pluronic®, ortada hidrofobik bir polioksipropilen zinciri ve bunun iki ucunda bulunan hidrofilik polioksietilen zincirlerinden meydana gelmiş olan blok kopolimerdir. Poloksamerler olarak da bilinen bu maddenin isimlendirilmesinde kullanılan terimlerden F(katı), L (sıvı) olmak üzere malzemenin fiziksel halini ve sayılardan ilk hane 300 ile çarpılarak hidrofobik kısmın yaklaşık moleküler ağırlığını, ikinci hane 10 ile çarpılarak hidrofilik polioksietilen içeriğin

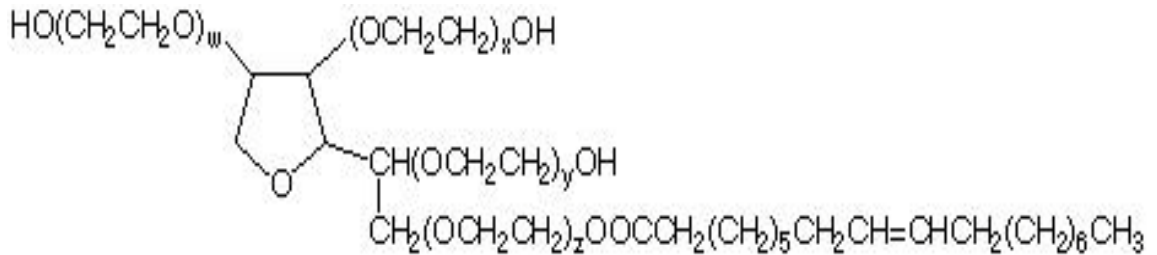
yüzdesini vermektedir. Bu durumda Pluronic® F68; katı olan, içerdiği hidrofobik polioksipropilen zincirinin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak $6 \times 300 = 1800$ olan ve yüzde $8 \times 10 = 80$ oranında hidrofilik polioksietilen zinciri ihtiva eden bir poloksamerdir şeklinde ifade edilebilmektedir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Poloksamer'in moleküler yapısı

3.1.5.3. Polisorbat 80 (Tween® 80)

Polietoksilenmiş sorbitan ve oleik asit moleküllerinden meydana gelen ve noniyonik bir sürfaktan olan polisorbat 80, polioksietilenmonoleat olarak da bilinmektedir. Aynı molekülün monolaurat içeren türevi polisorbat 20, monopalmitat içeren türevi polisorbat 40, monostearat içeren türevi de polisorbat 60 olarak adlandırılmıştır.



$$w + x + y + z = 20$$

Şekil 3.5. Polisorbat 80'in moleküler yapısı [112].

3.2.Yöntem

3.2.1. Stok Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1.1. Atorvastatin Stok Çözeltisi

Nanopartiküler sistemlerin üretiminde kullanılan Atorvastatin stok çözeltisi, her serinin hazırlanmasından önce taze olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla tartılan Atorvastatin kalsiyum, belirli miktar metanol içerisinde çözdürüldükten sonra 16 mg/mL'lik stok çözelti hazırlamak üzere metanol ile gerekli hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Pluronic F68 Stok Çözeltisi

Nanopartiküler sistemlerin hazırlama yönteminde kullanılan Pluronic F68'in stok çözeltisinin hazırlanmasına yönelik olarak 1000 mg Pluronic F68 tartılarak bir miktar distile su içerisinde çözüldürülmüş ve yine distile su ile 20 mL'ye tamamlanmış ve 50 mg/mL derişimdeki stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.1.3. Polisorbat 80 Stok Çözeltisi

Nanopartiküler sistemlerin yüzeylerinin kaplanması için 200 mg/mL derişiminde polisorbat 80 çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla 2000 mg polisorbat 80 üzerine gerekli miktarda distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerinde köpürmeye sebep olmayacak hızda manyetik balık ile karıştırılmıştır.

3.2.2. Atorvastatin'in İn-Vitro Miktar Tayini

3.2.2.1.Kalibrasyon Doğrularının Hazırlanması

Atorvastatin kalsiyum miktarı Eroğlu ve ark. tarafından geliştirilen HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir [113]. Bu yöntemde mobil faz olarak 50mM NaH₂PO₄ (pH:4.5)/asetonitril/metanol (3/3/4 (h/h/h)) kullanılmıştır. Analitik ayırım için Fortis C₁₈ ters faz kolunu (150 x 4.6 mm; 5 µm) 25°C'de kullanılmış ve Atorvastatin kalsiyum deteksiyonu λ=210 nm'de gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmıştır. Atorvastatin'in metanolde hazırlanan 400 µg/mL derişimdeki stok çözeltisinden hareketle 40 µg/mL derişimde ikinci ana stok hazırlanmış ve bu çözelti kullanılarak 6 farklı kalibrasyon noktası için gerekli seyreltmeler yapılmıştır (4-32 µg/mL).

3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Bir analitik yöntemin validasyonu, o yöntemin doğruluk ve güvenilirliğinin kanıtlanmasına yönelik olarak gerçekleştirilmektedir. Atorvastatin'in in-vitro miktar tayin yönteminin validasyonuna yönelik olarak yapılan bu çalışmada doğrusallık (Linearity), doğruluk (Accuracy), kesinlik (Precision) (tekrarlanabilirlik (Repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility)), özgüllük (Specificity) ve duyarlılık (Sensitivity) gibi analitik validasyon ölçütleri incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

3.2.2.2.1. Doğrusallık

Atorvastatin'in in-vitro miktar tayini için geliştirilen bu yöntemde seçilen derişim aralığında artan derişim ile doğru orantılı olarak artan Atorvastatin pik alanının arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Bu amaca yönelik olarak seçilen Bölüm 3.2.1.1.'de açıklanan 400 µg/mL derişimdeki ana stok çözeltilerden hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda hazırlanan 4, 6, 8, 12, 16 ve 32 µg/mL derişimlerdeki kalibrasyon noktaları üzerinden HPLC analizi yapılmış ve elde edilen pik alanları bu derişimlere karşı doğrusal regresyona tabi tutulmuştur. Sonuçta kalibrasyon denklemi ve bu denklemin tanımlayıcılık katsayısı hesaplanmıştır.

3.2.2.2.2. Doğruluk

Kullanılan analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığının gösterilmesi amacıyla yapılmaktadır. Seçilen üç farklı derişimde (4, 8, 32 µg/mL) hazırlanan Atorvastatin çözeltileri HPLC ile analiz edilerek sonuçların gerçek değerlere olan yakınlıkları incelenmiştir [114, 115].

3.2.2.2.3. Kesinlik

Kesinlik ölçütü, bir analitik yöntemin birbirini takip eden ölçümler arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Sayısal bir değeri yoktur ancak sonuçlar standart sapma (SS) ve varyasyon katsayıları (VK) ile ifade edilmektedir. İstatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılabileceği sayıda derişimde örnek ardarda ölçülerek sonuçlar aritmetik ortalama (\bar{x}), SS ve VK hesaplanması ile değerlendirilmektedir.

Kesinlik değerlendirmesinde iki alt ölçüt incelenmektedir:

Tekrarlanabilirlik: Aynı derişimdeki Atorvastatin çözeltilisinden hareketle, aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenmiştir. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde doğrusallık için hazırlanan 6 farklı seyreltme noktasından düşük-orta-yüksek derişimler olacak şekilde 3 farklı derişim (4, 8, 32 µg/mL) seçilerek 6 defa ardışık ölçümler tekrarlanmıştır. Elde edilen değerlerin istatistiksel olarak SS ve VK hesaplanmış ve sonuçlar yorumlanmıştır.

Tekrar Elde Edilebilirlik: Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır. Atorvastatin'in aynı derişimdeki hazırlanan 3 farklı çözeltilisinden hareketle n=6 olacak şekilde HPLC analizi yapılarak elde edilen değerlerin SS ve VK hesaplanarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.2.2.2.4. Özgüllük

Bir analitik yöntemin özgüllüğü; ortamda bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir [115]. Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak mobil faz, salım ortamı ve salım ortamındaki boş nanopartiküllerin numunelerinin, etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromotogramları incelenmiştir.

3.2.2.2.5. Duyarlılık

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik olarak saptanabilirlik sınırı ve tayin edilebilirlik sınırı incelenmiştir [114, 115]. Atorvastatin'in in-vitro olarak yapılan miktar tayin yönteminde elde edilen kromotogramlardaki sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu derişim bulunarak, Atorvastatin'in saptanabilecek en düşük derişimi incelenmiştir. Tayin edilebilirlik için de yine benzer bir şekilde sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu derişim, yani Atorvastatin'in doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde tayininin yapılabileceği en düşük derişim belirlenmiştir.

3.2.2.2.6. Kararlılık

Atorvastatin'in çalışma süresi boyunca kararlılığını göstermek amacıyla 4, 8 ve 32 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltileri, salım ortamında su banyosu içerisinde tutularak hazırlandıktan hemen sonra ve 72 saat sonra analiz edilmiştir (n=3). Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3 Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanması

Bu tez çalışmasında, yukarıda özellikleri verilen polimerler kullanılarak, nanopartiküler sistemlerin boyut, zeta potansiyelleri, verimlilik, model etkin madde yükleme etkinliği gibi özelliklerini değerlendirmek üzere emülsiyon-çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme olmak üzere farklı iki yöntem kullanılmıştır.

Model etkin madde olarak seçilen Atorvastatin'in lipofilik özelliklerinden dolayı, hazırlama yöntemlerinde polimerin çözündüğü faz olan organik faz içerisine ilave edilmiştir. Atorvastatin'in metanol içerisinde hazırlanan stok çözeltisinden hareketle (16 mg/mL) belirli hacimlerde etkin madde ilave edilmiştir. Kontrol amacıyla etkin madde içermeyen nanopartiküller de aynı yöntemlerle hazırlanmıştır.

3.2.3.1. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında emülsiyon-çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme olmak üzere farklı iki yöntem kullanılmıştır.

3.2.3.1.1.Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküllerin üretiminde, emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yönteminde [116] kısaca; belirli miktarda polimerin organik çözücü içerisinde tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Aynı bir beher içerisinde belirli miktarda yüzey aktif madde distile suya ilave edilmiş ve manyetik balık kullanılarak tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra flakon içerisinde bulunan polimer çözeltisi enjektör yardımı ile yüzey aktif madde içeren sulu faza ilave edilmiş ve karıştırma işlemi değişik ortamlarda (homojenizatör, ultrasonik prob, ultrasonik banyo)

gerçekleştirilmiştir. Daha sonra organik çözücü rotavapor sisteminde uzaklaştırılmıştır.

Nanopartiküllerin hazırlanması sırasında polimer tipi ve derişimi, organik çözücü tipi, organik faz/sulu faz oranı, yüzey aktif madde tipi ve sulu fazdaki derişimi ve karıştırma şekli değiştirilerek, bu parametrelerin partikül özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir.

Bu yöntemle hazırlanan PLGA nanopartiküllerin formülasyonları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

3.2.3.1.2. Nanoçöktürme Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Model etkin madde olarak seçilen Atorvastatin'in fizikokimyasal özellikleri dikkate alındığında, enkapsülasyon etkinliğini de artıracığı düşünülen nanoçöktürme tekniği ile nanopartiküller hazırlanmıştır [117]. Bu amaçla belirli bir miktar polimer aseton içerisinde çözdürülürken diğer taraftan belli miktardaki yüzey aktif madde distile su içerisine eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan su fazı üzerine polimer çözeltisi enjektör yardımı ile eklenmiştir. Bu yöntemde aseton/su oranı 1/3 olarak kullanılmıştır. Daha sonra rotavaporda aseton uçurularak nanopartiküllerin su içerisindeki süspansiyonu elde edilmiştir. Ayrıca bu yöntemle etkin madde içeren nanopartiküller de hazırlanmış, bu amaçla taze hazırlanmış Atorvastatin stok çözeltisinden belli miktarda alınarak aseton fazına eklenmiştir.

Bu yöntemde polimer derişimi, organik çözücü tipi ve yüzey aktif madde derişimi gibi parametreler değiştirilerek nanopartiküllerin boyut dağılımına etkileri incelenmiştir.

Bu yöntemle hazırlanan PLGA nanopartiküllerin formülasyonları da Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin formülasyonu.

Nanopartikül	Polimer	Polimer Derişimi (mg/mL)	Organik Çözücü	Organik faz/Su fazı	Yüzey aktif madde (mg/mL)*	Karıştırma ortamı
PLGA-1	RG 503 H	20	Diklorometan	1/2	PVA (40 mg/mL)	Homojenizatör 16000 rpm
PLGA-2	RG 503 H	20	Diklorometan	1/2	PVA (40 mg/mL) + Sodyum Oleat (%1)	Homojenizatör 16000 rpm
PLGA-3	RG 503	20	Diklorometan	1/2	Pluronic F88 (10 mg/mL)	Homojenizatör 16000 rpm
PLGA-4	RG 503	30	Etil asetat	1/5	Tween 80 (20 mg/mL)	Homojenizatör 20000 rpm
PLGA-5	RG 503	30	Etil asetat	1/5	Tween 80 (20 mg/mL)	Ultrasonik Prob (75 Hz, 750 watt)

*Yüzey aktif maddenin su fazı içerisindeki derişimidir.

Çizelge 3.2. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin formülasyonu.

Nanopartikül	Polimer	Polimer Derişimi (mg/mL)	Yüzey aktif madde* (mg/mL)
PLGA-9	RG 503	10	Pluronic F68 (2.5 mg/mL)
PLGA-10	RG 503	10	Pluronic F68 (5 mg/mL)
PLGA-11	RG 503	10	Pluronic F68 (10 mg/mL)
PLGA-12	RG 503	5	Pluronic F68 (2.5 mg/mL)
PLGA-13	RG 503	5	Pluronic F68 (5 mg/mL)
PLGA-14	RG 503	5	Pluronic F68 (10 mg/mL)
PLGA-15	RG 503	5	Pluronic F68 (1.5 mg/mL)
ATR-PLGA-16	RG 503	5	Pluronic F68 (1.5 mg/mL)
PLGA-17	RG503	5	Pluronic F68 (1 mg/mL)
ATR-PLGA-18	RG503	5	Pluronic F68 (1 mg/mL)

Yüzey aktif maddenin su fazı içerisindeki derişimidir.

3.2.3.2. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

3.2.3.2.1. Nanoçöktürme Yöntemi ile PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

PLGA-b-PEG nanopartikülleri bölüm 3.2.3.1.2' de verilen nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu amaçla belli miktardaki polimer aseton içerisinde çözdürülerek değişik derişimlerdeki polimer çözeltileri (5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL ve 40 mg/mL) hazırlanmıştır. Daha sonra seçilen polimer çözeltisi % 0,1 Pluronic F68 içeren 7,5 mL distile su içine enjektör yardımı ile eklenmiş ve manyetik karıştırıcı üzerinde 1 saat karıştırılmıştır. Ardından rotavaporda organik fazın ortamdan tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Aseton fazından arındırılmasının ardından nanopartikül süspansiyonu elde edilmiştir. Etkin madde yüklü olan formülasyonlarda ise 300 µL ATR stok çözeltilisinden alınarak (3,2 mg ATR) organik faz içerisine eklenmiştir. Benzer biçimde yüzey aktif madde kullanılmayan formülasyonlar da denenmiştir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında organik/su fazı oranı 2/3 ve 2.5/3 olmak üzere iki oran kullanılmıştır. Ayrıca nanopartiküler sistemlerin formülasyon çalışmalarında farklı PEG içeriğine (% 5, %10 ve %15) sahip PLGA-b-PEG kopolimeri kullanılmıştır.

Sonuç olarak polimer derişiminin, yüzey aktif maddenin, organik/su faz oranının ve farklı PEG içeriklerinin nanopartiküllerin boyutuna etkisi incelenmiştir.

3.2.3.2.2. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Polisorbat 80 ile Kaplanması

Hazırlanan nanopartiküllerin yüzeyleri polisorbat 80 ile kaplanarak, kaplama miktarının oluşan nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyeli ve salım özellikleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla; genel yöntemde verildiği gibi benzer şekilde belirlenen derişimlerde PLGA-b-PEG kopolimer çözeltileri aseton içinde hazırlanmıştır. Bu çözeltiye 3,2 mg ATR ilave edilerek genel yöntem ile nanopartiküller elde edilmiştir. Daha sonra nanopartikül formülasyonlarına, toplam polimer miktarı kadar polisorbat 80 eklenip manyetik karıştırma ortamında farklı sürelerde (30 dakika, 12 saat ve 24 saat) inkübasyonu sağlanmıştır. Polisorbat 80 ile kaplama işleminin zamanın fonksiyonu

olarak partikül boyutuna, zeta potansiyel ve etkin madde yükleme etkinliği üzerine etkileri incelenmiştir.

3.2.3.2.3. Floresan İşaretli PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Nanopartiküllere ait hücre sel alım çalışmalarının gerçekleştirilmesi için nanopartiküllere floresan bir boya olan Nil kırmızısı yüklenmiştir. Hidrofobik bir boya olan Nil kırmızısı, hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonu için biçilmiş kaftan olarak görülen nanoçöktürme tekniğinde nanopartiküllere yüksek oranda bağlanma göstermektedir. Bu amaçla %10 PEG içeriği oranına sahip PLGA-b-PEG kopolimerinin, derişimi 40 mg/mL olacak şekilde aseton içerisindeki çözeltisi hazırlanmıştır. Atorvastatin de tıpkı daha önce belirtilen şekilde 3,2 mg miktarında bu faza eklenmiştir ancak bu kez farklı olarak polimer ve ilacın eklendiği aseton fazına 0,5 mg/mL olacak şekilde Nil kırmızısı eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Aseton fazı/su fazı oranı 2.5/3 olacak şekilde aseton fazı su fazı üzerine enjektör yardımıyla eklendikten sonra aseton rotavapor ile uzaklaştırılmıştır. Polisorbat 80 kaplı olan nanopartiküller için polimer miktarı kadar polisorbat 80 eklenerek inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Floresan boyanın özelliğini kaybetmemesi amacı ile hazırlama kaplarının tümü ışık geçirmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılmıştır ve kullanıma kadar karanlık bir ortamda korunmuştur.

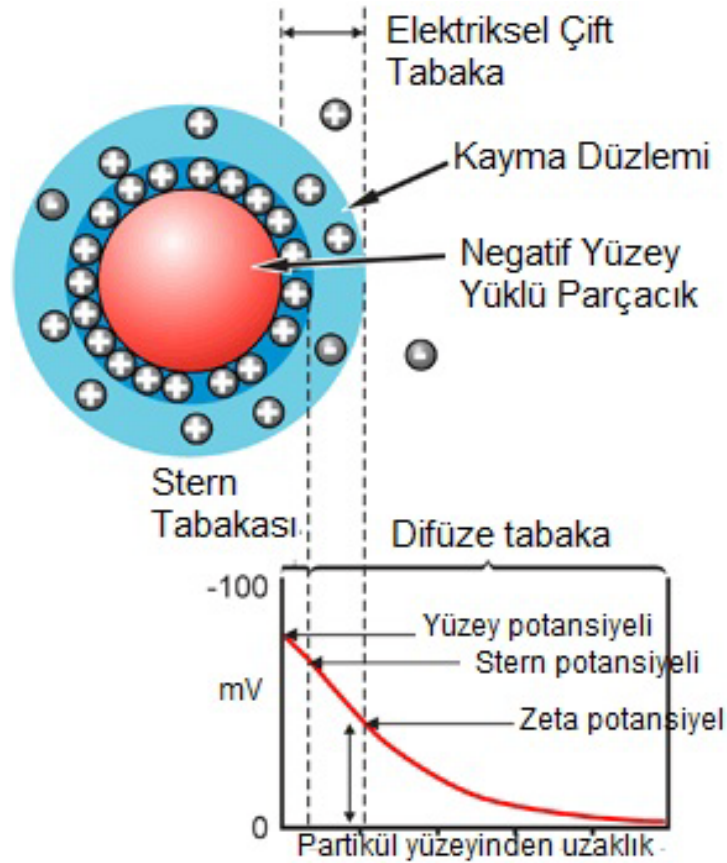
3.2.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

3.2.4.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılımları ve zeta potansiyelleri, Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Bu cihaz ile yapılan partikül büyüklüğü dağılımı tayinindeki temel prensip, dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin süspansiyon içinde Brownian hareketi yapmasına bağlı gelişen hareketlerinin ölçümüdür. Büyük boyutlu partiküllerin küçük olanlardan daha fazla ışık saçması sonucu boyut açısından hassas bir ölçüm yapılabilmekte ve özellikle agregasyon durumlarında stabil olmayan sistemler kolaylıkla ve hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir. Dinamik ışık saçılımı tekniği, Foton Korelasyon Spektroskopisi ya da Kuazi-Elastik Işık Saçılımı olarak da bilinmektedir.

Zeta potansiyeli, sulu ortamlarda partiküllerin yüzeyindeki iyonizasyon ya da yüzeylerine adsorbe olan iyonik maddelerin meydana getirdiği yüzey yükü olarak tanımlanmaktadır. Bu yüzey yüküne bağlı olarak partikülü çevreleyen iyonların dağılımı değişiklik göstermektedir. Partikül hareket ederken, bu iyon tabakası da onunla birlikte hareket etmekte, tıpkı bir parçası gibi davranmaktadır. Bu değer negatif ve pozitif her iki yönde de artması sonucu partiküller birbirini itmekte ve sistem kararlılığı korunmaktadır (Şekil 3.6.). Nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin ölçümü için kullanılan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı, bu potansiyeli ölçmek için süspansiyon boyunca bir elektriksel alan uygulamakta ve partiküllerin yüklerine bağlı olarak gelişen hareket hızlarını ölçerek bir hesaplama yapmaktadır [118].



Şekil 3.6. Zeta potansiyel [118].

3.2.4.2. Nanopartiküllerin AFM Analizleri

Hazırlanan nanopartiküllerin yüzey morfolojisi değerlendirilmesi ve görüntülenmesine yönelik olarak Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılmıştır.

Bu amaçla üretilen nanopartiküllerin hazırlanması için Bölüm 3.2.3.2.1'de verilen genel prosedür izlenmiştir. Bu amaçla üç farklı PEG içeriğine sahip kopolimer (% 5 PEG, %10 PEG, %15 PEG) kullanılmıştır. Hazırlama sırasında polimer derişimi 40 mg/mL ve aseton/su oranı 2/3 ve ATR miktarı 3,2 mg olarak kullanılmıştır.

Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerde ise kaplama işlemi Bölüm 3.2.3.2.2'de verildiği şekilde 12 saat inkübasyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen nanopartiküllerin boyutları ve zeta potansiyelleri ölçüldükten sonra AFM analizine geçilmiştir.

