



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KONTROLLÜ SALIM YAPAN RIVASTİGMİN
İÇEREN İMPLANTE PARTİKÜLER SİSTEMLERİN
FORMÜLASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Tuğrul Mert SERİM

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR**

2011 - ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KONTROLLÜ SALIM YAPAN RİVASTİGMİN
İÇEREN İMPLANTE PARTİKÜLER SİSTEMLERİN
FORMÜLASYONU ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Tuğrul Mert SERİM

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nurten ÖZDEMİR**

2011 - ANKARA

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

Tez Savunma Tarihi: 27/09/2011

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

Prof.Dr. Nurten ÖZDEMİR
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. Nilüfer YÜKSEL
Ankara Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Prof.Dr. Nuray ARI
Ankara Üniversitesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Yeşim KARASULU
Ege Üniversitesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	ix
Simgeler ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kontrollü Salım Sistemleri	3
1.2. İmplant Edilebilen Kontrollü Salım Sistemleri	5
1.2.1. İmplant Edilebilen Kontrollü Salım Sistemlerinin Tipleri	7
1.2.1.1. Hız Programlı İlaç Taşıyıcı Sistemler	7
1.2.1.2. Aktivasyon Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler	10
1.2.1.2.1. Fiziksel Etmenlerle Aktive Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler	11
1.2.1.2.2. Kimyasal Etmenlerle Aktive Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler	13
1.2.1.2.3. Biyokimyasal Etmenlerle Aktive Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler	13
1.2.1.3. Geri Besleme Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler	13
1.2.2. İmplant Edilebilen İlaç Taşıyıcı Sistemlerden Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	14
1.2.2.1. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerden Mikroküreler	14
1.2.2.2. Mikrokürelerin Hazırlama Yöntemleri	15
1.2.3. İmplant Edilebilen Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Materyallerin Taşınması Gereken Özellikler	17
1.3. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler	18
1.3.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerlerin Sınıflandırılması	19

1.3.2.	Polimer Degradasyon Mekanizmaları	21
1.3.3.	Polimer Erozyon Mekanizmaları	23
1.4.	Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	24
1.4.1.	PLGA'nın Yapısı ve Elde Edilmesi	24
1.4.2.	PLGA'nın Fizikokimyasal Özellikleri	25
1.4.3.	PLGA'nın Farmasötik Alanda Kullanılışı	26
1.4.4.	PLGA Mikroküreler	26
1.4.4.1.	Çift Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile PLGA Mikrokürelerin Hazırlanması	26
1.5.	Polimer Matrislerden Etkin Madde Salım Mekanizmaları ve Salım Kinetikleri	28
1.6.	Polimerik Mikrokürelerin Sterilizasyonu	38
1.7.	Rivastigmin Tartarat	39
1.7.1.	Fizikokimyasal Özellikleri	40
1.7.2.	Farmakolojik Özellikleri	40
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	41
2.1.	Gereçler	41
2.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
2.1.2.	Kullanılan Aletler	42
2.2.	Yöntemler	43
2.2.1.	Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi	43
2.2.1.1.	Etkin Maddenin İnfrared (IR) Spektrumunun İncelenmesi	43
2.2.1.2.	Etkin Maddenin Erime Noktasının Tayini	43
2.2.1.3.	Etkin Maddenin DSC Analizi	43
2.2.1.4.	Etkin Maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumunun İncelenmesi	43
2.2.1.5.	Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayini	44
2.2.1.5.1.	Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininde Kullanılan Tampon Çözeltisi	44

2.2.1.5.2.	Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Kalibrasyonu	44
2.2.1.6.	Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonu	44
2.2.1.6.1.	Seçicilik	45
2.2.1.6.2.	Doğrusallık ve Aralığı	46
2.2.1.6.3.	Doğruluk ve Geri Elde	46
2.2.1.6.4.	Kesinlik	47
2.2.1.6.5.	Teşhis ve Tayin Sınırları	48
2.2.1.7.	Etkin Maddenin Stabilesinin İncelenmesi	48
2.2.2.	Polimerin Özelliklerinin Belirlenmesi	49
2.2.2.1.	Polimerin IR Spektrumunun İncelenmesi	49
2.2.2.2.	Polimerin DSC Analizi	49
2.2.3.	Ön Formülasyon ve Formülasyon Çalışmaları	49
2.2.3.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	49
2.2.3.2.	Formülasyon Çalışmaları	55
2.2.3.3.	Formülasyonun Hazırlanış Aşamasında Kullanılan Tampon Çözeltisi	58
2.2.4.	Hazırlanan Formüllerde Yapılan Kontroller	59
2.2.4.1.	Hazırlanan Formüllerde Etkin Madde Miktar Tayini ve Enkapsülasyon Etkinliği	59
2.2.4.2.	Hazırlanan Formüllerin Şekil ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	60
2.2.4.3.	Hazırlanan Formüllerin IR Analizi	60
2.2.4.4.	Hazırlanan Formüllerin DSC Analizi	61
2.2.4.5.	Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımının Tayini	61
2.2.4.6.	Hazırlanan Formüllerde İn Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları	61
2.2.4.6.1.	İN Vitro Etkin Madde Salım Çalışmalarında Kullanılan Ortam	61
2.2.4.6.2.	İN Vitro Etkin Madde Salım Çalışmalarının Yapılışı	62

2.2.4.6.3.	Hazırlanan Formüllerin Sterilizasyonu	63
2.2.4.6.4.	Kinetik Hesaplamalar ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi	63
3.	BULGULAR	64
3.1.	Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular	64
3.1.1.	Etkin Maddenin IR Spektrumu	64
3.1.2.	Etkin Maddenin Erime Noktasının Tayini	64
3.1.3.	Etkin Maddenin DSC Analizi	64
3.1.4.	Etkin Maddenin UV Spektrumu	65
3.1.5.	Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Kalibrasyonu	67
3.1.6.	Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonuna İlişkin Bulgular	69
3.1.6.1.	Seçicilik	69
3.1.6.2.	Doğrusallık ve Aralığı	69
3.1.6.3.	Doğruluk ve Geri Elde	72
3.1.6.4.	Kesinlik	73
3.1.6.5.	Teşhis ve Tayin Sınırları	76
3.1.7.	Etkin Maddenin Stabilesinin İncelenmesi	76
3.2.	Polimere Ait Bulgular	77
3.2.1.	Polimerin IR Spektrumu	77
3.2.2.	Polimerin DSC Analizi	77
3.3.	Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	78
3.3.1.	Hazırlanan Formüllerde Etkin Madde Miktar Tayini ve Enkapsülasyon Etkinliği	78
3.3.2.	Hazırlanan Formüllerin Şekil ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi	81
3.3.3.	Hazırlanan Formüllerin IR Analizi	86
3.3.4.	Hazırlanan Formüllerin DSC Analizi	86
3.3.5.	Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Tayinine İlişkin Bulgular	88

3.3.6.	Hazırlanan Formüllerde İn Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları	89
3.3.6.1.	In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Mikroenkapsülasyon İşleminin Etkisi	89
3.3.6.2.	In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Aynı Oranda Eklenen Farklı Stabilizatörlerin Etkisi	91
3.3.6.3.	In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisi	92
3.3.6.4.	In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Primer Emülsiyona Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisi	94
3.3.6.5.	In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Farklı Miktarda Etkin Madde Kullanılmasının Etkisi	95
3.3.6.6.	In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Sterilizasyonun Etkisi	96
3.3.7.	In Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları Verilerinin Kinetik Değerlendirmesi	97
4.	TARTIŞMA	99
4.1.	Etkin Maddenin Özelliklerinin Değerlendirilmesi	99
4.2.	Polimerin Özelliklerinin Değerlendirilmesi	102
4.3.	Formülasyon Çalışmalarının ve Hazırlanan Formüller Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Verilerin Değerlendirilmesi	103
4.3.1.	Enkapsülasyon Etkinliğini Artırmaya Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi	103
4.3.2.	Hazırlanan Formüllerin Şekil ve Yüzey Morfolojilerinin Değerlendirilmesi	110
4.3.3.	Hazırlanan Formüllerin IR Analizinin Değerlendirilmesi	111
4.3.4.	Hazırlanan Formüllerin DSC Analizinin Değerlendirilmesi	111
4.3.5.	Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Sonuçlarının Değerlendirilmesi	111

4.3.6.	İn Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları Sonuçlarının Değerlendirilmesi	114
4.3.6.1.	İn Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Mikroenkapsülasyonun Etkisinin Değerlendirilmesi	114
4.3.6.2.	İn Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Aynı Oranda Eklenen Farklı Stabilizatörlerin Etkisinin Değerlendirilmesi	114
4.3.6.3.	İn Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisinin Değerlendirilmesi	116
4.3.6.4.	İn Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Primer Emülsiyona Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisinin Değerlendirilmesi	118
4.3.6.5.	İn Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Farklı Miktarda Etkin Madde Kullanılmasının Etkisinin Değerlendirilmesi	119
4.3.6.6.	İn Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Sterilizasyonun Etkisi	120
4.3.7.	Kinetik Mekanizmalara Uyumun İncelenmesi	120
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	123
	ÖZET	125
	SUMMARY	126
	KAYNAKLAR	127
	ÖZGEÇMİŞ	135

ÖNSÖZ

Bu çalışmada rivastigmin tartarat içeren PLGA mikroküre formülasyonları hazırlanmış ve formülasyon parametrelerinin, enkapsülasyon etkinliği, partikül büyüklüğü ve *in vitro* etkin madde salımı üzerine etkisi incelenmiştir.

Çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan, aynı zamanda manevi olarak da benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof Dr. Nurten ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana destek olan ve her türlü kolaylığı gösteren Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Asuman BOZKIR'a çok teşekkür ederim. Bu çalışmanın yürütülebilmesine lisans ve lisansüstü öğrenimim boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşarak imkan veren tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Bana desteklerini her zaman hissettiren Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL, Yrd. Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN, Dr. Ecz. Tangül ŞEN ve Dr. Ecz. Özge İNAL'a teşekkür ederim. Tez çalışmamda bana içtenlikle destek olan Doç. Dr. Yeşim KARASULU'ya destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca sabırla tüm sorularımı yanıtlayan ve bana her zaman destek olan, Dr. Ecz. Ulya BADILLI, Dr. Ecz. Zerrin BAYINDIR, Dr. Ecz. Tuba TÜRK, Dr. Ecz. Burcu DEVRİM ve Dr. Ecz. Ongun SAKA'ya çok teşekkür ederim. Uzm. Ecz. Günseli TILKAN, Uzm. Ecz. Berrin KÜÇÜKTÜRKMEN, Uzm. Ecz. Gülin AMASYA, Uzm. Ecz. Murat ORAL, Uzm. Ecz. Umut Can ÖZ ve Ecz. Selin ÇOBAN'a destekleri, dostlukları ve varlıkları için çok teşekkür ederim.

Çalışmada kullandığımız Rivastigmin tartarata gönderen Novartis İlaç Firması'na teşekkür ederim.

Erime noktası ve IR analizlerinde bana yardımcı olan Uzm. Ecz. Serap YILMAZ ve Ecz. Dilan KONYAR'a, partikül büyüklüğü analizlerimin yapılmasında bana yardımcı olan Ecz. Sevgi GÖKÇEK'e çok teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca kalpleri benimle çarpan aileme; sevgili annem, meslektaşım Ecz. Mukaddes SERİM'e, biricik kardeşim Ece SERİM'e, Ümmügülüm ARICIOĞLU, Ceyda ARICIOĞLU ve Kübra ARICIOĞLU'na sabır ve özveriyle beni bugüne getirdikleri ve asla yalnız bırakmadıkları için sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AOKT	Artık ortalama kareler toplamı
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IR	Infrared
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MA	Molekül ağırlığı
Mrad	Megarad
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil pirolidon
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SH	Standart hata
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. Çok dozlu klasik ilaç şekli alınımının ardından etkin madde konsantrasyon profili (A_1, A_2, A_3, A_4) ve ideal ilaç konsantrasyon profili (B)	1
Şekil 1.2. Difüzyon kontrollü matris sistem.	8
Şekil 1.3. Membran geçiş kontrollü depo sistem.	8
Şekil 1.4. Manyetik alana maruz kaldıktan sonra sistemden artan etkin madde salımının gösterildiği manyetik kontrollü polimerik ilaç salım sisteminin şematik diyagramı	12
Şekil 1.5. Hidrasyonla aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler.	12
Şekil 1.6. Partiküler ilaç taşıyıcı sistemler; (a) Mikrokapsül, (b) Mikroküre, (c) Nanopartikül	14
Şekil 1.7. Yüzey erozyonu	23
Şekil 1.8. Kütle erozyonu	24
Şekil 1.9. PLGA kopolimerinin yapısındaki monomerlerden (a) laktik asit (x), (b) glikolik asit (y) ve (c) PLGA kopolimeri	25
Şekil 1.10. Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikrokürelerin hazırlanması	27
Şekil 1.11. Salım mekanizmaları: (A) Su dolu porlardan difüzyon, (B) Polimerden difüzyon, (C) Ozmotik pompalama, (D) Erozyon	28
Şekil 1.12. PLGA matrisler içinde meydana gelen ve ilaç salımını sağlayan fizikokimyasal süreçler.	29
Şekil 1.13. Rivastigmin tartaratın: a) açık formülü, b) kapalı formülü	39
Şekil 2.1. Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle rivastigmin tartarat içeren PLGA mikrokürelerin üretim şeması	50
Şekil 3.1. Rivastigmin tartaratın IR spektrumu	64
Şekil 3.2. Rivastigmin tartaratın DSC termogramı	65

Şekil 3.3.	Rivastigmin tartaratın referans UV spektrumu	65
Şekil 3.4.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamında HPLC ile elde edilen UV spektrumu	66
Şekil 3.5.	Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamında HPLC ile elde edilen UV spektrumu	66
Şekil 3.6.	Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamında HPLC ile elde edilen 3 boyutlu UV spektrumu	67
Şekil 3.7.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu	68
Şekil 3.8.	Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamındaki kalibrasyon doğrusu	68
Şekil 3.9.	Rivastigmin Tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin doğru	70
Şekil 3.10.	Rivastigmin Tartaratın distile su ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin doğru	71
Şekil 3.11.	PLGA 50:50'nin IR spektrumu	77
Şekil 3.12.	PLGA 50:50'nin DSC termogramı	78
Şekil 3.13.	Etkin madde-polimer oranı 1:1 olan F23 kodlu formülün optik mikroskop görüntüleri	81
Şekil 3.14.	Enkapsülasyon etkinliği bakımından ideal formül olarak belirlenen F34 kodlu formülün optik mikroskop görüntüleri	81
Şekil 3.15.	F35 ve F37 kodlu formüllerin optik mikroskop görüntüleri	82
Şekil 3.16.	F40 kodlu formülün beyaz ışık ve floresan lamba altında alınan optik mikroskop görüntüleri	82
Şekil 3.17.	F41 ve F43 kodlu formülasyonların optik mikroskop görüntüleri	82
Şekil 3.18.	Primer emülsiyon oluşturulması sırasında farklı homojenizasyon hızlarıyla hazırlanan F45, F46 ve F47 kodlu formüllerin optik mikroskop görüntüleri	83
Şekil 3.19.	Dış faza stabilizatör olarak % 1,5 a/h oranında PVP içeren F50 kodlu formülün optik mikroskop görüntüsü	83
Şekil 3.20.	F34 kodlu formülün SEM görüntüleri	84

Şekil 3.21.	F34 kodlu formülün <i>in vitro</i> salım deneyi ardından SEM görüntüleri	85
Şekil 3.22.	F34 kodlu formülün IR spektrumu	86
Şekil 3.23.	F34 kodlu formüldeki maddeleri içeren fiziksel karışımın DSC termogramı	87
Şekil 3.24.	F34 kodlu formülün DSC termogramı	87
Şekil 3.25.	İdeal formül olarak belirlenen F34 kodlu formülün partikül büyüklüğü dağılımı	89
Şekil 3.26.	Saf rivastigmin tartarat ve F34 kodlu formülün ilk 12 saatte elde edilen salım profili	90
Şekil 3.27.	F34 kodlu formülün 17. gün sonunda elde edilen salım profili	90
Şekil 3.28.	F34 ve F40 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri	91
Şekil 3.29.	F34 ve F40 kodlu formüllerin 21. gün sonunda elde edilen salım profilleri	91
Şekil 3.30.	F35 kodlu formülün ilk 12 saatteki salım profili	92
Şekil 3.31.	F35 kodlu formülün 21. gün sonundaki salım profili	92
Şekil 3.32.	F40, F49 ve F50 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri	93
Şekil 3.33.	F40 ve F50 kodlu formüllerin 21. gün sonunda elde edilen salım profilleri	93
Şekil 3.34.	F34 ve F44 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri	94
Şekil 3.35.	F40 ve F51 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profili	94
Şekil 3.36.	F34 ve F41 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri	95
Şekil 3.37.	F34 ve F41 kodlu formüllerin 21. gün sonunda elde edilen salım profilleri	95
Şekil 3.38.	γ-radyasyonla sterilizasyon öncesinde ve sonrasında F34 kodlu formülün ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri	96

- Şekil 3.39. γ -radyasyonla sterilizasyon öncesinde ve sonrasında F34 kodlu formülün 17. gün sonunda elde edilen salım profilleri 96
- Şekil 4.1. F34 kodlu formülde salımın 36. saatinden sonra salınan etkin madde miktarına karşı (Q), belli bir zaman aralığında açığa çıkan etkin madde miktarları (dQ/dt) grafiği 121

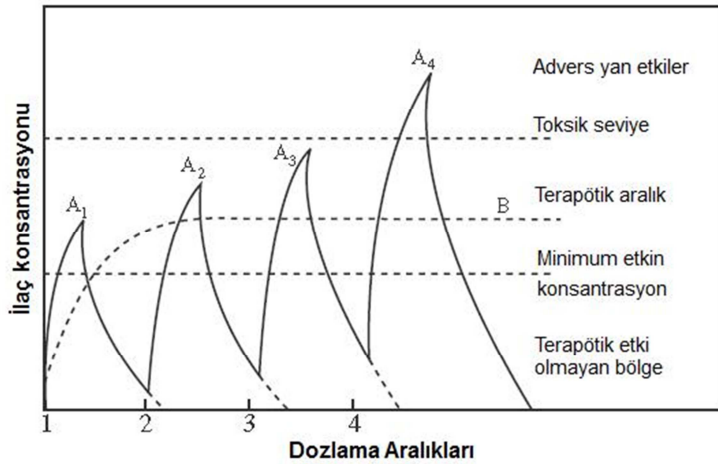
ÇİZELGELER

		Sayfa
Çizelge 1.1.	Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması	20
Çizelge 2.1.	Rivastigmin tartaratın HPLC ile miktar tayini koşulları	45
Çizelge 2.2.	Ön Formülasyon Çalışmalarında Hazırlanan Formüller	52
Çizelge 2.3.	Formülasyon Çalışmalarında Hazırlanan Formüller	55
Çizelge 3.1.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su içindeki miktar tayininin kalibrasyonuna ait parametreler	67
Çizelge 3.2.	Rivastigmin Tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin parametreler	70
Çizelge 3.3.	Rivastigmin Tartaratın distile su ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin parametreler	71
Çizelge 3.4.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayin yönteminin doğruluk ve geri elde çalışmasına ilişkin sonuçlar	72
Çizelge 3.5.	Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin doğruluk ve geri elde çalışmasına ilişkin sonuçlar	72
Çizelge 3.6.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayin yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmasına ilişkin sonuçlar	73
Çizelge 3.7.	Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmasına ilişkin sonuçlar	73
Çizelge 3.8.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasına ilişkin sonuçlar	74
Çizelge 3.9.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki	75

	miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasında günler arasındaki farkı incelemek için yapılan t-testi ile incelenen parametreler	
Çizelge 3.10.	Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasına ilişkin sonuçlar	75
Çizelge 3.11.	Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasında günler arasındaki farkı incelemek için yapılan t-testi ile incelenen parametreler	76
Çizelge 3.12.	Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin teşhis ve tayin sınırları	76
Çizelge 3.13.	Hazırlanan formüllerin işlem verimleri ve enkapsülasyon etkinlikleri	79
Çizelge 3.14.	Mikroküre formülasyonlarının geometrik ortalama çapları ve dağılımın genişliğini ifade eden span değerleri	88
Çizelge 3.15.	Formülasyon değişkenlerinin partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerine etkisi	88
Çizelge 3.16.	Formülasyonların <i>in vitro</i> salım hızı kinetik verileri	98

1. GİRİŞ

İlaç teknolojileri geliştikçe, ilaçların etki bakımından daha spesifik ve bölgesel seçici olmaları, minimum dozlama ile maksimum etkiyi mümkün olan en uzun süre boyunca göstermeleri istenmektedir. Klasik ilaç şekilleri, sık ve tekrarlanan doz gerektirmeleri, etkin madde konsantrasyonunun etkili düzeyin altına düşmesi veya toksik düzeyin üstüne çıkması gibi istenmeyen durumlara yol açabilmeleri gibi nedenlerle bu beklentilere cevap verememektedir (Şekil 1.1). Bu beklentileri karşılayabilmek, etkin madde dozunu azaltmak, dozlama aralığını uzatmak, yan ve toksik etkilerden arındırmak, etkin maddeyi hedef bölgeye ulaştırmak amacıyla geliştirilen kontrollü salım sistemleri ile mümkün olmuştur.



Şekil 1.1. Çok dozlu klasik ilaç şekli alımının ardından etkin madde konsantrasyon profili (A₁, A₂, A₃, A₄) ve ideal ilaç konsantrasyon profili (B) (Chien ve Lin, 2007).

İlaçların etkin kullanımında, kandaki etkin madde konsantrasyonunun istenilen terapötik düzeyde uzun süre sabit tutulması ve vücuda verilen etkin maddenin eliminasyonu azaltılarak ilaçtan elde edilecek faydanın artırılması gerekmektedir; ancak en yaygın uygulama şekillerinin başında gelen ilaçların oral kullanımı ile bunu sağlamak oldukça zordur. Bu durumda, etkin maddenin verilen dozunun, gastrointestinal sistemden geçişi sırasındaki eliminasyonunun azaltılabilmesi ve sabit kan konsantrasyonunda uzun süreli bir etki oluşturulabilmesi için önerilen en ideal yol ilacın implantasyonudur.

İmplant sistemlerinin hazırlanmasında, etkin maddenin çıkışını kontrol edecek polimerik materyalin seçimi çok önemlidir. Polimerik sistem içine yerleştirilen etkin maddeler, implante edilerek spesifik organ ya da dokulara hedeflendirilebilmektedir. Böylece yan etkiler ve etkin terapötik doz azaltılabilmekte ve etki bölgesine ulaşmadan önceki metabolik dönüşüm de ortadan kaldırılabilir. Bu belirtilen koşulların sağlanabilmesi için polimerin öncelikle biyolojik sistemle geçimli olması gerekmektedir. Ayrıca, enjeksiyon ile yerleştirilen implantların etki süreleri bittikten sonra dokudan uzaklaştırılabilmesi için hastanın tekrar bir cerrahi müdahaleye maruz kalmaması amacıyla, polimerin zamanla vücutta parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması yani polimerin biyolojik olarak parçalanabilir olması gerekmektedir.

Alzheimer Hastalığı, günlük yaşamsal aktivitelerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulma ile karakterize, nöropsikiyatrik semptomların ve davranış değişikliklerinin eşlik ettiği nörodejeneratif bir hastalıktır. En önemli erken semptomlarından biri hafıza kaybıdır. Bu hafıza kaybı, geçmiş hafızanın korunduğu, günlük yaşam içinde küçük unutkanlıklarla başlayan, hastalık ilerledikçe bu unutkanlıkların arttığı bir hafıza kaybıdır. Kontrollü salım yapan enjekte edilebilir partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tedavide yer alması ile unutma problemi yaşayan hastanın günde iki defa oral ilaç alımı yerine uzun etkili enjeksiyonlar ile uyuncunun artırılması önemlidir.

Alzheimer Hastalığı tedavisinde, ikinci kuşak karbamat yapılı psödo-irreversibl asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibitörü olan rivastigmin tartarat etkin maddesi içeren kapsül formu, oral çözelti ve transdermal terapötik sistem (TTS) formu piyasada bulunmaktadır. Bu çalışmada rivastigmin tartarat etkin maddesi içeren, kontrollü salım yapan, enjekte edilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) mikroküreler hazırlanarak tedavide kullanılan doz sıklığı fazla olan ilaç şekillerinden daha etkin ve daha uzun etkili bir ilaç şeklinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

1.1. Kontrollü Salım Sistemleri

Pek çok ilaç şeklinde, etkin maddenin istenilen dokuda istenilen düzeyde bulunması, organ fizyolojisi ve metabolizma tarafından sınırlandırılmaktadır. Örneğin oral olarak uygulanan ilaçlar dokulara difüzyon, permeasyon ve akış prensipleriyle dağılırlar. Doku etkin madde düzeyi tek dozlamayla yetersiz ise ilacın yeniden verilmesi gerekir. İlacın istenilen yerde konumlandırılması enjeksiyon yoluyla kontrol edilebilir; ancak bu kısıtlı alanlarda mümkündür ve genelde etkinlik kısa ömürlüdür. Kontrollü salım sistemleri, terapötik ajanların istenen bölgede konumlandırılması ve etki süresinin kontrolünde alternatif bir yaklaşım sunar. Kontrollü salımda etkin madde, bir ilaç taşıma sistemi meydana getirmek için başka bileşenlerle (genellikle polimerik) bir araya getirilir.