AFM analizi için nanopartikül süspansiyonlarından alınan 20µL örnek AFM için özel olarak hazırlanmış mika plakalara damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında kurumaları beklenmiştir. Ardından cihaz, dinamik modda (tapping mode), Buggetsensor Tap300-G model silikon uç kullanılarak (yarıçap < 10 nm), rezonans frekansı 300 kHz ve kuvvet sabiti 40 N/m değerlerinde çalıştırılmıştır. Uç açısı kantilever boyunca 20°-25°, yanlardan 25°-30° ve tepeden 10° olarak belirlenmiştir. Alınan görüntülerde ölçülen partikül boyutları Nanosizer cihazından alınan sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

3.2.4.3. FTIR Analizi

Hazırlanmış nanopartiküllerin kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla FTIR analizleri yapılmıştır. Bu amaçla üretilen nanopartiküller analiz edilmeden önce 1 gün boyunca liyofilizatörde tutularak kurutulmuş daha sonra KBr ile (% 1) karıştırılarak 10 tonluk pres yardımıyla peletleri hazırlanmış ve FTIR spektrumları alınmıştır.

Aynı zamanda PLGA-b-PEG polimeri, etkin madde ve polisorbat 80 için de örnekler hazırlanarak FTIR analizleri yapılmıştır.

3.2.5. Nanopartikül Üretim Veriminin Hesaplanması

Nanopartikül üretim veriminin belirlenmesi için üretilen nanopartiküller çöktürüldükten sonra süpernatant kısımları atılarak çökelti liyofilizatörde kurutulmuştur. Liyofilize nanopartiküllerin miktarı tartılarak aşağıda verilen formül ile nanopartikül üretim verimi hesaplanmıştır. Bu amaçla ilaç yüklü olan ve olmayan nanopartiküllerin her ikisi için de üretim verimi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Kullanılan polimer miktarı ile elde edilen nanopartikül miktarı belirlendikten sonra yüzde üretim verimi aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Üretim verimi} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: Nanopartiküllerin ağırlığı

B: Polimer ve etkin maddenin ağırlığı

3.2.6. Atorvastatin Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Etkin madde yükleme etkinliğinin belirlenmesine yönelik olarak nanopartikül formülasyonlarının hazırlama işlemi sırasında dış sulu fazda serbest halde kalan etkin madde miktarı tayin edilmiş ve dolaylı yoldan, nanopartikül içerisine hapsedilen madde miktarı hesaplanmıştır.

Bu amaçla, ilaç yüklü nanopartiküllerin bulunduğu süspansiyon 14000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra üst fazdan alınan örnek 0,22 µm por açıklığına sahip filtreden süzülerek Bölüm 3.2.2'de verilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek, etkin madde yükleme etkinlikleri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Etkin madde yükleme etkinliği (\%)} = \{(K1 - K2)/K1\} \times 100$$

- K1: Nanopartikül formülasyonu hazırlanmasında kullanılan Atorvastatin kalsiyum miktarı
- K2: Su fazında serbest halde nanopartiküllere yüklenmeden kalan Atorvastatin kalsiyum miktarı

3.2.7. İn-Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları

Hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salım çalışmaları için 12 saat polisorbata 80 kaplı nanopartiküller ve kaplı olmayan nanopartiküller kullanılarak salım profiline etkisi incelenmiştir. Bu amaçla üretilen nanopartiküller çöktürülerek “sink” koşullar sağlanacak miktarda pH 7,4 PBS içerisinde dağıtılmış ve nanopartikül süspansiyonu, 2 mL’lik eppendorf tüplere 4,2 mg nanopartikül içerecek şekilde eklenmiştir. Her bir örnek zamanı noktasında bir eppendorf tüpü kullanılacak şekilde hazırlanan numuneler, dakikada 50 devir olacak şekilde ayarlanan yatay çalkalamalı ve $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ’deki su banyosunda yerleştirilmiştir. Örnekler belirlenmiş zaman noktalarında alınarak 14000 rpm’de santrifüjlenmiş ve üst faz üzerinden salınan etkin madde miktarı Bölüm 3.2.2.’de açıklanan HPLC yöntemi ile analiz edilerek belirlenmiştir. HPLC yöntemi ile hesaplanan etkin madde miktarları zamana karşı grafiğe aktarılmış ve salım profilleri elde edilmiştir. Deneyler 3 tekrar üzerinden yapılmış ve % salınan madde miktarları standart hata çubukları ile verilmiştir.

3.2.8. Nanopartiküllerin Hücresel Alım Çalışmaları

Nanopartiküllerin hücresel alım çalışmaları için aseptik şartlarda genç sığır damarından izole edilen düz kas hücre (SMC) ve endotel hücre (EC) kaynakları kullanılmıştır. Laboratuvarımızda izole ve karakterize edilen SMC’ler ve EC’ler tabloda verilen hücre kültür ortamlarında çoğaltılmıştır. Daha sonra 1×10^4 hücre, 24 kuyucuklu petri kaplarına ekilerek inkübatörde (37°C ve % 5 CO_2) 48 saat kültür edilmiştir. Diğer taraftan floresan boya içeren nanopartikül süspansiyonu 0,22’lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Kuyucuklara, 5 mg/mL derişimindeki nanopartikül ve polisorbata 80 kaplı nanopartikül stok solüsyonlarından 100 μL ve 500 μL olmaküzere farklı miktarlarda (500 μg ve 2500 μg) ayrı ayrı eklenerek ardından 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası nanopartiküllerin hücresel alımları Leica DM 4000 Floresan mikroskop ile incelenerek, görüntüleri alınmıştır.

Çizelge 3.3. EC ve SMC hücre kültür ortamları

Endotel Hücre (EC) Kültür Ortamı	Düz Kas Hücre (SMC) Kültür Ortamı
DMEM	DMEM
% 10 FCS	% 20 FCS
% ₀ 1 Penisilin-Streptomisin	% ₀ 1 Penisilin-Streptomisin
% 1 Gentamisin	% 1 Gentamisin
% 1 L-glutamin	% 1 L-glutamin
125 µg/mL Heparin	

3.2.9. Nanopartiküllerin İn-Vivo Sistemlerde İncelenmesi

Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin beyne geçişleri hayvan deneyleri ile değerlendirilmiştir. Hayvan deneyleri fazı için Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 17. 08. 2010 tarihli toplantısında 10/44 karar numarası ile etik kurul izni alınmıştır. Bu incelemede 200-250 gram ağırlığında Wistar ırkı yetişkin erkek sıçanlar kullanılmıştır.

Bu amaçla deney hayvanlarına floresan işaretli nanopartiküller, polisorbit 80 kaplı (PNP) ve kapsız (NP) olmak üzere iki formda ayrı ayrı kuyruk venlerinden verilmiş ve belirlenmiş sürelerde (1 saat, 6 saat, 24 saat ve 48 saat) in-vivo görüntüleme sistemi (Kodak CareStream İn-vivo Imaging System FX Pro) ile izlenmiştir. Deney sırasında izlenen prosedür aşağıda verilmiştir.

Hayvan deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan nanopartiküller nanopartiküller 14000 rpm hızda 15 dakika boyunca çöktürülerek ard arda distile su ile yıkanmış ve serbest floresan boyadan arındırılmıştır. Bu nanopartiküller 50 mg/mL derişimde olacak şekilde fosfat tamponu (PBS) içerisinde süspande edilmiştir.

Deney hayvanlarının anestezileri amacı ile ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) kombinasyonu kullanılmıştır. Anestezik madde kombinasyonu intraperitoneal yol ile uygulanmıştır. Bu anestezik protokolü ile deneklerin lateral kuyruk venalarından enjeksiyon yapılması sırasında hareketsiz kalmaları için gereken düzeyde sedasyon sağlanmıştır.

Lateral kuyruk venasının görölür duruma gelmesi için deneklerin kuyruk ucundan tutulup hafifçe rotasyon yaptırılmış ve damar görölür hale geldiğinde alkol solüsyonu ile gerekli asepsi sağlanarak 23 “gauge” kalınlığında hipodermik bir iğne ile damara girilmiştir. İğnenin damar içinde olduğundan emin olabilmek ve hatalı enjeksiyon uygulamalarının önüne geçmek amacı ile önce % 0,9 NaCl solüsyonu ile ön enjeksiyon yapılmış ve iğnenin damar içinde olduğu anlaşıldıktan sonra nanopartikül solüsyonları enjeksiyonu yapılmıştır. Her bir deney hayvanına 15 mg/kg dozunda nanopartikül enjekte edilmiştir.

Uygulama olarak 1 saat, 6 saat, 24 saat ve 48 saat olmak üzere 4 zaman noktası belirlenmiş ve her bir zaman noktası için 3 adet deney hayvanı kullanılmıştır. Nanopartikül formülasyonları hayvanlara uygulandıktan sonra belirlenen bu zaman noktalarında in-vivo görüntüleme sistemi ile incelenmiştir. Herhangi bir formülasyon uygulanmayan hayvanlara ait incelemeler de yapılarak kontrol grubu oluşturulmuştur.

Deney hayvanlarının anestezileri sürerken Kodak CareStream In-vivo Imaging System FX Pro görüntüleme cihazı ile gerekli taramalar (X-ışını ve floresan taramalar) yapılmıştır.

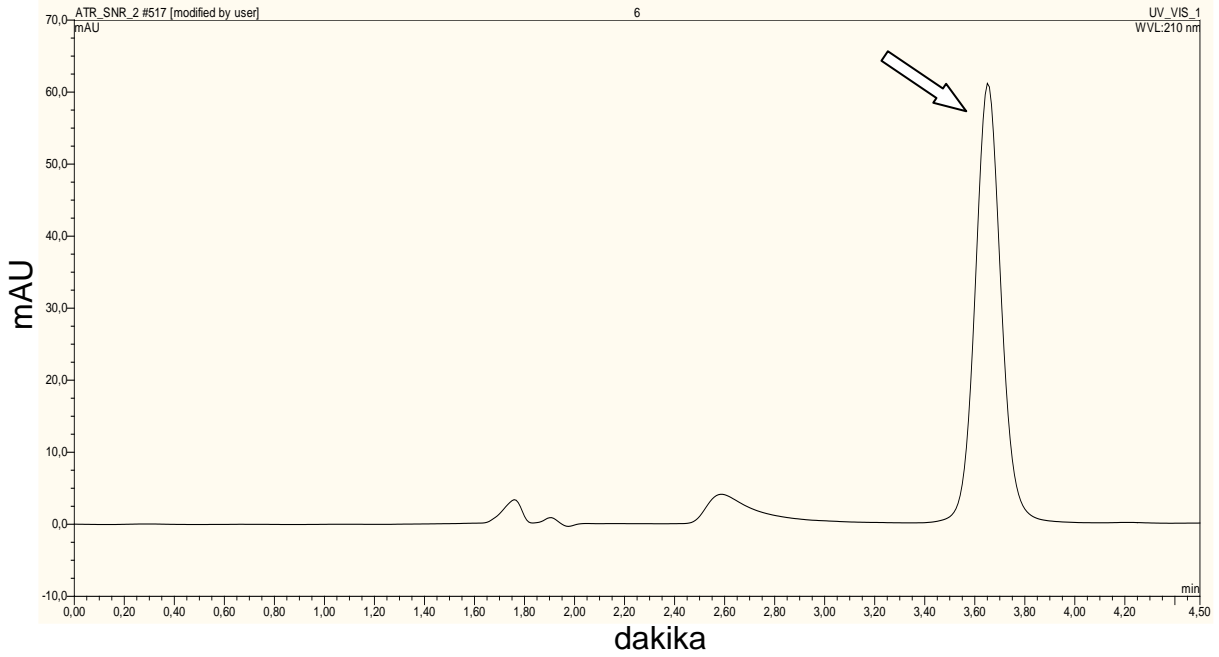
Deney hayvanlarının genel anestezileri devam ederken yüksek dozda pentobarbital sodium ile ötenazileri yapılmıştır. Ötenazi sonrasında foramen magnum’dan başlayarak calvarium kaldırılarak cerebrum ve cerebellum açığa çıkarılmış ve her iki anatomik yapı son derece nazik bir şekilde yerinden çıkarılarak in-vivo görüntüleme cihazında uygun filtreler ile taranarak kemik çatı olmadan yeniden değerlendirilmiştir.

Görüntüleme sisteminde Nil kırmızısına uygun olarak eksitasyon için 550 nm ve emisyon için 600 nm’lik filtreler kullanılmıştır. Görüntüler 1 dakikalık pozlama süresi ile elde edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Atorvastatin'in HPLC Yöntemi ile İn-Vitro Miktar Tayini

Atorvastatin'in in-vitro miktar tayinine ait kullanılan yöntem Bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem sonucunda Atorvastatin'e ait HPLC kromotogramı Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. Atorvastatin'e ait HPLC kromotogramı (6 µg/mL)

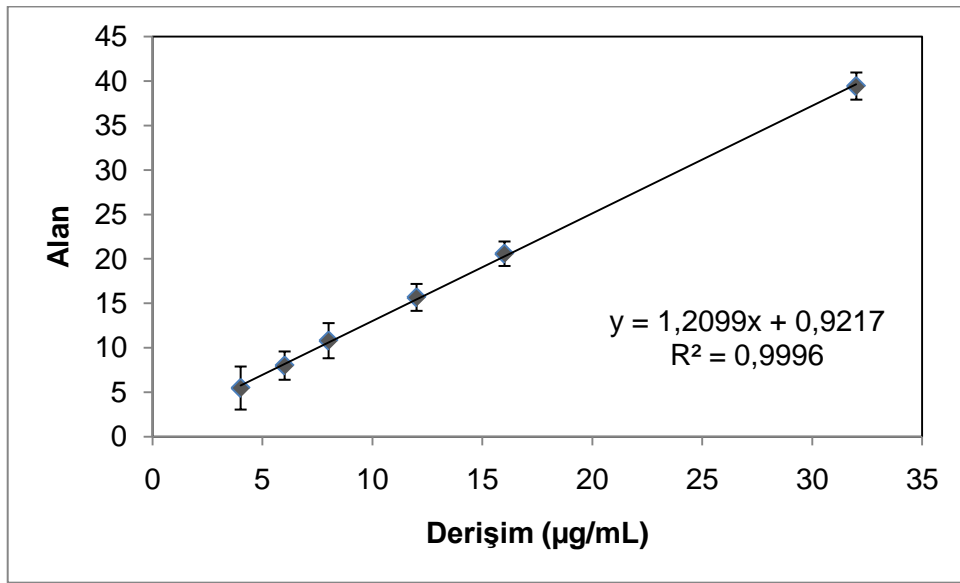
Atorvastatin'in in vitro miktar tayinine yönelik olarak kullanılan HPLC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon doğrusunun denklemi 4, 6, 8, 12, 16 ve 32 µg/mL derişimde hazırlanan Atorvastatin stok çözeltilerinden hareketle elde edilmiştir. 6 farklı seri üzerinden oluşturulan kalibrasyon doğrusunun denklemi ve korelasyon katsayıları ayrı ayrı hesaplanarak ortalama değerler üzerinden oluşturulan grafik Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

4.1.1. İn-Vitro Miktar Tayin Yönteminin Validasyonu

Atorvastatin'in in vitro miktar tayin yönteminin validasyonuna yönelik olarak Bölüm 3.2.2.2.'de açıklanan şekilde doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgünlük, duyarlılık ve kararlılık ölçütleri çalışılmıştır.

4.1.1.1. Doğrusallık

Bölüm 3.2.2.2.1.'de açıklandığı gibi, Atorvastatin'in 400 µg/mL derişimdeki ana stok çözeltilisinden hareketle hazırlanan ikincil stok üzerinden yapılan 4, 6, 8, 12, 16 ve 32 µg/mL derişimdeki seyreltmeler yapılmıştır. Bu kalibrasyon noktalarının pik alanlarına karşı doğrusal regresyonunun yapılması sonucunda elde edilen doğrunun tanımlayıcılık katsayısı 0,9996 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak kullanılan analitik yöntemin 4-32 µg/mL derişim aralığında doğrusallığı gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Atorvastatin'e ait kalibrasyon doğrusu.

4.1.1.2. Doğruluk

Bölüm 3.2.2.2.2.'de açıklandığı gibi seçilen 4, 8 ve 32 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltilerin kullanılan analiz yöntemi ile pik alanları elde edilmiş ve gerçek değerlerine olan yakınlık dereceleri hesaplanmıştır. Bu değerlerin % geri kazanım sonuçları Çizelge 4.1.'de gösterilmektedir. Hesaplanan varyasyon katsayıları % 2'den küçük bulunmuştur ve yöntemin doğruluğu ispatlanmıştır.

Çizelge 4.1. Analiz Yönteminin Doğruluk Bulguları

	Eklenen Derişim ($\mu\text{g/mL}$)			% Geri Kazanılan		
	4	8	32			
Tayin Edilen Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	3,958	8,107	32,124	98,961	101,344	100,389
	3,885	8,342	31,733	97,128	104,286	99,168
	3,817	8,088	31,599	95,431	101,112	98,479
	3,988	8,395	31,621	99,721	104,940	98,816
	3,831	8,242	32,098	95,783	103,029	100,308
	3,842	8,368	31,310	96,062	104,609	97,844
Ortalama	3,887	8,257	31,748	97,181	103,220	99,212
S.S.	0,071	0,134	0,315	1,783	1,675	0,983
V.K.	1,834	1,623	0,991	1,834	1,623	0,991

4.1.1.3. Kesinlik

Bölüm 3.2.2.2.3'te açıklandığı gibi analitik yöntemin kesinliğinin gösterilebilmesi için tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik sonuçları çalışılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.2. ve Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Hesaplanan varyasyon katsayılarının tümü % 2'den küçük bulunmuştur. Böylece yöntemin kesinliği ispatlanmıştır.

Çizelge 4.2. Tekrarlanabilirlik Sonuçları

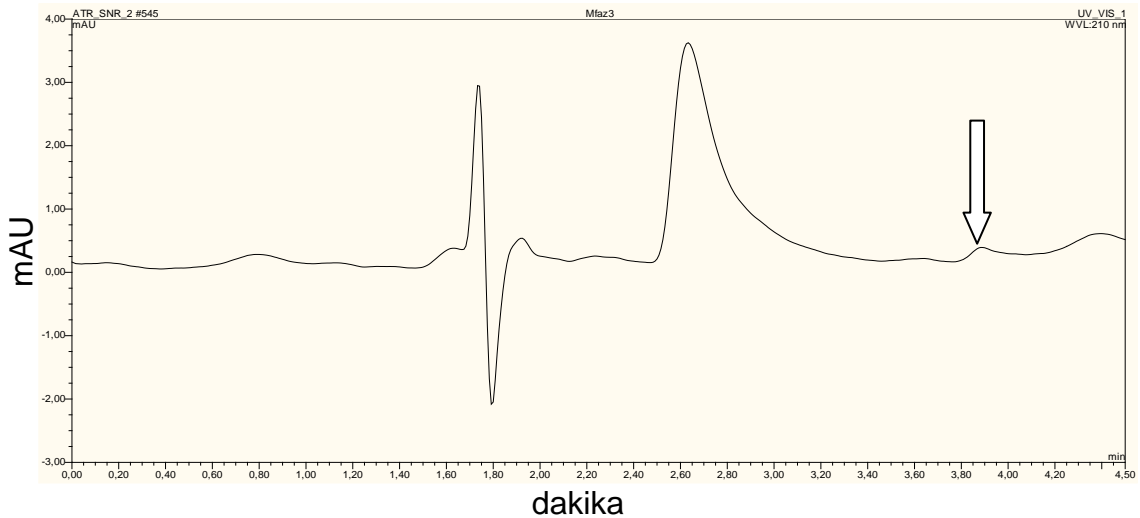
N	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)		
	4	8	32
1	3,928	8,096	31,965
2	3,997	8,140	31,957
3	3,960	8,145	31,994
4	3,955	8,097	32,000
5	3,971	8,090	31,840
6	3,937	8,083	31,924
Ortalama	3,958	8,108	31,948
S.S.	0,024	0,026	0,058
V.K.	0,623	0,332	0,182

Çizelge 4.3. Tekrar Elde Edilebilirlik Sonuçları

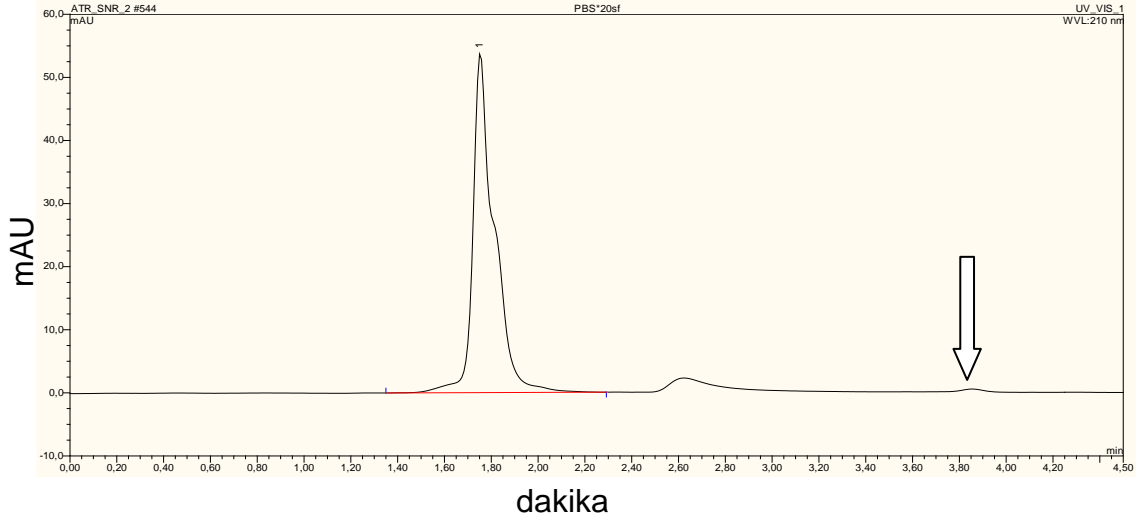
N	Derişim ($\mu\text{g/mL}$)		
	4	8	32
1	3,958	8,107	32,124
2	3,885	8,342	31,733
3	3,817	8,088	31,599
4	3,988	8,395	31,621
5	3,831	8,242	32,098
6	3,842	8,368	31,310
Ortalama	3,887	8,257	31,748
S.S.	0,071	0,134	0,315
V.K.	1,834	1,623	0,991

4.1.1.4. Özgüllük

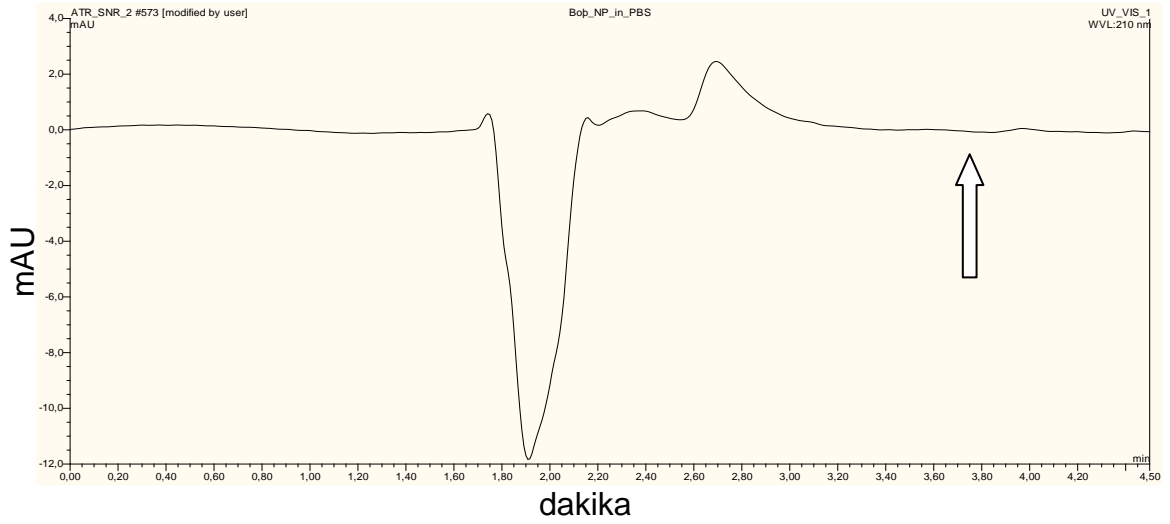
Bölüm 3.2.2.2.4.'te açıklandığı şekilde, mobil faz, salım ortamı (PBS) ve PBS içerisindeki boş nanopartikül numunelerinin HPLC kromatogramları alınmıştır. Mobil faza ait kromatogramda (Şekil 4.3.), in-vitro salım ortamı (PBS)'e ait kromatogramda (Şekil 4.4.) ve PBS içerisinde bulunan ilaç yüklü olmayan nanopartiküllere ait kromatogramda (Şekil 4.5.) Atorvastatin tayin noktasında herhangi bir başka sinyal bulunmadığı ispatlanmış ve yöntemin özgüllüğü ortaya koyulmuştur.



Şekil 4.3. Mobil faza ait kromatogram



Şekil 4.4. İn vitro salım ortamına (PBS) ait kromotogram



Şekil 4.5. PBS içerisinde ilaç yüklü olmayan nanopartiküllere ait kromotogram

4.1.1.5. Duyarlılık

Kullanılan analitik yöntemin duyarlılığının belirlenmesi için Bölüm 3.2.2.2.5.'de belirtildiği şekilde uygulanmış ve miktar tayin sınırı 1,44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve saptama sınırı 0,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak tayin edilmiştir.

4.1.1.6. Kararlılık

Bölüm 3.2.2.2.6.'da açıklandığı şekilde Atorvastatin'in 4, 8 ve 32 µg/mL derişimde hazırlanan çözeltisi belirtilen koşullarda analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir (n=3). Bu sonuçlara göre; salım süresi boyunca (72 saat) etkin maddenin kararlılığı kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.4. Kararlılık verileri (n=3)

Derişim (µg/mL)	t = 0 saat	t = 72 saat
4	3,962±0,034	4,019±0,137
8	8,126±0,026	8,536±0,152
32	31,971±0,019	33,896±0,661

4.2. PLGA Nanopartikülleri

4.2.1. Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Hazırlanan PLGA Nanopartikülleri

Nanopartikül üretim tekniklerinden emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak çeşitli parametrelerde yapılan değişiklikler incelenmiştir. Bu incelemelerde amaç, uygun partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin agregasyon sorunu yaşanmaksızın hazırlanabilmesidir.

Bu nanopartiküller arasında öncelikle hazırlanmasında yüksek devirli homojenizatör kullanılanlarda yüzey aktif madde olarak PVA kullanılarak üretilen nanopartiküller (PLGA-1) ile PVA'nın yanında sodyum oleat da kullanılarak üretilen nanopartiküller (PLGA-2) boyut ve zeta potansiyel açısından karşılaştırılmıştır. Sürfaktan olarak PVA ile birlikte sodyum oleatın da eklenmesiyle partikül boyutu anlamlı miktarda artarken zeta potansiyel de mutlak değer olarak büyümüştür ki bu da süspansiyon kararlılığının iyileştirilmiş olması anlamına gelmektedir. Ancak bu sürfaktan kombinasyonu sonucu üretilen nanopartiküllerin ardarda hazırlanmalarında boyutları açısından standart sapmaları daha yüksek

bulunmuştur. Bu durumda, sodyum oleatın formülasyona eklenmesi zeta potansiyel değerini artırarak sistemin kararlılığını yükseltiyor olsa da ortalama partikül boyutu değerlerine ait standart sapmayı çok yüksek seviyelere çekmekte ve sistemin tekrar hazırlanabilmesi açısından güvenilirliğini bozmaktadır. Ayrıca her iki formülasyonda da agregasyonların bulunması uygun şartların sağlanmadığını belirtmektedir.

Monodispers bir sistemin elde edilmesini sağlamak için yapılan denemelerden biri olan PLGA-3 nanopartiküllerinde ise yüzey aktif maddenin değiştirilmesi planlanmıştır. Bu amaçla yüzey aktif madde olarak noniyonik bir yüzey aktif madde olan ve toksik özellik göstermeyen Pluronic F88 kullanılmıştır [119]. Bu şekilde üretilen nanopartiküllerin boyutları $509,6 \pm 8,202$ nm olarak bulunmuştur. Partikül boyutunun oldukça artmasının yanında boyut dağılımında iki tepeli pikler gözlenmiş ve agregasyon problemi bu şekilde de ortadan kaldırılamamıştır.

Çizelge 4.5. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerine ait boyut, yüzey yükü ve agregasyon sonuçları (n=3).

Nanopartikül	Ortalama Boyut (nm)	Zeta Potansiyel (mV)	Agregasyon
PLGA-1	$291,9 \pm 5,688$	$-6,286 \pm 1,674$	+
PLGA-2	$384,9 \pm 50,96$	$-10,25 \pm 0,143$	+
PLGA-3	$509,6 \pm 8,202$	-	+
PLGA-4	$316,2 \pm 3,802$	$-3,847 \pm 1,322$	++
PLGA-5	$140,6 \pm 3,704$	-	++

Emülsifiye edici olarak yüksek devirli homojenizatör (ultraturaks) yerine ultrasonik prob kullanılarak hazırlanan PLGA-5 nanopartiküllerinin boyutları oldukça küçültülmüş, $140,6 \pm 3,704$ nm olarak bulunmuştur. Ancak bu üretimde de fazla miktarda agregasyon göze çarpmaktadır. Sonuç olarak emülsifikasyon işleminin farklı bir şekilde yapılması da monodispers bir sistem elde edilmesini sağlamamıştır. Ancak partikül boyutunun açık bir şekilde azalmış olması ultrasonik prob ile yapılan emülsifikasyon işleminde oluşturulan damlacıkların çok daha

küçük olduğunu düşündürmektedir, zira bu yöntemde oluşan emülsiyon sistemindeki damlacıkların boyutları ile çözücü uzaklaştırıldığında elde edilen partiküllerin boyutu doğru orantılıdır [120].

Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yönteminde yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucu agregasyon probleminin önüne geçilememiştir. Bununla birlikte enkapsüle edilmesi planlanan ilaç etkin maddesi olan Atorvastatin'in hidrofobik karakteri de göz önünde bulundurularak daha yüksek enkapsülasyon etkinliği göstermesi beklenen nanoçöktürme tekniği ile nanopartiküller hazırlanmıştır.

4.2.2. Nanoçöktürme Yöntemi ile Hazırlanan PLGA Nanopartiküller

Nanoçöktürme yönteminde farklı polimer ve yüzey aktif madde derişimleri kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin (PLGA-9, PLGA-10, PLGA-11, PLGA-12, PLGA-13, PLGA 14) boyutları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.6). Buna göre; polimer derişiminin artışı tüm yüzey aktif madde derişimleri için partiküllerin büyümesine neden olmuştur. Polimer derişiminin bu etkisi daha önceden literatürde belirtilen bilgilerle örtüşmektedir [121]. Ancak aynı polimer derişiminde, yüzey aktif madde derişiminin partikül boyutuna etkisi için bir ilişki kurulamamıştır. Ayrıca hazırlanan bu formülasyonlarda 100 nm'nin altında ortalama partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller (PLGA-12) üretilmiştir. Üretilen nanopartiküllerin hiçbirinde agregasyon sorunu gözlenmemiş, polidispersite endeksleri incelenerek her defasında dar partikül boyutu dağılımına sahip sistemler elde edildiği ortaya koyulmuştur (Çizelge 4.7.)

Çizelge 4.6. Polimer ve yüzey aktif madde derişiminin nanopartikül boyutuna etkisi.

[Yüzey Aktif Madde] [Polimer]	2,5 mg/mL Pluronic F68	5 mg/mL Pluronic F68	10 mg/mL Pluronic F68
10 mg/mL RG 503	(PLGA 9) 134,3 ± 1,301 nm	(PLGA 10) 121,06 ± 1,101 nm	(PLGA 11) 147,766 ± 0,251 nm
5 mg/mL RG 503	(PLGA 12) 88,45 ± 1,413 nm	(PLGA 13) 103 ± 1,442 nm	(PLGA 14) 104,833 ± 0,251 nm

Çizelge 4.7. Polimer ve yüzey aktif madde derişiminin polidispersite endeksine etkisi.

[Yüzey Aktif Madde] [Polimer]	2,5 mg/mL Pluronic F68	5 mg/mL Pluronic F68	10 mg/mL Pluronic F68
10 mg/mL RG 503	(PLGA 9) 0,123 ± 0,016	(PLGA 10) 0,11 ± 0,007	(PLGA 11) 0,087 ± 0,009
5 mg/mL RG 503	(PLGA 12) 0,105 ± 0,031	(PLGA 13) 0,095 ± 0,024	(PLGA 14) 0,102 ± 0,003

Etkin madde yüklü nanopartiküllerde de sürfaktan derişiminin etkisini incelemek amacıyla üretilen nanopartiküllerin (PLGA-15, ATR-PLGA-16, PLGA-17, ATR-PLGA-18) boyutları karşılaştırılmıştır. Buna göre 1,5 mg/mL Pluronic F68 derişimine sahip olan formülasyonda, 1 mg/mL Pluronic F68 derişimine sahip olan formülasyona göre daha küçük nanopartiküller üretilmiş ve etkin madde yüklü olan nanopartiküllerin etkin madde yüklü olmayanlardan daha büyük partikül büyüklüğüne sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Yüzey aktif madde derişiminin etkin madde yüklü olan ve olmayan partiküllerin boyutuna etkisi.

[Yüzey Aktif Madde] Formülasyon Tipi	1,5 mg/mL Pluronic F68	1 mg/mL Pluronic F68
Etkin madde yüklü olmayan nanopartiküller	(PLGA-15) 69,936 ± 1,162 nm	(PLGA-17) 92,483 ± 1,296 nm
Etkin madde yüklü nanopartiküller	(ATR-PLGA-16) 85,796 ± 3,418 nm	(ATR-PLGA-18) 97,383 ± 1,26 nm

4.3. PLGA-b-PEG Nanopartikülleri

Giriş kısmında bahsedildiği üzere PLA, PGA ve bunların kopolimeri olan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerleri çeşitli biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Özellikle amorf yapıları PLGA kopolimerleri yapısındaki PLA and PGA oranının değiştirilmesi ile spesifik uygulamalara özel bozunum kinetikleri sağlayabilmeleri; hidroliz ve enzimatik yollarla insan vücudunda bozunabilmesi ve bozunma ürünlerinin üre olarak atılabilmesi ya da trikarboksilik asit döngüsüne katılabilmesi ve en önemlisi, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nden (FDA) klinik uygulamalar için onay almış olması sayesinde farmasötik ve biyomedikal alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bütün popülerliğine rağmen, PLGA kopolimerlerinin diğer biyobozunur polimerler gibi sahip olduğu güçlü hidrofobik özellikleri pratik uygulamalarda bazı sınırlamalara yol açar.

Diğer taraftan bu polimerlerin yapısına poli(etilen glikol) (PEG) gibi biyoyumlu ve hidrofilik bir polimerin eklenmesi, polimerik malzemeye hidrofilik karakter kazandırmakta ve polimerin spesifik uygulamalara yönelik değişik fiziko-kimyasal özellikler kazandırmaktadır [122]. Bunlara ek olarak, yüksek orandaki polimer zinciri esnekliği sayesinde, PEG polimer birimleri serbest dönme hareketleri ve yüksek hidrofilik karakterleriyle, hidrofobik polimer yapısını perdeleyerek retiküloendotelial sistem (RES) tarafından tanınmayı geciktirici bir hidrofilik sterik etki yarattığı giriş kısmında bahsedilmiştir.

Bu bilgiler ışığında PLGA-b-PEG kopolimerlerin farmasötik ve biyomedikal alanda olan mevcut potansiyellerinin daha artacağı aşikardır. Bu nedenlerden dolayı çalışmalarımıza amfifilik PLGA-b-PEG polimerleri ile devam edilmiştir. Bu polimerler ile suda çözünmeyen bloklardan çekirdek ve hidrofilik bloklardan oluşan kabuk şeklinde nano yapılar oluşturularak, bu yapılara Atorvastatin yüklenmiştir.

Nanopartiküllerin üretiminde, PLGA-b-PEG polimerindeki farklı PEG içerikleri ve farklı polimer derişimleri kullanılarak bu parametrelerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerlerine etkileri incelenmiş ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.3.1. PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Etkisi

5 mg/mL polimer derişimi kullanılarak hazırlanan, aseton fazı ile Pluronic F68 içeren su fazı oranının 2/3 olarak belirlendiği ve polimer olarak PLGA-b-PEG kopolimerinin farklı PEG içeriğine sahip çeşitleri ile hazırlanan nanopartiküllerin boyut ve PDI değerleri Çizelge 4.9 verilmiştir. Sonuçlara göre diblok kopolimer içerisindeki PEG oranı arttıkça partikül boyutunun küçüldüğü görülmüştür.

PLGA-b-PEG kopolimeri kendisini meydana getiren PLGA ve PEG polimerlerinden farklı özellikler gösterirler ve bu sebeple kendilerine has mikrofaz ayırımları, kristallikleri, çözünürlükleri vardır. Nanopartiküllerin büyüklükleri polimer derişimi, polimerdeki hidrofilik/hidrofobik blokların oranları ve kullanılan çözücüdeki bağlı çözünürlükleri, sıcaklık, pH, gibi parametrelere göre değişmektedir. Bu nedenlerle blok polimerdeki PEG oranının artmasıyla nanopartikül boyutlarının küçülmesinin nedeni olarak polimerdeki PEG miktarının artmasıyla, PEG'in yüzey aktif madde gibi davranarak oluşan partiküllerde kararlılığı artırdığı düşünülmektedir [123].

Çizelge 4.9. Kullanılan diblok kopolimerdeki PEG oranının nanopartiküllerin boyutuna ve polidispersite endeksine etkisi.

Kullanılan diblok kopolimerdeki PEG içeriği	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
% 5	48,73 ± 0,274 nm	0,156 ± 0,007
% 10	34,81 ± 0,289 nm	0,221 ± 0,009
%15	33,86 ± 0,265 nm	0,114 ± 0,011

Yüzey aktif madde kullanılmadan hazırlanan nanopartiküller için % 10 oranında PEG içeren ve farklı kopolimer derişimleri (5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL, 40 mg/mL) ile hazırlanan nanopartiküllerin boyutları incelenmiş ve sonuçlar çizelge 4.10'da verilmiştir. Sonuçlara göre % 10 oranında PEG içeren diblok kopolimerin derişimindeki artış ortalama partikül boyutunun 130 nm'ye kadar artmasına neden olmuştur. Bu artışın sebebi olarak 2 etki gösterilmektedir. Birincisi artan polimer derişimi ile birim miktar çözücü başına düşen polimer zinciri sayısı artmakta ve nanoçöktürme tekniğinde su fazına difüze olan organik çözücünün taşıdığı artmış polimer miktarına bağlı olarak daha büyük polimer agregasyonları oluşmakta ve

daha büyük nanopartiküller oluşmaktadır. İkincisi ise; artan polimer derişiminde bağlı olarak artan organik faz viskozitesi sonucu kütle transfer direncinin yükselmesidir [124-126].

Ayrıca tüm sistemlerin partikül büyüklüğü dağılımlarının monodispers sistemlere yakın olduğu izlenmiştir. Bundan sonraki çalışmalar için nanopartikül formülasyonlarında polimer derişiminin 40 mg/mL kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.10. PLGA-b-PEG kopolimer derişiminin boyut ve PDI üzerine etkisi

PLGA-b-PEG Derişimi	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI
5 mg/mL	29,84 + 0,211	0,151 ± 0,012
10 mg/mL	34,51 ± 0,197	0,189 ± 0,010
20 mg/mL	42,54 ± 0,199	0,339 ± 0,009
40 mg/mL	130,0 ± 0,156	0,184 ± 0,011

Aseton/su fazı oranı 2/3 olarak kullanılmıştır.

4.3.2. Polisorbat 80 Kaplamanın Nanopartikül Büyüklüğü ve Dağılımına Etkisi

Bu bölümde hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında polimer derişimi yukardaki veriler ışığında 40 mg/mL ve aseton/su fazı 2,5/3 oranında kullanılmış, ortama 3,2 mg Atorvastatin eklenmiştir. Polimer içindeki PEG'in yüzey aktif madde etkisi gösterdiği düşünülerek, ortamda yüzey aktif madde kullanılmamıştır [123].

Farklı PEG içerikleri ile nanopartiküller hazırlanmış ve aynı zamanda Bölüm 3.2.3.2.2. belirtildiği gibi farklı inkübasyon sürelerinde polisorbat 80 ile kaplanmıştır. Farklı PEG içerikleri ile hazırlanan nanopartiküllerin (NP) ve polisorbat kaplı nanopartiküllerin (PNP), partikül boyutu, yüzey yükü ve ilaç yükleme etkinlikleri karşılaştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Aynı polimer derişiminde (40 mg/mL) aseton/su fazı oranının 2/3'ten 2,5/3'e çıkarılmasıyla partikül boyutunun yaklaşık 130 nm'den 153 nm'ye arttığı gözlenmiştir. Literatürde de belirtildiği gibi organik/su fazları oranının artması faz ayrımını zayıflatmakta ve bunun sonucu olarak boyuttaki bu artışın gerçekleştiği

düşünülmektedir [109]. Etkin madde içermeyen nanopartiküllerin boyutu ortalama 147 nm olarak bulunmuştur.

PLGA-b-PEG polimerindeki PEG oranının % 5'ten % 15'e artmasıyla nanopartiküllerin boyutlarının 172 nm'den 69 nm'ye azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni; oluşmakta olan nanopartiküllerin yüzeyindeki PEG zincirlerinin oluşan dispersiyonu stabilize etmesi şeklinde açıklanmaktadır [123]. Polimer derişiminin artmasıyla % PEG oranının partikül büyüklüğüne etkisi de net olarak görülmüştür. Ayrıca % 5 PEG içeren nanopartiküllerin üretiminde agregasyon sorunu yaşanırken % 15 PEG içeren polimerlerde bu sorun gözlenmemiştir.

Sonuç olarak blok kopolimerdeki % PEG oranının değiştirilmesiyle istenilen boyutta nanopartiküllerin hazırlanabilmesi mümkündür.

Nanopartikülleri polisorbata 80 ile kaplamanın partikül büyüklüğüne ve zeta potansiyele etkisi incelendiğinde, polisorbata 80 kaplamanın nanopartiküllerin boyutunu artırdığı gözlenmiştir. Bu fiziksel kaplamada maksimum adsorpsiyonun ilk 30 dakikada tamamlandığı, ancak 30 dakikadan sonra devam eden kaplama işleminin nanopartiküllerin boyutlarında anlamlı bir değişmeye neden olmadığı gözlenmiştir. Polisorbata 80 ile nanopartikül yüzeyinin kaplanmasında ilk yarım saatin yeterli olduğu düşünülmüştür.

% 5 ve % 10 PEG içeren nanopartiküllerde, polisorbata 80 kaplamanın nanopartiküllere ait zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişim yaratmadığı ancak % 15 PEG içeren nanopartiküllerde bu değerlerin mutlak olarak azaldığı görülmüştür. Bunun, nanopartiküllerin yüzey alanının artması ve aynı zamanda polisorbata 80'in noniyonik yapısı nedeniyle partikül yüzeyindeki yükleri nötralize etme eğiliminden kaynaklandığı düşünülmekte ve bu sonuç literatür ile uyumaktadır [112].

Üretilen tüm nanopartiküllerin polidispersite endekslerinin uygun olduğu ve monodispers sistemlere yakın bulunduğu gözlenmiştir. Ancak üretim sırasında, % 5 PEG oranına sahip kopolimer ile üretilen nanopartiküllerde gözle görünür derecede agregasyon bulunduğu belirtilmelidir. Bu agregasyonlar, ölçümler yapılmadan önce 3000 rpm dönüş hızında 3 dakika boyunca santrifüjlenerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bu agregasyonların sebebinin yüzey aktif madde

kullanılmaması ve düşük oranda PEG içeren polimerle hazırlanması nedeniyle oluşan partiküllerin yüzey stabilizasyonunun yeteri derecede sağlanamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Polisorbat 80 kaplamanın yüzey yükünü sıfıra yaklaştırması eğilimi daha önceki çalışmalar ile gözlenmiştir. Özellikle %15 PEG oranına sahip kopolimer ile üretilen nanopartiküllerin bu bilgiyi açıkça yansıttığı ortadadır.

Nanopartiküllerde etkin madde yükleme etkinliğinin, artan % PEG miktarı ile azaldığı gözlenmiştir. % PEG oranının 15'ten 5'e azalırken etkin madde yükleme etkinliği % 17' den % 51'e çıkmaktadır. Atorvastatin'in hidrofobik yapısından dolayı polimerdeki hidrofobik blokların artmasıyla daha fazla etkileşmesinin bu artışa neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca PEG içeriğinin azalmasına bağlı olarak partiküllerin boyutunun artması da ilaç enkapsülasyonunu arttırmıştır.

Polisorbat 80 kaplama süresinin artmasıyla nanopartiküllerde etkin madde yükleme miktarının düştüğü gözlenmiştir. Bunun nedeni, partiküllerin kaplama ortamı ile inkübasyonu sırasında etkin maddenin dış faza kaçmasıdır. Sonuç olarak in-vitro ve in-vivo uygulamalar için nanopartiküllerin polisorbat 80 ile 30 dakika kaplanmasının yeterli olacağı düşünülmektedir.