Kontrollü salım sistemleri; salım süresi, salım hızı veya hedefleme gibi gerekli özelliklerin düzenlenmesi amacıyla tasarlanabilen bir bileşen içeren ve genelde etkinin bir günden uzun sürdüğü sistemlerdir (Saltzman, 2001, s.: 235).

Kontrollü salım sistemlerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir (Chien ve Lin, 2007, s.: 1082; Kontrollü Salım Sistemleri, 2002, s.: 4):

- i. İstenen salım hızında bir terapötik dozun kontrollü olarak uygulanabilmesi,
- ii. Etkin madde konsantrasyonunun tedavide uzatılmış bir süre boyunca optimal terapötik aralıkta korunabilmesi,
- iii. *In vivo* yarılanma ömrü kısa olan etkin maddelerin parçalanması geciktirilerek yarılanma ömrünün uzatılabilmesi,
- iv. İstenilen dokulara hedeflendirilebilmeleri,
- v. Etkinlik-doiz ilişkisinin çok iyi olması,
- vi. Yan etkilerin azaltılması,
- vii. Sık doz alımının azalması,
- viii. Hasta uyuncunun artırılması.

Kontrollü salım sistemleri beraberinde getirdiği pek çok avantajla, ilaç teknolojisinde süregelen pek çok sorunun çözümü gibi görünmektedir; ancak bu sistemlerin de dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar şu şekilde sıralanabilir (Kontrollü Salım Sistemleri, 2002, s.:4):

- i. Polimerin veya metabolizma ürününün toksik etki veya biyolojik geçimsizlik gösterebilmesi,
- ii. Sistem uygulandıktan sonra etkin madde salımının istenildiği an durdurulamaması,
- iii. Her etkin maddenin kontrollü salım sistemi haline getirilememesi,
- iv. Polimerin veya sistemin formülasyon maliyetinin yüksek olabilmesi.

Teknik özelliklerine göre kontrollü salım sistemleri şu şekilde sınıflandırılabilirler (Chien ve Lin, 2007, s.: 1082):

1. Hız programlı ilaç taşıyıcı sistemler

- i. Polimer membran geçiş kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler
- ii. Polimer matris difüzyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler
- iii. Polimer membran-matris hibrid tip ilaç taşıyıcı sistemler
- iv. Mikrorezervuar partiyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

2. Aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler

- i. Fiziksel etmenlerle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Ozmotik basınç ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Hidrodinamik basınç ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Buhar basıncı ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Mekanik kuvvet ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Manyetizma ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Sonoforez ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - İyontoforez ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Hidrasyon ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler

- ii. Kimyasal etmenlerle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - pH değişikliği ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - İyonlar ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Hidroliz ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - iii. Biyokimyasal etmenlerle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
 - Enzimler ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler,
 - Biyokimyasallar ile aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler
3. Geri besleme kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler
- i. Biyoerozyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler
 - ii. Biyoduyarlı ilaç taşıyıcı sistemler
 - iii. Kendi kendini ayarlayabilen ilaç taşıyıcı sistemler
4. Spesifik dokuya hedefleme yapan ilaç taşıyıcı sistemler

1.2. İmplant Edilebilen Kontrollü Salım Sistemleri

İmplant edilebilir kontrollü salım sistemleri kullanılmaksızın, ilaç tedavisinde, etkin maddenin inip çıkan plazma konsantrasyonunun önüne geçmenin tek yolu, hastaya sabit hızda devamlı IV infüzyon uygulamak olup, bu tip tedavi, kan plazma konsantrasyonunun sürekli gözetim altında tutulmasını gerektirmektedir.

Bu sorunu çözmek için, kontrollü ilaç salımı yapan yeni sistemlere ihtiyaç duyulmaktaydı. 1861 yılında Lafarge subkutan olarak implante edilebilen pelletler geliştirmiştir. Daha sonra 1930'ların sonunda uzatılmış etkili implante edilebilir ilaç taşıma sistemleri üzerine araştırmalar yeniden başlamıştır (Chien, 1991). 1936'da Deanesly ve Parks, çiftlik hayvanlarında kullanılmak üzere sıkıştırılmış saf kristal östrojen pelletler formüle etmişler, çiftlik hayvanlarına subkutan olarak implante etmişler ve pek çok hayvanda üç ayı aşan bir süre, sürekli etkinin oluştuğunu gözlemişlerdir. Hayvanlara hormonal implantasyon 1950'lerde standart uygulama haline gelmiş ve sığırların büyüme ve beslenme verimliliğini artırdığı görülmüştür. Bu bulgu, implantlar

alanındaki ilgiyi artırmış ve günümüze kadar süren araştırma ve buluşları tetiklemiştir (Dash ve Cudworth, 1998).

İmplant sistemler, etki yerine en yakın bölgeye implante edilerek etkin maddenin gastrointestinal kanal membranı, kan-beyin bariyeri karaciğer ilk geçiş etkisi gibi biyolojik bariyerleri aşmasını sağlamak, daha az doz ile toksik etkileri azaltmak ve uzun süre etki sağlamak amacıyla tasarlanmaktadır (Danckwerts ve Fassihi, 1991). Klasik oral tedaviler dozaj formunun günde bir, iki veya daha fazla alınmasını gerektirebilirken, bazı implante edilebilir sistemler, 5 yıla kadar etkisini sürdürmek üzere geliştirilmişlerdir.

İmplant edilebilen kontrollü salım sistemlerinin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Sabit hızla etkin madde salımı gerçekleştirerek plazma konsantrasyonundaki dalgalanmaların önüne geçilir ve plazma konsantrasyonu terapötik aralıkta tutulur.
- İlaç biyolojik bariyerlerden geçip elimine olmadığı için daha az miktarda etkin madde gereksinimi olur.
- Etki bölgesine yakın etkin madde salımı olduğu için diğer organlarda minimum yan etki görülür.
- Acil durumda hızla vücuttan uzaklaştırılabilirler.
- Hızla metabolize olan veya başka yolla verilemeyen etkin maddeler implantasyon yoluyla kolayca verilebilirler.
- Sık tekrarlanan dozlama olmadığı için hasta uyuncu yüksektir.

İmplant edilebilen kontrollü salım sistemlerinin dezavantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Biyoyumluluğu olmayan ve/veya toksik materyal kullanılmış olabilir.
- Biyoparçalanabilir olanlar bazı zararlı yan ürünler verebilir.
- Biyoparçalanabilir olmayanların yerleştirilmesi ve geri alınması için cerrahi işlem gereklidir.

- Üretim ve uygulama sırasındaki hatalar sonucunda etkin madde sızması veya kontrolsüz etkin madde salımı gerçekleşebilir.
- İmplantasyon bölgesinde ağrı veya rahatsızlık şikayetleri olabilir.
- Klasik ilaç şekillerine göre maliyeti yüksek sistemlerdir.

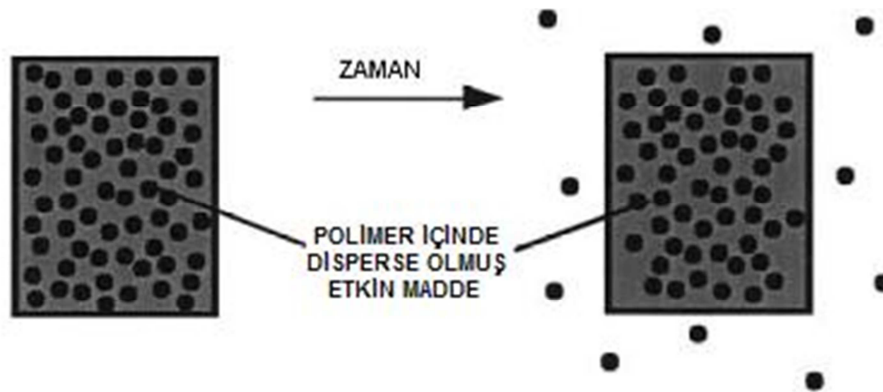
1.2.1. İmplant Edilebilen Kontrollü Salım Sistemlerinin Tipleri

Bir ilaç taşıyıcı sistemin kontrollü salım sistemi şeklinde adlandırılmasını sağlayan her teknik özellik implante edilebilen ilaç taşıyıcı sistemlerde de kullanılabilir ve temelde bu özelliklerin bir kısmı da implante edilebilir ilaç taşıyıcı sistemler için geliştirilmiştir. Dolayısıyla Bölüm 1.1'de yer alan sınıflandırma implante edilebilen ilaç taşıyıcı sistemlerin sınıflandırılmasında da kullanılır. İmplant edilebilen kontrollü salım sistemleri, teknik özelliklerine göre 4 ana grup altında incelenebilir. Bunlar; hız programlı ilaç taşıyıcı sistemler, aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler, geri besleme kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler ve spesifik dokuya hedefleme yapan ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Chien ve Lin, 2007, s.: 1082). Bunlardan spesifik dokuya hedefleme yapan ilaç taşıyıcı sistemler geliştirme aşamasındadır; ancak diğer üç sınıfın teknik özelliklerini taşıyan pek çok ticari implante edilebilir preparat bulunmaktadır.

1.2.1.1. Hız Programlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bu grupta yer alan sistemlerde etkin madde moleküllerinin ilaç taşıyıcı sistemden salımı spesifik bir salım profiline göre önceden programlanmıştır. Bu, etkin madde moleküllerinin ilaç taşıyıcı sistem içindeki (matris) veya sistemi çevreleyen (depo-rezervuar) bir bariyer ortamdan difüzyonunun kontrol edildiği sistem tasarımı ile sağlanır. Polimer membran geçiş kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler (depo sistemler), polimer matris difüzyon kontrollü sistemler (matris sistemler), polimer membran-matris hibrid tip ilaç taşıyıcı sistemler ve mikrozervuar partiyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler bu grupta yer alır (Chien ve Lin, 2007, s.: 1082).

Biyolojik olarak parçalanmayan matris ve depo sistemler çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimerik matris sistemlerinde (monolitik sistemler de denmektedir), etkin madde hidrofilik veya lipofilik polimer matris materyalinde homojen olarak disperse edilmiştir. Etkin maddenin polimerik matris materyalinden yavaş difüzyonu, etkin maddenin sistemden geciktirilmiş salımını sağlar (Şekil 1.2). Diğer yandan, depo tipi sistem, etkin maddenin vücuda difüzyonunu kontrol edebilen kalınlık ve geçirgenlik özelliklerine sahip geçirgen biyolojik olarak parçalanmayan bir zar tarafından çevrelenmiş, kompakt bir etkin madde çekirdeğini içerir (Şekil 1.3).



Şekil 1.2. Difüzyon kontrollü matris sistem (Fung ve Saltzman, 1997).



Şekil 1.3. Membran geçiş kontrollü depo sistem (Fung ve Saltzman, 1997).

Depo sistemlerde, depo içindeki etkin madde konsantrasyonu, kapalı membranın iç yüzeyiyle sabit dengede olursa, etkin maddenin difüzyon yoluyla salımı için itici güç sabit olur ve taşıma sistemlerinden sıfır derece salım kinetikleri sağlanabilir. Ancak bu tip bir sistemin bazı dezavantajları vardır. Bu sistemlerin çoğunun dış membranı biyolojik olarak parçalanamaz özelliğindedir. Bu nedenle etkin madde salındıktan sonra salım sisteminin vücuttan çıkarılması için küçük bir operasyon gerekmektedir. Ayrıca ilaç tedavisi sırasında, membrandaki bir yırtılma veya bozulma sonucu etkin maddenin bir anda boşalması ihtimali bulunmaktadır. Depoda bulunan etkin maddenin tipine bağlı olarak, etkin maddenin bir anda boşalması, istenmeyen toksik etkilere sebep olabilir (Dash ve Cudworth, 1998).

Depo sistemlerin birkaç yaygın uygulaması vardır. En yaygın kullanılan depo sistemi, Norplant® olarak da bilinen levonorgesterol (LNG) içeren uzatılmış etkili doğum kontrol sistemidir. Norplant® sisteminde LNG hormonu silikon membran içine enkapsüle edilmiştir ve 5 yıla kadar etkili bir şekilde LNG geciktirilmiş salımı sağladığı kanıtlanmıştır (Munro ve ark., 1996). Bunun dışında, dışta parçalanmayan bir kısım ve içte sıkıştırılmış bir doksorubisin rezervuarı içeren mikrokapsüller incelenmiştir (Juni ve ark., 1985).

Matris sistemler de yaygın olarak kullanılan biyolojik olarak parçalanmayan implantlardır. Bu sistemler etkin maddeyi katı bir biyolojik olarak parçalanmayan polimer içinde homojen dağılmış olarak içerir. Depo sistemler gibi, matris sistemler de etkin maddenin biyolojik olarak parçalanmayan fibröz bir polimer ağından difüzyonuna dayanır. Ancak, etkin maddenin salımı matris içindeki konsantrasyonuna bağlıdır. Matriste çözülmüş etkin madde konsantrasyonu ne kadar çoksa sistemden salım da o kadar çok olur. Ayrıca, bu matris tipi formülasyonlar, depo sistemlere benzer sorunlar içerirler. Bu matrisleri implante etmek ve çıkarmak için birer operasyon gerekmektedir. Biyolojik olarak parçalanmayan matris sistemlerin günümüzdeki en önemli kullanımı hayvanlara uzatılmış etkili hormon verilmesidir. Sığırlarda büyüme hızı ve beslenmeyi artırmak için uzatılmış estradiol salımı yapan polimerik kontrollü salım implantı geliştirilmiştir (Compudose®). Bu sistem silikon

kauçuk matris içinde disperse edilmiş kristal estradiol içerir (Ferguson ve ark., 1988).

Polimer membran-matris hibrid tip ilaç taşıyıcı sistemlerde rezervuar sistemlerdeki sabit etkin madde salım kinetikleri ile matris sistemlerin mekanik üstünlüğünü bir araya getirmek amaçlanmıştır. Bu sistemlerde etkin maddeyi içeren polimer matris etkin madde içermeyen polimerik bir zarla kaplanmıştır. Burada salım matris içinde difüzyonla değil, membrandan geçişle kontrol edilmektedir. Bu tip sistemlere örnek olarak levonorgestrel salımı yapan subdermal implant Norplant® II verilebilir.

Mikrorezervuar partiyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde, yüksek enerjili dispersiyon tekniğiyle etkin madde içeren sulu polimer çözeltisi, silikon elastomerleri gibi biyolojik olarak uyumlu, inert bir polimer içinde homojen olarak disperse edilmiş haldedir. Bu sistemlere örnek olarak norgestomet salımı yapan subdermal implant Syncro-Mate-C verilebilir (Chien ve Lin, 2007).

1.2.1.2. Aktivasyon Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bu grupta yer alan sistemlerde etkin madde salımı bazı fiziksel, kimyasal veya biyokimyasal etmenlerle aktive edilir ve dışarıdan enerji verilmesiyle hızlandırılır. Bu durumda salım hızı, uygulanan işlem veya enerji girdisinin düzenlenmesi ile kontrol edilir. Aktivasyon kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler, uygulanan işlemin veya enerjinin çeşidine göre sınıflandırılır (Chien ve Lin, 2007).

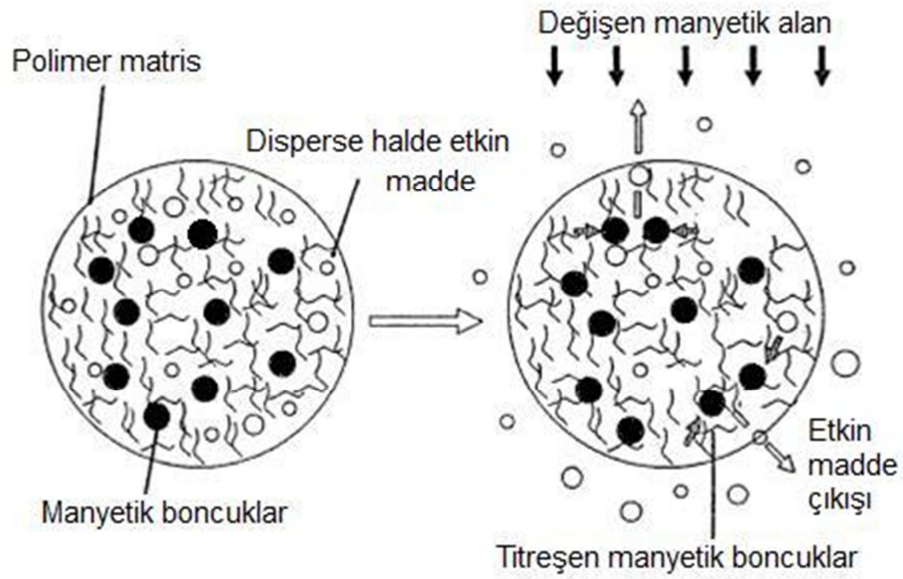
1.2.1.2.1. Fiziksel Etmenlerle Aktive Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bu grupta, ozmotik basınç, hidrodinamik basınç, buhar basıncı, mekanik kuvvet, manyetik kuvvet, sonofrez, hidrasyon gibi fiziksel etmenlerle etkin madde salımı aktive olan sistemler yer almaktadır.

Ozmotik basınçla aktive olan ilaç taşıyıcı sistemlerde, etkin madde su geçişinin kontrollü olduğu yarı-geçirgen bir bölmede bulunur. Bölmede bulunan etkin madde, kontrollü ozmotik basınç gradyanı ile lazerle açılmış salım deliğinden sabit hızda çıkar. Bu sistemlere örnek olarak Alzet ozmotik pompa verilebilir (Chien ve Lin, 2007). Buhar basıncıyla aktive olan sistemlere örnek olarak, vücut ısıyla buharlaşan florokarbonların buhar basıncıyla ilaç uygulaması sağlayan implante edilebilir infüzyon pompası Infusaid® verilebilir (Blackshear ve ark, 1979).

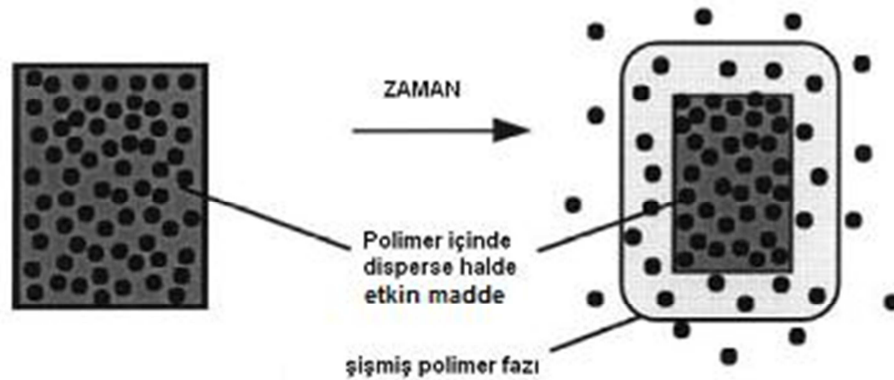
Mekanik kuvvetle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemlerde, etkin madde salımı genelde mekanik pompaların sağladığı itici güç ile gerçekleşir. Pil gibi bir dış güç kaynağıyla çalışan peristaltik pompalar bu grupta sayılabilir (Dash ve Cudworth, 1998).

Manyetik kuvvetle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonunda, küçük manyetik boncuklar bir polimer içine homojen olarak disperse edilir. Bu sistem biyolojik bir sisteme konduğunda, konsantrasyon gradyanına dayalı normal bir difüzyon görülür. Ancak; bir dış salınımlı manyetik alana maruz kaldığında, daha fazla miktarda etkin madde hızla salınabilir (Şekil 1.4). Bu tip ilaç salım sistemlerinin en büyük avantajı, bir dış manyetik uyaran kullanılarak salım kinetiklerinin değiştirilmesinin mümkün olmasıdır (Dash ve Cudworth, 1998). Bu tip bir sistemler, polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerden nispeten düşük hızda salınan peptidler gibi makromoleküllerin salım hızını artırmak için kullanılabilir (Chien ve Lin, 2007). Benzer şekilde ultrasonik enerjinin yarattığı titreşimlerle salım gerçekleştiren ilaç taşıyıcı sistemler de bulunmaktadır.



Şekil 1.4. Manyetik alana maruz kaldıktan sonra sistemden artan etkin madde salımının gösterildiği manyetik kontrollü polimerik ilaç salım sisteminin şematik diyagramı (Danckwerts ve Fassihi, 1991)

Hidrasyonla aktive olan ilaç taşıyıcı sistemlerde ise, etkin madde hidrofilik polimer kullanılarak üretilmiş şişebilen bir polimer matris içinde homojen bir şekilde disperse haldedir. Etkin maddenin salımı, hidrasyonla birlikte polimer matrisin şişmesiyle gerçekleşir (Şekil 1.5). Şişme kontrollü olan bu sistemlerde, suda çözünen çapraz bağlı polimerler kullanılır. Bu sistemlere örnek olarak norgestomet içeren subkutan implant Syncro-Mate-B verilebilir.



Şekil 1.5. Hidrasyonla aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler (Fung ve Saltzman, 1997).

1.2.1.2.2. Kimyasal Etmenlerle Aktive Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bu tip sistemlerde etkin madde salımı kimyasal reaksiyon ile gerçekleşmektedir. Hidrolizle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler bu grupta yer almaktadır. Hidrolizle aktive olan ilaç taşıyıcı sistemlerde, etkin madde salımı hidroliz işlemine bağlıdır. Bu sistemlerde etkin madde genelde mikrokapsüllerde, mikrokürelere veya nanopartiküllerde enkapsüle haldedir. Bu sistemler poli(laktik-ko-glikolik asit) gibi biyolojik olarak parçalanabilen veya biyolojik olarak erozyona uğrayabilen polimerlerden hazırlanmışlardır. Polimer matristen etkin madde salımı, hidrolizin tetiklediği polimer zincirinin degradasyonu ile gerçekleşir ve etkin madde çıkış hızı, polimer degradasyon hızı tarafından kontrol edilir (Heller, 1984). Bu sistemlere örnek olarak löprolid içeren subkutan olarak enjekte edilebilen mikroküre formülasyonu olan Lupron Depot[®] verilebilir. Bu sistemlerin en büyük avantajı, sistem vücut tarafından uzaklaştırıldığı için çıkarılması için ikinci bir cerrahi işlem gerektirmemesidir. Etkin madde salım hızı; biyodegradasyon hızı, polimer bileşimi, polimerin molekül ağırlığı, yüklenen etkin madde miktarı ve polimer-etkin madde etkileşimi ile belirlenir (Controlled Drug Delivery, 1987, s.:485).

1.2.1.2.3. Biyokimyasal Etmenlerle Aktive Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler

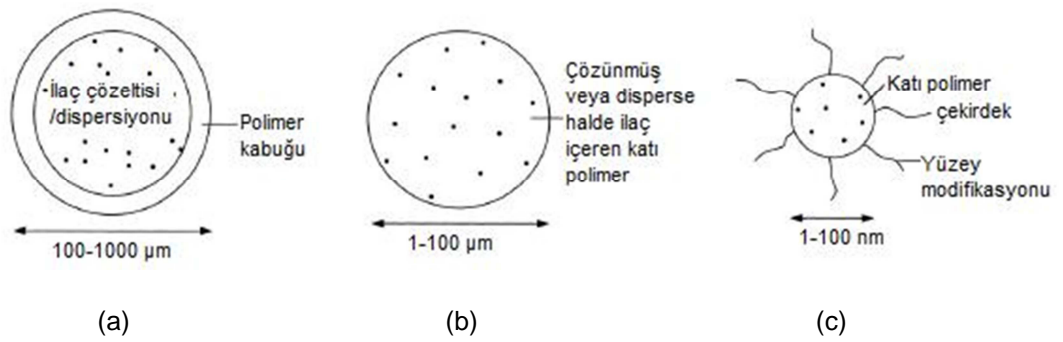
Bu tip sistemlerde, etkin madde ya mikrokürelere yüklenmiştir ya da albuminler, polipeptidler gibi biyopolimerlerden üretilen polimer zincirlerine bağlı halde bulunur. Bu sistemlerde etkin madde salımı, dokudaki spesifik bir enzimin biyopolimeri hidrolizi ile gerçekleşir (Chien ve Lin, 2007).

1.2.1.3. Geri Besleme Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bu tip sistemlerde etkin madde salımı, geri besleme mekanizmaları aracılığıyla vücutta bir biyokimyasal madde gibi tetikleyici bir ajan ile aktive edilir. Etkin madde salım hızı, sisteme yerleştirilen bir sensör tarafından belirlenen tetikleyici ajan konsantrasyonu ile belirlenir. Tetikleyici ajan sayesinde ilaç taşıyıcı sistem şişer veya degradasyona uğrar ve etkin madde salımı gerçekleşir (Chien ve Lin, 2007).

1.2.2. İmplant Edilebilen İlaç Taşıyıcı Sistemlerden Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Polimerik partiküler sistemler cerrahi işlem gerekmeden enjeksiyonla kolayca implante edilebilmeleri sebebiyle büyük avantaj sağlarlar. Küçük boyutları sebebiyle polimerik partiküler sistemler istenen dokuya veya kan dolaşımına enjekte edilebilirler. Mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller (Şekil 1.6), partiküler ilaç taşıyıcı sistemler sınıfında yer alırlar (Saltzman, 2001, s.:271-272). Bu çalışmada formüle edilmek üzere partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden mikroküre seçilmiştir.



Şekil 1.6. Partiküler ilaç taşıyıcı sistemler. (a) Mikrokapsül. (b) Mikroküre. (c) Nanopartikül.