Çizelge 4.11. Farklı PEG içeriğine sahip PLGA-b-PEG kopolimerle ile hazırlanan nanopartiküllerde polisorbata 80 kaplamanın ortalama partikül boyutu, PDI, zeta potansiyel ve etkin madde yükleme etkinliği üzerine etkisi (n=3)

Diblok Kopolimerlerdeki PEG içeriği (%)	Polisorbat 80 Kaplama Süresi	Ortalama Nanopartikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	Etkin Madde Yükleme Etkinliği (%)
% 5	-	172,3 ± 3,341	0,139 ± 0,007	-10,77 ± 0,757	51
	30 Dakika	181,9 ± 3,081	0,207 ± 0,006	-11,6 ± 1,27	-
	12 Saat	184,1 ± 1,457	0,222 ± 0,010	-11,3 ± 0,577	11
	24 Saat	183,1 ± 3,317	0,215 ± 0,019	-11,3 ± 0,608	-
% 10	-	147,5 ± 1,002	0,129 ± 0,011	-19,2 ± 1,46	Etkin madde içermemektedir
	-	153,6 ± 0,550	0,219 ± 0,003	-11,1 ± 0,265	31
	30 Dakika	158,1 ± 1,477	0,219 ± 0,009	-9,77 ± 0,757	-
	12 Saat	158,8 ± 1,572	0,220 ± 0,007	-10,7 ± 0,977	9
	24 Saat	158,4 ± 1,609	0,218 ± 0,006	-8,90 ± 0,366	-
%15	-	69,15 ± 1,462	0,139 ± 0,011	-8,75 ± 2,12	17
	30 Dakika	75,25 ± 1,878	0,153 ± 0,005	-5,77 ± 0,723	-
	12 Saat	75,95 ± 1,158	0,146 ± 0,011	-3,30 ± 0,111	2
	24 Saat	76,48 ± 0,9564	0,156 ± 0,006	-3,19 ± 0,239	-

*40 mg/mL polimer derişimi ve 5/6 aseton/su fazı oranı ile üretilen nanopartiküllere ait değerlerdir.

4.4. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Üretim Verimi

Hazırlanan etkin madde içermeyen nanopartiküllerin üretim verimi % $51,7 \pm 2,9$ (n=6) ve Atorvastatin içeren nanopartiküllerin üretim verim % $48,8 \pm 3,9$ olarak bulunmuştur (n=6). Atorvastatin yüklenmesinin üretim verimi üzerinde anlamlı bir değişiklik sağlamadığı belirlenmiştir.

4.5. PLGA-b-PEG Nanopartikül Sistemlerinin AFM Analizleri

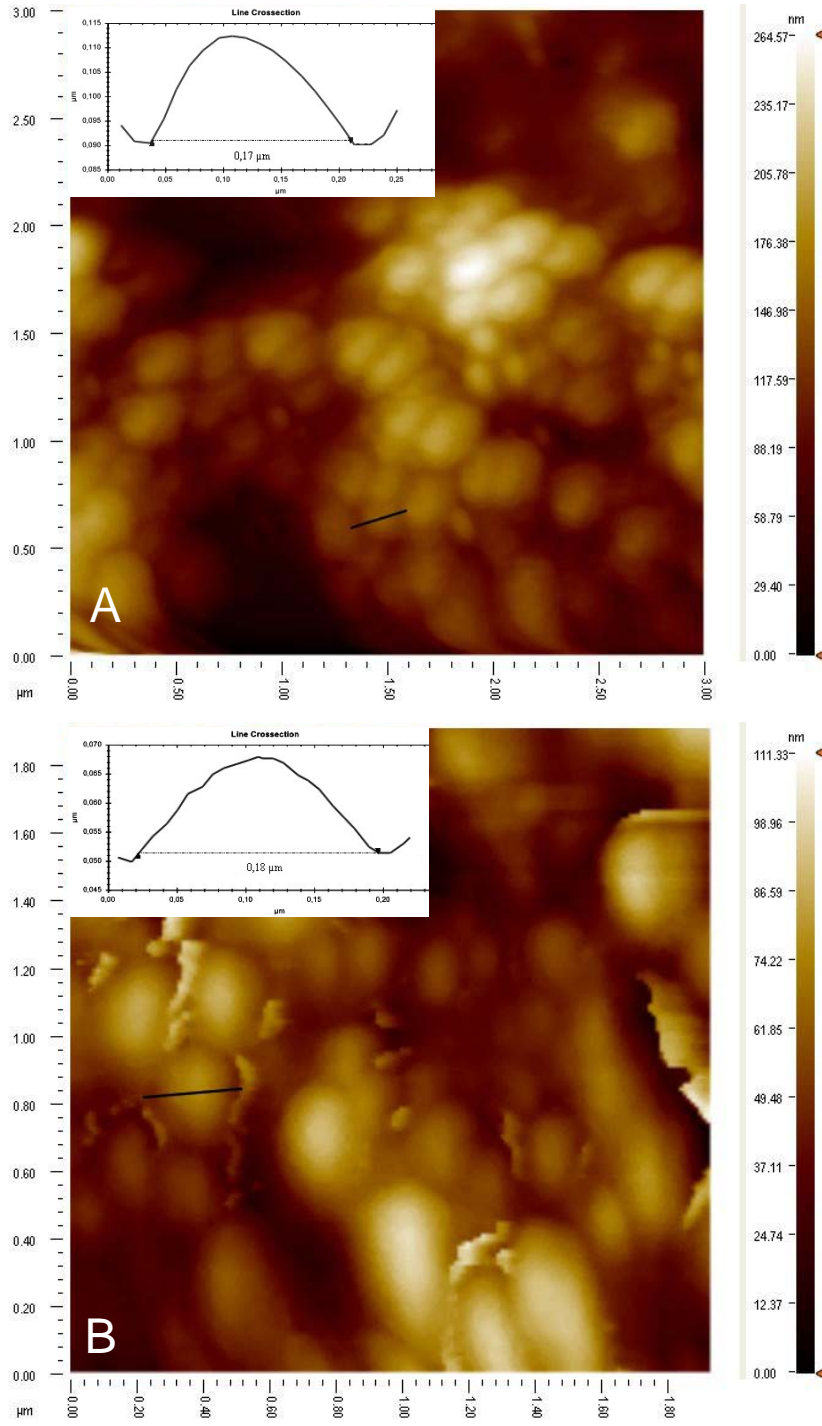
Nanopartiküllerin morfolojilerinin incelenmesi amacıyla nanopartikül formülasyonlarında polimer derişimi 40 mg/mL ve aseton/su fazları 2/3 oranında kullanılmış olup ortama 3,2 mg Atorvastatin eklenmiştir. Farklı PEG içeriği oranına sahip polimerler ile üretilen nanopartiküllere ait AFM görüntüleri incelenmiş, Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile yapılan ortalama partikül boyutu ölçümleri ile bu görüntüler karşılaştırılmıştır.

% 5 PEG oranına sahip kopolimer ile üretilen nanopartiküllerdeki agregasyon 3000 rpm dönüş hızında 3 dakika boyunca santrifüjleme işlemi yapılarak giderildikten sonra AFM ile inceleme yapılmıştır. Boyut ölçüm cihazı ile yapılan ölçümler sonucu ortalama $169,5 \pm 2,169$ nm boyutunda ölçülen polisorbata 80 kaplı olmayan nanopartiküllere ait AFM görüntüleri bu boyut ile uyum içindedir. Polisorbata 80 kaplı nanopartiküllerde ise ortalama boyut $177,2 \pm 0,8214$ nm olarak ölçülmüştür ve bu değer de yine aynı örneğe ait AFM görüntüsü ile örtüşmektedir. Her iki formülasyon için de nanopartiküllerde agregasyon bulunmadığı ve dar bir boyut dağılım aralığına sahip oldukları görünmektedir (Şekil 4.6.). Boyut dağılım aralıkları için boyut ölçüm cihazından alınan PDI değerleri de bu görüşü desteklemektedir. Bu değer polisorbata 80 kaplı olmayan nanopartiküller için $0,258 \pm 0,017$ ve kaplı olanlar için $0,243 \pm 0,005$ şeklindedir.

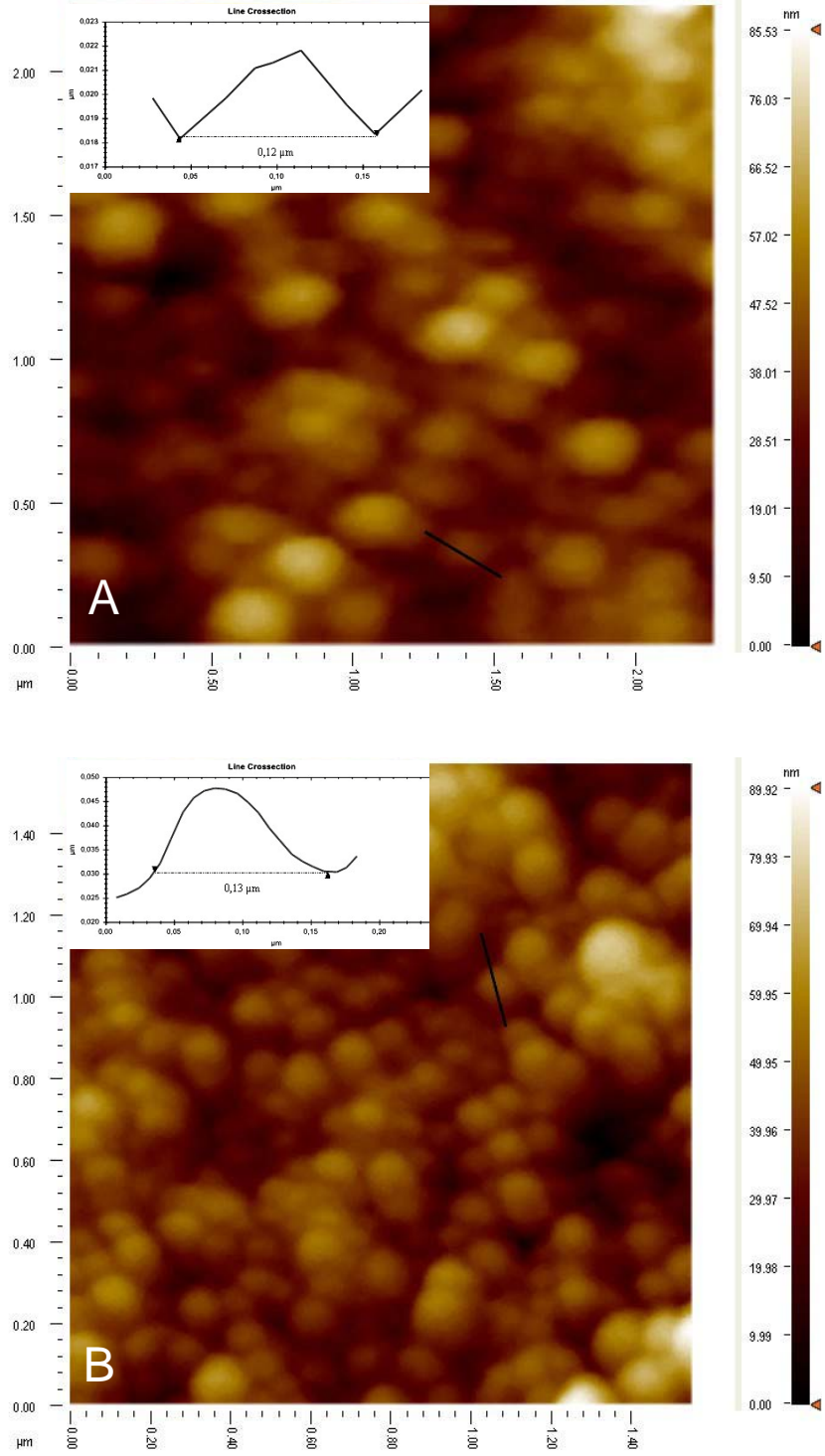
% 10 PEG oranına sahip kopolimer ile üretilenlerde ise hazırlama süresince herhangi bir agregasyon oluşmamıştır. Boyut ölçüm cihazı ile yapılan ölçümlerde polisorbata 80 kaplı olmayanlar ortalama olarak $122,3 \pm 0,6380$ nm ve kaplı olanlar da $133,0 \pm 1,114$ nm boyutlarında bulunmuştur. Bu değerler AFM görüntülerinden çıkarılan sonuçlar ile uyum içindedir (Şekil 4.7.). Boyut dağılım aralıkları % 5 PEG içeren kopolimerle üretilen nanopartiküllere kıyasla biraz daha dar bulunmuştur. Bu amaçla ölçülen PDI değerleri polisorbata 80 kaplı olmayanlar için $0,158 \pm 0,006$ ve kaplı olanlar için $0,152 \pm 0,014$ olarak bulunmuştur.

%15 PEG oranına sahip kopolimer ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül boyutu ise diğerlerine göre çok daha küçük olmakla birlikte polisorbata 80 kaplı olmayanlar için $67,53 \pm 0,6953$ nm ve kaplı olanlar için $64,24 \pm 0,3538$ nm olarak ölçülmüştür. Bu değerler, AFM görüntüleri ile desteklenmektedir (Şekil 4.8). Bu partiküller de dar bir boyut dağılımına sahiptirler ve PDI değerleri polisorbata 80 kaplı olmayanlar için $0,223 \pm 0,017$ ve kaplı olanlar için $0,154 \pm 0,009$ olarak ölçülmüştür.

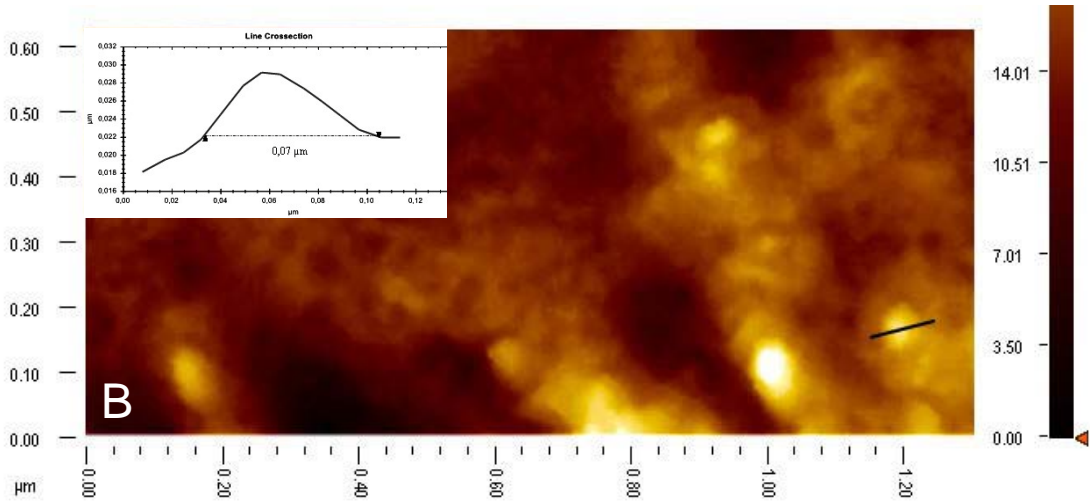
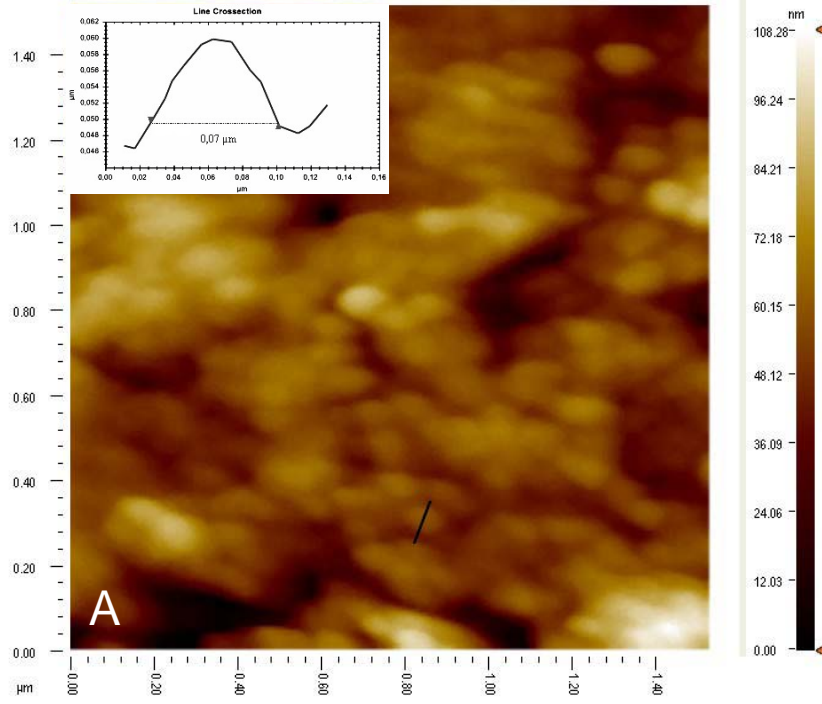
AFM analizleri yapılan bu örneklerle ait boyut dağılımı grafikleri boyut ölçüm cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Buna göre % 5 PEG içeren kopolimer kullanılarak üretilen partiküllerde 5 μ m civarında görülen küçük pik, santrifüj sonrası uzaklaştırılmayan hazırlama sırasında oluşmuş agregasyonlar nedeniyle oluşmaktadır (Şekil 4.9.). %10 ve %15 PEG içeriğine sahip kopolimerlerle hazırlananlarda ise herhangi bir agregasyona ait bir girişim bulunmamaktadır (Şekil 4.10. ve Şekil 4.11.). 6 tekrarlı olarak yapılan bu ölçümlerin birbirleriyle ve AFM analizleri sonucu elde edilen görüntülerle örtüştüğü gözlenmiştir.



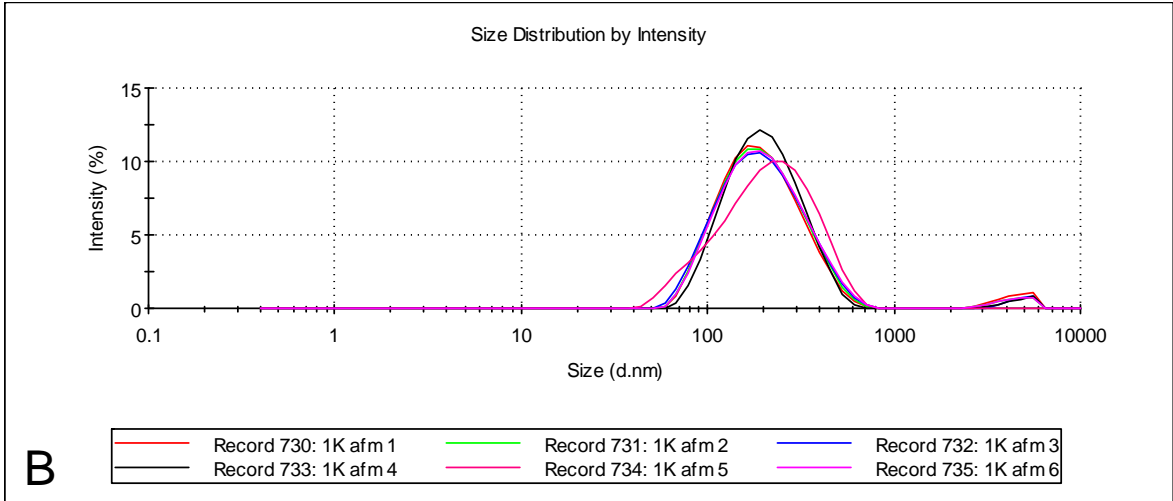
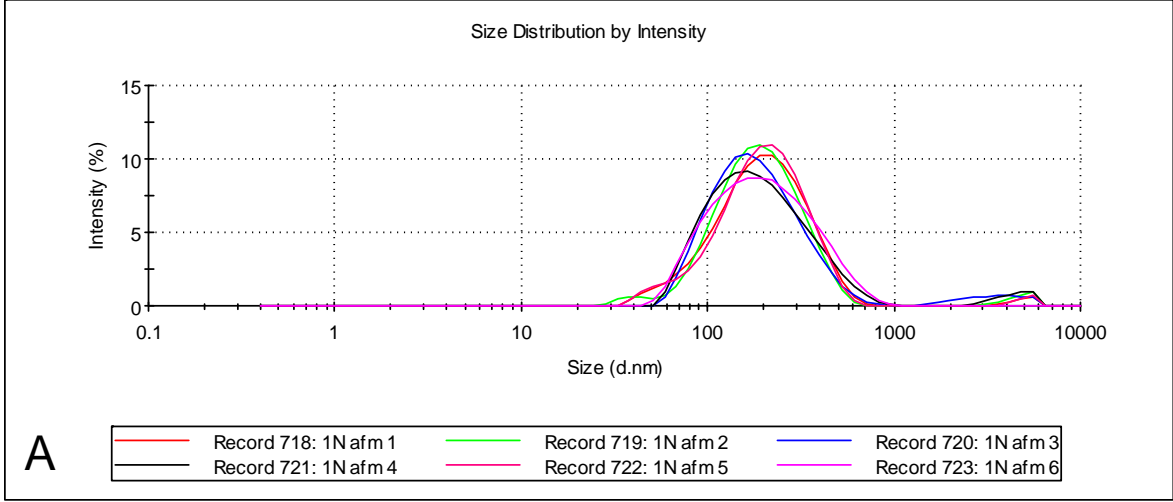
Şekil 4.6. % 5 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüleri. A) Nanopartiküller (NP), B) Polisorbat 80 kaplı nanopartiküller (PNP).