1.2.2.1. Partiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerden Mikroküreler

Mikroküreler, katı polimer faz içinde etkin maddenin çözündüğü veya disperse olduğu homojen partiküllerdir (Saltzman, 2001). Mikrokürelerin çapları genelde 1-100 µm arasındadır. Mikrokürelerin etkin maddeyi kontrollü bir şekilde salması, etkin maddeyi hedef dokuya taşınması, etkin maddenin özelliklerini değiştirmemesi, düşük dozda ilaç kullanımı sağlanması, dayanıklı olması, biyolojik olarak uyumlu olması istenir (Kaş, 2002).

1.2.2.2. Mikrokürelerin Hazırlama Yöntemleri

Mikroküre hazırlarken seçilecek hazırlama yöntemi, etkin maddenin özellikleri, kullanılacak polimerin özellikleri, etkin madde ve polimerin etkileşimi, mikrokürenin uygulama bölgesi, mikroküreden beklenen özelliklere göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak mikroküre hazırlama yöntemleri şu şekilde sıralanabilir (Kaş, 2002):

- i. Polimerizasyon
 - Emülsiyon polimerizasyonu
 - Süspansiyon polimerizasyonu
 - Misel polimerizasyonu
 - Sedimentasyon polimerizasyonu
- ii. Koaservasyon
 - Basit koaservasyon
 - Kompleks koaservasyon
- iii. Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma
 - Tek emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma
 - Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma
 - Çoklu emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma
- iv. İn sitü yöntem
- v. Polikondenzasyon
 - Süspansiyon polikondenzasyonu
 - Emülsiyon polikondenzasyonu
- vi. Püskürterek dondurma
- vii. Püskürterek kurutma
- viii. Delik yöntemi
- ix. Dispers fazda jelleşme ve çapraz bağlanma

PLGA ile mikroküre hazırlamaya uygunluğundan dolayı tercih edilen emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yönteminin sınıflandırması şu şekilde detaylandırılabilir:

- i. Tek emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma (Soppimath ve ark., 2001; Jeong ve ark., 2009)
 - Yağ içinde su tipi emülsiyon (S/Y)
 - Su içinde yağ tipi emülsiyon (Y/S)
 - Yağ içinde yağ tipi emülsiyon (Y/Y)
- ii. Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma (Genta ve ark., 1997; Lee ve ark., 2000)
 - Su içinde yağ içinde su tipi emülsiyon (S/Y/S)
 - Yağ içinde su içinde su tipi emülsiyon (Y/S/Y)
 - Yağ içinde yağ içinde su tipi emülsiyon (S/Y/Y)
- iii. Çoklu emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma (O'Donnell ve McGinity, 1998; Zheng, 2009)
 - Yağ içinde yağ içinde yağ içinde su tipi emülsiyon (S/Y/Y/Y)
 - Su içinde yağ içinde yağ içinde su tipi emülsiyon (S/Y/Y/S)
- iv. Katı dispersiyon içeren emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma (Morita ve ark., 2000; Leach ve ark., 2005; Lee ve ark., 2007, Yuan ve ark., 2009)
 - Su içinde yağ içinde katı tipi emülsiyon (K/Y/S)
 - Yağ içinde yağ içinde katı tipi emülsiyon (K/Y/Y)
 - Su içinde yağ içinde su içinde katı tipi emülsiyon (K/S/Y/S)
 - Su içinde yağ içinde yağ içinde katı tipi emülsiyon (K/Y/Y/S)

Bu sınıflandırma içinde hidrofilik etkin maddenin lipofilik PLGA ile mikrokürelerinin, istenen özelliklerde hazırlanmasına olanak tanıyan su içinde yağ içinde su tipi (S/Y/S) çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile mikroküreler hazırlanmıştır.

1.2.3. İmplant Edilebilen Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Materyallerin Taşınması Gereken Özellikler

Yaşayan sisteme implante edilmek ve organ ve dokuların, işlevlerini kısmen veya tamamen üstlenmek üzere tasarlanmış vücudun geçici ya da kalıcı olarak parçası haline gelen cansız materyallere biyomateryaller denmektedir (Özalp ve Özdemir, 1996; Park ve Park, 1996). Biyomateryaller sınıfına genel olarak; metaller, seramikler, doğal maddeler, polimerler ve kompozitler dahil edilebilir. Metaller, seramikler, doğal maddeler ve kompozitler, daha çok biyomedikal mühendisliğinde doku süstitüsyonunda veya doku iskeleti olarak kullanılırken, implante edilebilir ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında daha çok polimerik biyomateryaller kullanılır (Özalp ve Özdemir, 1996).

İmplant edilebilir ilaç taşıma sistemleri geliştirilirken göz önünde bulundurulması gereken birkaç temel faktör bulunmaktadır. Sistem implante edileceği için insan vücuduyla biyolojik olarak geçimli olması şarttır. Bir maddenin biyolojik olarak geçimli olabilmesi için bazı şartlara uyması gerekir.

İmplant edilebilen kontrollü salım sistemlerinde kullanılan biyomateryallerin taşınması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir (Özalp ve Özdemir, 1996; Park ve Park, 1996):

- Kimyasal olarak inert olmalıdır.
- Bölgedeki doku tarafından kimyasal veya fiziksel modifikasyona uğratılmamalıdır.
- Formülasyonda yer alan maddelerle reaksiyona girmemelidir.
- Biyolojik olarak uyumlu olmalıdır.
- İmplantasyon bölgesinde hiçbir enflamasyon cevabına yol açmamalıdır.
- Hipoalerjenik olmalıdır.
- Karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve toksik olmamalıdır.

- Şeklini ve yerini salım süresi boyunca korumalıdır.
- Biyoparçalanabilir polimerler kontrollü aşınmalı, etkin maddenin doz boşalmasına neden olmamalıdır.
- Farklı şekil ve kıvamda üretilebilmelidir.
- Özellikleri etkilenmeden sterilize edilebilmelidir.
- Tedavi bittiğinde vücuttan tamamen uzaklaştırılabilmelidir.
- Çok sayıda etkin madde ile geçimli olmalıdır.

Bu ajanların geliştirilmesi çok sayıda farklı stabilite ve biyolojik uyumluluk testlerini kapsayan hem çok zaman alan hem de çok karmaşık bir işlemdir. Eğer uygun biyolojik uyumluluk sağlanamazsa, kapsüler kontraktür, etkin maddenin beklenmeyen bir şekilde salımı, platelet adezyonu, doku hasarı veya implant çevresindeki alanda enfeksiyon oluşması gibi istenmeyen etkiler meydana gelebilir. Bu da implante edilmiş olan ilaç taşıyıcı sistemden gerektiği gibi fayda alınamamasının yanı sıra kişiye çeşitli zararları da dokunabilir.

1.3. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler

Çok sayıda aynı veya farklı molekülün kimyasal bağlarla az veya çok düzenli biçimde bağlanarak oluşturduğu uzun zincirli ve yüksek molekül ağırlıklı bileşiklere polimer denir (Peppas ve Peppas, 2002).

Polimer bilimindeki gelişmeler, kontrollü salım teknolojilerini mümkün kılmıştır. Bu gelişmeler sayesinde kontrollü salımda aranan özellikleri destekleyebilecek yeni polimerler sentezlenmiş ve yeni sentez metodlarıyla da sentezlenen polimerlerin kalitesi artmıştır (Kim ve ark., 2009).

Polimerik biyomateryallerin diğ er biyomateryallere göre avantajları (Park ve Lakes, 1979; Hasırcı, 1994):

- Değiş ik formlarda kolaylıkla hazırlanabilirler.
- Vücut içinde paslanmazlar.
- Doğ al dokulara çok büyük benzerlik gösterdikleri için, heparin gibi maddelerle bağlanabilmeleri mümkündür.
- Adezif özellikte polimerlerin kullanımı organlara dikiş atılmadan uygulanabilmelerini sağlar.
- Dansiteleri doğ al dokuların dansitesine çok yakındır.

Polimerik biyomateryallerin diğ er biyomateryallere göre dezavantajları (Park ve Lakes, 1979; Hasırcı, 1994):

- Elastik ve viskoelastik özellikleri polimerlerin yaygın kullanımını zorlaştırır.
- Vücutta kontrol dış ı parçalanabilmeleri söz konusudur.
- Katkı maddesi içermeyen saf, medikal amaçlı polimer bulmak zordur.

1.3.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerlerin Sınıflandırılması

Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan polimerler doğ al ve sentetik kaynaklı olmak üzere baş lıca 2 gruba ayrılır (Wood, 1980; Bogdansky, 1990). Sentetik polimerler ise biyolojik ortamdaki davranış ına göre biyolojik olarak parçalanabilir polimerler ve biyolojik olarak parçalanmayan polimerler olarak 2 gruba ayrılır. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerlerin sınıflandırılması ve her grupta yer alan polimer örnekleri Çizelge 1.1'de yer almaktadır.

Çizelge 1.1. Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin sınıflandırılması (Fung ve Saltzman, 1997)

Polimerler	Polimer Sınıfı	Örnek
Doğal, biyolojik olarak parçalanabilir	Proteinler	Albumin, Kolajen, Jelatin, Sığır ve İnsan Serum Albuminleri (BSA ve HSA)
	Polisakkaritler	Selüloz, dekstran, kitozan, Kondroitin sülfat, aljinat Nişasta, hiyaluronik asit
Sentetik, biyolojik olarak parçalanabilir	Poliamidler	Poliamino asit, polipeptid
	Poliesterler	Poli(laktik asit)
		Poli(glikolik asit)
		Poli(laktik-ko-glikolik asit)*
		Poli(kaprolakton)
		Poli(dioksanon)
Poli(hidroksibütirat)		
Polianhidridler		
Poliortoesterler		
Polifosfoesterler	Polifosfat, polifosfonat, polifosfit	
Sentetik, biyolojik olarak parçalanabilir olmayan	Silikon elastomerler	
	Poli(etilen-ko-vinil asetat)	
	Poliakrilatlar	Poli(metil metakrilat)

Fizyolojik koşullarda biyolojik olarak uyumlu bileşenlere ayrılabilen biyolojik olarak parçalanabilir polimerler ilaç taşıma sistemlerinin hazırlanmasında biyolojik olarak parçalanabilir olmayan polimerlere göre daha çok tercih edilir (Markland ve Yang, 2007).

Biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin avantajları şu şekilde sıralanabilir (Markland ve Yang, 2007):

- Komplikasyon ve enfeksiyon riski taşıyan ve ek maliyet getiren bir cerrahi işlemle çıkarılmaları gerekmez.
- İnert ve biyolojik olarak uyumlu moleküllere parçalanırlar.
- Hasta için daha uygun ve basit sistemlerdir.

Bu çalışmada ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında sentetik biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerden poliester yapıdaki poli(laktik-ko-glikolik asit) kullanılmıştır.

1.3.2. Polimer Degradasyon Mekanizmaları

Polimer degradasyonu, polimer zincirlerini oligomer ve monomere parçalayan zincir kırılmasıdır. Biyolojik olarak parçalanabilir terimi degradasyonun biyolojik sistem içinde gerçekleştiğini ifade etmektedir (Park ve ark., 1993). Farmasötik alandaki avantajları sebebiyle biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, kontrollü salım sistemlerinde tercih edilirler.

Parçalanabilir diye adlandırılın veya adlandırılmasın tüm polimerler degradasyona uğrarlar. İlaç salımının polimer degradasyonundan çok daha hızlı gerçekleştiği polimerlere parçalanmayan polimer, polimer degradasyonunun sistemin uygulanma süresi içinde ilacın salımıyla birlikte gerçekleştiği polimerlere ise parçalanabilen polimerler denebilir.

Radyasyon kaynaklı degradasyon, termal degradasyon, mekanik degradasyon ve kimyasal degradasyon gibi farklı degradasyon çeşitleri bulunur.

UV ışınlarla ve γ -radyasyona maruziyet polimerlerin çoğunda önemli ölçüde degradasyona sebep olurlar. γ -sterilizasyon yapılmıyorsa bu etki önemsizdir; ancak γ ışınlarıyla sterilizasyonda molekül ağırlığında azalma gözlenebilir (Spencehauser ve ark., 1989).

Mekanik degradasyon daha çok mekanik gerilim uygulanan, cerrahi iplik materyali olarak kullanılan polimerlerde görülmektedir. Termal degradasyon ise daha çok parçalanmayan polimerlerde etkilidir.

Parçalanabilen polimerlerin çoğunda hidrolize olabilen bağlar bulunmaktadır. Bu sebeple en önemli degradasyon mekanizması hidroliz veya enzimlerin katalizlediği hidroliz şeklinde gerçekleşen kimyasal hidrolizdir. Enzimatik degradasyona, biyodegradasyon da denir ve degradasyonun kısmen de olsa biyolojik sistem tarafından gerçekleştirildiğini göstermektedir (Göpferich, 1996).

Hidroliz ile degradasyonda öncelikle polimerin hidrasyonu gerçekleşir. Polimerin yüzeyine ve varsa porlarına su nüfuz eder. Suyu temastan sonra polimerin gerilme direncinde kayıp olur. Gerilme direncinin yitilmesiyle polimer bütünlüğünü kaybeder ve son olarak kopan bileşenlerin difüzyon veya mekanik etkilerle taşınmasıyla kütle kaybı gerçekleşir (Park ve Lakes, 2007).

Doğal polimerlerin büyük bölümü, sentetik polimerlerin ise bir bölümü hidrofilik özelliktedir. Su ile temas eden polimer su tutup şişer ve yapıya giren su polimer moleküllerinin kopmasına sebep olur. Sentetik polimerlerin çoğu suda çözünmez; ancak yapılarında hidrolize olabilen fonksiyonel gruplar vardır. Bu polimerlerde pasif hidroliz gerçekleşir (St. Pierre ve Chiellini, 1986).

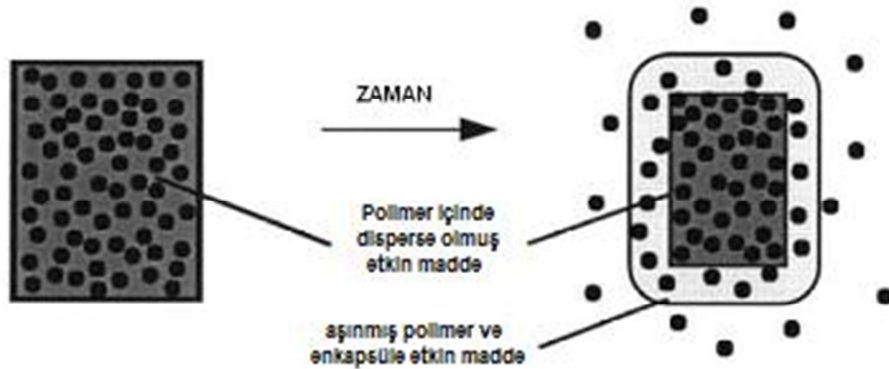
Degradasyon hızı, kimyasal bağ tipi, pH, kopolimer kompozisyonu ve su tutma özelliğinden büyük ölçüde etkilenmektedir (Helder ve ark., 1990; Göpferich, 1996).

Polimer degradasyonu sonucunda, polimer kristal yapısında, camsı geçiş sıcaklığında (T_g), molekül ağırlığında ve su tutma kapasitesinde değişiklikler gözlenir (Göpferich, 1996).

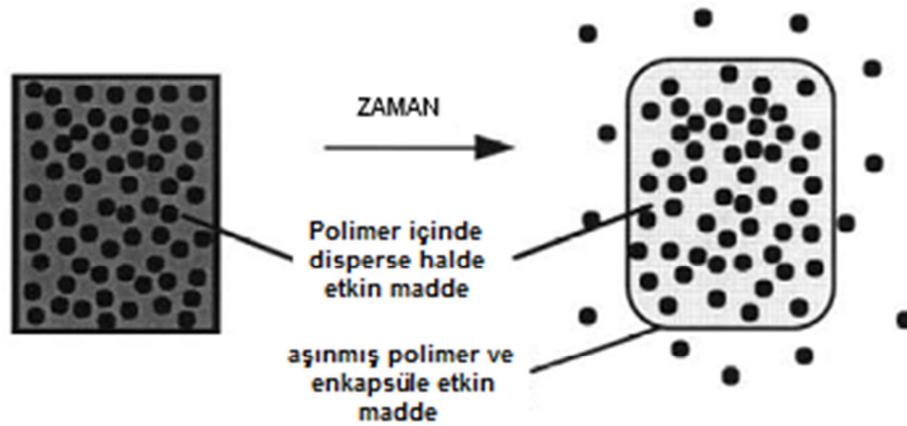
1.3.3. Polimer Erozyon Mekanizmaları

Tüm parçalanabilen polimerler degradasyonun ardından erozyona uğrarlar. Erozyon, degradasyon sonucu açığa çıkan oligomer ve monomerlerin polimerden uzaklaşması sonucu oluşan kütle kaybı olarak tanımlanabilir. Polimerlerde iki tür erozyon gerçekleşir: Yüzey erozyonu (homojen) ve kütle erozyonu (heterojen). Yüzey erozyonu olan polimerlerde, erozyon sadece yüzeyden gerçekleşir. Boyutları küçülür ancak orijinal geometrik şekil korunur. Bu sistemlerde salım hızı polimer erozyon hızıyla doğru orantılıdır (Şekil 1.7). Kütle erozyonu olan polimerlerde degradasyon ve erozyon sadece yüzeyde gerçekleşmez. Uygulamadan sonra bir süre boyutlarını korurlar (Şekil 1.8). Bu iki durum ideal durumlardır, polimerlerin çoğunda kesin bir ayırım yapılamaz.

Polimer erozyonu degradasyondan daha karmaşık bir süreçtir; çünkü degradasyon, şişme, çözünme, oligomer ve monomerlerin difüzyonu ve morfolojik değişiklikler gibi pek çok başka süreçten etkilenmektedir. Erozyonda en etkili süreç degradasyondur. Erozyon, molekül ağırlığında azalma, toplam kütle kaybı ve şekil değişikliği ile anlaşılabilir (Göpferich, 1996).



Şekil 1.7. Yüzey erozyonu (Fung ve Saltzman, 1997).



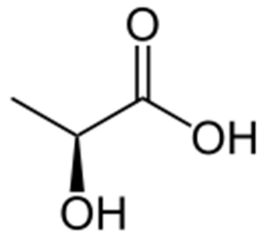
Şekil 1.8. Kütle erozyonu (Fung ve Saltzman, 1997).

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

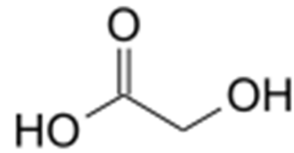
Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), kanıtlanmış güvenilirliği, toksisitesinin olmaması, geniş bir aralıktaki fizikokimyasal özellikleri, esnekliği sebebiyle işlenebilirliği, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olması sebebiyle çeşitli dozaj formlarının hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir polimerdir (Markland ve Yang, 2007).

1.4.1. PLGA'nın Yapısı ve Elde Edilmesi

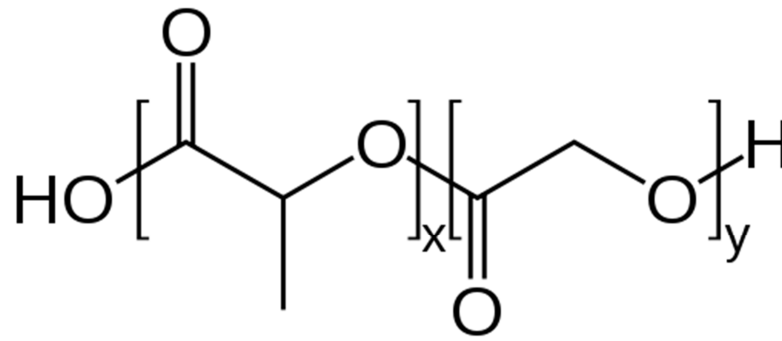
Poliester yapıdaki PLGA kopolimeri, değişik oranlarda, glikolik asit ve laktik asitin siklik dimerleri olan glikolid ve rasemik karışım halindeki D,L-laktid monomerlerinin anyonik halka açılması reaksiyonu ile hazırlanır (Şekil 1.9). İki farklı monomer yapıdan elde edilmesi polimerizasyonun homojen bir şekilde gerçekleşmemesine sebep olabilir ve sentezlenen polimer serileri arasında özelliklerin değişkenliğine sebep olabilir (Markland ve Yang, 2007).



(a)



(b)



(c)

Şekil 1.9. PLGA kopolimerinin yapısındaki monomerlerden (a) laktik asit (x), (b) glikolik asit (y) ve (c) PLGA kopolimeri

1.4.2. PLGA'nın Fizikokimyasal Özellikleri

PLGA kopolimeri farklı oranlarda laktik asit ve glikolik asit monomerlerinden oluşabilir. Kopolimerizasyon oranı değiştirilerek fizikokimyasal özellikleri değiştirilebilir. Laktik asit-glikolik asit oranı 85:15, 75:25, 65:35, 50:50 gibi farklı oranlarda olabilir ve farklı ihtiyaçlara göre yüksek veya düşük molekül ağırlıklı olanları vardır.

PLGA içindeki glikolik asit oranının artırılması polimerin hidrofiliğini artırır. Bu hidrofiliğinden ötürü PLGA içindeki glikolik asit oranı arttıkça polimerin degradasyon hızı artar. PLGA 50:50'nin degradasyon hızı 2 aydır. Kopolimer PLA ve PGA homopolimerlerine göre daha hızlı degrade olur, bu da kopolimerin homopolimerlere göre daha amorf yapıda olmasından kaynaklanır. Esas degradasyon zamanı çevre koşullarına, polimerin molekül ağırlığına, sistemin geometrisine, morfolojisine ve üretim koşullarına göre değişiklik gösterir. Sulu ortamda PLGA hidroliz ile parçalanır ve kitle erozyonu gösterir (Markland ve Yang, 2007).

Kopolimerin amorf yapıda olması, polimerin işlenebilmesini kolaylaştırır. İlaç yüklemek ve ilacın polimer içinde difüzyonu daha kolaydır (Saltzman, 2001).

PLGA 50:50'nin camsı geçiş sıcaklığı 40-47°C'dir ve kopolimerizasyon oranı değiştikçe camsı geçiş sıcaklığı da değişiklik gösterir (Saltzman, 2001).

1.4.3. PLGA'nın Farmasötik Alanda Kullanılışı

PLGA biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak uyumlu olması sebebiyle farmasötik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk defa cerrahi iplik ve protez yapımında kullanılan PLGA, daha sonra ilaç salımı yapan polimerik film ve mikroküreler gibi partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca çevreye zararsız olması sebebiyle pestisitlerin kontrollü salımında da kullanılması düşünülmektedir (Saltzman, 2001).

1.4.4. PLGA Mikroküreler

Yüksek biyolojik uyumluluğu sebebiyle, biyolojik olarak parçalanabilir poliester yapıdaki PLGA, terapötik ajanların mikroenkapsülasyonunda en çok tercih edilen biyomateryallerdendir (Lu ve ark., 2003).

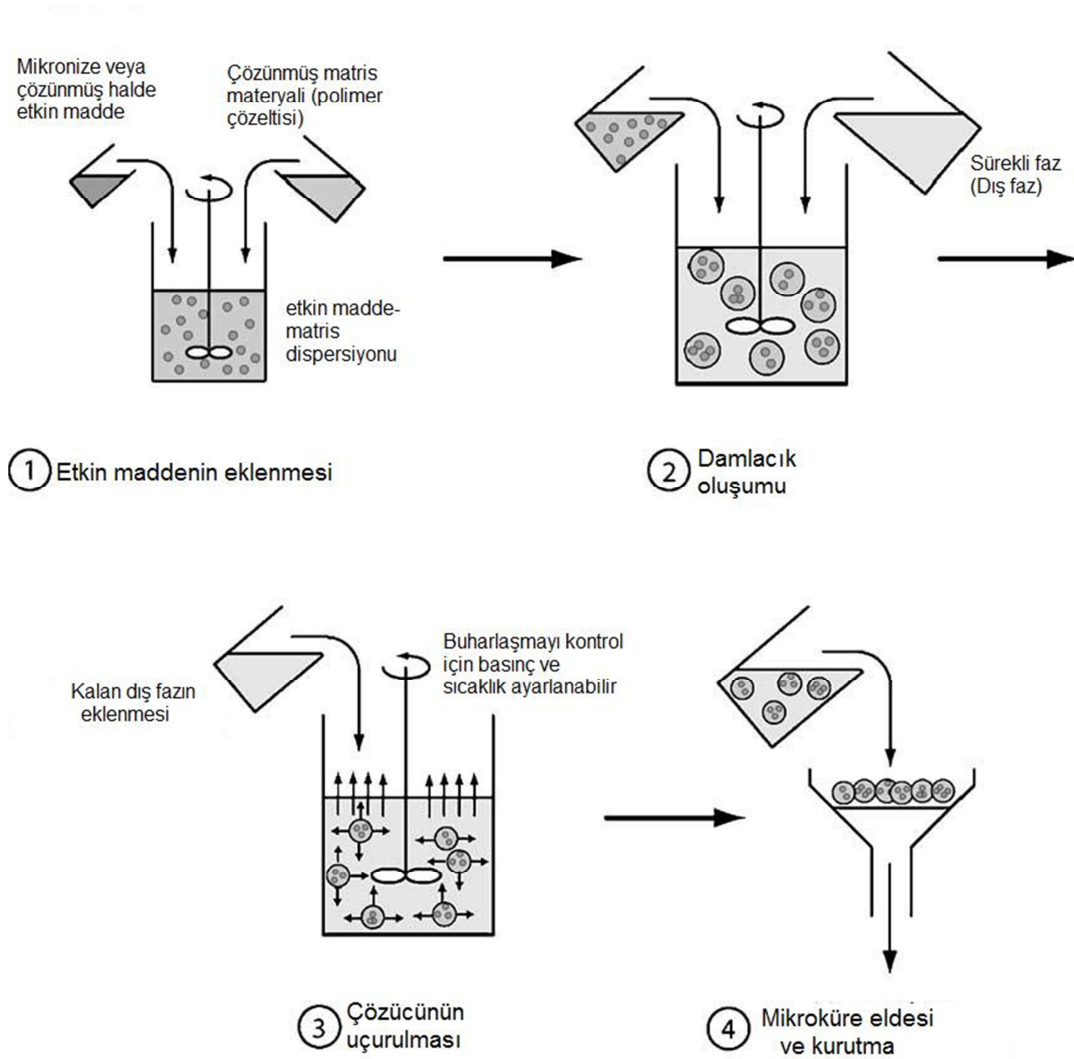
1.4.4.1. Çift Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile PLGA Mikrokürelerin Hazırlanması

Çözücü buharlaştırma yöntemi, diğer mikroküre hazırlama yöntemlerinde olduğu gibi yüksek sıcaklık veya faz ayrışmasını tetikleyici ajanların eklenmesini gerektirmez. Nano ve mikro boyut aralığında kontrollü partikül büyüklükleri elde edilebilir. Bu sebeplerle tercih edilen bir yöntemdir; ancak yüksek enkapsülasyon etkinliği ve düşük artık çözücü içeriği elde edebilmek için enkapsülasyon koşulları ve materyaller buna uygun olarak seçilmelidir (Freitas ve ark., 2005).

Hidrofilik etkin maddelerin PLGA ile hazırlanan mikrokürelere yüklenebilmeleri için, su içinde yağ içinde su tipi çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi tercih edilir. Bu yöntemde, etkin madde polimer çözeltisi içinde doğrudan disperse edilmeden en içte bir su fazı oluşturularak, etkin maddenin polimerin bulunduğu yağ fazından daha yüksek afinite gösterdiği dış su fazına göçü engellenmeye çalışılır (Ito ve ark., 2007; Ng ve ark., 2010).

Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikroküre hazırlanmasında 4 ana basamak bulunmaktadır (Özalp, 1997; Freitas ve ark., 2005):

- i. Sulu etkin madde çözeltisinin polimer içeren organik çözeltiliye katılarak primer emülsiyonun oluşturulması
- ii. Primer emülsiyonun organik faz ile karışmayan sulu dış faza eklenerek ikinci emülsiyonun oluşturulması
- iii. Organik fazdaki çözücünün buharlaşması ve emülsiyon damlacıklarının katı mikrokürelere dönüşmesi
- iv. Mikrokürelere toplanması ve kurutulması (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikrokürelere hazırlanması (Freitas ve ark., 2005)

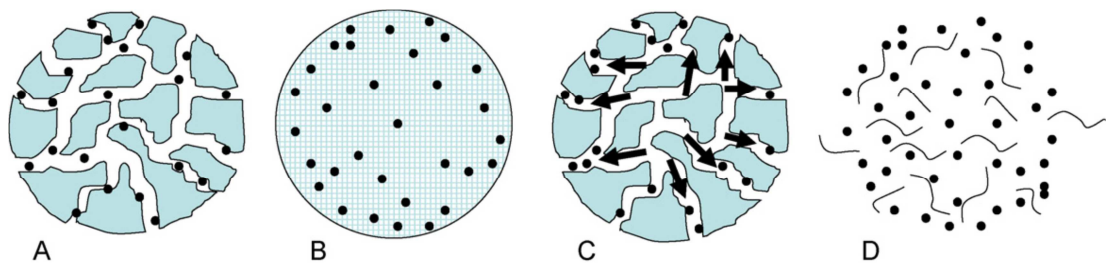
Primer ve sekonder emülsiyonun hazırlanmasında damlacık büyüklüğünü küçültmek ve eş damlacık büyüklüğü elde etmek için yüksek hızda karıştırma yapan homojenizatörler kullanılır. Elde edilen emülsiyonun stabilitesinin sağlanması ve oluşan damlacıkların koalesansının engellenmesi için dış faza polivinil alkol veya yüzey aktif maddeler gibi stabilizatör ajanlar eklenebilir. Organik çözücü uçurulduktan sonra elde edilen mikroküreler yıkanarak organik solvan ve diğer yardımcı madde kalıntılarında temizlenir. Dış fazdan filtrasyonla ayrılıp oda sıcaklığında veya etüvde kurutulabilir. Dış fazdan mikrokürelerin ayrılıp kurutulması için liyofilizasyon tekniği de uygulanabilir (Özalp, 1997; Freitas ve ark., 2005; Ito ve ark., 2007; Ng ve ark., 2010).

1.5. Polimer Matrislerden Etkin Madde Salım Mekanizmaları ve Salım Kinetikleri

Salım mekanizması, etkin madde moleküllerinin taşınma veya salınma şekli (Kranz ve ark., 2000; Sansdrap ve Moes, 1997) olarak tanımlanabileceği gibi salım hızını belirleyen olay veya işlem olarak da tanımlanabilir.

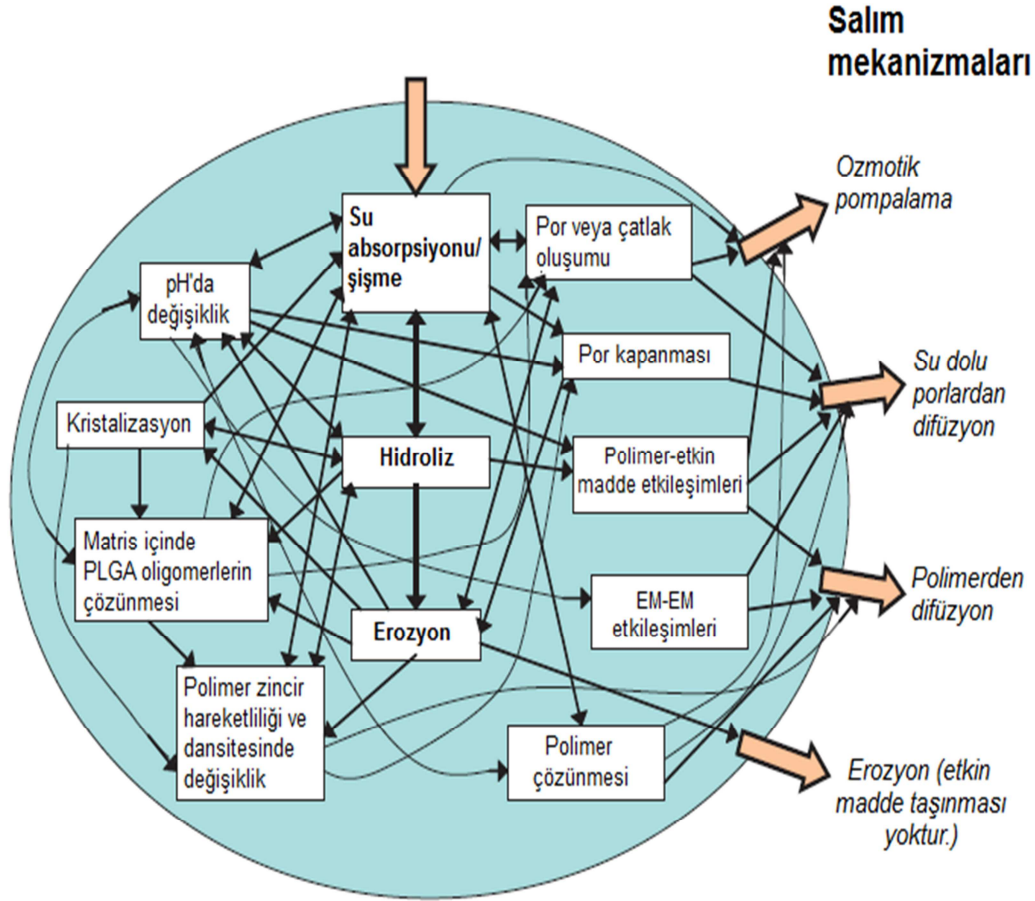
Polimer matrislerden etkin madde şu mekanizmalarla çıkabilir (Fredenberg ve ark., 2011):

- i. Su dolu porlardan difüzyon
- ii. Polimerden difüzyon
- iii. Ozmotik pompalama
- iv. Erozyon (Şekil 1.11)



Şekil 1.11. Salım mekanizmaları: (A) Su dolu porlardan difüzyon, (B) Polimerden difüzyon, (C) Ozmotik pompalama, (D) Erozyon (Fredenberg ve ark., 2011)

Polimer matristen etkin madde salımı esnasında salım hızını etkileyen faktörler Şekil 1.12'de görülmektedir.



Şekil 1.12. PLGA matrisler içinde meydana gelen ve etkin madde salımını sağlayan fizikokimyasal süreçler. Bu süreçlerin etkin madde salımı ve diğer süreçler üzerindeki etkileri oklarla gösterilmiştir ve bazı oklar çift yönlüdür (Fredenberg ve ark., 2011).

Polimer matrislerde salım daha çok difüzyon ile gerçekleşir. Difüzyon, partiküllerin çok yoğun olduğu ortamdaki az yoğun ortama geçişi ile yani etkin maddenin matris içinden matris dışına doğru göçü şeklinde olur. Difüzyon iki taraf konsantrasyonu eşitlenene kadar devam eder. Difüzyon mekanizması Fick'in 1. kanunu ile açıklanır. Fick'e göre maddenin difüzyon hızı Denklem 1.1'de gösterilmiştir (Controlled Drug Delivery, 1987; Lee ve Jasti, 2006, s.:109).

$$\frac{dQ}{dt} = -DA \frac{dc}{dx} \quad (\text{Denklem 1.1})$$

$\frac{dQ}{dt}$: Etkin maddenin difüzyon hızı (mg/s)

D : Etkin maddenin difüzyon katsayısı (cm²/s)

A : Etkin maddenin difüze olduğu yüzeyin kesit alanı (cm²)

$\frac{dc}{dx}$: Etkin maddenin difüze olduğu mesafeye göre konsantrasyon değişimi
(Etkin maddenin konsantrasyon gradyanı) (mg/cm²)

Denklemdaki eksi işareti zamanla konsantrasyonun azaldığını ifade eder. D ile gösterilen difüzyon katsayısı Denklem 1.2'de verilen Stokes-Einstein eşitliği ile belirlenmektedir.

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta rN} \quad (\text{Denklem 1.2})$$

D : Difüzyon katsayısı (cm²/s)

N : Avogadro sayısı (6,02 x 10²³)

r : Difüze olan partikülün yarıçapı (cm)

T : Mutlak sıcaklık (K^o)

η : Ortamın viskozluğu (cP)

R : Molar gaz sabiti (1,987 cal.mol⁻¹.derece⁻¹)

Denkleme göre difüzyon katsayısı ortam sıcaklığı ile doğru, maddenin partikül büyüklüğü ve ortamın viskozluğu ile ters orantılıdır.

Bir t anında difüze olan madde miktarını bulmak için Fick'in birinci eşitliğinin integrali alındığı zaman elde edilen denklem, Denklem 1.3'te gösterilmiştir.

$$Q = \frac{DA}{x} (C_1 - C_2)t \quad (\text{Denklem 1.3})$$

- Q : Birim yüzeyden difüze olan yığılmalı etkin madde miktarı (mg/cm²)
 C_1 : Etkin maddenin difüzyona başladığı yerdeki konsantrasyonu (mg/mL)
 C_2 : Etkin maddenin çözünme ortamındaki konsantrasyonu (mg/mL)
 x : Etkin maddenin katettiği mesafe (cm)
 D : Etkin maddenin difüzyon katsayısı (cm²/s)
 A : Difüzyonun olduğu kesitin yüzey alanı (cm²)

Hazırlanan ilaç şekillerinin kalite kontrolü ve ilaçların karakterizasyonu için çözünme hızı testleri yapılır (Dyas ve Shah, 2007). Çözünme hızı bir maddenin bir sıvı içinde birim zamanda çözünen miktarıdır. Bazı kaynaklarda bu terim hızlı salım yapan oral katı dozaj şeklinden birim zamanda çözünme ortamına geçen etkin madde miktarı olarak tanımlanmaktadır (Çapan, 2004). Hızlı salım yapan oral katı dozaj şeklinden, etkin maddenin salım hızını belirleyen faktör çözünme hızıdır, ancak kontrollü salım yapan, etkin madde salım hızının çözünme hızı yerine etkin maddenin ilaç taşıyıcı içindeki difüzyonuna, taşıyıcının degradasyonuna veya erozyonuna bağlı olduğu sistemlerde “*in vitro* salım veya *in vitro* çıkış çalışmaları” terimi kullanılmaktadır.

Her iki durumda da zamana bağlı olarak açığa çıkan etkin madde miktarı uygun yöntemlerle belirlenmekte ve elde edilen verilerin çeşitli kinetik modellere uygunlukları değerlendirilmektedir. Partikül şekli ve büyüklüğü, kullanılan polimer ve yardımcı maddelerin özellikleri, hazırlama yöntemi, etkin maddenin özellikleri etkin madde salımını etkilemektedir ve bu özellikler göz önünde bulundurularak uygun kinetik modeller belirlenmektedir.

Kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesinin başlamasıyla nihai amaç, kan konsantrasyonunda dalgalanma olmadan sabit tutulabilmesi için sürekli sabit hızda etkin madde salımının gerçekleştirilmesi olmuştur. Bu tip salım sıfır derece kinetik ile değerlendirilir. Sıfır derece kinetik Denklem 1.4’te verilmiştir (Martin ve ark., 1993; Li ve Jasti, 2006, s.:12).

$$C = C_0 - kr_0t \quad (\text{Denklem 1.4})$$

C_0 : Başlangıçtaki etkin madde miktarı (mg)

C : t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı (mg)

kr_0 : Sıfır derece salım hız sabiti (mg/sa)

t : Zaman (sa)

Denklem 1.4'te salım hız sabiti (kr_0), çözünmeden kalan etkin maddenin zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile elde edilen doğrunun eğimidir. Birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarı madde konsantrasyonundan bağımsızdır ve etkin maddenin çıkış hızı sabittir.

Genelde hızlı salımın gerçekleştiği, çözünme hızının yüksek olduğu konvansiyonel ilaç şekillerinde çıkış ortamdaki madde konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu durumda salım birinci derece salım kinetiğine uyum gösterir (Li ve Jasti, 2006, s.:13). Birinci derece salım kinetiği Denklem 1.5'te gösterilmiştir.

$$\ln C = \ln C_0 - k_1t \quad (\text{Denklem 1.5})$$

C_0 : Başlangıçtaki etkin madde miktarı (mg)

C : t anında çözünmeden kalan etkin madde miktarı (mg)

k_1 : Birinci derece salım hız sabiti (sa^{-1})

t : Zaman (sa)

Biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerden yapılmış homojen ve heterojen matrislerden etkin madde salımının, Higuchi tarafından ileri sürülmüş kinetiklere uyum göstermesi de söz konusu olabilir.

Homojen matris sistemlerde etkin madde matris içinden matris yüzeyine difüze olarak çözünme ortamına geçer. Bu sistemlerde çıkışın olduğu yüzey alanı sabit kabul edilir. Homojen matris sistemlerin uyum gösterdiği Higuchi

kinetiği Denklem 1.6'da gösterilmiştir (Saltzman, 2001, s.: 249; Lee ve Jasti, 2006, s.:111).

$$Q = \sqrt{D \cdot t(2A - C_s)C_s} \quad (\text{Denklem 1.6})$$

Q : Birim yüzeyden t anında salınan etkin madde miktarı (mg/cm²)

D : Etkin maddenin homojen matris ortamındaki difüzyon katsayısı (cm²/s)

A : Matriste birim hacimdeki etkin madde miktarı (mg/mL)

C_s : Etkin maddenin matris içindeki çözünürlüğü (mg/mL)

Taşıyıcı sistemin içinde çeşitli porların, kanalların ve çatlakların olduğu, etkin maddenin matris içindeki bu porları dolduran ortam sıvısı içinde çözünüp matris yüzeyine difüze olduğu heterojen matris sistemler ise Higuchi'nin heterojen matrisler için olan kinetik modeline uyum göstermektedir (Saltzman, 2001, s.: 256; Lee ve Jasti, 2006, s.:111). Biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerden yapılmış partiküler ilaç şekilleri bu kinetiğe uyum göstermektedir. Bu sistemlerde matrisin porozitesi (ε) ve kapiller sistemin kıvrımlılık katsayısı (τ) da salım hızını etkiler.

$$Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau}(2A - \varepsilon \cdot C_s)C_s \cdot t} \quad (\text{Denklem 1.7})$$

Q : Birim yüzeyden t anında salınan etkin madde miktarı (mg/cm²)

D : Etkin maddenin ortam sıvısındaki difüzyon katsayısı (cm²/s)

ε : Matrisin porozitesi (%)

C_s : Etkin maddenin ortam sıvısındaki çözünürlüğü (mg/mL)

τ : Kapiller sistemin kıvrımlılık katsayısı (tortuosity)

Higuchi kinetik modellerine göre düzlemsel bir yüzeyden herhangi bir t anında salınan etkin madde miktarı zamanın karekökü ile doğru orantılıdır (Higuchi, 1963).

Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin şekli de salım hızına etki eder. Bu durumda Hopfenberg kinetiğine de uyum görülebilmektedir. Bu kinetikte ilaç taşıyıcı sistemin tabaka şeklinde (düzlemsel), silindirik ve küresel olmasına göre veriler farklı şekilde değerlendirilmektedir (Park ve ark, 1993). Hopfenberg kinetiği Denklem 1.8'de görülmektedir.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{k_0 t}{C_0 a}\right]^n \quad (\text{Denklem 1.8})$$

M_t : t anında çıkan etkin madde miktarı (mg)

M_∞ : Toplam etkin madde miktarı (mg)

C_0 : Başlangıç anındaki etkin madde konsantrasyonu (mg/mL)

a : Düzlemin yarı kalınlığı, silindir ve kürenin yarıçapı

k : Salım hız sabiti

n : Şekil faktörü

Kullanılan sistem düzlemsel ise $n=1$ alınır. Bu durumda eşitlik Denklem 1.9'da görüldüğü gibi olur.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{k_0 t}{C_0 a} \quad (\text{Denklem 1.9})$$

Kullanılan sistem silindirik ise $n=2$ alınır. Bu durumda eşitlik Denklem 1.10'da görüldüğü gibi olur.

$$\left[1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right]^{1/2} = 1 - \frac{k_0 t}{C_0 a} \quad (\text{Denklem 1.10})$$

Kullanılan sistem küresel ise $n=3$ alınır. Bu durumda eşitlik Denklem 1.11'de görüldüğü gibi olur.

$$\left[1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right]^{1/3} = 1 - \frac{k_0 t}{C_0 a} \quad (\text{Denklem 1.11})$$

Etkin maddenin açığa çıkışının difüzyonla ve/veya polimerde meydana gelen gevşeme ile oluşunu açıklamak üzere geliştirilen Korsmeyer-Peppas eşitliği de Denklem 1.12'de verilmiştir (Peppas ve ark., 1980; Korsmeyer ve ark., 1983).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{Denklem 1.12})$$

M_t : t anında çıkan etkin madde miktarı (mg)

M_∞ : Toplam etkin madde miktarı (mg)

$\frac{M_t}{M_\infty}$: t anında çıkan etkin madde fraksiyonu

k : Salım yapan sistemin yapısal ve geometrik özelliklerini bileştiren bir sabit

n : Difüzyonal sabit

Denklem 1.12'de iki tarafın logaritması alındığında eşitlik Denklem 1.13'teki gibi olur.

$$\log \frac{M_t}{M_\infty} = \log k + n \log t \quad (\text{Denklem 1.13})$$

Elde edilen bu denklem sink koşul sağlandığında, ortamda etkin maddenin hiç birikmediği koşullarda, etkin maddenin %60'ı salınana kadar geçerlidir

$$\left(\frac{M_t}{M_\infty} \leq 0,60 \right).$$

Şişebilen sistemlerde bu denklemin kullanılabilmesi için sistemin şişmesinin orijinal hacminin % 125'ini geçmemesi ya da denge oranının 1,33'ten yüksek olmaması gerekir.

Denklem 1.12 kalın membran şeklindeki ve şişme göstermeyen sistemlere uygulandığında n değeri 0,5-1 arasında değişir. $n = 0,5$ 'te difüzyonla çıkış, n

= 1'de ise sıfır dereceden çıkış söz konusudur. Kinetik uygulanan sistem küresel ise $n = 0,43$ ise difüzyonla, $n = 1$ ise sıfır derece kinetikle salım olmaktadır.

Sistemde şişebilen polimerik yapıların bulunması etkin madde salımını sıfır derece kinetiğe yaklaştırmaktadır. n değeri belirtilen değerler dışında bulunuyorsa, burada etkin maddenin difüzyonuyla birlikte polimerik gevşemenin de olduğu belirtilmektedir (Ritger ve Peppas, 1987a, 1987b).

Etkin madde salımı difüzyonun yanı sıra polimerik yapının şişmesi ve degradasyonu ile de gerçekleşebilir. Bu duruma uygun eşitlik Denklem 1.14'te verilmiştir.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^{0,5} + k_2 t \quad (\text{Denklem 1.14})$$

Bu durumda etkin madde çıkışı iki mekanizma ile kontrol edilir. Birincisi salımın en başında, polimer degrade olmaya başlamadan önce salımın difüzyonla gerçekleştiği aşamada (k_1) daha etkindir. Burada salım zamanın karekökü ile doğru orantılıdır. İkinci aşama ise polimerin degradasyon aşamasıdır (k_2) ve degrade olan polimerden difüzyon daha hızlıdır ve sıfır dereceden çıkış görülür. Denklemde yer alan k_1 ve k_2 değerlerine bakılarak difüzyon-degradasyon mekanizmalarından hangisinin etkin olduğu saptanır.

Sink koşulunun sağlandığı ve partikül boyutunun salım esnasında zamanla azaldığı durumda daha çok multipartiküler küresel şekilli sistemlerde (partiküler ilaç taşıma sistemleri gibi) Hixson-Crowell eşitliği (Denklem 1.15) de incelenir (Dyas ve Shah, 2007).

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = kt \quad (\text{Denklem 1.15})$$

W_0 : Etkin maddenin en baştaki miktarı/doz (mg)

W_t : t anında kalan etkin madde miktarı (mg)

k : Salım hızı sabiti ($\text{mg}^{1/3}/\text{sa}$)

Salım hızı verilerinin doğrusallaştırılmasında Rosin-Rammler-Sperling-Bennet-Weibull (RRSBW) kinetiği de sıkça kullanılır (Denklem 1.16).

$$\varphi(\tau) = 1 - \exp\{-(\tau - \tau_d)\beta\} \quad (\text{Denklem 1.16})$$

φ : Çözünen etkin madde yüzdesi

τ : Zaman (dk)

β : Şekil faktörü

τ_d : Etkin maddenin %63,2'sinin salınması için geçen süre (dk)

Denklem 1.16'nın logaritması alınarak salım hızı verileri doğrusallaştırılır. Yeni eşitlik Denklem 1.17'de görülmektedir.

$$\log[\ln\{1/(1 - \varphi)\}] = \beta \log \tau - \beta \log \tau_d \quad (\text{Denklem 1.17})$$

$y = mx + n$ Denklem aslında; $y = \log[\ln\{1/(1 - \varphi)\}]$ şeklinde bir doğru denklemdir.

Burada;

$$y = \log[\ln\{1/(1 - \varphi)\}]$$

$$x = \log \tau$$

Doğrunun eğimi (m) ve y-kesişim değeri (n) şu şekildedir:

$$m = \beta$$

$$n = \beta \log \tau_d$$

Burada kıyaslama faktörü temelde τ_d , yani etkin maddenin %63,2'sinin çözüldüğü süredir (Langenbucher, 1976).

1.6. Polimerik Mikrokürelerin Sterilizasyonu

Sterilizasyon, bir üründeki tüm mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekillerinin ve virüslerin öldürülmesi veya uzaklaştırılmasıdır. Bu amaçla farmakopelerde sterilite güvence sınırı (SAL), 10^{-6} olarak belirlenmiştir. Bu 1

milyon üründe en fazla 1 mikroorganizma bulunması anlamına gelir (Dortunç, 2004).

Hazırlanan farmasötik preparatların bitmiş ürün olarak sterilize edilmesi (terminal sterilizasyon), ekonomik olarak uygunluğu, uygulama kolaylığı ve sonuç ürünün sterilliğinden emin olunabilmesi sebebiyle tercih edilir. Ancak terminal sterilizasyon yöntemlerinin uygulanmasının uygun olmadığı etkin maddenin zarar gördüğü, farmasötik ürünün yapısının bozulduğu durumlarda preparat aseptik olarak hazırlanarak sterilliği temin edilir.

Sterilizasyon, ısı ile, filtrasyonla, gazlarla ve radyasyonla yapılabilir. Bu terminal sterilizasyon yöntemlerinden hangisinin uygulanacağı, preparatın ve preparatta kullanılan materyallerin özelliklerine göre seçilir.