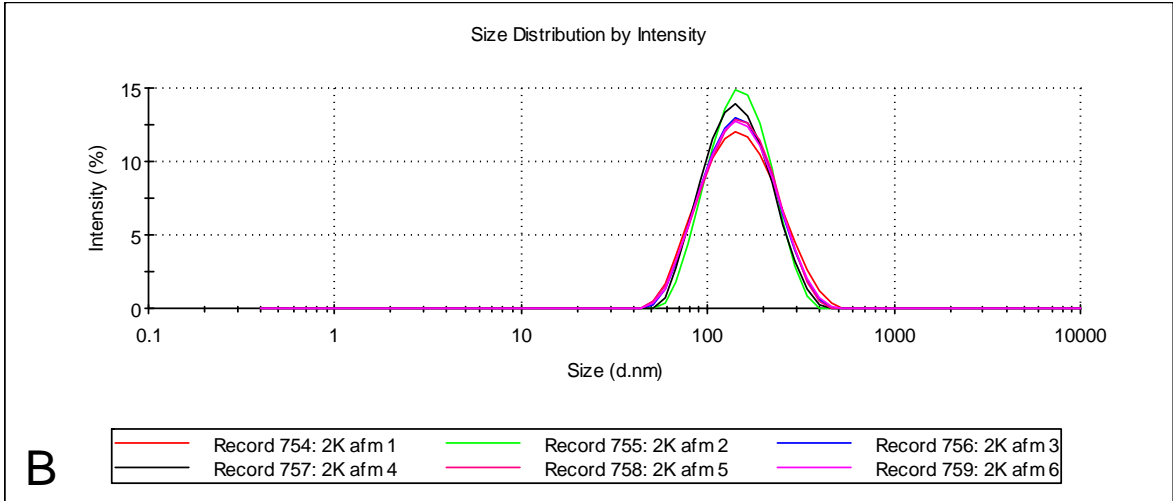
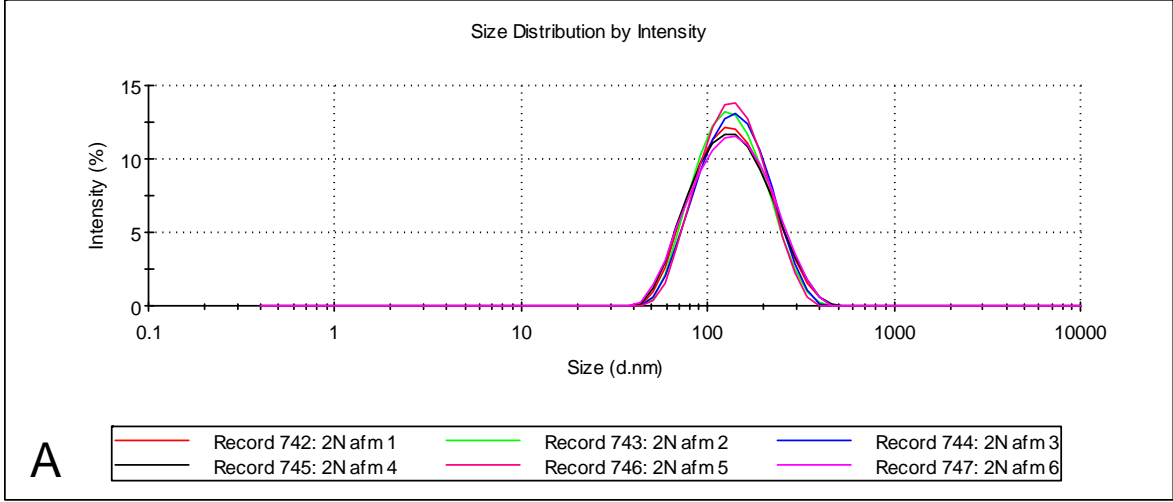
Şekil 4.7. % 10 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüleri. A) Nanopartiküller (NP), B) Polisorbat 80 kaplı nanopartiküller (PNP).



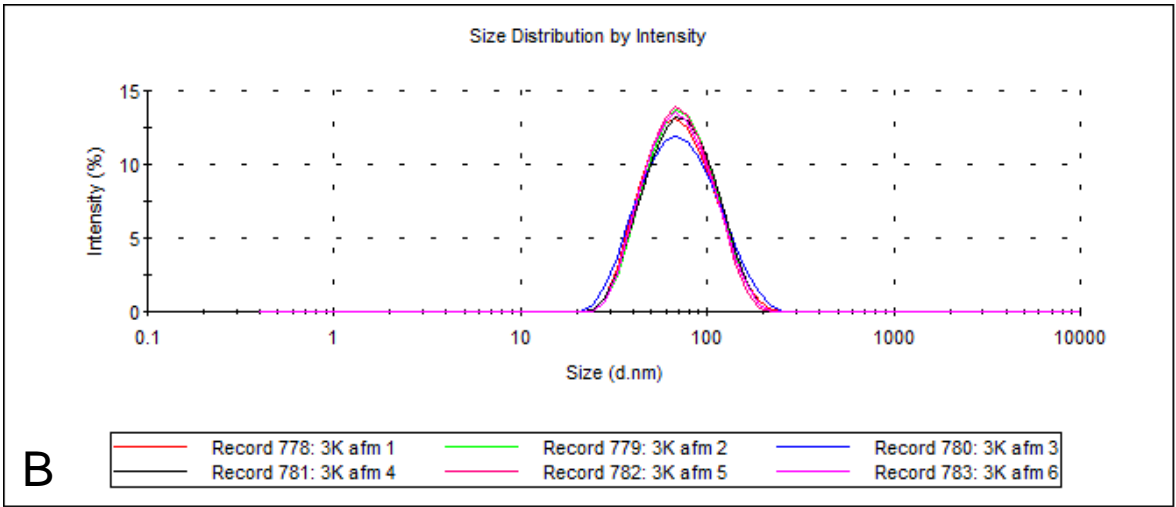
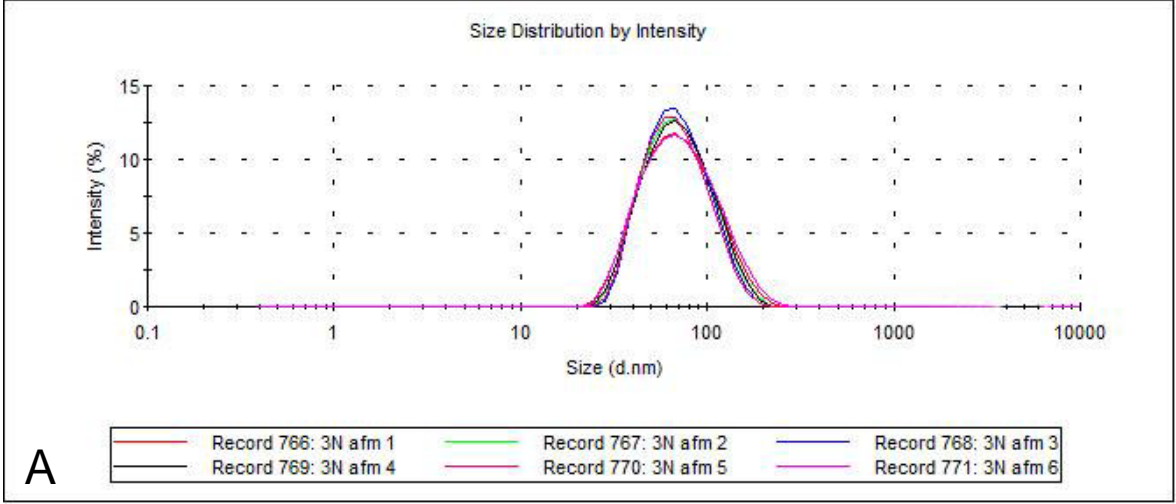
Şekil 4.8. % 15 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüleri. A) Nanopartiküller (NP), B) Polisorbat 80 kaplı nanopartiküller (PNP).



Şekil 4.9. % 5 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin boyut analizleri A) Nanopartiküller (NP), B) Polisorbat 80 kaplı nanopartiküller (PNP).



Şekil 4.10. % 10 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin boyut analizleri A) Nanopartiküller (NP), B) Polisorbat 80 kaplı nanopartiküller (PNP).



Şekil 4.11. % 15 PEG içeren PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin boyut analizleri A) Nanopartiküller (NP), B) Polisorbat 80 kaplı nanopartiküller (PNP).

4.6. FTIR Analiz Sonuçları

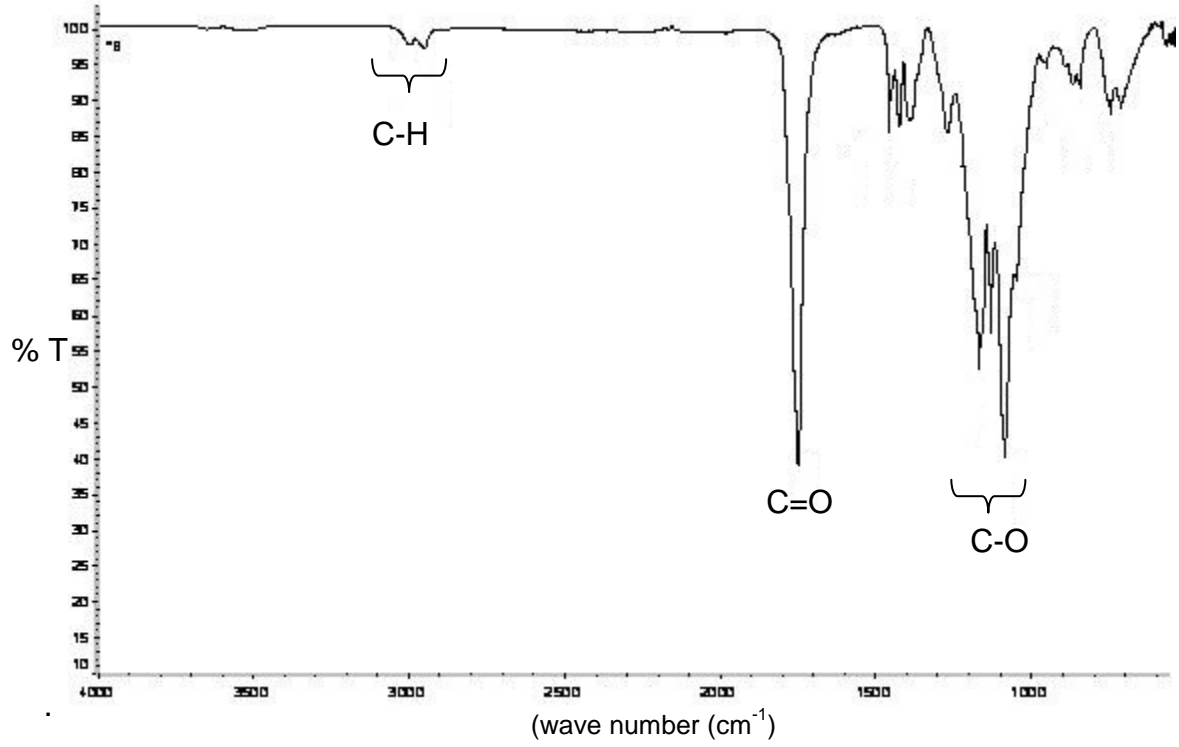
PLGA-b-PEG, Atorvastatin, polisorbata 80 ve nanopartiküllerin FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.12-15'te verilmiştir.

PLGA-b-PEG kopolimerine ait FT-IR spektrumunda (Şekil 4.12) 3500 cm^{-1} 'deki geniş pik –OH grubu gerilmesine, 2900-3000 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik CH_2 ve CH_3 'e ait C-H gerilmesine ve 1750 cm^{-1} 'deki pik, C=O gerilmesine aittir. 1300 cm^{-1} ve 1090-1170 cm^{-1} aralığındaki pikler ise sırasıyla karboksilik asite ait C-O gerilmesine ve ester grubuna ait C-O gerilmesine aittir.

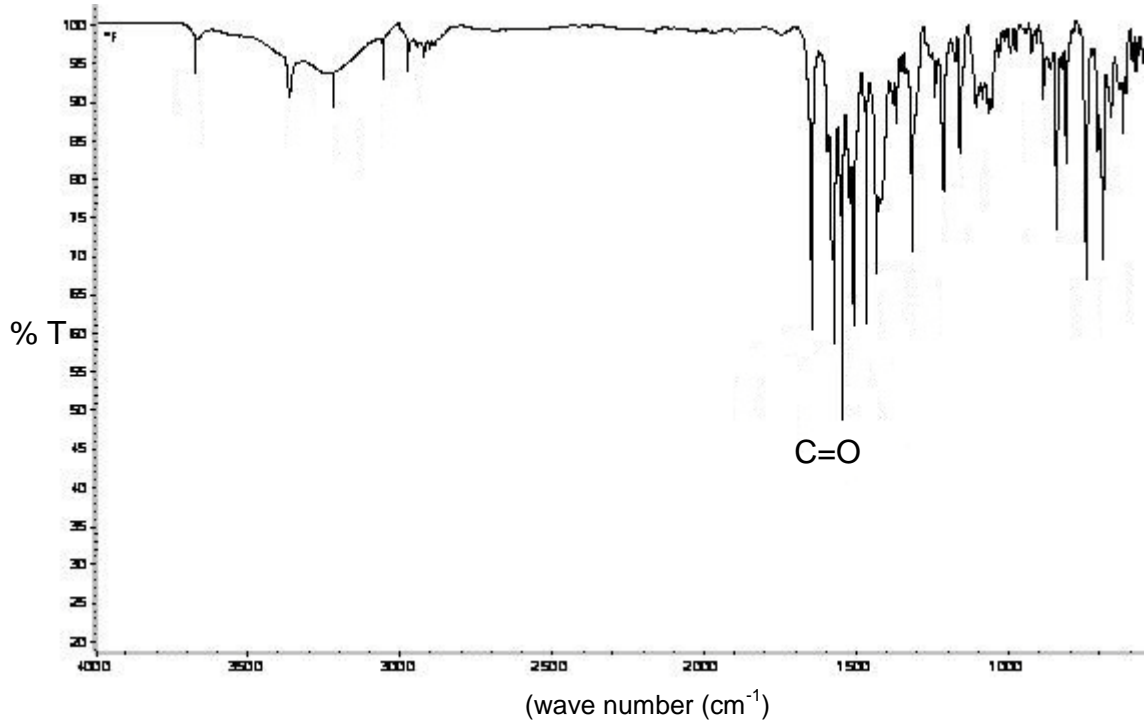
Atorvastatin'e ait FTIR spektrumu incelendiğinde en önemli pikler (3600-3000 cm^{-1}) hidrojen bağlı OH gerilmeleri ve 3669 cm^{-1} de bulunan serbest OH gerilmelerine aittir. Diğer karakteristik pikler, 1644 cm^{-1} (asimetrik C=O gerilme), 1573 cm^{-1} (simetrik C=O gerilme), 1550-1431 cm^{-1} aralığında (dört pik (ise C-C halkasına ait gerilmeler) 1317 cm^{-1} (CH_3/CH_2 deformasyonları), 1238 cm^{-1} (C-N gerilmeleri) ve 1207 cm^{-1} (C-N /C-O gerilmeleri)'de mevcuttur (Şekil 4.13).

Polisorbata 80'e ait FTIR spektrum incelendiğinde 3500 cm^{-1} 'deki geniş pik –OH grubu gerilmesi, 1738 cm^{-1} 'de C=O (ester karbonili) , ve 1108 cm^{-1} 'de C-O-C gerilmesi ve 1652' cm^{-1} 'de C=C küçük geniş pik izlenmektedir (Şekil 4.14).

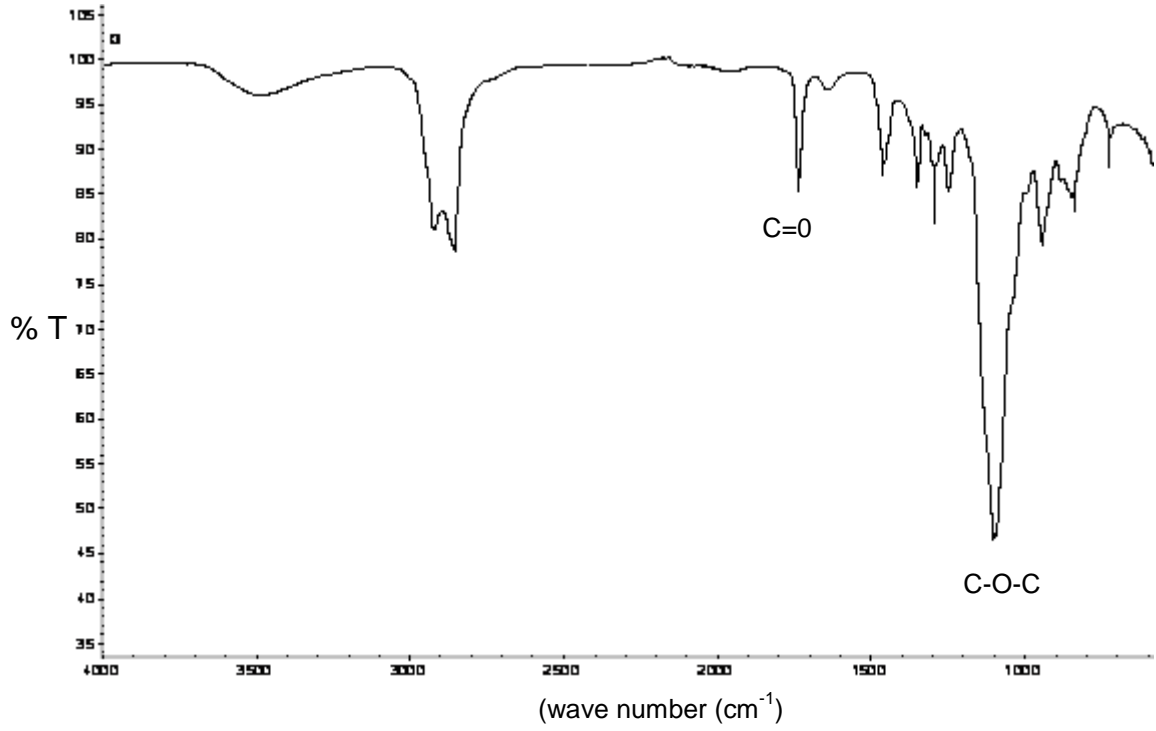
Hazırlanan nanopartiküllere ait infrared spektrumlarında (Şekil 4.15) bütün örneklerde de PLGA-b-PEG kopolimerinde bulunan ester karboniline ait C=O çift bağ gerilme piki 1735 cm^{-1} belirgin olarak, C-O tekli bağ gerilme pikleri ise 1000 – 1260 cm^{-1} frekans aralığında keskin pikler olarak görülmektedir. Atorvastatin yüklenmiş olan örneklerde (3 ve 4) 1680-1540 ve 3300-3500 cm^{-1} 'de N-H bağ eğilmesi ile 1475 ve 3020 cm^{-1} deki aromatik C=C gerilmeleri gözlemlenebilir. Atorvastatin molekülündeki monosüstitüe ve orto süstitüe aromatik halkalardaki C-H eğilmeleri de sırası ile 730 ve 850 cm^{-1} 'de keskin piklerle mevcuttur. Son olarak polisorbata 80 içeren 2 ve 4 numaralı örneklerde 2880 – 2950 arası C-H alkan gerilmeleri ile terminal konumdaki hidroksil gruplarının etilen glikol polimeri üzerinden ya da diğer polisorbata 80 molekülleri ile yaptıkları hidrojen bağları da 3300-3600 cm^{-1} arası geniş ve orta şiddetli olarak gözlemlenebilir.



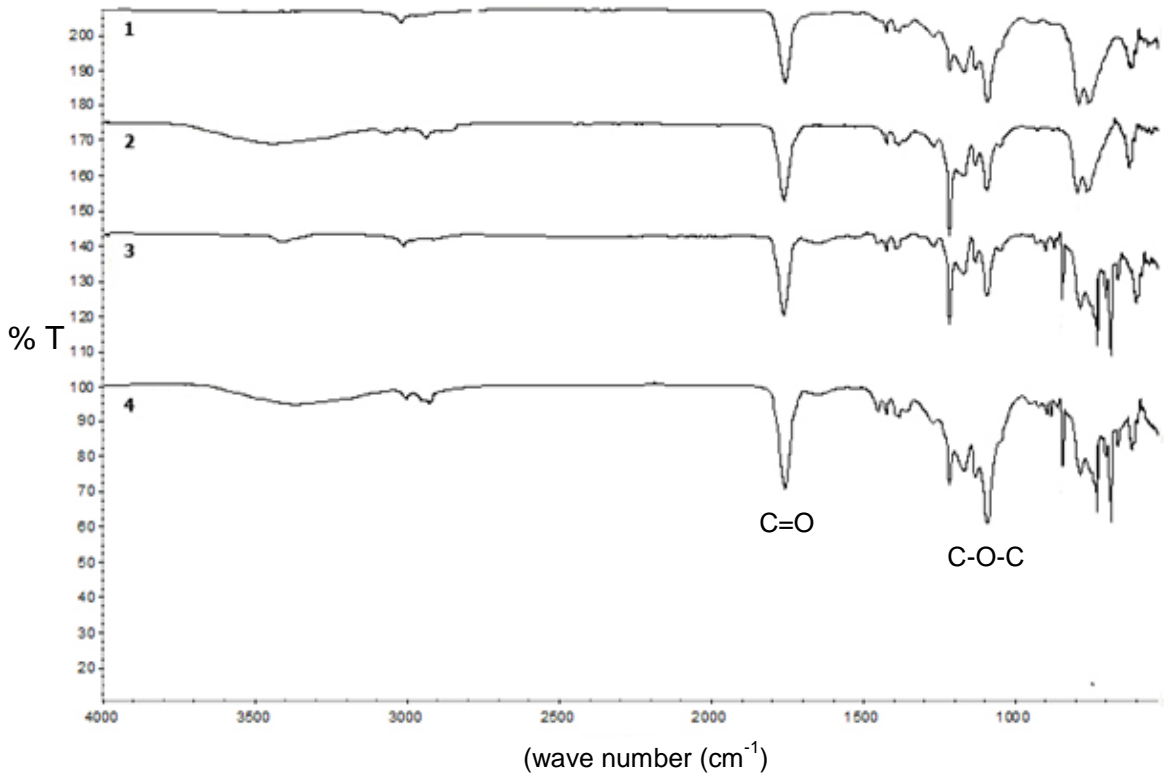
Şekil 4.12. % 10 PEG içeren PLGA-b-PEG RGP d 50155 kopolimerine ait FTIR spektrumu



Şekil 4.13. Atorvastatin'e ait FTIR spektrumu



Şekil 4.14. Polisorbat 80'e ait FTIR spektrumu



Şekil 4.15. Nanopartiküllerin FTIR spektrumları: 1) ATR içermeyen NP, 2) ATR içermeyen PNP, 3) ATR içeren NP, 4) ATR içeren PNP

4.7. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerden İn-Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları

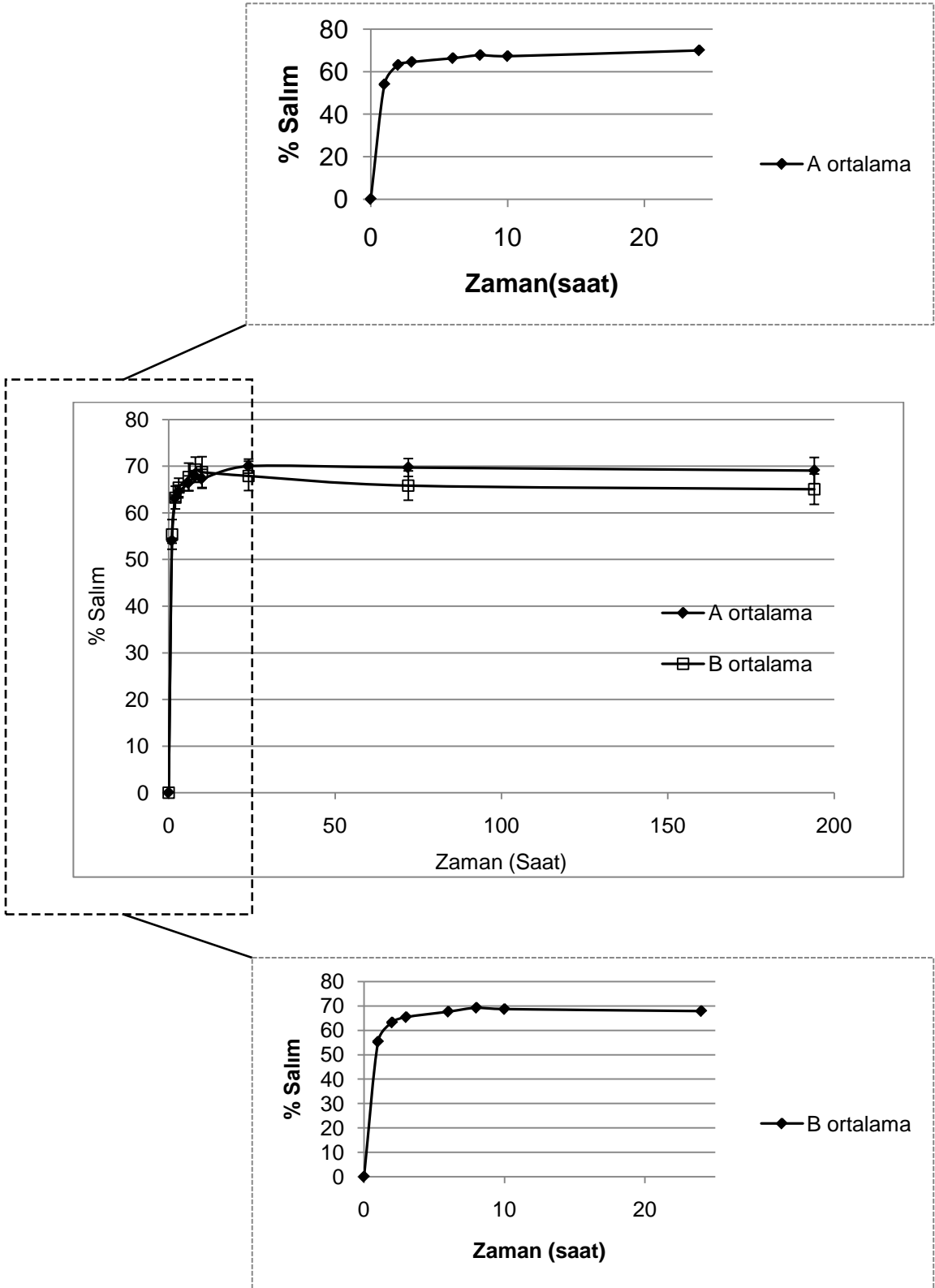
Nanopartiküllerin vitro salım deneyleri önceden belirlenmiş her bir zaman noktasında % salınan etkin madde miktarları Bölüm 3.2.2’de açıklanan HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, zamana karşı % salınan madde olarak grafiklere aktarılmış ve salım profilleri elde edilmiştir. Her bir zaman noktası için 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan çalışmalarından elde edilen profiller üzerinde standart hata çubukları ile birlikte gösterilmiştir.