İmplant edilmek üzere hazırlanan partiküler ilaç şekillerinin uygulanmadan önce steril olması şarttır. Bu ürünlerin sterilizasyonunda, polimerik materyalin yüksek ısı ve buharla degrade olmasından dolayı yaş ısı veya kuru ısıyla sterilizasyonu tercih edilmez. Çözelti formundaki ilaç şekillerinin sterilizasyonunda tercih edilen filtrasyonla sterilizasyon partiküler ilaç şekillerine uygulanamaz.

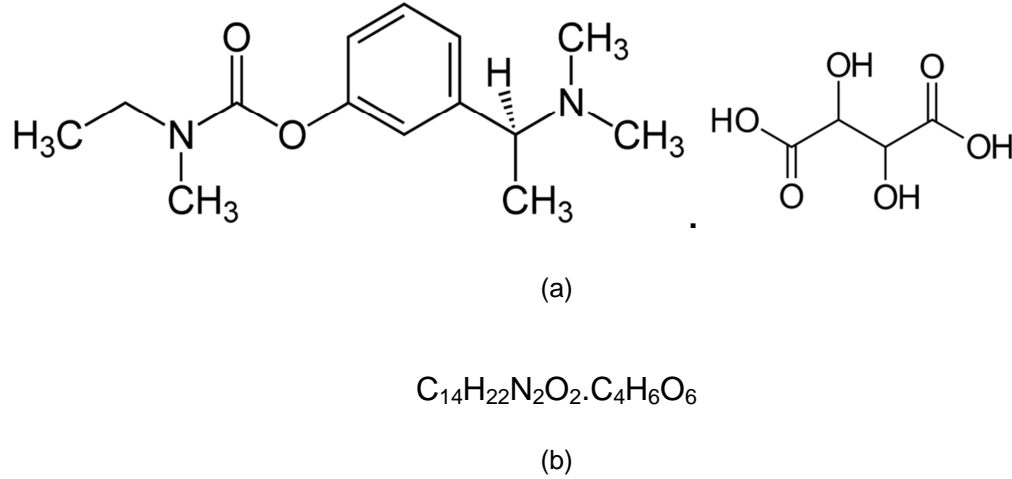
Partiküler ilaç şekillerinin etilen oksit gazıyla sterilizasyonu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Friess ve Schlapp, 2006); ancak etilen oksit gazı toksik kalıntı bırakabilir ve polimerin camsı geçiş sıcaklığı ve molekül ağırlığındaki değişiklikler takip edilmelidir. Etilen oksit ile sterilizasyon farmasötik ürünlerde gerekmedikçe kullanılmamalıdır ve etilen oksit kalıntısı 1 ppm'i geçmemelidir (EMA, 1996).

Partiküler ilaç şekillerinin sterilizasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntem radyasyonla sterilizasyondur. Bu yöntemde γ -radyasyon uygulanır. Ancak γ -radyasyon, polimerin molekül ağırlığı ve camsı geçiş sıcaklığını etkileyerek degradasyon hızını artırabilir (Friess ve Schlapp, 2006). Bu da tedavide istenmeyen durumlara yol açabilir.

Polimerik partiküler ilaç şekillerinde γ -radyasyon dozu 2,5 Mrad (25 kGy) olarak kabul edilmiş ve yapılan mikrobiyolojik incelemelerde bu dozun sterilizasyon için yeterli olan ve polimer yapısını etkilemeyen minimum doz olduğu görülmüştür (Hoxey ve ark., 1995; Özalp, 1997).

1.7. Rivastigmin Tartarat

Bu çalışmada mikropartiküllere yüklenmek üzere başlangıç ve orta seviyede Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan rivastigmin tartarat seçilmiştir. Rivastigmin tartarat, özellikle merkezi sinir sisteminde asetilkolinesteraz ve ve bütirikolinesteraz metabolizmasını reversibl olarak inhibe eden karbamat türevi bir bileşiktir (Williams ve ark., 2003). IUPAC isimlendirmesi (-)-*m*-[(*S*)-1-(Dimetilamino)etil]fenil etilmetilkarbamat olan rivastigminin, tartarik asit tuzunun açık ve kapalı formülü Şekil 1.13'te görülmektedir (Clarke's, 2005; Martindale, 2009, s.: 369).



Şekil 1.13. Rivastigmin tartaratın: a) açık formülü, b) kapalı formülü

1.7.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Molekül ağırlığı 400,43 g olan rivastigmin tartarat, beyaz ya da beyaza yakın kristal toz şeklindedir. Suda çok çözünür, etanol ve asetonitrilde çözünür, oktanolde az çözünür ve etil asetatı çok az çözünür. Erime noktası 123-125°C'dir. Partisyon katsayısı (log *P*(oktanol/pH 7,0 tampon)) 3,0'dır

(Clarke's, 2005). Rivastigmin tartaratin teşhis ve miktar tayini UV spektrofotometrisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve Gaz kromatografisi-kütle kromatografisi (GC-MS) ile yapılabilir (Clarke's, 2005, Arumugam ve ark., 2008).

1.7.2. Farmakolojik Özellikleri

Rivastigmin tartarat oral uygulamadan sonra gastrointestinal kanaldan hızlıca absorbe olur. Pik plazma konsantrasyonuna 1 saat içinde ulaşır. Yemeklerle birlikte alınması absorpsiyonunu 1,5 saat geciktirir ve maksimum plazma konsantrasyonunu düşürür. İlaç kolinesteraz enziminin katalizlediği hidrolizle hızla dekarbamile metabolitine metabolize olur. Rivastigmin tartarat ilk geçiş etkisine maruz kalır ve tüm vücuda dağılır. İlacın %90'ı ilk 24 saat içinde idrarla atılır ve %1'den azı feçesle atılır. Rivastigmin tartarat metabolizması böbrek bozukluğu olanlarda değişiklik gösterebilir. Doz aşımı olduğunda bulantı, kusma ve diyare görülebilir (Clarke's, 2005). Rivastigmin tartaratin en yaygın yan etkileri iştah azlığı ve kilo kaybı, karın ağrısı, bulantı, ajitasyon, sersemlik, depresyon, baş ağrısı, uykusuzluk, halsizlik, titreme, terleme ve dispepsidir. Daha az olarak; konvülziyon, anjina pectoris, senkop, gastrointestinal hemoraji ve üriner retansiyon görülebilir (Williams ve ark., 2003).

Rivastigmin tartaratin biyoyararlanımı 3 mg'lık dozun ardından %36'dır ve yemeklerle artabilir (AUC değerinde artış görülür). Yarı ömrü 1 saattir. Görünür dağılma hacmi 1,8-2,7 L/kg'dır. %40 oranında plazma proteinlerine bağlanır (Clarke's, 2005). Rivastigmin tartaratin başlangıç dozu günde iki kere 1,5 mg'dır. Doz, günde iki kez 3 mg, günde iki kez 4,5 mg ve günde iki kez 6 mg olacak şekilde artırılabilir (Martindale, 2009, s.: 369).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril	Sigma-Aldrich
Diklorometan	Sigma-Aldrich
Fosforik asit	Aldrich
PLGA 50:50 (MA 40 000-75 000)	Sigma
PLGA 65:35 (MA 40 000-75 000)	Aldrich
PLGA 75:25 (MA 90 000-126 000)	Sigma
PLGA 85:15 (MA 50 000-75 000)	Aldrich
Poli(DL-laktid) (MA 75 000-120 000)	Sigma
Polivinil alkol (MA 30 000-70 000)	Sigma-Aldrich
Polivinil pirolidon (MA 10 000)	Sigma-Aldrich
Polivinil pirolidon (MA 40 000)	Sigma-Aldrich
Potasyum bromür	Merck
Potasyum dihidrojen fosfat	Carlo Erba
Resomer® RG 502 (50:50, MA 7000-17 000)	Aldrich
Rivastigmin tartarat	Novartis
Sodyum hidroksit	Carlo Erba
Sodyum klorür	Carlo Erba

2.1.2. Kullanılan Aletler

Çalkalayıcı su banyosu	GFL 1083
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC-60
Diyaliz membran (12 000-14 000 Da MWCO)	Spectrum Labs Spectra/Por
Hassas terazi	Sartorius BL 210 S
IR spektrofotometre	Jasco FT-IR 420
Kapiller Erime Noktası Tayin Cihazı	Electrothermal 9100
Kolon	Waters Symmetry
Liyofilizatör	Christ Gamma 2-16 LSC
Manyetik karıştırıcı	IKA Werke RT 10
Membran filtre (selüloz asetat, 0,22 µm)	Sartorius
Optik mikroskop	Leica DM 4000B
Otomatik pipet (2-20 mL)	Isotherm
Otomatik pipet (20-200 mL)	Isotherm
Otomatik pipet (100-1000 mL)	Kartell pluripet
Partikül büyüklüğü tayin cihazı	Malvern Mastersizer 2000
pH metre	Inolab 720
Santrifüj cihazı	Sigma 2-16P
Spektrofotometre (UV/VIS)	Spekol UV VIS
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Jeol JSM 6400
Ultrasonik karıştırıcı	Ultrasonic LC 30
Vorteks karıştırıcı	Heidolph Reax Top
Yüksek hızlı homojenizatör	IKA Labortechnik T25
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Agilent 1100 Series HPLC

2.2. Yöntemler

2.2.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.1.1. Etkin Maddenin İnfrared (IR) Spektrumunun İncelenmesi

Rivastigmin tartaratın agat havanda potasyum bromür ile 1:10 oranında homojen karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım hidrolik preste 10 000 kg/cm² basınçla beş dakika sıkıştırılarak disk haline getirilmiştir. Elde edilen disk IR spektrofotometresine yerleştirilmiş ve 4 000-400 cm⁻¹ dalga sayıları arasında IR spektrumu alınmıştır.

2.2.1.2. Etkin Maddenin Erime Noktasının Tayini

Toz haldeki rivastigmin tartarat bir ucu kapalı kılcal cam boruya doldurulup Electrothermal 9100 erime noktası tayin cihazının analiz bölmesine yerleştirilmiştir. Sıcaklık yükseltilerek maddenin eridiği sıcaklık termometre yardımıyla saptanmıştır.

2.2.1.3. Etkin Maddenin DSC Analizi

DSC cihazı uygun şekilde açıldıktan sonra içine toz halde bir miktar rivastigmin tartarat konmuş olan alüminyum numune kabı analiz bölmesine yerleştirilmiştir. Rivastigmin tartarat numunesi 25°C'den 280°C'ye dakikada 20°C sıcaklık artışı ile ısıtılarak bu sıcaklık aralığındaki termogramı elde edilmiştir.

2.2.1.4. Etkin Maddenin Ultraviyole (UV) Spektrumunun İncelenmesi

Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu (USP 30, 2007) ve ultra saf su içindeki konsantrasyonları bilinen berrak çözeltilerinin UV spektrofotometrede 200-400 nm aralığında UV spektrumları alınmış ve maksimum absorbanans gösterdikleri dalga boyları (λ_{max}) saptanmıştır. Ayrıca HPLC'de de aynı çözeltilerin UV spektrumları alınmış, uygunluğu incelenmiştir.

2.2.1.5. Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayini

2.2.1.5.1. Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininde Kullanılan Tampon Çözeltilisi

Rivastigmin tartaratin HPLC ile miktar tayininde mobil faz olarak pH 3 fosfat tamponu:asetonitril (75:25 h/h) kullanılmıştır (Arumugam ve ark., 2008).

pH 3 Fosfat Tamponu:

Potasyum dihidrojen fosfat		3,40 g
Arıtılmış su	y.m.	1000,00 mL

900 mL arıtılmış suda 3,40 g potasyum dihidrojen fosfat çözülür. Fosforik asit yardımıyla pH 3'e ayarlanır. Ardından arıtılmış su ile 1000 mL'ye tamamlanır (EP 6, 2008, s.: 509).

2.2.1.5.2. Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Kalibrasyonu

Rivastigmin tartaratin ultra saf su ve pH 7,4 fosfat tamponu içinde 0,1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltileri hazırlanmıştır. Ultra saf su kullanılarak hazırlanan stoktan 0,5 µg/mL - 20 µg/mL konsantrasyon aralığında 9, pH 7,4 fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan stoktan 0,25 µg/mL - 20 µg/mL konsantrasyon aralığında 10 farklı çözelti hazırlanmıştır. HPLC'de 210 nm'de çözeltilerin analizi yapılmıştır. Aynı deneyler üç kere tekrarlanarak elde edilen alan sonuçlarının ortalaması alınmıştır. Konsantrasyona karşı elde edilen rivastigmin tartarata ait piklerin alan verileri kullanılarak en küçük kareler yöntemi ile doğru denklemleri hesaplanmıştır.

2.2.1.6. Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonu

Rivastigmin tartaratin miktar tayininde kullanılan HPLC yönteminin ve yöntemde kullanılmak üzere belirlenen koşulların uygunluğunun belirlenmesi amacıyla yöntemin analitik validasyonu yapılmıştır.

Rivastigmin tartaratın ultra saf su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarındaki miktar tayinlerinde 210 nm dalga boyu kullanılmıştır. Mobil faz oranları ve alıkonma zamanı yapılan ön çalışmalarla belirlenmiştir. HPLC yönteminin koşulları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Rivastigmin tartaratın HPLC ile miktar tayini koşulları

Kolon	Waters Symmetry® C ₁₈ , 5 µm, 4,6x250 mm
Mobil faz	pH 3 fosfat tamponu (EP 6, 2008):Asetonitril (75:25 h/h)
Kolon sıcaklığı	30°C
Akış hızı	1mL/dakika
Enjeksiyon hacmi	50 µL
Dalga boyu	210 nm
Alıkonma zamanı	3,9 dakika

Miktar tayininin analitik validasyonu için seçicilik, doğrusallık ve aralığı, doğruluk ve geri elde, kesinlik, teşhis ve tayin sınırları incelenmiştir (USP 30, 2007, s.:680; ICH Q2(R1), 2005).

2.2.1.6.1. Seçicilik

Rivastigmin tartaratın HPLC ile miktar tayini esnasında, rivastigmin tartaratın çalışmada kullanılan ve ortamda bulunması muhtemel diğer maddelerden ayrılarak net bir şekilde tayin edilip edilemediğini belirlemek amacıyla seçicilik çalışmaları yapılmıştır.

Bu amaçla formülasyonlarda yer alan, ultra saf su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarında çözünebilen maddelerin tek başına ve bilinen konsantrasyonda rivastigmin tartarat içeren çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin 210 nm’de analizleri yapılmıştır. Bu dalga boyunda pik verip vermedikleri ve alıkonma zamanının yakın olması sebebiyle etkin madde ile girişim yapan bir madde olup olmadığı belirlenmiştir.

2.2.1.6.2. Doğrusallık ve Aralığı

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralıkta, örnekteki madde konsantrasyonu ile doğru orantılı test sonuçları alınabilmesidir. HPLC analizinde doğrusallık bulunurken en küçük kareler yöntemi ile konsantrasyona karşı elde edilen pik alanı değerlerinden regresyon doğru denklemi hesaplanmaktadır. Bu doğrunun eğimi, madde konsantrasyonu ile bulunan deney sonuçları arasındaki matematiksel ilişkiyi göstermektedir. Regresyon doğrusunun eğimi, y kesişim değeri, korelasyon katsayısı ve artık kareler toplamı bulunmalıdır.

Analitik yöntemin aralığı ise; analitik yöntemin uygun seviyede kesinlik, doğruluk ve doğrusallığa sahip olduğunun gösterilmiş olduğu en üst ve en alt madde konsantrasyonu arasındaki aralıktır.

Rivastigmin tartaratin ultra saf su ve pH 7,4 fosfat tamponu ortamlarındaki HPLC ile miktar tayin yönteminin doğrusallığının belirlenmesi için bu ortamlar içinde 0,25-20 µg/mL konsantrasyon aralığında 10 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış, bu çözeltilere HPLC analizi yapılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanı değerleri belirlenmiştir. InStat istatistik programı (2000) yardımıyla konsantrasyona karşılık pik alanı doğrusu çizilmiş ve elde edilen bu doğrunun % 95 güven sınırları gösterilmiştir.

2.2.1.6.3. Doğruluk ve Geri Elde

Bir analitik yöntemin doğruluğu, gerçekliği genel kabul görmüş değer veya referans değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade eder.

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu içinde 0,25 µg/mL, 4 µg/mL ve 10 µg/mL ve ultra saf su içinde 0,5 µg/mL, 4 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında üçer çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler HPLC ile 6'şar kez analiz edilmiştir. Rivastigmin tartarata ait pik alanı verileri yardımıyla pratik konsantrasyon ve % geri elde değerleri hesaplandı.

Ortalama % geri elde, standart sapma ve bağıl standart sapma (varyasyon katsayısı) değerleri hesaplanarak yöntemin doğruluğu gösterildi.

2.2.1.6.4. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, belirtilen koşullar altında aynı homojen örnekten çoklu örnekleme ile elde edilen ölçümler dizisi arasındaki yakınlığı (dağılımın derecesini) ifade eder. Kesinlik üç seviyede ele alınabilir: tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik.

Tekrarlanabilirlik, aynı işlem koşulları altında kısa bir zaman aralığı sonundaki kesinliği ifade eder. Ara kesinlik, farklı günler, farklı analistler ve farklı malzeme gibi laboratuvar içi değişkenleri ifade eder. Tekrar elde edilebilirlik ise laboratuvarlar arası kesinliği ifade eder.

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu içinde 0,25 µg/mL, 4 µg/mL ve 10 µg/mL ve ultra saf su içinde 0,5 µg/mL, 4 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında üçer çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler HPLC ile 6'şar kez analiz edilmiştir. Elde edilen pik alanı verileri yardımıyla pratik konsantrasyonları hesaplandı. Ortalama konsantrasyon, standart sapma ve bağıl standart sapma verileri kullanılarak yöntemin tekrarlanabilirliği kanıtlandı.

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamlarındaki miktar tayin yönteminin ara kesinliğinin belirlenebilmesi için pH 7,4 fosfat tamponu içinde 0,25 µg/mL, 4 µg/mL ve 10 µg/mL ve ultra saf su içinde 0,5 µg/mL, 4 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında üçer çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler HPLC ile birbirini takip eden 3 gün 6'şar kez analiz edilmiştir. Elde edilen pratik konsantrasyon değerlerinden hareketle üç günlük veriler karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar açısından günler arasında fark olup olmadığına karar vermek için SPSS istatistiksel analiz programı ile t-testi uygulanmış ve p değerleri değerlendirilmiştir. % 95 olasılıklı çift yönlü testte

serbestlik derecesi 10 olduğu zaman elde edilen t-tablo değeri olan 2,23 ile bulunan t değerleri kıyaslanmıştır.

2.2.1.6.5. Teşhis ve Tayin Sınırları

Bir analitik yöntemdeki teşhis sınırı (LOD), kesin olarak miktarı belirlenemese de örnek içinde varlığı tespit edilebilen en düşük madde miktarıdır. Teşhis sınırı Denklem 2.1'de verilmiş olan eşitlikle hesaplanmıştır.

$$Teşhis\ Sınırı = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

(Denklem 2.1)

σ : Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

S : Kalibrasyon doğrusunun eğimi

Bir analitik yöntemdeki tayin sınırı (LOQ), bir örnekten uygun kesinlik ve doğrulukla miktar tayini yapılabilen madde miktarıdır. Tayin sınırı düşük miktarda madde içeren örneklerin madde miktar tayinlerinde önemli olan bir parametredir. Tayin sınırı Denklem 2.2'de verilmiş olan eşitlikle hesaplanmıştır.

$$Tayin\ sınırı = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

(Denklem 2.2)

σ : Regresyon doğrularının y kesişim değerlerinin standart sapması

S : Kalibrasyon doğrusunun eğimi

2.2.1.7. Etkin Maddenin Stabilitésinin İncelenmesi

Etkin maddenin *in vitro* salım çalışmalarının yapılacağı pH 7,4 fosfat tamponu içindeki 37°C'deki stabilitési, bir ay sürdürülen çalışmadan doğru sonuç alınabilmesi için önemlidir. Bu amaçla pH 7,4 fosfat tamponu içinde hazırlanan konsantrasyonları belli rivastigmin tartarat çözeltileri 37°C'de, su banyosunda bir ay bekletilmiştir. Bu süre boyunca belirli zaman aralıklarında alınan numunelerde HPLC ile rivastigmin tartarat miktar tayini yapılmıştır.

2.2.2. Polimerin Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.2.1. Polimerin IR Spektrumunun İncelenmesi

Toz hale getirilmiş polimerin agat havanda potasyum bromür ile 1:10 oranında homojen karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım hidrolik preste 10 000 kg/cm² basınçla beş dakika sıkıştırılarak disk haline getirilmiştir. Elde edilen disk IR spektrofotometresine yerleştirilmiş ve 4 000-400 cm⁻¹ dalga sayıları arasında IR spektrumu alınmıştır.

2.2.2.2. Polimerin DSC Analizi

DSC cihazı uygun şekilde açıldıktan sonra içine bir miktar PLGA (50:50) konmuş olan alüminyum numune kabı analiz bölmesine yerleştirilmiştir. Polimer numunesi 25°C'den 280°C'ye dakikada 20°C sıcaklık artışı ile ısıtılarak bu sıcaklık aralığındaki termogramı elde edilmiştir.

2.2.3. Ön Formülasyon ve Formülasyon Çalışmaları

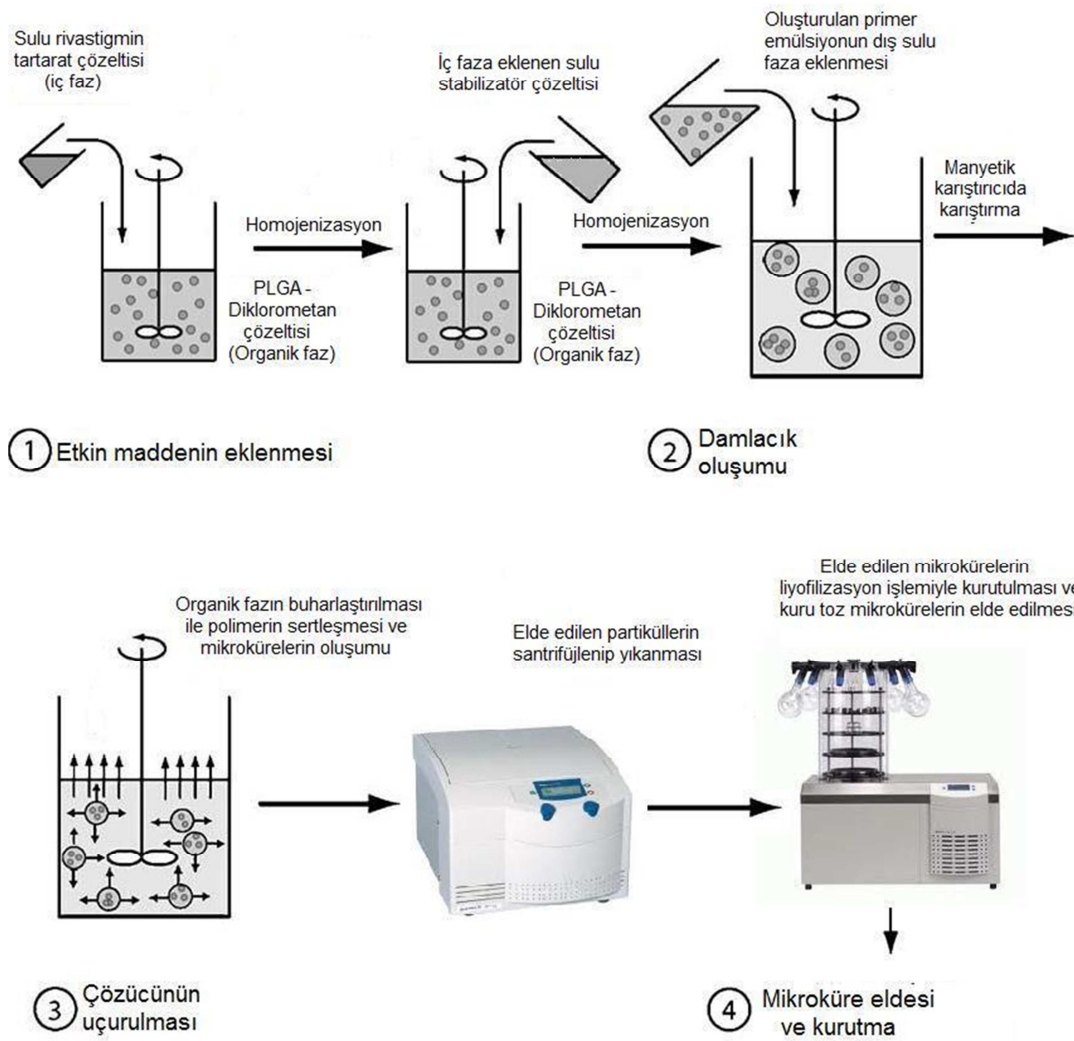
2.2.3.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında, hidrofilik etkin maddelerin PLGA mikrokürelere yüklenmesini mümkün kılan bir yöntem olan su içinde yağ içinde su tipi çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi seçilmiştir (Ito ve ark., 2007; Ng ve ark., 2010).

Bu yöntem ile önce boş mikrokürelere hazırlanmıştır (F0). Optik mikroskopta küresel partiküllerin oluştuğu teyit edilmiştir. Boş mikrokürelere eldesi gerçekleştirildikten sonra etkin madde eklenerek mikroküre hazırlanmıştır (F1).

10 mg rivastigmin tartarat içeren 0,2 mL iç su fazı, 200 mL PLGA 50:50'nin içinde çözülmüş olduğu 1,5 mL diklorometan (organik faz) içine eklenip yüksek hızlı homojenizatörle 10000 rpm'de 30 saniye homojenize edilmiş ve böylece primer emülsiyon elde edilmiştir. Sonra üzerine 1 mL % 1 a/h PVA

içeren sulu çözelti eklenmiş ve tekrar yüksek hızlı homojenizatörle 10000 rpm'de 30 saniye homojenize edilmiştir. Daha sonra bu karışım % 0,3 a/h PVA içeren 200 mL sulu faza (dış faz) eklenerek ikinci emülsiyon elde edilmiştir. Daha sonra diklorometan uçurularak mikrokürelerin sertleştirilmesi için formülasyon oda sıcaklığında 350 rpm'de manyetik karıştırıcıda 4 saat boyunca karıştırılmıştır. 4 saatin sonunda elde edilen mikroküreler 3 kere ultra saf su ile yıkanarak santrifüjlenmiş ve elde edilen mikroküreler liyofilizasyonla kurutulmuştur. Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle rivastigmin tartarat içeren PLGA mikrokürelerin üretim şeması Şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2.1. Çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle rivastigmin tartarat içeren PLGA mikrokürelerin üretim şeması

Çok hidrofilik olması sebebiyle dış faza kaçan etkin maddenin enkapsülasyon etkinliğini artırmak amacıyla çeşitli formülasyon parametreleri ön formülasyon çalışmalarında incelenmiştir.

Ön formülasyon çalışmalarının yapıldığı F1-F34 arasındaki formüllerde;

- Farklı hidrofilik özelliklere ve molekül ağırlıklarına sahip PLGA tipleri,
- Farklı etkin madde ve polimer miktarları (oranları),
- Farklı dış faz miktarı,
- Farklı karıştırma süreleri,
- Farklı dış faz içerikleri,
 - farklı pH'larda tampon kullanımı,
 - farklı iyon doygunlukları,
- Farklı miktarda etkin madde ilavesi parametreleri incelenerek suda çok çözünür olması sebebiyle PLGA mikrokürelere enkapsülasyon güçlüğü olan rivastigmin tartaratin enkapsülasyon etkinliğinin arttırılmasına çalışılmıştır.

Ön formülasyon çalışmalarında enkapsülasyon etkinliğini arttırmak amacıyla hazırlanan F1-F34 kodlu formüller Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Ön Formülasyon Çalışmalarında Hazırlanan Formüller

Formül Kodu	Polimer tipi	EM miktarı	Polimer miktarı	Dış faz miktarı	Karıştırma süresi	Karıştırma hızı	Homojenizasyon süresi	Homojenizasyon hızı	İç faz stabilizatör çöz.	Dış faz içeriği
F1	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F2	Resomer502	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F3	PLGA 65:35	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F4	PLGA 75:25	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F5	PLGA 85:15	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F6	PLA	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F7	PLGA 50:50	25 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F8	PLGA 50:50	50 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F9	PLGA 50:50	75 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F10	PLGA 50:50	100 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F11	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F12	PLGA 50:50	25 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F13	PLGA 50:50	10 mg	100 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.

Çizelge 2.2. (Devam) Ön Formülasyon Çalışmalarında Hazırlanan Formüller

Formül Kodu	Polimer tipi	EM miktarı	Polimer miktarı	Dış faz miktarı	Karıştırma süresi	Karıştırma hızı	Homojenizasyon süresi	Homojenizasyon hızı	İç faz stabilizatör çöz.	Dış faz içeriği
F14	PLGA 50:50	10 mg	150 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F15	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	2 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F16	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	3 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F17	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	100 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F18	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	300 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F19	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	400 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F20	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	500 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F21	PLGA 50:50	100 mg	100 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	% 0,3 PVA çöz.
F22	PLGA 50:50	100 mg	100 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F23	PLGA 50:50	100 mg	100 mg	200 mL	3 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F24	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 10 amonyum klorür tamp. (% 0,3 PVA)
F25	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 10,9 amonyum klorür tamp. (% 0,3 PVA)
F26	PLGA 65:35	100 mg	200 mg	300 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)

Çizelge 2.2. (Devam) Ön Formülasyon Çalışmalarında Hazırlanan Formüller

Formül Kodu	Polimer tipi	EM miktarı	Polimer miktarı	Dış faz miktarı	Karıştırma süresi	Karıştırma hızı	Homojenizasyon süresi	Homojenizasyon hızı	İç faz stabilizatör çöz.	Dış faz içeriği
F27	PLGA 65:35	100 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F28	PLGA 50:50	100 mg	200 mg	300 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F29	PLGA 50:50	100 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F30	PLGA 50:50	100 mg	100 mg	300 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F31	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	%5 NaCl çöz. (% 0,3 PVA)
F32	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%1 NaCl,% 0,3 PVA)
F33	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	300 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%1 NaCl,% 0,3 PVA)
F34	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl,% 0,3 PVA)

2.2.3.2. Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında suda çok çözünür özellikte olan rivastigmin tartaratin enkapsülasyonu sağlandıktan sonra elde edilen partiküllerin *in vitro* etkin madde salım özelliklerini iyileştirmek ve partikül iriliklerini azaltmak amacıyla;

- Dış fazda farklı bir stabilizatör kullanımının,
- Dış fazda farklı miktarlarda stabilizatör kullanımının,
- İç fazda farklı miktarlarda stabilizatör kullanımının,
- Farklı homojenizasyon hızlarının,
- Farklı molekül ağırlığında PLGA kullanımının,
- Formülasyona farklı miktarda etkin madde ilavesinin etkilerinin incelenebilmesi F34-F51 kodlu formüller hazırlanmıştır.

Formülasyon çalışmalarında hazırlanan formüller Çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Formülasyon Çalışmalarında Hazırlanan Formüller

Formül Kodu	Polimer tipi	EM miktarı	Polimer miktarı	Dış faz miktarı	Karıştırma süresi	Karıştırma hızı	Homojenizasyon süresi	Homojenizasyon hızı	İç faz stabilizatör çöz.	Dış faz içeriği
F34	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, % 0,3 PVA)
F35	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,1 PVA)
F36	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	300 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)
F37	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%3 NaCl, %0,3 PVA)
F38	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%0,3 PVP MA40000)
F39	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%0,3 PVP MA10000)
F40	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVP çöz.	pH 9 fosfat tamp (%0,3 PVP MA40000+%2NaCl)
F41	PLGA 50:50	20 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)
F42	PLGA 50:50	100 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)
F43	Resomer502	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)
F44	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 5 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)
F45	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	13500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)

Çizelge 2.3. (Devam) Formülasyon Çalışmalarında Hazırlanan Formüller

Formül Kodu	Polimer tipi	EM miktarı	Polimer miktarı	Dış faz miktarı	Karıştırma süresi	Karıştırma hızı	Homojenizasyon süresi	Homojenizasyon hızı	İç faz stabilizatör çöz.	Dış faz içeriği
F46	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	20500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)
F47	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	24000 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 9 fosfat tamp (%2 NaCl, %0,3 PVA)
F48	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVA çöz.	pH 7,4 fosfat tamp. (% 0,3 PVA)
F49	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVP çöz.	pH 9 fosfat tamp (%0,9 PVP MA40000,%2NaCl)
F50	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 1 PVP çöz.	pH 9 fosfat tamp (%1,5 PVP MA40000,%2NaCl)
F51	PLGA 50:50	10 mg	200 mg	200 mL	4 saat	350 rpm	30 sn.	9500 rpm	1 mL % 2 PVP çöz.	pH 9 fosfat tamp (%0,3 PVP MA40000,%2NaCl)

2.2.3.3. Formülasyonun Hazırlanış Aşamasında Kullanılan Tampon Çözeltileri

Çift emülsiyon / çözücü buharlaştırma yöntemiyle PLGA mikrokürelerin hazırlanması esnasında, dış sulu fazın pH'ının enkapsülasyon etkinliğine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi (Bölüm 2.2.4.6.1'de yer almaktadır), pH 9 fosfat tampon çözeltisi, pH 10 amonyum klorür tampon çözeltisi ve pH 10,9 amonyum klorür tampon çözeltisi mikroküre üretiminde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

pH 9 Fosfat Tamponu:

Potasyum dihidrojen fosfat		1,74 g
Arıtılmış su	y.m.	100,00 mL

80 mL arıtılmış suda 1,74 g potasyum dihidrojen fosfat çözülmüştür. 1 M potasyum hidroksit yardımıyla pH 9'a ayarlanmıştır. Ardından arıtılmış su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (EP 6, 2008, s.: 513).

pH 10 Amonyum Klorür Tamponu:

Amonyum klorür		5,4 g
Amonyak		35,0 mL
Arıtılmış su	y.m.	100,0 mL

5,4 g amonyum klorür 20 mL arıtılmış suda çözülmüştür. 35 mL amonyak eklenmiş ve arıtılmış suyla 100 mL'ye tamamlanmıştır (EP 6, 2008, s.: 513).

pH 10,9 Amonyum Klorür Tamponu:

Amonyum klorür		6,75 g
Amonyak	y.m.	100,00 mL

6,75 g amonyum klorür bir miktar amonyak içinde çözülmüş ve amonyakla 100 mL'ye tamamlanmıştır (EP 6, 2008, s.: 513).

2.2.4. Hazırlanan Formüllerde Yapılan Kontroller

2.2.4.1. Hazırlanan Formüllerde Etkin Madde Miktar Tayini ve Enkapsülasyon Etkinliği

Hazırlanan mikrokürelerde rivastigmin tartarat miktar tayini yapmak için 10 mg mikroküre tartılmış, 1 mL diklorometan içinde vorteks karıştırıcı yardımıyla 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra üzerine 20 mL arıtılmış su eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 50°C'de karıştırarak diklorometanın uçması ve polimerin çökmesi sağlanmıştır. Isıtma sırasında buharlaşan çözücü miktarını yerine koymak ve hacmi sabitlemek için 25 mL'lik balon jode hacim tamamlanmıştır ve 6 dakika 4500 rpm'de santrifüj yapılarak çöken polimerin ayrılması sağlanmış, üstte kalan etkin madde çözeltisinden alınarak HPLC analizi yapılmıştır. Miktar tayin işlemi 3 paralel halinde yapılarak sonuçların ortalaması alınmış ve rivastigmin tartarat miktarı belirlenmiştir.

Belirlenen etkin madde miktarı yardımıyla formülasyonlardaki enkapsülasyon etkinliği ve işlem verimi belirlenmiş ve bu veriler *in vitro* salım çalışmalarında kullanılacak mikroküre miktarının belirlenmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Enkapsülasyon etkinliği Denklem 2.3'e göre hesaplanmıştır.

$$EE = \frac{\text{Pratik etkin madde miktarı}}{\text{Teorik etkin madde miktarı}} \times 100$$

(Denklem 2.3)

Denklemden;

EE: Enkapsülasyon etkinliği

Pratik etkin madde miktarı: 10 mg mikrokürede ölçülen etkin madde miktarı

Teorik etkin madde miktarı: Formülasyonda 10 mg mikrokürede bulunması gereken teorik etkin madde miktarı

Formüllerin hazırlanmasında oluşan madde kaybı ve ulaşılan kütlenin değerlendirilmesi için işlem verimi Denklem 2.4'e göre hesaplanmıştır.

$$Işlem Verimi = \frac{Pratik madde miktarı}{Teorik madde miktarı} \times 100$$

(Denklem 2.4)

Pratik madde miktarı: Hazırlanan formülasyonun ölçülen toplam miktarı

Teorik madde miktarı: Hazırlanan formülasyonun teorik madde miktarı

2.2.4.2. Hazırlanan Formüllerin Şekil ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Formülasyon çalışmaları sırasında mikropartiküllerin oluşup oluşmadığının, şekillerinin küresel olup olmadığının belirlenmesi ve yaklaşık partikül büyüklüğünün gözlemlenebilmesi için optik mikroskoptan yararlanılmıştır.

Mikrokürelerin yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Hazırlanan formüller içinde belirlenen bir formüle SEM analizi uygulanmıştır. Hazırlanan mikrokürelerin *in vitro* etkin madde salım çalışmaları sonrasındaki değişikliklerin tespiti amacıyla, aynı formülün bir aylık *in vitro* etkin madde salım çalışmasının ardından SEM analizi ile yüzey özellikleri incelenmiştir.

SEM analizi için öncelikle mikroküreler bir örnek tutucuya iletken çift taraflı bir bant üzerine yayılarak sabitlenmiş ve soğuk saçılımlı kaplayıcı kullanılarak altınla kaplanmıştır. Kaplanan numuneler SEM cihazına yerleştirilerek elektron mikrografları çekilmiştir.

2.2.4.3. Hazırlanan Formüllerin IR Analizi

Önce formüldeki maddeleri aynı oranda içeren toz haldeki fiziksel karışımların, sonra da hazırlanan formüllerin agat havanda potasyum bromür ile 1:10 oranında homojen karışımları hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımlar hidrolik preste 10 000 kg/cm² basınçla beş dakika sıkıştırılarak disk haline getirilmiştir. Elde edilen diskler IR spektrofotometresine yerleştirilmiş ve 4000-400 cm⁻¹ dalga sayıları arasında IR spektrumları alınmıştır.

2.2.4.4. Hazırlanan Formüllerin DSC Analizi

DSC cihazı ile formüldeki maddeleri aynı oranda içeren toz haldeki fiziksel karışım ve analizi yapılacak formülün konmuş olduğu alüminyum numune kapları analiz bölmesine yerleştirilmiş ve sırasıyla analizleri gerçekleştirilmiştir. Fiziksel karışım ve formül, 25°C'den 280°C'ye dakikada 20°C sıcaklık artışı ile ısıtılarak bu sıcaklık aralığındaki termogramları elde edilmiştir.

2.2.4.5. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımının Tayini

Geometrik ortalama partikül çapı ($d_{0,5}$) ve partiküllerin büyüklük dağılımının genişliğini ifade eden değerler (span), Malvern Mastersizer 2000 cihazı kullanılarak lazer ışını kırınımı yöntemiyle tayin edilmiştir. Ölçümler, hazırlanan mikrokürelerin içinde çözünmediği su ortamında yapılmıştır. Analiz her mikroküre formülasyonu için üç kez tekrarlanarak yapılmıştır.

2.2.4.6. Hazırlanan Formüllerde In Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları

2.2.4.6.1. In Vitro Etkin Madde Salım Çalışmalarında Kullanılan Ortam

Hastaya subkutan veya intramüsküler yolla verilmesi planlanan dozaj formunun *in vitro* etkin madde salım çalışmaları esnasında fizyolojik ortama benzer bir ortam yaratmak için uygun olduğu düşünülen pH 7,4 fosfat tamponu seçilmiştir.

pH 7,4 Fosfat Tamponu:

Potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi (0,2 M)		50,0 mL
Sodyum hidroksit çözeltisi (0,2 M)		39,1 mL
Arıtılmış su	y.m.	200,0 mL

Potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi (0,2 M):

Potasyum dihidrojen fosfat		27,22 g
Arıtılmış su	y.m.	1000 mL

pH 7,4 fosfat tamponunu hazırlamak için öncelikle 0,2 M potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 27,22 g tartılan potasyum dihidrojen fosfat bir miktar arıtılmış suda çözülmüştür. Daha sonra arıtılmış su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiden 50 mL, 200 mL'lik bir balon jöjeye alınmıştır. Üzerine 39,1 mL 0,2 M sodyum hidroksit çözeltisi eklenmiş ve 200 mL'ye arıtılmış su ile tamamlanmıştır (USP 30, 2007).

2.2.4.6.2. In Vitro Etkin Madde Salım Çalışmalarının Yapılışı

Hazırlanan dozaj formundan etkin madde salımının fizyolojik koşullarda nasıl olabileceğini göstermek amacıyla yürütülen *in vitro* etkin madde salım çalışmalarında statik yöntem kullanılmıştır.

0,4 mg rivastigmin tartarat içerecek miktarda tartılan mikroküreler, 1 saat boyunca çalışmanın yapılacağı çözünme ortamı olan pH 7,4 fosfat tamponu içinde hidrasyon işleminden geçirilmiş, eş boyutta kesilmiş, bir ucu bağlı diyaliz membranlara yerleştirilmiştir. Üzerlerine 1'er mL pH 7,4 fosfat tamponu eklenip diğer uçları da bağlanmıştır. Mikroküre formülasyonu içeren membranlar 37°C'de 50 rpm'de çalkalayıcı su banyosu nda bulunan 20 mL pH 7,4 fosfat tamponu içeren kapaklı cam numune kaplarına yerleştirilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında 0,5 mL numune alınarak yerine aynı miktarda taze ortam sıvısı ilave edilmiştir.

Alınan numuneler HPLC'de analiz edilmiştir ve kalibrasyon denklemi yardımıyla numunelerin etkin madde konsantrasyonları belirlenmiştir. 3 paralel halinde yürütülen deneylerin sonucunda elde edilen verilerle rivastigmin tartaratın % çıkan etkin madde miktarlarına göre salım profilleri çizilmiştir. Ayrıca elde edilen bu verilerle salım kinetikleri incelenmiştir.

Aynı koşullarda 0,4 mg saf etkin maddenin de 3 paralel halinde *in vitro* salım çalışması yapılmıştır.

2.2.4.6.3. Hazırlanan Formüllerin Sterilizasyonu

İmplant edilmek üzere tasarlanıp hazırlanan formüllerin sterilize edilmesi gerekmektedir. Sterilizasyon sonucunda polimerik yapıda meydana gelebilecek değişikliklerin minimumda tutulması ve *in vitro* etkin madde salımının etkilenmemesi amacıyla polimerik yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemler için en uygun sterilizasyon yöntemi olan gama ışınları ile sterilizasyon tercih edilmiştir.

Sterilizasyon işlemi, ^{60}Co gama kaynağı ile kenar doz hızı 0.51 Mrad/sa, merkez doz hızı 0,47 Mrad/sa olan PX- γ -30 Issolodovatejl sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sterilize edilecek mikroküreler amber renkli flakonlar içinde ışınlama alanına konulmuş ve ışınlama dozu olarak polimerik materyaller için uygun görülen 2,5 Mrad seçilmiştir.

2.2.4.6.4. Kinetik Hesaplamalar ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

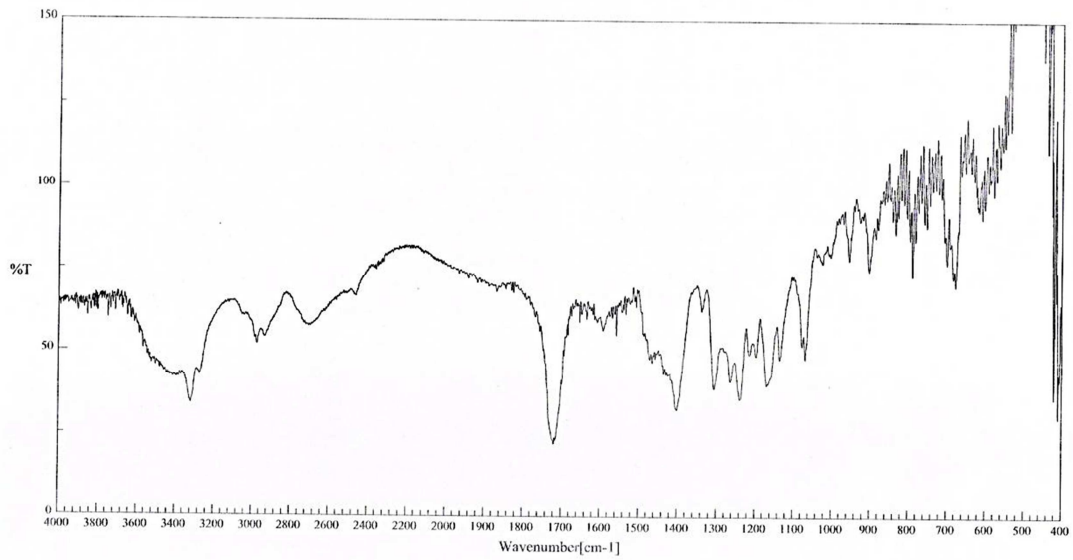
Hazırlanan formüllerden etkin madde açığa çıkışının uyum sağladığı kinetik model, Bölüm 1.5'te yer alan kinetik modellerden hareketle SPSS istatistiksel analiz programı kullanılarak bulunmuş ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile formülasyon değişkenlerinin etkin madde salımını nasıl etkilediği bulunmuştur.

3. BULGULAR

3.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

3.1.1. Etkin Maddenin IR Spektrumu

Bölüm 2.2.1.1'de anlatıldığı şekilde elde edilen rivastigmin tartaratin IR spektrumunda, fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



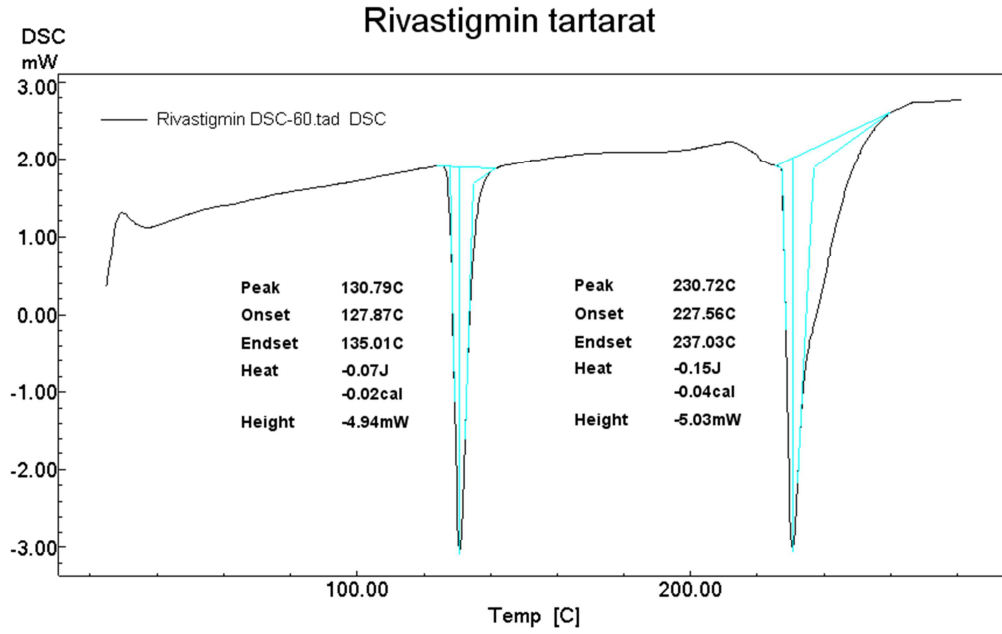
Şekil 3.1. Rivastigmin tartaratin IR spektrumu

3.1.2. Etkin Maddenin Erime Noktasının Tayini

Rivastigmin tartaratin erime noktası tayini 3 paralel ölçümün sonucu alınarak Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı biçimde yapılmıştır. Deney sonucunda maddenin 125°C'de eridiği görülmüştür.

3.1.3. Etkin Maddenin DSC Analizi

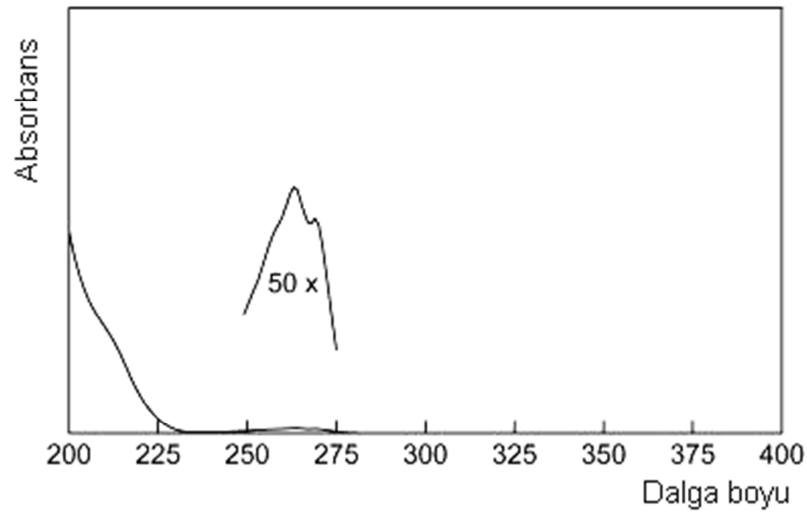
Rivastigmin tartaratin DSC termogramı Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. Elde edilen termogram Şekil 3.2'de verilmiştir.



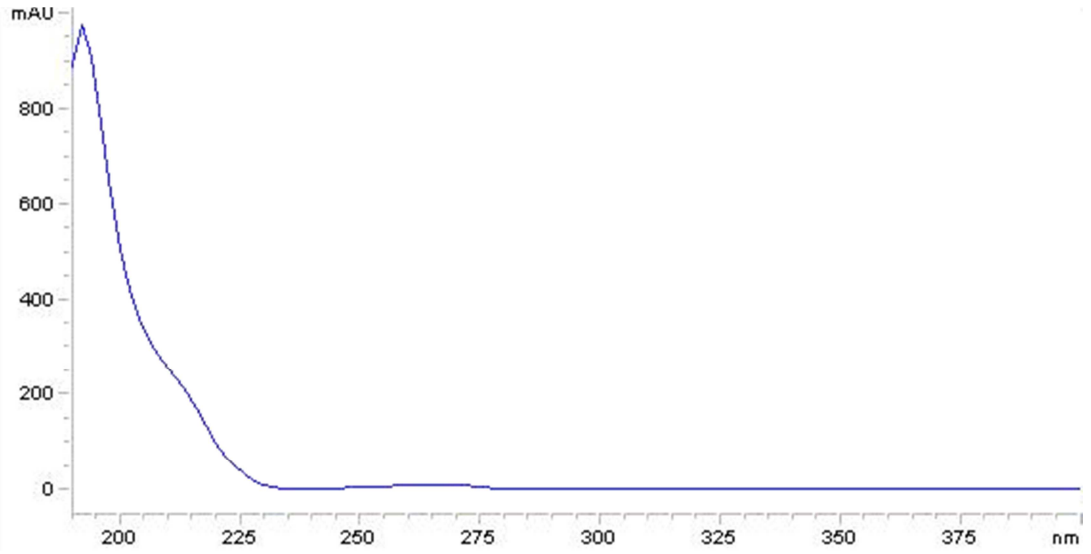
Şekil 3.2. Rivastigmin tartaratın DSC termogramı

3.1.4. Etkin Maddenin UV Spektrumu

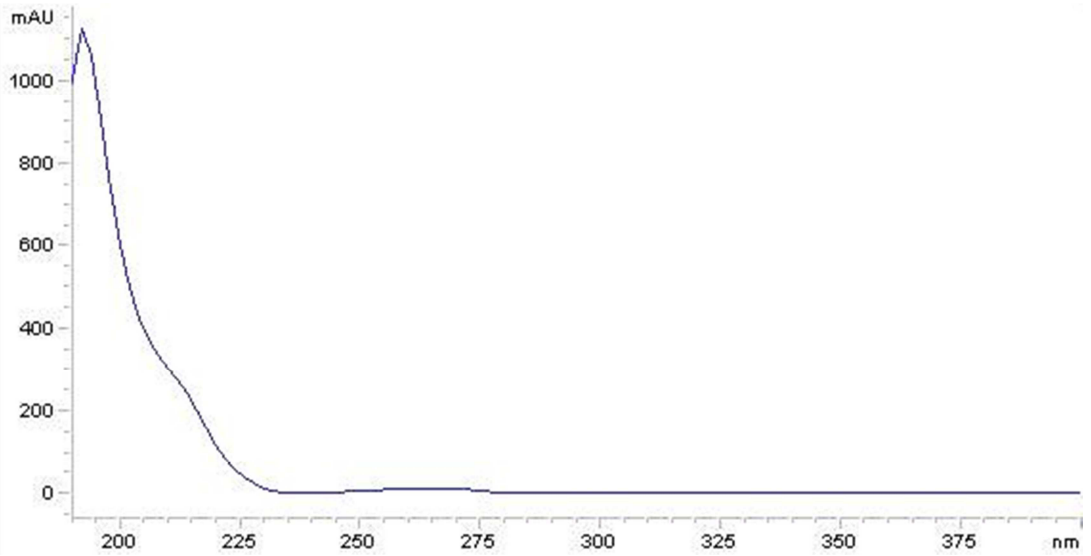
Rivastigmin tartaratın UV spektrumu, UV spektrofotometresi ve HPLC ile Bölüm 2.2.1.4'te anlatıldığı şekilde alınmıştır. Referans spektrum ve HPLC ile elde edilen UV spektrum Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da görülmektedir.



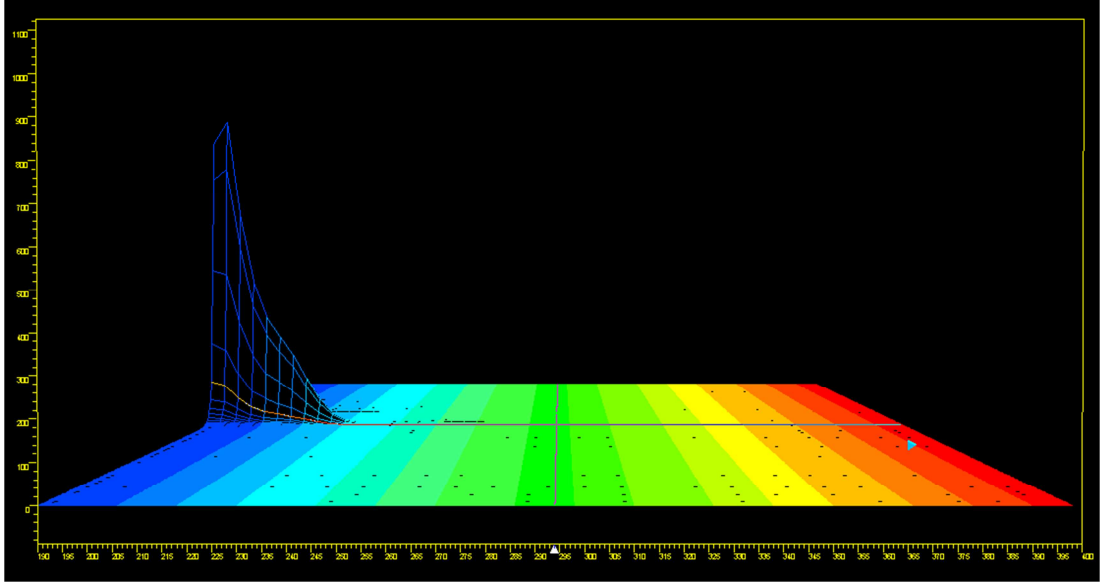
Şekil 3.3. Rivastigmin tartaratın referans UV spektrumu (Clarke's, 2005)



Şekil 3.4. Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamında HPLC ile elde edilen UV spektrumu



Şekil 3.5. Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamında HPLC ile elde edilen UV spektrumu



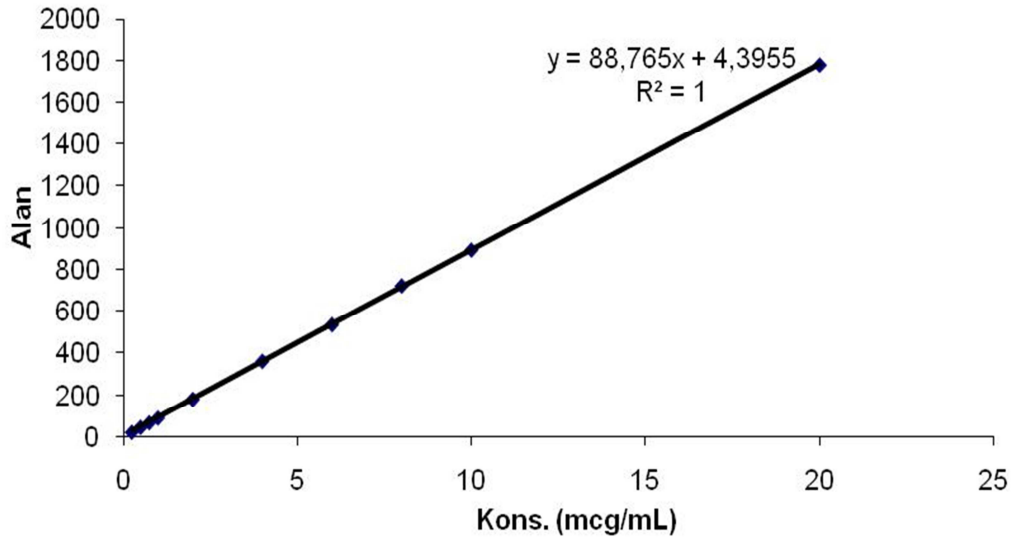
Şekil 3.6. Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamında HPLC ile elde edilen 3 boyutlu UV spektrumu

3.1.5. Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Kalibrasyonu

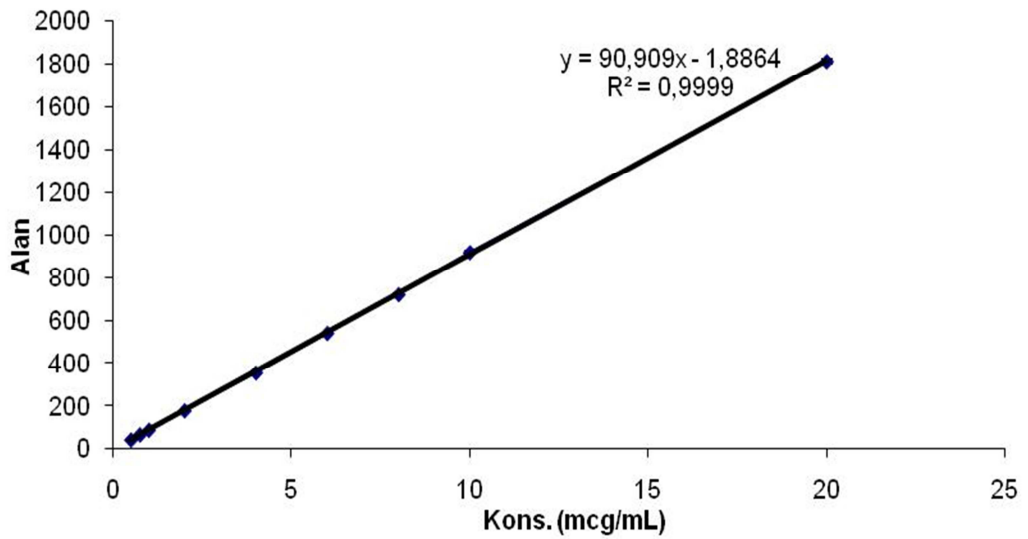
Bölüm 2.2.1.5.2'de anlatıldığı biçimde pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su yapılan ölçümler sonucunda elde edilen kalibrasyon parametreleri ve kalibrasyon doğruları sırasıyla Çizelge 3.1, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de görülmektedir.

Çizelge 3.1. Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su içindeki miktar tayininin kalibrasyonuna ait parametreler

Ortam	Eğim \pm SH	Kesişim \pm SH	r^2
pH 7,4 Fosfat Tamponu	88,7650 \pm 0,4595	4,3955 \pm 1,0901	1,0000
Ultra Saf Su	90,9090 \pm 1,5236	1,8864 \pm 1,4442	0,9999



Şekil 3.7. Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki kalibrasyon doğrusu



Şekil 3.8. Rivastigmin tartaratın ultra saf su ortamındaki kalibrasyon doğrusu

3.1.6. Etkin Maddenin HPLC ile Miktar Tayininin Analitik Validasyonuna İlişkin Bulgular

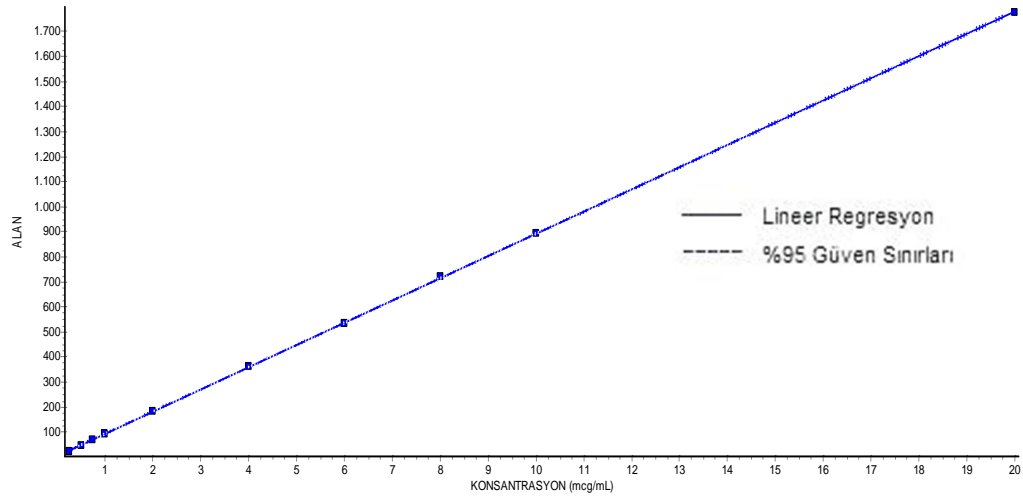
3.1.6.1. Seçicilik

Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su içindeki miktar tayininin seçicilik çalışması Bölüm 2.2.1.6.1'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Formülasyonda kullanılan polimer ve organik çözücü (PLGA ve diklorometan) suda çözünmediği için rivastigmin tartarat ile pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su içinde çözeltisi hazırlanamamıştır. Formülasyon aşamasında süzme ve uçurma işlemi yapıldığı için numunelere çözünmemiş halde diklorometan ve PLGA artığı geçmeyeceği düşünülmüştür. Formülasyonda yer alan suda çözünen polivinil alkolün rivastigmin içeren pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su içinde çözeltileri hazırlanmış, HPLC analizinde rivastigmin tartarat ile aynı dalga boyunda ve yakın alıkonma zamanında pik vermediği gözlenmiştir.

Ayrıca rivastigmin tartarat içermeyen mikroküre formülasyonu hazırlanmış, etkin madde miktar tayin işlemi uygulanmış ve alınan örneğe HPLC analizi uygulanmıştır. Analizde rivastigmin tartarat ile aynı dalga boyunda ve yakın alıkonma zamanında pik gözlenmemiştir. Boş mikroküreler ile *in vitro* etkin madde salım çalışması da yapılmış, belirli zaman aralıklarında alınan örnekler HPLC ile analiz edilmiştir. Analizde rivastigmin tartarat ile aynı dalga boyunda ve yakın alıkonma zamanında pik gözlenmemiştir.

3.1.6.2. Doğrusallık ve Aralığı

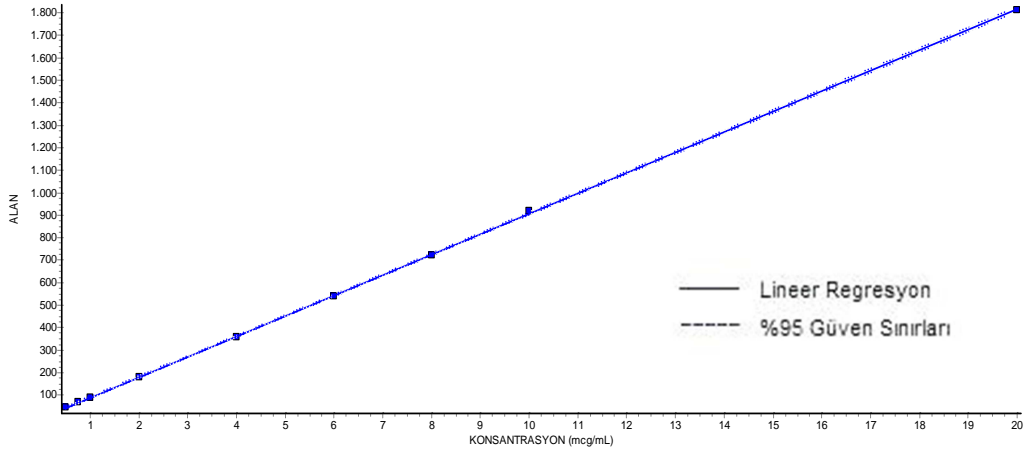
Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su içindeki miktar tayininin doğrusallık ve aralığı çalışması Bölüm 2.2.1.6.2'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen doğrular Şekil 3.9 ve Şekil 3.10'da, bu doğruya ilişkin parametreler ise Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.9. Rivastigmin Tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin doğru

Çizelge 3.2. Rivastigmin Tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin parametreler

Eğim (m)	88,765
Standart hata	0,1928
%95 Olasılıklı Güven Sınırları	88,320 - 89,209
Kesişim (n)	4,395
Standart hata	1,520
%95 Olasılıklı Güven Sınırları	0,8895 - 7,901
Korelasyon katsayısı (r)	1,0000
Determinasyon katsayısı (r^2)	1,0000
Regresyon doğrusundan olan sapmaların sapmaların standart sapması ($Sy.x$)	3,587
Lineer regresyon kareler toplamı	$2,728 \times 10^6$
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	102,96
Ortalamanın artık kareler toplamı	12,870



Şekil 3.10. Rivastigmin Tartaratin distile su ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin doğru

Çizelge 3.3. Rivastigmin Tartaratin distile su ortamındaki doğrusallık ve aralığı çalışmasına ilişkin parametreler

Eğim (m)	90,909
Standart hata	0,3058
%95 Olasılıklı Güven Sınırları	90,186 - 91,632
Kesişim (n)	-1,886
Standart hata	2,542
%95 Olasılıklı Güven Sınırları	-7,898 - 4,125
Korelasyon katsayısı (r)	1,0000
Determinasyon katsayısı (r^2)	0,9999
Regresyon doğrusundan olan sapmaların standart sapması ($Sy.x$)	5,457
Lineer regresyon kareler toplamı	$2,632 \times 10^6$
Doğrusallıktan sapmaların kareler toplamı	208,47
Ortalamanın artık kareler toplamı	29,782

3.1.6.3. Doğruluk ve Geri Elde

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su içindeki miktar tayininin doğruluk ve geri elde çalışması Bölüm 2.2.1.6.3'te açıklandığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen veriler ve bu verilere ilişkin parametreler Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayin yönteminin doğruluk ve geri elde çalışmasına ilişkin sonuçlar

Çözünme Ortamı: pH 7,4 Fosfat Tamponu					
Teorik Konsantrasyon: 0,25 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde
0,246	98,257	4,104	102,604	10,315	103,149
0,251	100,510	4,121	103,026	10,383	103,825
0,256	102,313	4,128	103,195	10,292	102,924
0,257	102,763	4,131	103,280	10,337	103,375
0,255	101,862	4,153	103,815	10,360	103,600
0,256	102,313	4,110	102,744	10,315	103,149
Ortalama % Geri Elde	101,336		103,111		103,337
Standart Sapma	1,696		0,431		0,303
Bağıl Standart Sapma (BSS)	1,674		0,418		0,293

Çizelge 3.5. Rivastigmin tartaratin ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin doğruluk ve geri elde çalışmasına ilişkin sonuçlar

Çözünme Ortamı: Ultra Saf Su					
Teorik Konsantrasyon: 0,5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde	Pratik Konsantrasyon	% Geri Elde
0,506	101,170	4,079	101,966	10,008	100,077
0,509	101,830	4,018	100,454	10,011	100,110
0,506	101,170	4,041	101,031	9,992	99,923
0,509	101,830	4,041	101,031	10,005	100,055
0,507	101,390	4,058	101,444	10,012	100,121
0,506	101,170	4,047	101,169	10,016	100,165
Ortalama % Geri Elde	101,427		101,183		100,075
Standart Sapma	0,324		0,502		0,084
Bağıl Standart Sapma (BSS)	0,319		0,496		0,084

3.1.6.4. Kesinlik

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamlarındaki miktar tayin yönteminin tekrarlanabilirlik çalışması Bölüm 2.2.1.6.4'te açıklandığı biçimde yapılmıştır. Elde edilen veriler ve bu verilere ilişkin parametreler Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayin yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmasına ilişkin sonuçlar

Çözünme Ortamı: pH 7,4 Fosfat Tamponu					
Teorik Konsantrasyon: 0,25 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon
26,8	0,252	360,1	4,007	901,1	10,102
26,0	0,243	360,8	4,015	902,8	10,121
26,1	0,245	358,5	3,989	899,6	10,085
27,0	0,255	360,2	4,008	897,7	10,064
26,8	0,252	361,2	4,020	899,2	10,081
26,5	0,249	363,9	4,050	902,8	10,121
Ortalama	0,249		4,015		10,096
Standart Sapma	0,005		0,020		0,023
BSS	1,844		0,501		0,230

Çizelge 3.7. Rivastigmin tartaratin ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin tekrarlanabilirlik çalışmasına ilişkin sonuçlar

Çözünme Ortamı: Ultra Saf Su					
Teorik Konsantrasyon: 0,5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon
44,7	0,512	359,8	3,979	910,8	10,040
43,4	0,498	360,3	3,984	905,5	9,981
44,2	0,507	359,0	3,970	902,2	9,945
43,3	0,497	359,5	3,975	907,4	10,002
44,3	0,508	359,5	3,975	907,8	10,007
44,9	0,515	359,1	3,971	909,2	10,022
Ortalama	0,506		3,976		9,999
Standart Sapma	0,007		0,005		0,033
BSS	1,433		0,132		0,331

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamlarındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışması Bölüm 2.2.1.6.4'te açıklandığı biçimde yapılmıştır. Elde edilen veriler ve bu verilere ilişkin parametreler Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasına ilişkin sonuçlar

Çözünme Ortamı: pH 7,4 Fosfat Tamponu					
Teorik Konsantrasyon: 0,25 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon
1. gün					
27,0	0,255	362,1	4,030	903,3	10,127
27,2	0,257	361,1	4,019	902,6	10,119
26,9	0,254	361,6	4,024	904,0	10,135
27,5	0,260	362,0	4,029	901,8	10,110
26,7	0,251	363,9	4,050	901,8	10,110
26,8	0,252	363,7	4,048	901,9	10,111
2. gün					
27,8	0,264	361,1	4,019	899,5	10,084
26,6	0,250	362,3	4,032	901,8	10,110
26,5	0,249	362,7	4,037	904,0	10,135
26,9	0,254	360,9	4,016	900,8	10,099
26,7	0,251	363,2	4,042	901,4	10,105
27,3	0,258	360,4	4,011	902,1	10,113
3. gün					
27,4	0,259	359,9	4,005	902,3	10,116
26,7	0,251	361,2	4,020	904,0	10,135
27,0	0,255	359,8	4,004	901,2	10,103
26,4	0,248	362,2	4,031	903,7	10,131
26,1	0,245	362,2	4,031	903,6	10,130
26,6	0,250	361,7	4,025	902,7	10,120
Ortalama	0,253		4,026		10,116
Standart Sapma	0,005		0,013		0,014
Bağıl Standart Sapma	1,882451		0,327		0,139

Çizelge 3.9. Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ortamındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasında günler arasındaki farkı incelemek için yapılan t-testi ile incelenen parametreler

Çözünme Ortamı: pH 7,4 Fosfat Tamponu						
Kıyaslanan günler	Teorik Konsantrasyon: 0,25 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
	p*	t	p*	t	p*	t
1-2	0,213	0,185	0,894	0,981	0,516	1,358
1-3	0,376	1,428	0,868	1,941	0,720	0,592
2-3	0,703	0,964	0,746	0,956	0,680	1,758

*p<0,05 olması farkın önemli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.10. Rivastigmin tartaratin ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasına ilişkin sonuçlar

Çözünme Ortamı: Ultra Saf Su					
Teorik Konsantrasyon: 0,5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon	Alan	Konsantrasyon
1. gün					
44,1	0,506	363,6	4,020	908,9	10,019
44,4	0,509	364,5	4,030	908,3	10,012
44,2	0,507	363,8	4,023	907,2	10,000
44,1	0,506	363,5	4,019	908,8	10,018
43,7	0,501	364,0	4,025	907,5	10,003
43,5	0,499	364,3	4,028	907,6	10,004
2. gün					
44,8	0,514	365,7	4,043	906,3	9,990
44,6	0,511	362,5	4,008	906,9	9,997
44,2	0,507	362,9	4,013	907,8	10,007
44,1	0,506	363,8	4,023	908,9	10,019
43,9	0,504	363,6	4,020	910,6	10,037
43,8	0,503	362,6	4,009	908,7	10,016
3. gün					
44,5	0,510	364,6	4,031	906,9	9,997
44,1	0,506	364,7	4,032	907,5	10,003
45,1	0,517	361,9	4,002	906,6	9,993
44,0	0,505	363,1	4,015	908,9	10,019
44,5	0,510	363,7	4,021	909,7	10,027
43,9	0,504	364,1	4,026	908,4	10,013
Ortalama	0,507		4,022		10,010
Standart Sapma	0,004		0,010		0,012
Bağıl Standart Sapma	0,866		0,248		0,125

Çizelge 3.11. Rivastigmin tartaratin ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin ara kesinlik çalışmasında günler arasındaki farkı incelemek için yapılan t-testi ile incelenen parametreler

Çözünme Ortamı: Ultra Saf Su						
Kıyaslanan günler	Teorik Konsantrasyon: 0,5 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 4 µg/mL		Teorik Konsantrasyon: 10 µg/mL	
	p	t	p	t	p	t
1-2	0,848	1,216	0,118	0,862	0,149	0,218
1-3	0,676	1,595	0,102	0,605	0,140	0,105
2-3	0,815	0,446	0,848	0,260	0,651	0,267

*p<0,05 olması farkın önemli olduğunu göstermektedir.