İn-vitro salım çalışmalarında kullanılan formülasyonlara ait salım profilleri aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.16). Bu sonuçlara göre polisorbata 80 kaplamanın salım profili üzerine herhangi bir etkisi bulunmadığı gösterilmiştir. Polisorbat 80 kaplı olan partiküller ile kaplı olmayanların her ikisinin de ilk 1 saat içerisinde Atorvastatin’in yaklaşık % 50’sini saldıkları belirlenmiştir. Başlangıçtaki, patlama etkisi (“burst effect”) olarak bilinen bu hızlı salımın nedeni nanopartiküllerin yüzeyine adsorblanmış olmasından kaynaklanmaktadır [104, 127, 128].

5 ile 10. saatler arasında her iki formülasyon için de salım profilinin plato oluşturmaya başlaması, ilacın nanopartiküllerden kontrollü olarak salındığını göstermektedir. Literatürde yer alan çalışmalardan aynı kopolimer ile üretilen nanopartiküllerden ilaç salımı ile sonuçlarımız paralellik göstermektedir [105, 129].

Bu iki formülasyon arasındaki fark, polisorbata 80 kaplama işlemi süresince bir miktar etkin maddenin ilaç salımı benzeri bir şekilde nanopartiküllerden uzaklaşması sonucu, ilaç yükleme etkinliklerinin farklı ölçülmesidir. Bu ilaç yükleme etkinlikleri salımı gerçekleştirilen örneklerden NP için % 30,901 ± 0,745 ve PNP için % 9,305 ± 0,894 olarak ölçülmüştür.

Genel olarak aynı ilaç salım profiline sahip bu iki formülasyon da kontrollü ilaç salımı için uygun bulunmuştur.



Şekil 4.16. Nanopartiküllerin İn-vitro salım sonuçları, A) Nanopartikül (NP) ve B) Polisorbat kaplı nanopartikül (PNP).

4.8. PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hücresel Alımları

Nil kırmızısı işaretli nanopartiküllerin hücresel alım çalışmaları için aseptik şartlarda genç sığır damarından izole edilen düz kas hücre (SMC) ve endotel hücre (EC) kaynakları kullanılmıştır. Nil kırmızısının düz kas hücrelerinde hücre içi lipid damlacıklarının görüntülenmesinde kullanıldığı daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir [130]. Bu nedenle nanopartiküller öncelikle deneysel kısımda verildiği gibi damar düz kas hücrelerinde denenmiş ve hücresel alımları incelenmiştir (Şekil 4.17). Nanopartiküllerin hücreler tarafından alındığı ve literatürde de belirtildiği gibi sitoplazmik lipidlerin seçilebildiği belirlenmiştir (Şekil 4.17).

Şekil 4.18'de sitoplazmik uzantıları ile tutunan hücre morfolojisi gösteren endotel hücreler gözlenmektedir. Polisorbat 80 kaplı ve kaplı olmayan nanopartiküllerin damar endotelleri ile yapılan hücresel alım çalışmalarında kuyucuk başına 500 µg ve 2500 µg NP olmak üzere iki nanopartikül derişimi denenmiş olup, görüntüleri Şekil 4.19-22'de verilmiştir. Polisorbat 80 kaplı olmayan nanopartiküllerin denendiği kuyucuklar izlendiğinde, burada proliferatif endotel hücre gözlenmekle birlikte, çekirdek etrafında floresan ışımaya muhtemelen nil kırmızısı işaretli nanopartikül gruplarının varlığını ifade etmektedir. Yine aynı şekilde polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin verildiği kuyucukların floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, endotel hücre sitoplazmalarında kırmızı granüler floresan ışımaya görünmektedir. Diğer bir deyişle lipid damlalarına affinite gösteren floresan boya ile işaretli nanopartiküllerin intrastoplazmik varlığı izlenmektedir (Şekil 4.21-22). Kuyucuk başına nil kırmızısı işaretli nanopartikül derişimi arttığında, floresan işaretlemenin daha yaygın olduğu ve parlaklığın arttığı izlenmiştir. Ancak polisorbat 80 kaplamanın hücre alımındaki rolü kantitatif bir analiz yapılmadığı için izlenememiştir. Literatürde, nanopartiküllerin hücresel ve makrofaj alımlarına ait çalışmalar mevcut olup [47, 56, 131], polisorbat 80 kaplamanın nanopartiküllerin hücresel alımlarını 20 kat artırdığı, diğerk bir çalışmada ise polisorbat 80 kaplamanın nanopartiküllerin, J774 A1 makrofajları tarafından fagosite edilmesini engellediği bildirilmiştir.

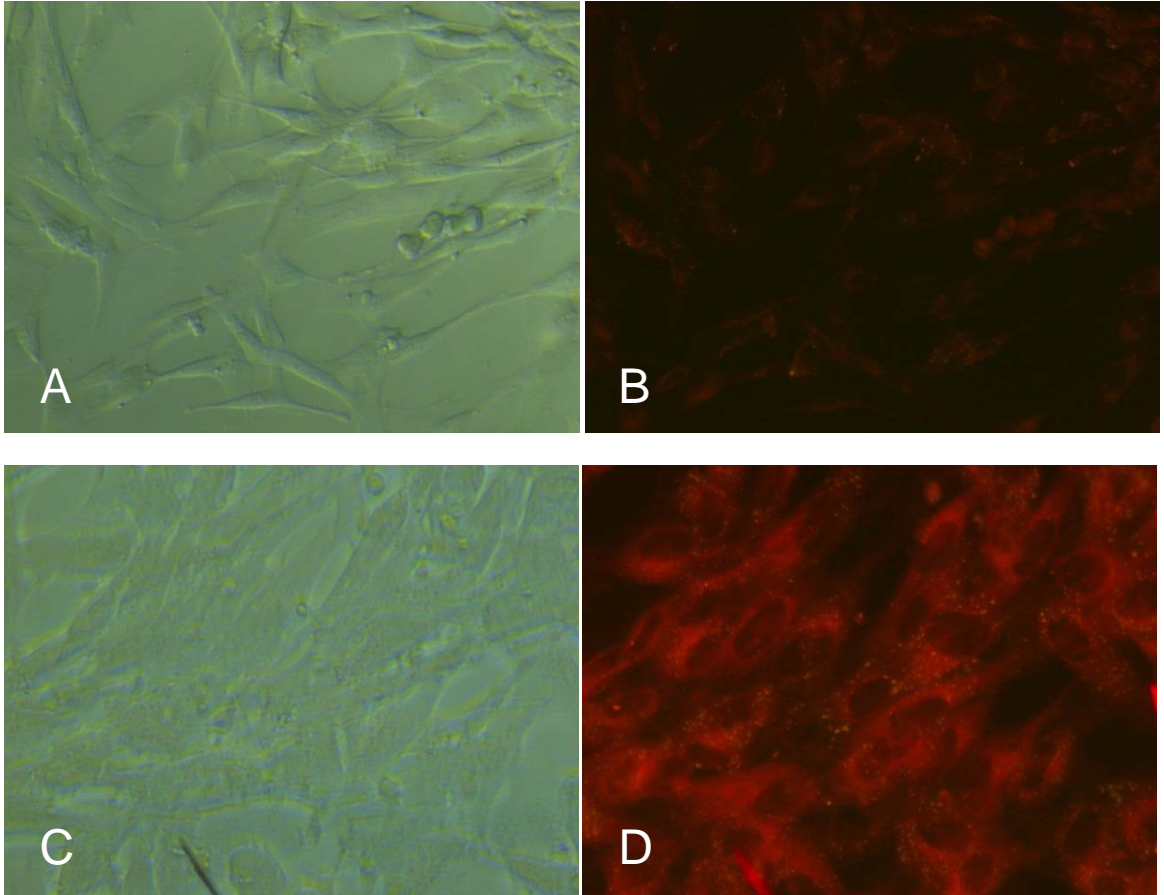
Genel bilgilerde de belirtildiği gibi KBB, sıkıca konuşlanmış olan beyin endotel hücrelerinden oluşmaktadır ve kan ve beyin arasındaki serbest alışverişi engellemektedir. Bu nedenle nanopartiküllerle yapılan hücresel alım çalışmaları

vasküler endotellerle yapılmış olup, bire bir beyin endotellerini tam olarak modellememekle birlikte, bu sistemlerin genel olarak hücresel alımları hakkında fikir vermiştir.

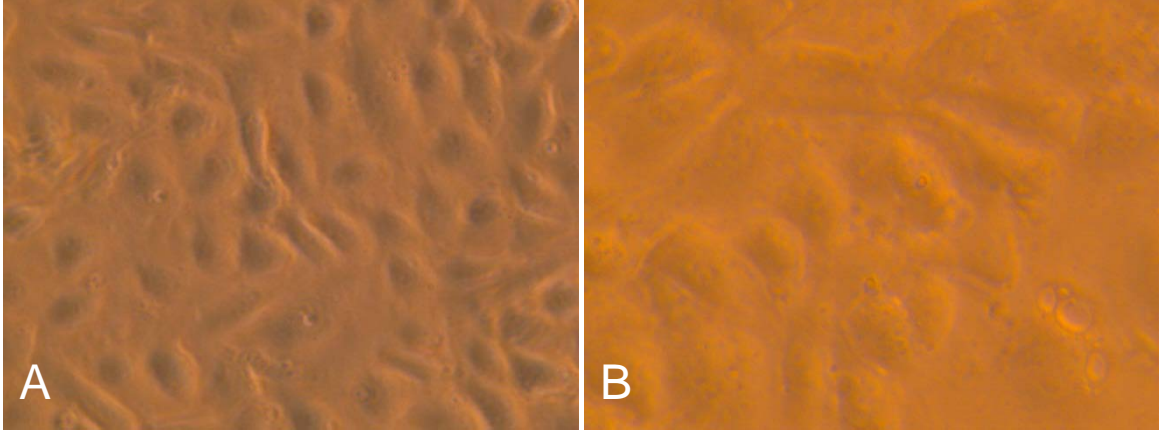
Çizelge 4.12. Floresan İşaretli Nanopartiküllerin Boyut ve Zeta Potansiyelleri

Nanopartikül Formülasyonu	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
NP*	146,4 ± 2,303	0,212 ± 0,007	-10,4 ± 0,551
PS-NP*	165,1 ± 0,556	0,239 ± 0,010	-6,60 ± 0,174

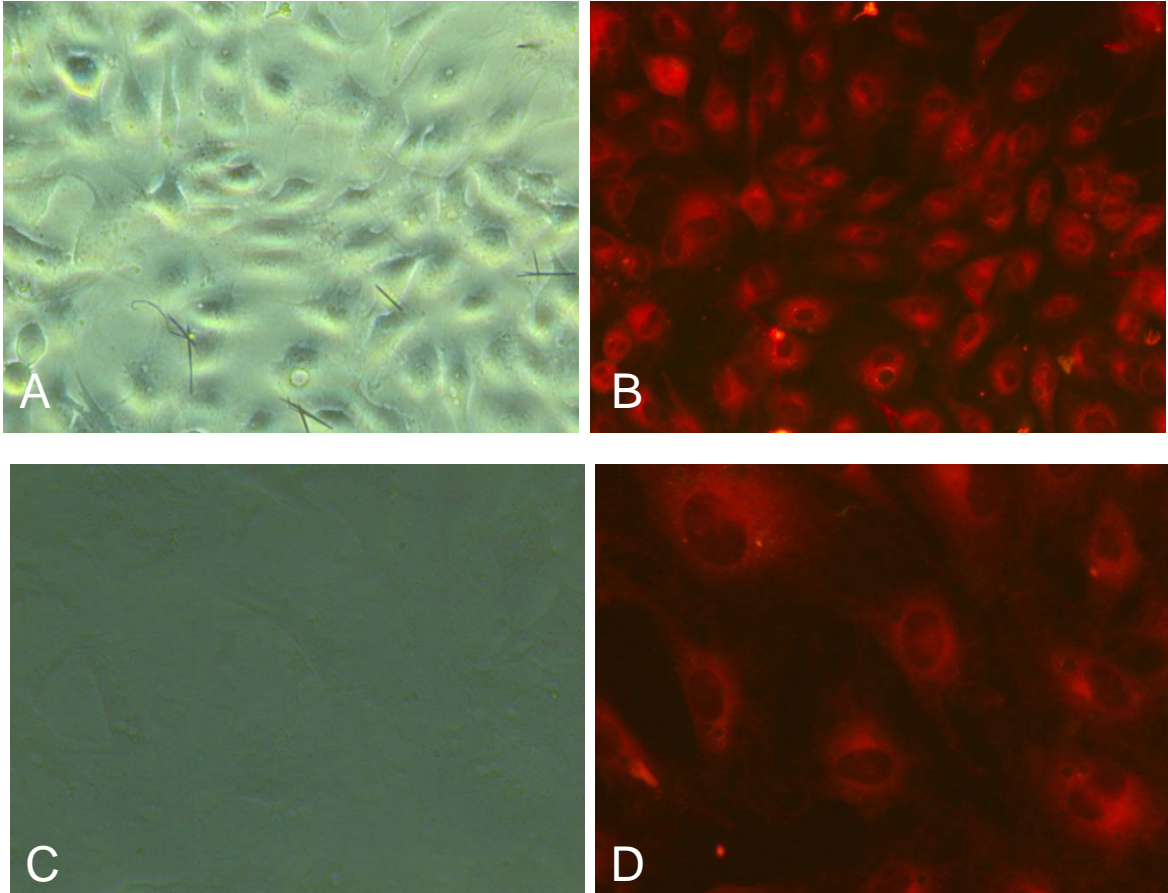
NP: Nil kırmızısı işaretlenmiş nanopartikül, PS-NP*: Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbat 80 kaplı nanopartikül.



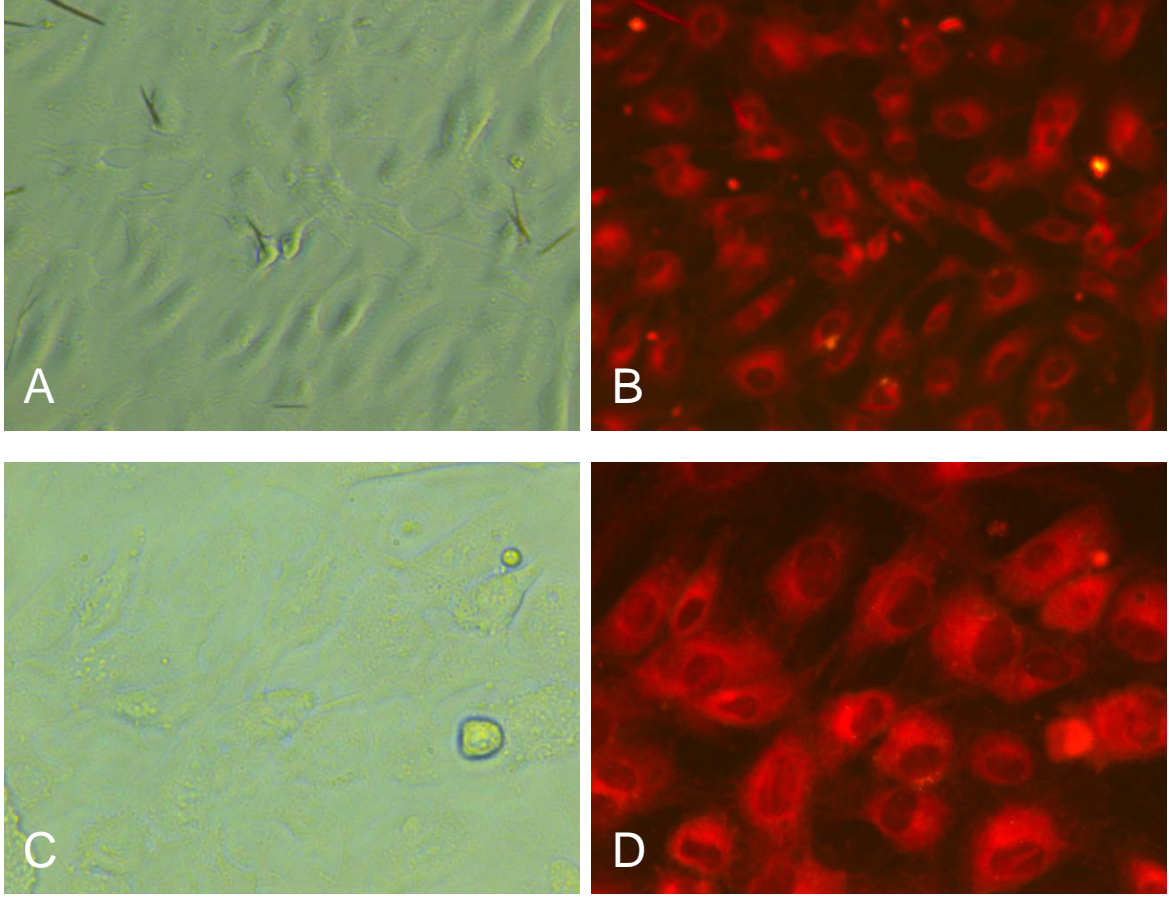
Şekil 4.17. Düz kas hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri, A) Inverted faz kontrast mikroskop (x20), B) Floresan mikroskop (x20) [Nanopartikül miktarı 50 µg NP/kuyucuk], C) Inverted faz kontrast mikroskop (x40), D) Floresan mikroskop (x40) [Nanopartikül miktarı 500 µg NP/kuyucuk].



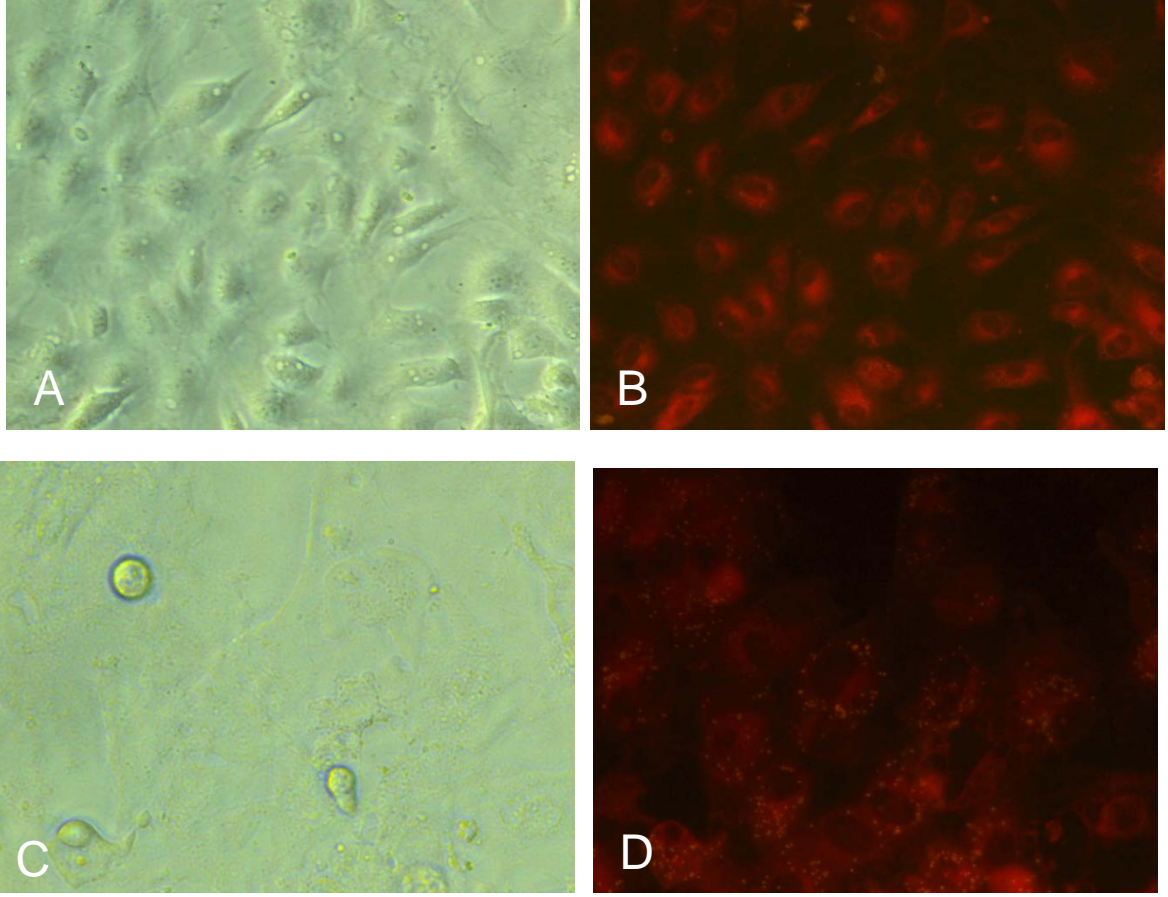
Şekil 4.18. Endotel hücrelerin inverted faz kontrast mikroskop görüntüleri A) x20, B) x 40



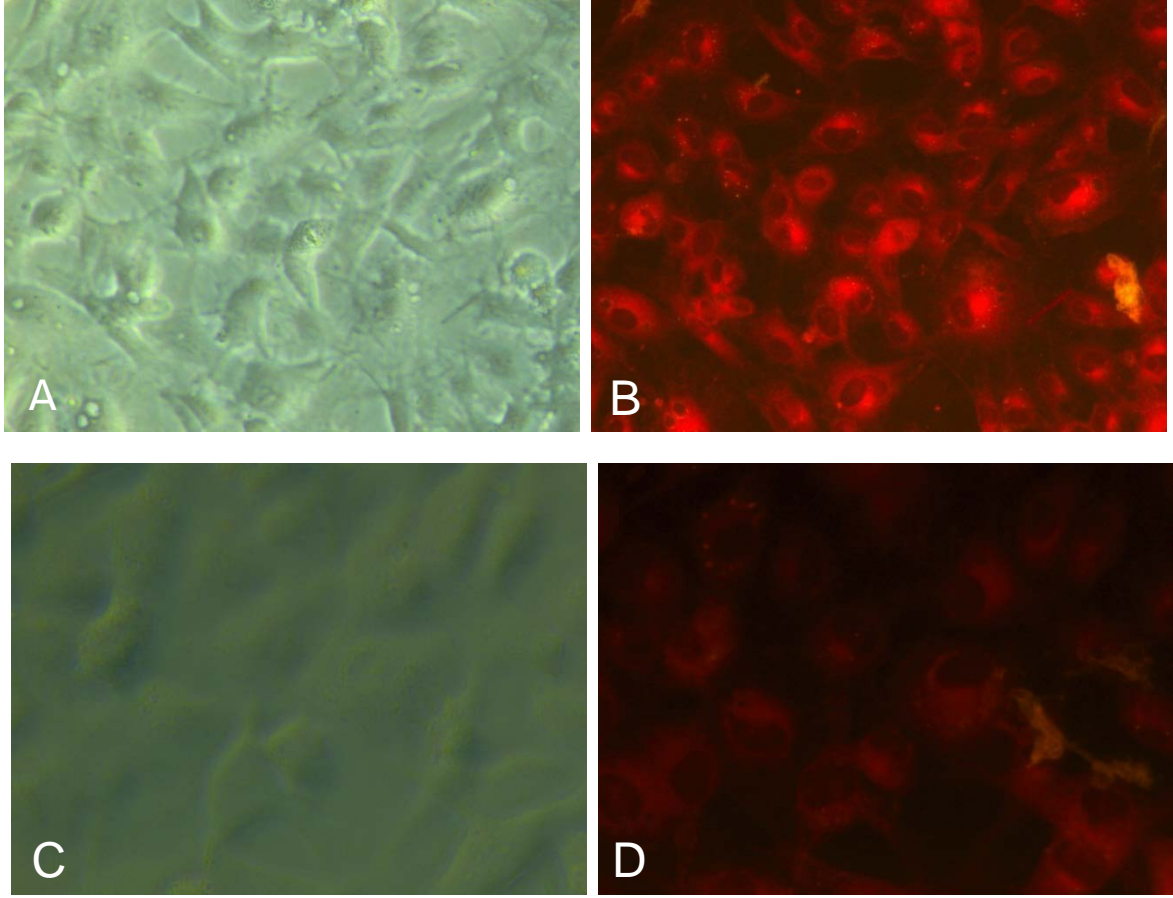
Şekil 4.19. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbata 80 kaplı olmayan nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri A) Inverted faz kontrast mikroskop (x20), B) Floresan mikroskop (x20), C) Inverted faz kontrast mikroskop (x40), D) Floresan mikroskop (x40), [Nanopartikül miktarı: 500 µg NP/kuyucuk]



Şekil 4.20. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbat 80 kaplı olmayan nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri, A) Inverted faz kontrast mikroskop (x20) B) Floresan mikroskop (x20), C) Inverted faz kontrast mikroskop (x40), D) Floresan mikroskop (x40). [Nanopartikül miktarı: 2500 µg NP/kuyucuk]



Şekil 4.21. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri A) Inverted faz kontrast mikroskop (x20) B) Floresan mikroskop (x20), C) Inverted faz kontrast mikroskop (x40), D) Floresan mikroskop (x40), [Nanopartikül miktarı: 500 µg NP/kuyucuk]



Şekil 4.22. Endotel hücrelerin Nil kırmızısı işaretlenmiş Polisorbitat 80 kaplı nanopartiküllerle kültür ortamında 2 saat inkübasyon sonrası mikroskop görüntüleri, A) Inverted faz kontrast mikroskop (x20) B) Floresan mikroskop (x20), C) Inverted faz kontrast mikroskop (x40), D) Floresan mikroskop (x40). [Nanopartikül miktarı: 2500 µg NP/kuyucuk]

4.9. Nanopartiküler Sistemlerin Beyne Hedeflendirilmesinin İn-vivo Değerlendirilmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin beyne geçiş etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla polisorbitat 80 kaplı olan ve kaplı olmayan nanopartiküller, süspansiyonları şeklinde şıçanların kuyruk venlerinden uygulanmıştır.

Gerçekleştirilen in-vivo incelemeler sonucu deney hayvanların tüm vücudunda (henüz canlı iken) ilk 1 saatte floresan ışımının maksimum şiddetine ulaştığı ve takip eden zamanlarda 6, 24 ve 48. saatlerde bu ışıma şiddetinin azaldığı verilen her iki nanopartikül formülasyonunda da belirlenmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).

Benzer şekilde iki formülasyonun (NP ve PNP) uygulandığı deney hayvanlarının beyinleri incelendiğinde, ilk 1 saatte floresan ışımının maksimum olduğu ve 6, 24 ve 48. saatlerde bu ışıma şiddetinin azaldığı izlenmiştir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24). Ancak floresan boya işaretli polisorbata 80 kaplı nanopartiküllerin uygulanmasını takiben ilk 1 saat içerisinde beyin dokusu üzerindeki floresan ışımının şiddeti kontrol grubuna kıyasla bariz bir şekilde artmıştır (Şekil 4.24).

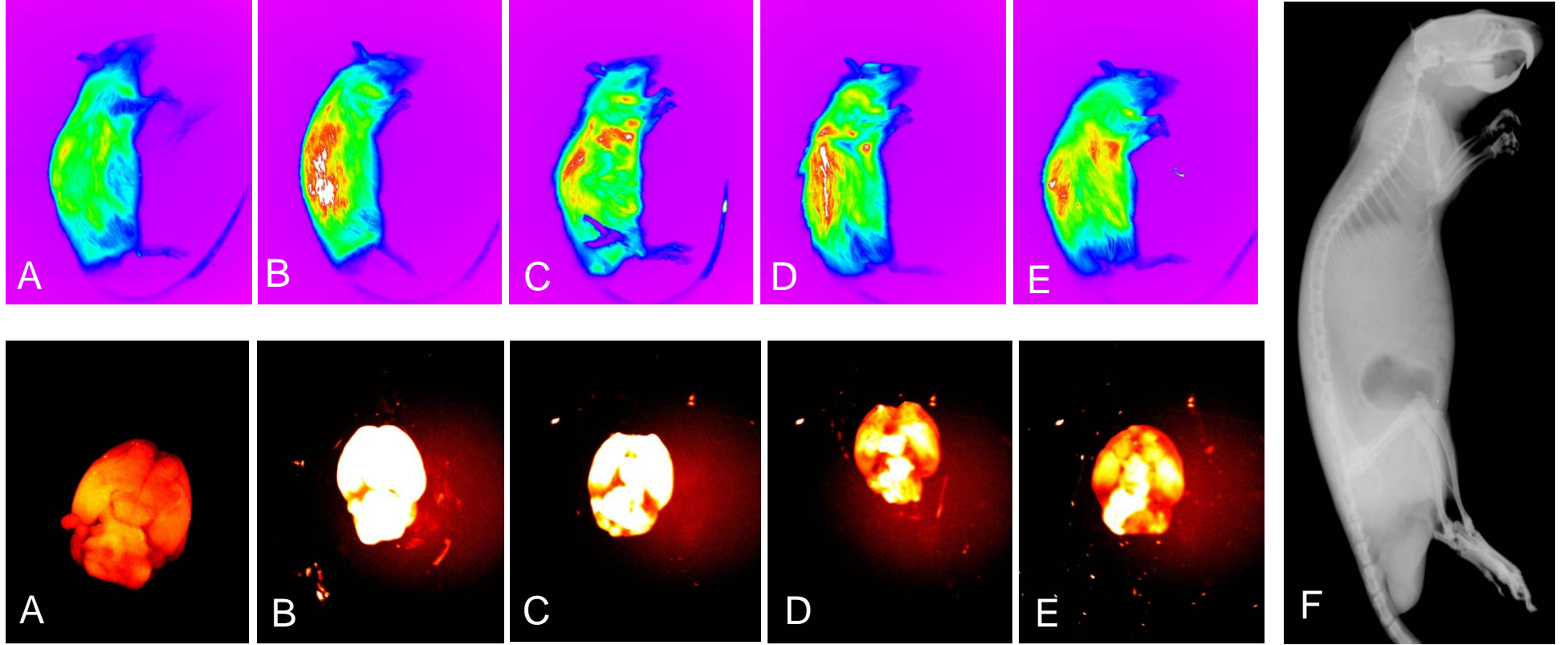
Sonuç olarak bu bulgular, polisorbata 80 kaplı olan ve olmayan nanopartiküllerin ilk 1 saatte hem beyin dokusunda hem de canlı vücudunun genelinde varlığını ve zamanla azaldığının bilgisini vermektedir.

Ancak izlenen floresan ışımının şiddeti ölçülemediği için, polisorbata 80 kaplı nanopartiküllerin (PNP) kontrol grubuyla (NP) arasındaki fark kantitatif olarak belirlenememiştir. Benzer çalışmalarda, polisorbata 80 kaplı olan nanopartiküllerin kaplı olmayanlara kıyasla beyin tarafından daha yüksek oranda alındığı farklı şekillerde gösterilmiştir [130, 132, 133].

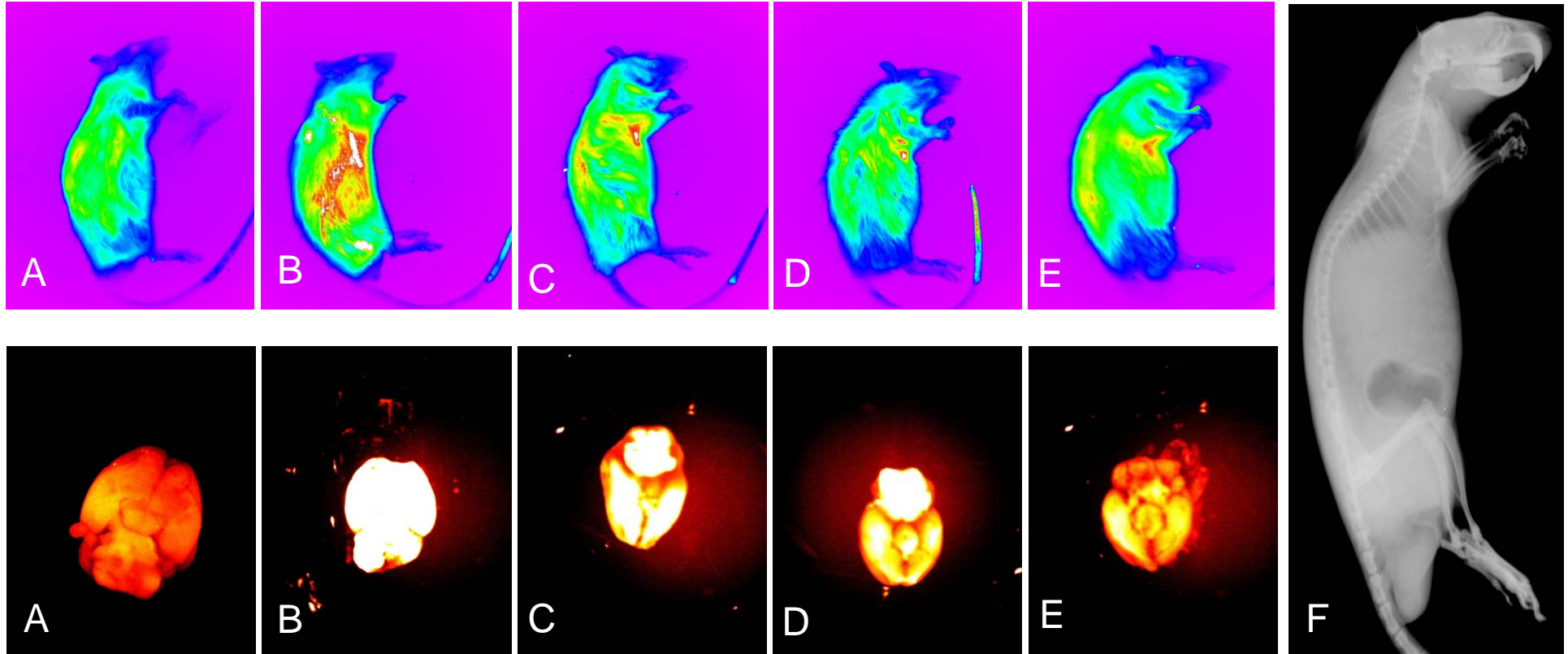
Sonuç olarak üretilen nanopartiküllerin polisorbata 80 kaplı olanları da olmayanları da beyin dokusunda toplanma göstermiştir. Bu toplanma ilk 1 saat için maksimum seviyede belirlenmiş ve ilerleyen zamanlarda beyin dokusundan uzaklaştığı ortaya koyulmuştur. Bu bilgiler, deney hayvanları canlı iken yapılan tüm vücut taramalarından elde edilen sonuçlar için de geçerlidir. Elde edilen sonuçlar benzer boyutlara sahip polimerik nanopartiküllerle gerçekleştirilen diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir [133]. Örneğin bu çalışmada kullanılan poli(bütill siyanoakrilat) nanopartikülleri radyoizotoplarla işaretlenerek farklı zaman noktalarında çeşitli dokularda izlenmiş ve polisorbata 80 kaplamanın etkisi incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında beyindeki nanopartikül derişimi polisorbata 80 kaplı olan ve olmayanlar için ilk 1 saatte maksimum olmakla birlikte gittikçe azalma göstermektedir. Bu da bizim çalışmalarımızın sonuçları ile örtüşmektedir. Polisorbata 80 kaplı olan nanopartiküller ise kaplı olmayanlara kıyasla beyinde 2 kat fazla olarak belirlenmiştir. Ancak bizim çalışmamızda floresan şiddet sayısal olarak ölçülemediği için bu açıdan bir değerlendirme yapılamıştır. Çalışmalarımız, beyin dokusu örneklerinin histolojik olarak incelenmesiyle devam etmektedir.

Deney hayvanlarına nanopartiküllerin verilmesinden sonra hayvanlarının canlılıkları 1 hafta boyunca izlenmiş ve hayvanların bu süre boyunca yaşadığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 48 saat sonrasında bile beyin dokusunda nanopartiküllere ait ışımının bulunması, hazırlanan nanopartiküler sistemlerin beyne ilaç gönderilebilmesi açısından uygun sistemler olduğunu ve Alzheimer hastalığı, inme, Parkinson hastalığı ve MS gibi nörolojik rahatsızlıkların tedavisi için umut verici olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 4.23. Nanopartiküllerin deney hayvanlarına uygulandıktan sonra belirli zaman noktalarında çekilen tüm vücut floresan (üstte) ve beyin floresan (altta) görüntüleri. A) Kontrol, B) 1 saat sonra, C) 6 saat sonra, D) 24 saat sonra, E) 48 saat sonra, F) X-ışını görüntüsü



Şekil 4.24. Polisorbat 80 kaplı nanopartiküllerin deney hayvanlarına uygulandıktan sonra belirli zaman noktalarında çekilen tüm vücut floresan (üstte) ve beyin floresan (altta) görüntüleri. A) Kontrol, B) 1 saat sonra, C) 6 saat sonra, D) 24 saat sonra, E) 48 saat sonra, F) X-ışını görüntüsü

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında beyne Atorvastatin hedeflemeye yönelik polisorbata 80 kaplı amfifilik poli(laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli(etilen glikol) (PLGA-b-PEG) nanopartikülleri hazırlanmıştır. Karakterize edilen nanopartiküllerin hücresel alımları değerlendirilmiş ve beyne geçebilme kabiliyetleri hayvan deneyleri ile izlenmiştir.

Nanopartikül üretim veriminin % 50 civarında olduğu bulunmuş ve verimin artırılmasına yönelik çalışmaların yapılması planlanmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin boyutları 30 ile 170 nm arasında bulunmuştur. Nanopartiküllerin küresel oldukları AFM analizi ile gösterilirken, partikül dağılımları monodispers sistemelere yakın bulunmuştur.

Polimer derişimindeki artışın, nanopartiküllerin boyutunu artırdığı izlenmiştir. Polimer derişimi ve kopolimer içindeki PEG miktarı gibi parametreler değiştirilerek istenilen boyutta nanopartiküllerin hazırlanabileceği görülmüştür. Atorvastatin, nanoçöktürme yöntemi ile nanopartiküllere yüklenmiş, yükleme etkinliğinin blok kopolimerdeki PEG oranı ile değiştiği izlenmiştir.

Kopolimer kompozisyonundaki PEG miktarının % 15'ten % 5'e azalması ile, nanopartiküllerin boyutunda artışla birlikte etkin madde yükleme etkinliği % 51'e çıkmıştır.

Nanopartikülleri polisorbata 80 ile kaplamanın partikül büyüklüğüne ve zeta potansiyele etkileri incelendiğinde, polisorbata 80 kaplamanın nanopartiküllerin boyutlarını artırdığı, maksimum adsorpsiyonun ilk 30 dakikada tamamlandığı, 30 dakikadan sonra devam eden kaplama işleminin nanopartiküllerin boyutlarında anlamlı bir değişmeye neden olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle polisorbata 80 ile nanopartikül yüzeyinin kaplanmasında ilk yarım saatin yeterli olduğu kanaatine varılmıştır.

Nil kırmızısı işaretli polisorbata 80 kaplı olan ve olmayan nanopartiküller, endotel hücrelerin sitoplazmasında incelenmiş ve her iki nanopartikül formülasyonunun da hücreler tarafından alındığı tespit edilmiştir. Ancak polisorbata 80 kaplamanın hücre alımına etkisi spesifik olarak belirlenememekle birlikte bu sistemlerin genel olarak

hücre alımları hakkında fikir edinilmiştir. Bu nedenle ileriye dönük olarak beyin endotelileri ile hücre alım çalışmalarının yeniden yapılması planlanmıştır.

Nil kırmızısı işaretli polisorbata 80 kaplı olan ve olmayan nanopartiküllerin beyne geçişleri hayvan deneyleri ile incelenmiş ve alınan floresan görüntüleme her iki nanopartikül formülasyonunun (NP ve PNP) da beyinde ilk 1 saatte maksimum floresan ışımaya verdikleri gözlenmiştir. Ancak polisorbata 80'in spesifik etkinliği anlaşılabilmiştir. Ancak 48 saat sonrasında bile beyin dokusunda nanopartiküllere ait ışımaların bulunmasının, beyne ilaç gönderilebilmesi açısından önemli olduğu düşünülmüştür. Çalışmalarımız, beyin dokusu örneklerinin histolojik olarak incelenmesiyle devam etmektedir.

Sonuç olarak hazırlanan bu polisorbata 80 kaplı PLGA-b-PEG nanopartiküller; Alzheimer hastalığı, inme, Parkinson hastalığı ve multiple sklerozis gibi nörolojik rahatsızlıklar için umut verici nanosistemlerdir.

KAYNAKLAR

1. Freitas, R., *What is nanomedicine?* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2005. **1**(1): p. 2-9.
2. Sumer, B. and J. Gao, *Theranostic nanomedicine for cancer.* Nanomedicine, 2008. **3**(2): p. 137-140.
3. Wang, M., D. Shin, J. Simons, and S. Nie, *Nanotechnology for targeted cancer therapy.* Expert review of anticancer therapy, 2007. **7**(6): p. 833-837.
4. Groneberg, D., M. Giersig, T. Welte, and U. Pison, *Nanoparticle-based diagnosis and therapy.* Current Drug Targets, 2006. **7**(6): p. 643-648.
5. Jain, K., *Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics.* Clinica Chimica Acta, 2005. **358**(1-2): p. 37-54.
6. Liu, Y., H. Miyoshi, and M. Nakamura, *Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles.* International Journal of Cancer, 2007. **120**(12): p. 2527-2537.
7. Baratchi, S., R. Kanwar, K. Khoshmanesh, P. Vasu, C. Ashok, M. Hittu, A. Parratt, S. Krishnakumar, X. Sun, and S. Sahoo, *Promises of nanotechnology for drug delivery to brain in neurodegenerative diseases.* Current Nanoscience, 2009. **5**(1): p. 15-25.
8. Jain, K., *Nanobiotechnology-based drug delivery to the central nervous system.* Neurodegenerative Diseases, 2007. **4**(4): p. 287-291.
9. Zweers, M., G. Engbers, D. Grijpma, and J. Feijen, *Release of anti-restenosis drugs from poly (ethylene oxide)-poly (DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles.* Journal of Controlled Release, 2006. **114**(3): p. 317-324.
10. Cheng, C., H. Wei, B. Shi, H. Cheng, C. Li, Z. Gu, S. Cheng, X. Zhang, and R. Zhuo, *Biotinylated thermoresponsive micelle self-assembled from double-hydrophilic block copolymer for drug delivery and tumor target.* Biomaterials, 2008. **29**(4): p. 497-505.
11. Li, Y., X. Zhang, H. Cheng, J. Zhu, S. Cheng, and R. Zhuo, *Self-assembled, thermosensitive PCL-gP (NIPAAm-co-HEMA) micelles for drug delivery.* Macromolecular rapid communications, 2006. **27**(22): p. 1913-1919.
12. Lee, A., Y. Wang, W. Ye, H. Yoon, S. Chan, and Y. Yang, *Efficient intracellular delivery of functional proteins using cationic polymer core/shell nanoparticles.* Biomaterials, 2008. **29**(9): p. 1224-1232.
13. Savic, R., L. Luo, A. Eisenberg, and D. Maysinger, *Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles.* Science, 2003. **300**(5619): p. 615.
14. Kataoka, K., A. Harada, and Y. Nagasaki, *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(1): p. 113-131.
15. Huang, C., C. Lo, H. Chen, and G. Hsiue, *Multifunctional micelles for cancer cell targeting, distribution imaging, and anticancer drug delivery.* Advanced functional materials, 2007. **17**(14): p. 2291-2297.
16. Shim, W., S. Kim, E. Choi, H. Park, J. Kim, and D. Lee, *Novel pH sensitive block copolymer micelles for solvent free drug loading.* Macromolecular bioscience, 2006. **6**(2): p. 179-186.
17. Lee, E., K. Na, and Y. Bae, *Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle.* Nano Lett, 2005. **5**(2): p. 325-329.