3.1.6.5. Teşhis ve Tayin Sınırları

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminde, Bölüm 2.2.1.6.5'te belirtildiği şekilde hesaplanan teşhis ve tayin sınırları Çizelge 3.12'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.12. Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamındaki miktar tayin yönteminin teşhis ve tayin sınırları

Ortam	Teşhis Sınırı	Tayin Sınırı
pH 7,4 Fosfat Tamponu	0,0702 µg/mL	0,2127 µg/mL
Ultra Saf Su	0,0908 µg/mL	0,2751 µg/mL

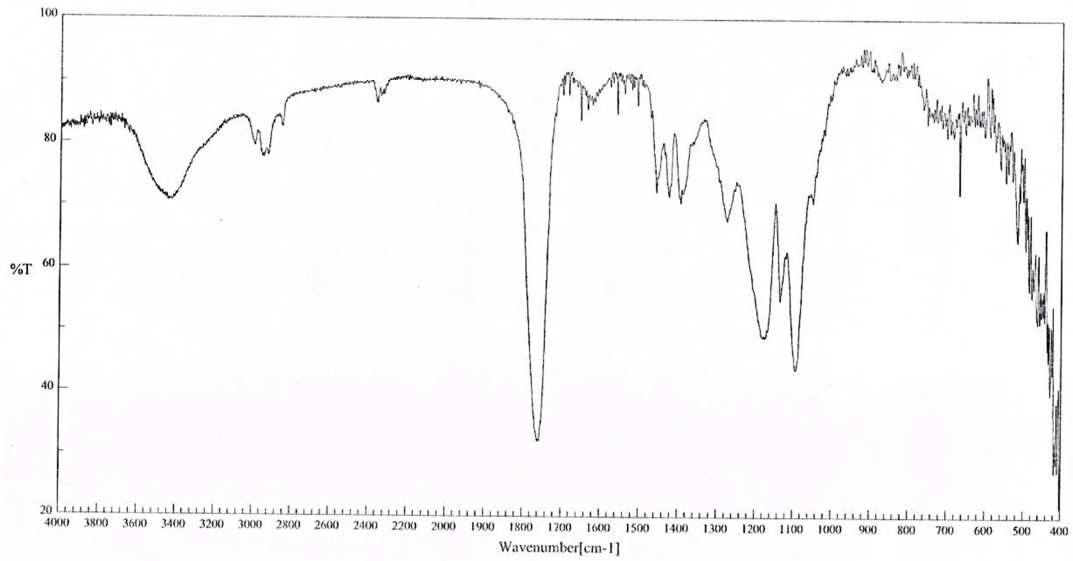
3.1.7. Etkin Maddenin Stabilitesinin İncelenmesi

Rivastigmin tartaratin bilinen konsantrasyondaki çözeltisinden Bölüm 2.2.1.7'de anlatıldığı şekilde 1 ay boyunca alınan numunelerin konsantrasyonlarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

3.2. Polimere Ait Bulgular

3.2.1. Polimerin IR Spektrumu

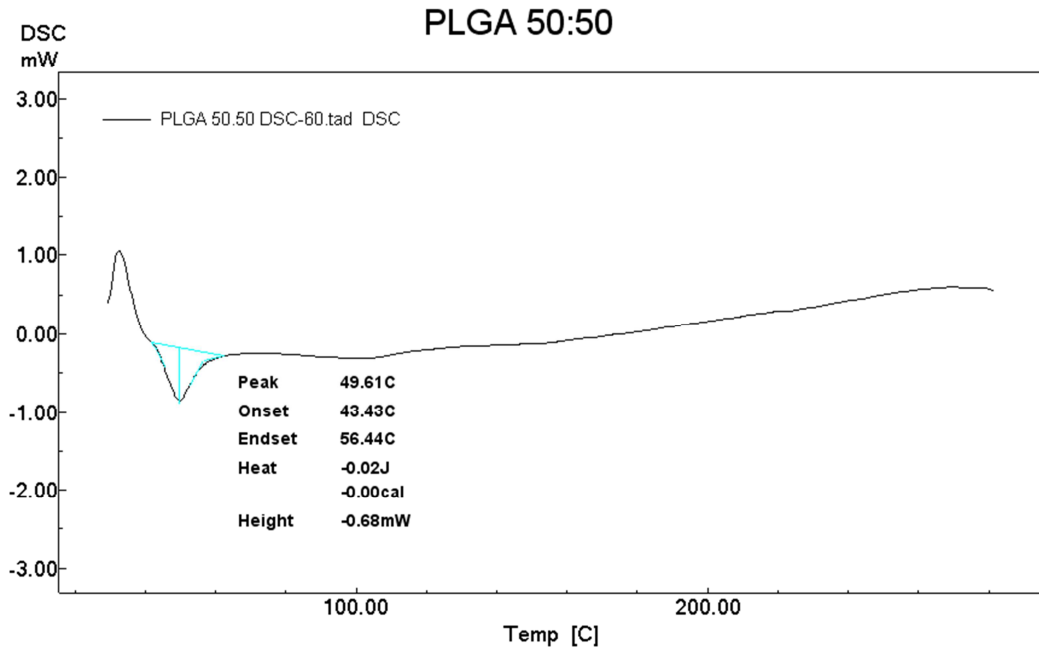
PLGA 50:50'nin Bölüm 2.2.2.1'de anlatıldığı şekilde elde edilen IR spektrumunda, maddenin fonksiyonel gruplarına ait bantlar Şekil 3.11'de görülmektedir.



Şekil 3.11. PLGA 50:50'nin IR spektrumu

3.2.2. Polimerin DSC Analizi

PLGA 50:50'nin DSC termogramı Bölüm 2.2.1.3'te anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. Elde edilen termogram Şekil 3.12'de görülmektedir.



Şekil 3.12. PLGA 50:50'nin DSC termogramı

3.3. Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.3.1. Hazırlanan Formüllerde Etkin Madde Miktar Tayini ve Enkapsülasyon Etkinliği

Hazırlanan formüllerin işlem verimleri, etkin madde miktar tayini verileri ve enkapsülasyon etkinlikleri Çizelge 3.13'te verilmiştir.

Çizelge 3.13. Hazırlanan formüllerin işlem verimleri ve enkapsülasyon etkinlikleri

Formül kodu	İşlem Verimi (%)	Teorik Etkin Madde Miktarı (mg)	Miktar Tayini			Enkapsülasyon Etkinliği (%)
			Pratik Etkin Madde Miktarı (mg)	Standart Sapma	Güven Sınırı (%95)	
F1	68,71	0,4762	0,0099	0,0001	±0,0002	2,08
F2	77,33	0,4762	0,0302	0,0002	±0,0004	6,33
F3	81,76	0,4762	0,1310	0,0006	±0,0015	27,49
F4	75,29	0,4762	0,0263	0,0001	±0,0003	5,51
F5	63,71	0,4762	0,0464	0,0002	±0,0004	9,72
F6	72,33	0,4762	0,0316	0,0042	±0,0105	6,62
F7	55,64	1,1111	0,0289	0,0001	±0,0002	2,59
F8	66,24	2,0000	0,1136	0,0001	±0,0003	5,68
F9	61,60	2,7273	0,1250	0,0012	±0,0001	4,58
F10	57,10	3,3333	0,4945	0,0000	±0,0030	14,84
F11	71,24	0,4762	0,1286	0,0006	±0,0001	26,99
F12	62,04	1,1111	0,2383	0,0002	±0,0015	21,45
F13	71,45	0,9091	0,0644	0,0000	±0,0005	7,08
F14	72,37	0,6667	0,0337	0,0000	±0,0001	5,05
F15	68,71	0,4762	0,0110	0,0000	±0,0000	2,30
F16	76,81	0,4762	0,0358	0,0001	±0,0001	7,51
F17	56,19	0,4762	0,0223	0,0002	±0,0002	4,66
F18	71,00	0,4762	0,0907	0,0000	±0,0005	19,03
F19	73,19	0,4762	0,0110	0,0000	±0,0001	2,28
F20	81,76	0,4762	0,0117	0,0011	±0,0001	2,43
F21	43,70	5,0000	0,0272	0,0012	±0,0028	0,54
F22	57,15	5,0000	0,8412	0,0008	±0,0029	16,83
F23	53,80	5,0000	0,5382	0,0001	±0,0020	10,77
F24	24,48	0,4762	0,0068	0,0042	±0,0001	1,42
F25	11,33	0,4762	0,0058	0,0000	±0,0001	1,19

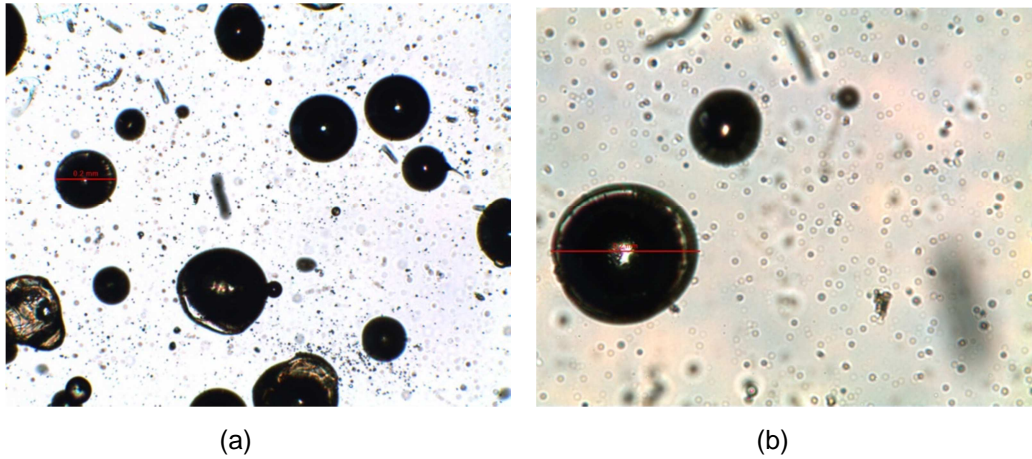
Çizelge 3.13. (Devam) Hazırlanan formüllerin işlem verimleri ve enkapsülasyon etkinlikleri

Formül kodu	İşlem Verimi (%)	Teorik Etkin Madde Miktarı (mg)	Miktar Tayini			Enkapsülasyon Etkinliği (%)
			Pratik Etkin Madde Miktarı (mg)	Standart Sapma	Güven Sınırı (%95)	
F26	96,33	3,3333	0,1469	0,0001	±0,0005	4,41
F27	59,73	3,3333	0,1637	0,0000	±0,0002	4,91
F28	56,37	3,3333	0,5436	0,0006	±0,0014	16,31
F29	56,80	3,3333	0,2028	0,0001	±0,0004	6,08
F30	55,45	5,0000	0,6177	0,0014	±0,0035	12,59
F31	89,86	0,4762	0,0938	0,0003	±0,0007	19,69
F32	104,05	0,4762	0,1717	0,0002	±0,0005	36,06
F33	102,24	0,4762	0,1874	0,0001	±0,0003	39,35
F34	97,71	0,4762	0,3576	0,0007	±0,0016	75,09
F35	83,67	0,4762	0,2110	0,0014	±0,0034	44,30
F36	85,00	0,4762	0,1681	0,0000	±0,0001	35,28
F37	105,14	0,4762	0,1473	0,0001	±0,0001	30,92
F38	106,19	0,4762	0,1262	0,0000	±0,0001	26,48
F39	69,14	0,4762	0,0644	0,0003	±0,0007	13,50
F40	101,00	0,4762	0,1717	0,0008	±0,0019	36,05
F41	94,86	0,9091	0,4357	0,0012	±0,0030	47,93
F42	105,17	3,3333	0,1996	0,0007	±0,0016	5,96
F43	80,05	0,4762	0,0300	0,0000	±0,0001	6,35
F44	84,48	0,4762	0,2595	0,0004	±0,0010	54,02
F45	102,90	0,4762	0,0959	0,0011	±0,0027	20,14
F46	103,52	0,4762	0,0868	0,0007	±0,0017	18,23
F47	105,48	0,4762	0,0594	0,0004	±0,0009	12,47
F48	104,05	0,4762	0,1064	0,0001	±0,0003	22,35
F49	100,52	0,4762	0,1869	0,0006	±0,0016	39,26
F50	70,14	0,4762	0,2308	0,0007	±0,0017	48,46
F51	91,24	0,4762	0,1969	0,0002	±0,0004	41,35

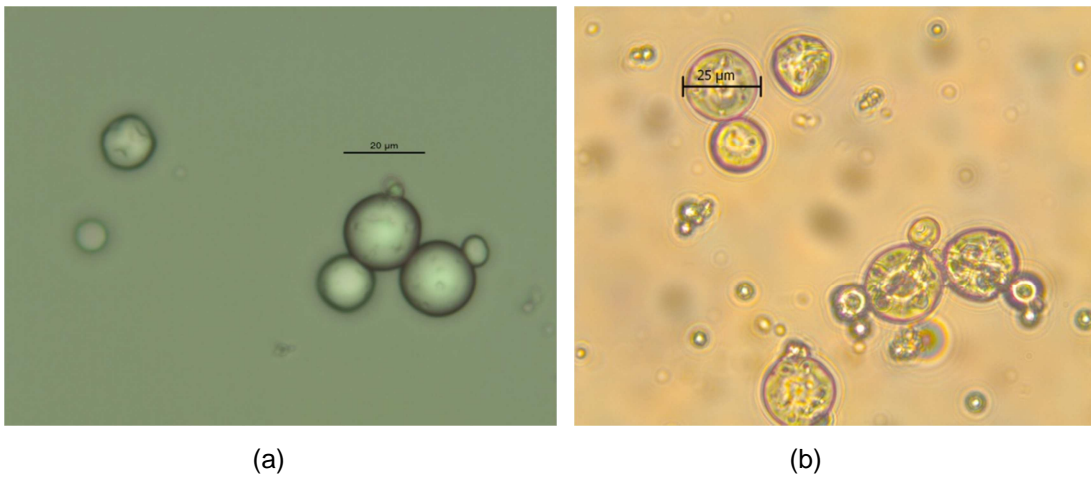
3.3.2. Hazırlanan Formüllerin Şekil ve Yüzey Morfolojilerinin İncelenmesi

Formülasyon aşamasında partiküllerin oluşumu ve şeklinin optik mikroskop ile incelenmesi sonucunda elde edilen F23, F34, F35, F37, F40, F41, F43, F45, F46, F47 ve F51 kodlu formülasyonlara ait optik mikroskop görüntüleri Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18 ve Şekil 3.19'da gösterilmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği dikkate alınarak ideal formül olarak seçilen F34 kodlu formülün *in vitro* etkin madde salım deneyleri öncesi ve 21 günlük *in vitro* salım çalışması sonrasındaki SEM görüntüleri Şekil 3.20 ve Şekil 3.21'te görülmektedir.



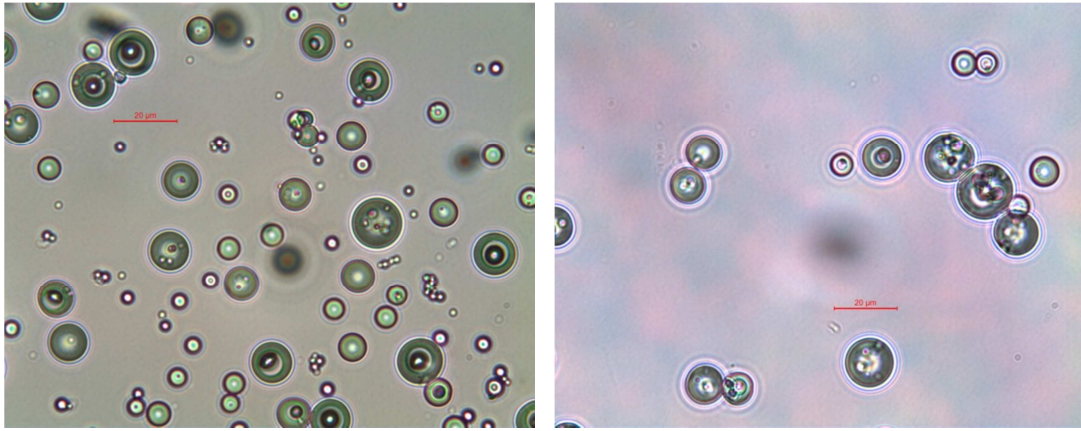
Şekil 3.13. Etkin madde-polimer oranı 1:1 olan F23 kodlu formülün optik mikroskop görüntüleri (Ölçek 200 μm 'dir.)



(a)

(b)

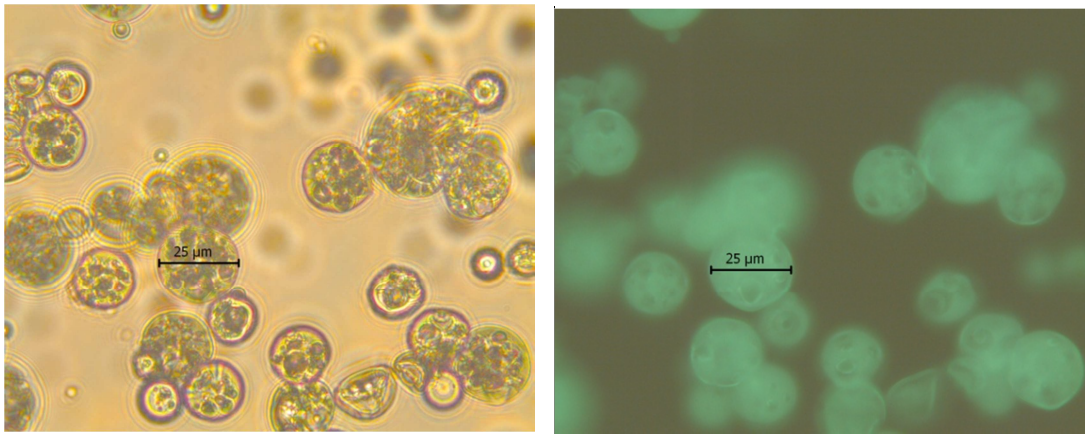
Şekil 3.14. Enkapsülasyon etkinliği bakımından ideal formül olarak belirlenen F34 kodlu formülün optik mikroskop görüntüleri [Ölçek 20 μm (a) ve 25 μm 'dir (b).]



(a)

(b)

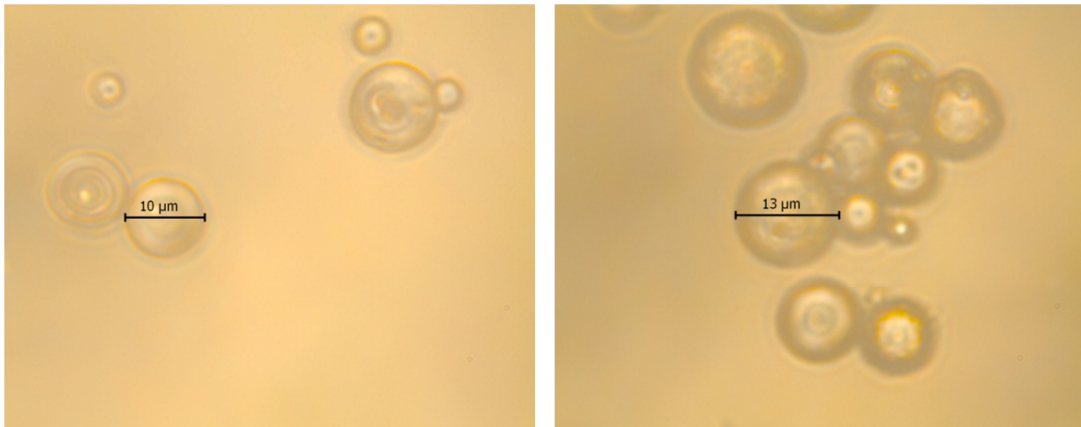
Şekil 3.15. F35 ve F37 kodlu formüllerin optik mikroskop görüntüleri (Ölçek 20 μm 'dir.)



(a)

(b)

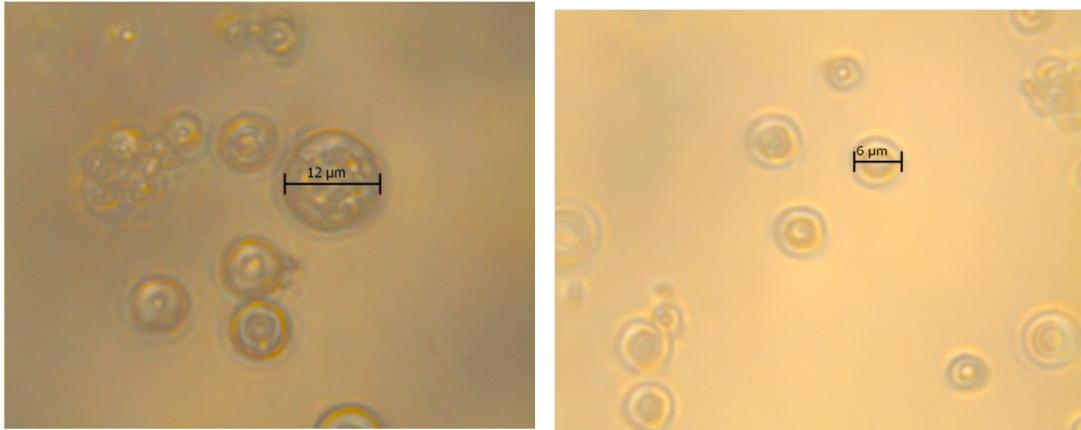
Şekil 3.16. F40 kodlu formülün beyaz ışık ve floresan lamba altında alınan optik mikroskop görüntüleri (Ölçek 25 μm 'dir.)



(a)

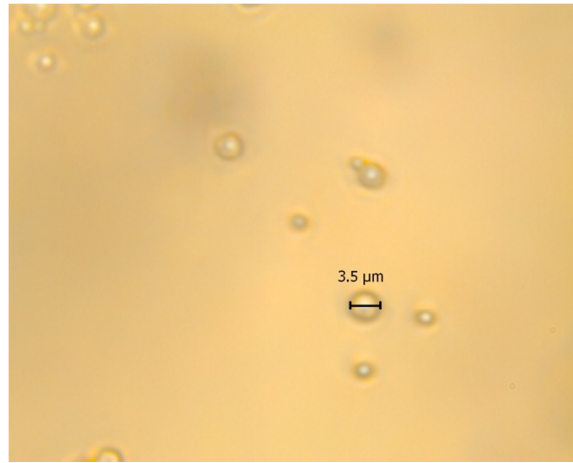
(b)

Şekil 3.17. F41 ve F43 kodlu formülasyonların optik mikroskop görüntüleri [Ölçek 10 μm (a) ve 13 μm 'dir (b).]



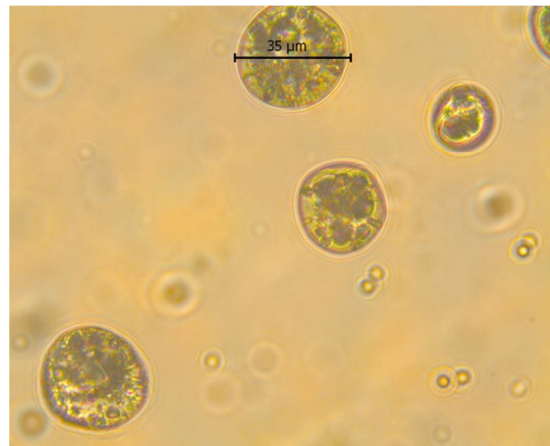
(a)

(b)

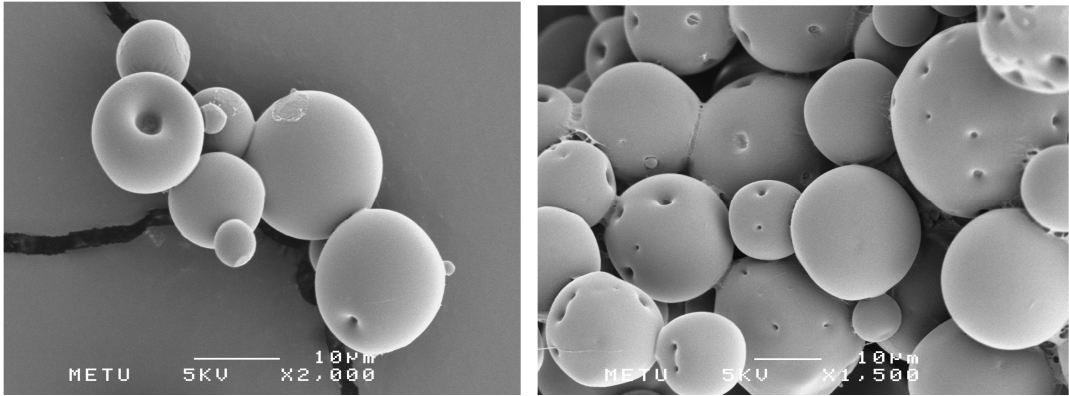


(c)

Şekil 3.18. Primer emülsiyon oluşturulması sırasında farklı homojenizasyon hızlarıyla hazırlanan F45, F46 ve F47 kodlu formüllerin optik mikroskop görüntüleri [Ölçek sırasıyla; 12 μm (a), 6 μm (b) ve 3,5 μm 'dir (c).]

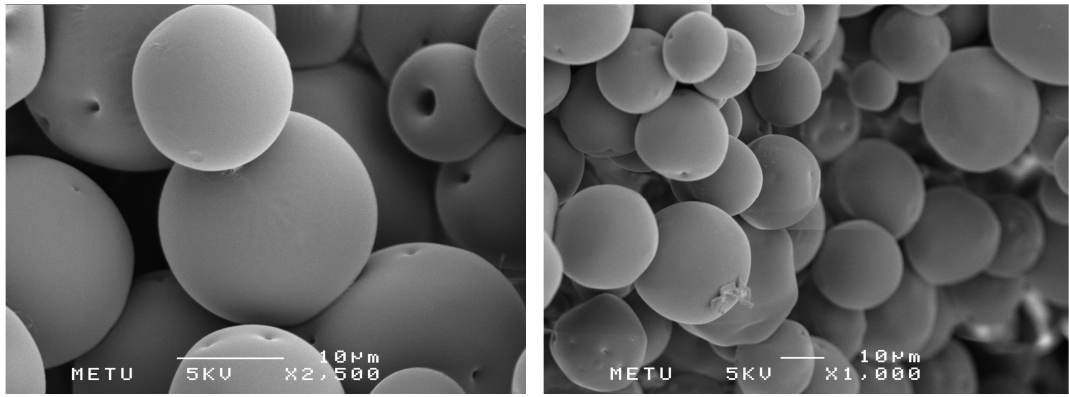


Şekil 3.19. Dış faza stabilizatör olarak % 1,5 a/h oranında PVP içeren F50 kodlu formülün optik mikroskop görüntüsü (Ölçek 35 µm'dir.)