18. Hubbell, J., *Materials science: Enhancing drug function*. Science, 2003. **300**(5619): p. 595.
19. van der Most, P., A. Dolga, I. Nijholt, P. Luiten, and U. Eisel, *Statins: Mechanisms of neuroprotection*. Progress in neurobiology, 2009. **88**(1): p. 64-75.
20. Bösel, J., F. Gandor, C. Harms, M. Synowitz, U. Harms, P. Djoufack, D. Megow, U. Dirnagl, H. Hörtnagl, and K. Fink, *Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones*. Journal of neurochemistry, 2005. **92**(6): p. 1386-1398.
21. Stêpień, K., M. Tomaszewski, and S. Czuczwar, *Neuroprotective properties of statins*. Pharmacol Rep, 2005. **57**(5): p. 561-569.
22. Laufs, U., K. Gertz, P. Huang, G. Nickenig, M. Bohm, U. Dirnagl, and M. Endres, *Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice*. Stroke, 2000. **31**(10): p. 2442-2449.
23. Lu, D., A. Goussev, J. Chen, P. Pannu, Y. Li, A. Mahmood, and M. Chopp, *Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury*. Journal of neurotrauma, 2004. **21**(1): p. 21-32.
24. Zhang, L., Z. Zhang, X. Liu, A. Hozeska-Solgot, and M. Chopp, *The PI3K/Akt pathway mediates the neuroprotective effect of atorvastatin in extending thrombolytic therapy after embolic stroke in the rat*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2007. **27**(11): p. 2470.
25. Blanco, M., F. Nombela, M. Castellanos, M. Rodriguez-Yanez, M. Garcia-Gil, R. Leira, I. Lizasoain, J. Serena, J. Vivancos, and M. Moro, *Statin treatment withdrawal in ischemic stroke: a controlled randomized study*. Neurology, 2007. **69**(9): p. 904.
26. Lee, S., Y. Kim, Y. Kim, and B. Yoon, *Atorvastatin enhances hypothermia-induced neuroprotection after stroke*. Journal of the neurological sciences, 2008. **275**(1-2): p. 64-68.
27. Jung, K., K. Chu, S. Jeong, S. Han, S. Lee, J. Kim, M. Kim, and J. Roh, *HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes sensorimotor recovery, suppressing acute inflammatory reaction after experimental intracerebral hemorrhage*. Stroke, 2004. **35**(7): p. 1744.
28. Kreuter, J., *Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(1): p. 65-81.
29. Kreuter, J. *Application of nanoparticles for the delivery of drugs to the brain*. 2005: Elsevier.
30. Kreuter, J., D. Shamenkov, V. Petrov, P. Ramge, K. Cychutek, C. Koch-Brandt, and R. Alyautdin, *Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier*. Journal of drug targeting, 2002. **10**(4): p. 317-325.
31. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Drug delivery systems: entering the mainstream*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1818-1822.
32. Thassu, D., *Nanoparticulate Drug Delivery Systems*, ed. M.D. Deepak Thassu, Yashwant Pathak 2007.
33. Hervé Hillaireau, P.C., *Polymeric Nanoparticles in Drug Delivery*, in *Polymers in Drug Delivery*. 2006, Taylor and Francis Group.

34. Vasant V. Ranade, M.A.H., *Drug Delivery Systems*. 2004, London: CRC Press.
35. Torchilin, V.P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(2): p. 145-160.
36. William A. Goddard, D.W.B., Sergey Edward Lyshevski, Gerald J. Iafrate, *Handbook of Nanoscience, Engineering, and Technology*, ed. R.C. Dorf. 2007: CRC Press.
37. Torchilin, V., *Nanoparticulates as drug carriers*. 2006: Imperial College Pr.
38. Camille Bouissou, C.v.d.W., *Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres*, in *Polymers in Drug Delivery*. 2006.
39. Kissel, T., Y. Li, and F. Unger, *ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002. **54**(1): p. 99-134.
40. Ijeoma F. Uchegbu, A.G.S., *Polymers in Drug Delivery*. 2006.
41. Couvreur, P. and C. Vauthier, *Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease*. *Pharm Res*, 2006. **23**(7): p. 1417-1450.
42. Zlokovic, B., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. *Neuron*, 2008. **57**(2): p. 178-201.
43. Pardridge, W., *Blood-brain barrier delivery*. *Drug discovery today*, 2007. **12**(1-2): p. 54-61.
44. Abbott, N., L. Rönnbäck, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006. **7**(1): p. 41-53.
45. Regina, A., M. Demeule, A. Laplante, J. Jodoin, C. Dagenais, F. Berthelet, A. Moghrabi, and R. Beliveau, *Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2001. **20**(1): p. 13-25.
46. Romberg, B., W.E. Hennink, and G. Storm, *Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles*. *Pharm Res*, 2008. **25**(1): p. 55-71.
47. Xu, P., E. Gullotti, L. Tong, C.B. Highley, D.R. Errabelli, T. Hasan, J.X. Cheng, D.S. Kohane, and Y. Yeo, *Intracellular drug delivery by poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, revisited*. *Mol Pharm*, 2009. **6**(1): p. 190-201.
48. Pietzonka, P., B. Rothen-Rutishauser, P. Langguth, H. Wunderli-Allenspach, E. Walter, and H.P. Merkle, *Transfer of lipophilic markers from PLGA and polystyrene nanoparticles to caco-2 monolayers mimics particle uptake*. *Pharm Res*, 2002. **19**(5): p. 595-601.
49. Chen, H., S. Kim, L. Li, S. Wang, K. Park, and J.X. Cheng, *Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Forster resonance energy transfer imaging*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(18): p. 6596-6601.
50. Costantino, L., F. Gandolfi, G. Tosi, F. Rivasi, M.A. Vandelli, and F. Forni, *Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier*. *J Control Release*, 2005. **108**(1): p. 84-96.
51. Olivier, J.C., *Drug transport to brain with targeted nanoparticles*. *NeuroRx*, 2005. **2**(1): p. 108-119.
52. Lu, W., Y.Z. Tan, K.L. Hu, and X.G. Jiang, *Cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle with its transcytosis ability and little toxicity against blood-brain barrier*. *Int J Pharm*, 2005. **295**(1-2): p. 247-260.

53. Kim, D.H. and D.C. Martin, *Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery*. *Biomaterials*, 2006. **27**(15): p. 3031-3037.
54. Pandey, R. and G.K. Khuller, *Oral nanoparticle-based antituberculosis drug delivery to the brain in an experimental model*. *J Antimicrob Chemother*, 2006. **57**(6): p. 1146-1152.
55. Gulyaev, A., S. Gelperina, I. Skidan, A. Antropov, G. Kivman, and J. Kreuter, *Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles*. *Pharmaceutical research*, 1999. **16**(10): p. 1564-1569.
56. Range, P., R. Unger, J. Oltrogge, D. Zenker, D. Begley, J. Kreuter, and H. von Briesen, *Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells*. *European Journal of Neuroscience*, 2000. **12**(6): p. 1931-1940.
57. Alyautdin, R., V. Petrov, K. Langer, A. Berthold, D. Kharkevich, and J. Kreuter, *Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles*. *Pharmaceutical research*, 1997. **14**(3): p. 325-328.
58. Gao, K. and X. Jiang, *Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles*. *International journal of pharmaceutics*, 2006. **310**(1-2): p. 213-219.
59. Sun, W., C. Xie, H. Wang, and Y. Hu, *Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain*. *Biomaterials*, 2004. **25**(15): p. 3065-3071.
60. Schroeder, U., P. Sommerfeld, S. Ulrich, and B. Sabel, *Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood-brain barrier*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1998. **87**(11): p. 1305-1307.
61. Panyam, J. and V. Labhasetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003. **55**(3): p. 329-347.
62. Kreuter, J., *Transport of Drugs Across the Blood-Brain Barrier by Nanoparticles*. *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents*, 2002. **2**(3): p. 241-249.
63. Stancu, C. and A. Sima, *Statins: mechanism of action and effects*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2001. **5**(4): p. 378-387.
64. U.S.A. National Institute Of Health (NIH). *LIPITOR (atorvastatin calcium) tablet, film coated* Available from: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=11081>.
65. Vaughan, C.J. and N. Delanty, *Neuroprotective properties of statins in cerebral ischemia and stroke*. *Stroke*, 1999. **30**(9): p. 1969-1973.
66. Chen, J., C. Zhang, H. Jiang, Y. Li, L. Zhang, A. Robin, M. Katakowski, M. Lu, and M. Chopp, *Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice*. *Journal of cerebral blood flow & Metabolism*, 2005. **25**(2): p. 281-290.
67. Chen, J., A. Zacharek, A. Li, X. Cui, C. Roberts, M. Lu, and M. Chopp, *Atorvastatin promotes presenilin-1 expression and Notch1 activity and increases neural progenitor cell proliferation after stroke*. *Stroke*, 2008. **39**(1): p. 220.

68. Sparks, D., M. Sabbagh, D. Connor, H. Soares, J. Lopez, G. Stankovic, S. Johnson-Traver, C. Ziolkowski, and P. Browne, *Statin therapy in Alzheimer's disease*. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2006. **114**(s185): p. 78-86.
69. Haag, M., A. Hofman, P. Koudstaal, B. Stricker, and M. Breteler, *Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study*. *British Medical Journal*, 2009. **80**(1): p. 13.
70. Paul, F., S. Waiczies, J. Wuerfel, J. Bellmann-Strobl, J. Dörr, H. Waiczies, M. Haertle, K. Wernecke, H. Volk, and O. Aktas, *Oral high-dose atorvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis*. *PLoS One*, 2008. **3**(4): p. 1928.
71. Neuhaus, O., O. Stüve, S. Zarnvil, and H. Hartung, *Are statins a treatment option for multiple sclerosis?* *The Lancet Neurology*, 2004. **3**(6): p. 369-371.
72. Stanislaus, R., K. Pahan, A. Singh, and I. Singh, *Amelioration of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats by lovastatin*. *Neuroscience letters*, 1999. **269**(2): p. 71-74.
73. Leffler, C.W., D.W. Busija, W.M. Armstead, D.R. Shanklin, R. Mirro, and O. Thelin, *Activated oxygen and arachidonate effects on newborn cerebral arterioles*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(4 Pt 2): p. H1230-1238.
74. Lu, D., A. Goussev, J. Chen, P. Pannu, Y. Li, A. Mahmood, and M. Chopp, *Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury*. *J Neurotrauma*, 2004. **21**(1): p. 21-32.
75. Youssef, S., O. Stuve, J.C. Patarroyo, P.J. Ruiz, J.L. Radosevich, E.M. Hur, M. Bravo, D.J. Mitchell, R.A. Sobel, L. Steinman, and S.S. Zamvil, *The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease*. *Nature*, 2002. **420**(6911): p. 78-84.
76. Kuipers, H.F. and P.J. van den Elsen, *Immunomodulation by statins: inhibition of cholesterol vs. isoprenoid biosynthesis*. *Biomed Pharmacother*, 2007. **61**(7): p. 400-407.
77. Sparks, D.L., M.N. Sabbagh, D.J. Connor, J. Lopez, L.J. Launer, P. Browne, D. Wasser, S. Johnson-Traver, J. Lochhead, and C. Ziolkowski, *Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results*. *Arch Neurol*, 2005. **62**(5): p. 753-757.
78. Robert O. Williams III, J.M.V., *Nanoparticle Engineering*, in *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Swarbrick, Editor. 2007, Informa Healthcare.
79. Dollo, G., P. Le Corre, A. Guerin, F. Chevanne, J.L. Burgot, and R. Leverage, *Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs*. *Eur J Pharm Sci*, 2003. **19**(4): p. 273-280.
80. Sham, J.O., Y. Zhang, W.H. Finlay, W.H. Roa, and R. Lobenberg, *Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung*. *Int J Pharm*, 2004. **269**(2): p. 457-467.
81. BÜCHI Labortechnik AG. *Nano Spray Dryer B-90*. 2010; Available from: <http://www.buchi.com/Features.12379.0.html>.

82. Eerikainen, H., W. Watanabe, E.I. Kauppinen, and P.P. Ahonen, *Aerosol flow reactor method for synthesis of drug nanoparticles*. Eur J Pharm Biopharm, 2003. **55**(3): p. 357-360.
83. Liversidge, G.G. and K.C. Cundy, *Particle-Size Reduction for Improvement of Oral Bioavailability of Hydrophobic Drugs .1. Absolute Oral Bioavailability of Nanocrystalline Danazol in Beagle Dogs*. International journal of pharmaceutics, 1995. **125**(1): p. 91-97.
84. Merisko-Liversidge, E., G.G. Liversidge, and E.R. Cooper, *Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **18**(2): p. 113-120.
85. Date, A.A. and V.B. Patravale, *Current strategies for engineering drug nanoparticles*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2004. **9**(3-4): p. 222-235.
86. Krause, K.P. and R.H. Muller, *Production and characterisation of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenisation*. Int J Pharm, 2001. **214**(1-2): p. 21-24.
87. Muller, R.H. and C.M. Keck, *Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles*. J Biotechnol, 2004. **113**(1-3): p. 151-170.
88. Rogers, T.L., I.B. Gillespie, J.E. Hitt, K.L. Fransen, C.A. Crawl, C.J. Tucker, G.B. Kupperblatt, J.N. Becker, D.L. Wilson, C. Todd, C.F. Broomall, J.C. Evans, and E.J. Elder, *Development and characterization of a scalable controlled precipitation process to enhance the dissolution of poorly water-soluble drugs*. Pharm Res, 2004. **21**(11): p. 2048-2057.
89. Rodriguez-Paez, J.E., A.C. Caballero, M. Villegas, C. Moure, P. Duran, and J.F. Fernandez, *Controlled precipitation methods: formation mechanism of ZnO nanoparticles*. Journal of the European Ceramic Society, 2001. **21**(7): p. 925-930.
90. Ibarguen, C.A., A. Mosquera, R. Parra, M.S. Castro, and J.E. Rodriguez-Paez, *Synthesis of SnO₂ nanoparticles through the controlled precipitation route*. Materials Chemistry and Physics, 2007. **101**(2-3): p. 433-440.
91. Sarkari, M., J. Brown, X. Chen, S. Swinnea, R.O. Williams, 3rd, and K.P. Johnston, *Enhanced drug dissolution using evaporative precipitation into aqueous solution*. Int J Pharm, 2002. **243**(1-2): p. 17-31.
92. Chen, X., T.J. Young, M. Sarkari, R.O. Williams, 3rd, and K.P. Johnston, *Preparation of cyclosporine A nanoparticles by evaporative precipitation into aqueous solution*. Int J Pharm, 2002. **242**(1-2): p. 3-14.
93. Sinswat, P., X. Gao, M.J. Yacaman, R.O. Williams, 3rd, and K.P. Johnston, *Stabilizer choice for rapid dissolving high potency itraconazole particles formed by evaporative precipitation into aqueous solution*. Int J Pharm, 2005. **302**(1-2): p. 113-124.
94. Hu, J.H., K.P. Johnston, and R.O. Williams, *Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2004. **30**(3): p. 233-245.
95. Jarmer, D.J., C.S. Lengsfeld, and T.W. Randolph, *Manipulation of particle size distribution of poly(L-lactic acid) nanoparticles with a jet-swirl nozzle during precipitation with a compressed antisolvent*. Journal of Supercritical Fluids, 2003. **27**(3): p. 317-336.
96. Young, T.J., S. Mawson, K.P. Johnston, I.B. Henriksen, G.W. Pace, and A.K. Mishra, *Rapid expansion from supercritical to aqueous solution to*

- produce submicron suspensions of water-insoluble drugs*. Biotechnol Prog, 2000. **16**(3): p. 402-407.
97. Mezziani, M.J. and Y.P. Sun, *Protein-conjugated nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution into aqueous solution*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(26): p. 8015-8018.
 98. Thakur, R. and R.B. Gupta, *Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process*. International journal of pharmaceutics, 2006. **308**(1-2): p. 190-199.
 99. Zhang, J., B. Han, J. Chen, Z. Li, Z. Liu, and W. Wu, *Synthesis of Ag/BSA composite nanospheres from water-in-oil microemulsion using compressed CO₂ as antisolvent*. Biotechnol Bioeng, 2005. **89**(3): p. 274-279.
 100. Muller, R.H., K. Mader, and S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. **50**(1): p. 161-177.
 101. Hu, J., K.P. Johnston, and R.O. Williams, 3rd, *Rapid dissolving high potency danazol powders produced by spray freezing into liquid process*. Int J Pharm, 2004. **271**(1-2): p. 145-154.
 102. Jain, R., *The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2475-2490.
 103. Jalil, R. and J.R. Nixon, *Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties*. J Microencapsul, 1990. **7**(3): p. 297-325.
 104. Li, Y., Y. Pei, X. Zhang, Z. Gu, Z. Zhou, W. Yuan, J. Zhou, J. Zhu, and X. Gao, *PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats*. Journal of Controlled Release, 2001. **71**(2): p. 203-211.
 105. Avgoustakis, K., A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, A. Karydas, and D. Ithakissios, *PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties*. Journal of Controlled Release, 2002. **79**(1-3): p. 123-135.
 106. Christoph Schmidt, A.L., *NANOCARRIERS IN DRUG DELIVERY-DESIGN, MANUFACTURE AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES*, in *NANOTHERAPEUTICS Drug Delivery Concepts in Nanoscience*, A. Lamprecht, Editor. 2009, PAN STANFORD PUBLISHING.
 107. Quintanar-Guerrero, D., E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker, *Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1998. **24**(12): p. 1113-1128.
 108. Govender, T., S. Stolnik, M. Garnett, L. Illum, and S. Davis, *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.
 109. Cheng, J., B. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. Radovic-Moreno, and R. Langer, *Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery*. Biomaterials, 2007. **28**(5): p. 869-876.
 110. Boehringer-Ingelheim. *Resomer*. [Specification Sheet] 2008; Available from: www.resomer.com.
 111. Sigma-Aldrich. *Poly(vinyl alcohol)*. Available from: www.sigmaaldrich.com.

112. Sigma-Aldrich. *Tween 80*. Available from: www.sigmaaldrich.com.
113. Eroglu, H., E. Nemutlu, O. Turkoglu, O. Nacar, E. Bodur, M. Sargon, E. Beskonakli, and L. Oner, *A Quadruped Study on Chitosan Microspheres Containing Atorvastatin Calcium: Preparation, Characterization, Quantification and in-Vivo Application*. CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 2010. **58**(9): p. 1161-1167.
114. Niopas, I. and A.C. Daftsios, *Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies*. J Pharm Biomed Anal, 2003. **32**(6): p. 1213-1218.
115. van Zoonen, P., H.A. van 't Klooster, R. Hoogerbrugge, S.M. Gort, and H.J. van de Wiel, *Validation of analytical methods and laboratory procedures for chemical measurements*. Arh Hig Rada Toksikol, 1998. **49**(4): p. 355-370.
116. Quintanar-Guerrero, D., E. Allemann, H. Fessi, and E. Doelker, *Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers*. Drug Dev Ind Pharm, 1998. **24**(12): p. 1113-1128.
117. Barichello, J., M. Morishita, K. Takayama, and T. Nagai, *Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1999. **25**(4): p. 471-476.
118. Malvern Instruments Ltd. *Technology, Malvern*. Available from: <http://www.malvern.com/>.
119. BASF Corporation, *Pluronic® F88 Block Copolymer Surfactant*. 2002: New Jersey.
120. Rosca, I., F. Watari, and M. Uo, *Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation*. Journal of Controlled Release, 2004. **99**(2): p. 271-280.
121. Mainardes, R. and R. Evangelista, *PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution*. International journal of pharmaceutics, 2005. **290**(1-2): p. 137-144.
122. Betancourt, T., J.D. Byrne, N. Sunaryo, S.W. Crowder, M. Kadapakkam, S. Patel, S. Casciato, and L. Brannon-Peppas, *PEGylation strategies for active targeting of PLA/PLGA nanoparticles*. J Biomed Mater Res A, 2009. **91**(1): p. 263-276.
123. Avgoustakis, K., *Pegylated poly (lactide) and poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery*. Current Drug Delivery, 2004. **1**(4): p. 321-333.
124. Galindo-Rodriguez, S., E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker, *Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods*. Pharmaceutical research, 2004. **21**(8): p. 1428-1439.
125. Chorny, M., I. Fishbein, H. Danenberg, and G. Golomb, *Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics*. Journal of Controlled Release, 2002. **83**(3): p. 389-400.
126. Xie, H. and J. Smith, *Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system*. Journal of Nanobiotechnology, 2010. **8**(1): p. 18.

127. Hans, M. and A. Lowman, *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2002. **6**(4): p. 319-327.
128. Soppimath, K., T. Aminabhavi, A. Kulkarni, and W. Rudzinski, *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1-2): p. 1-20.
129. Yoo, H. and T. Park, *Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer*. Journal of Controlled Release, 2001. **70**(1-2): p. 63-70.
130. Calvo, P., B. Gouritin, H. Chacun, D. Desmaële, J. D'Angelo, J. Noel, D. Georjgin, E. Fattal, J. Andreux, and P. Couvreur, *Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery*. Pharmaceutical research, 2001. **18**(8): p. 1157-1166.
131. Craparo, E., M. Ognibene, M. Casaletto, G. Pitarresi, G. Teresi, and G. Giammona, *Biocompatible polymeric micelles with polysorbate 80 for use in brain targeting*. Nanotechnology, 2008. **19**: p. 485603.
132. Wilson, B., M. Samanta, K. Santhi, K. Kumar, N. Paramakrishnan, and B. Suresh, *Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease*. Brain research, 2008. **1200**: p. 159-168.
133. Ambruosi, A., H. Yamamoto, and J. Kreuter, *Body distribution of polysorbate 80 and doxorubicin-loaded [14C] poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles after iv administration in rats*. Journal of drug targeting, 2005. **13**(10): p. 535-542.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Soner Şimşek

Doğum Yeri : Trabzon

Doğum Yılı : 1985

Elektronik Posta: sonersimsek61@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Trabzon Tefvik Serdar Anadolu Lisesi (1996 – 2003)

Lisans: : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2004 – 2008)

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

2009 - : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD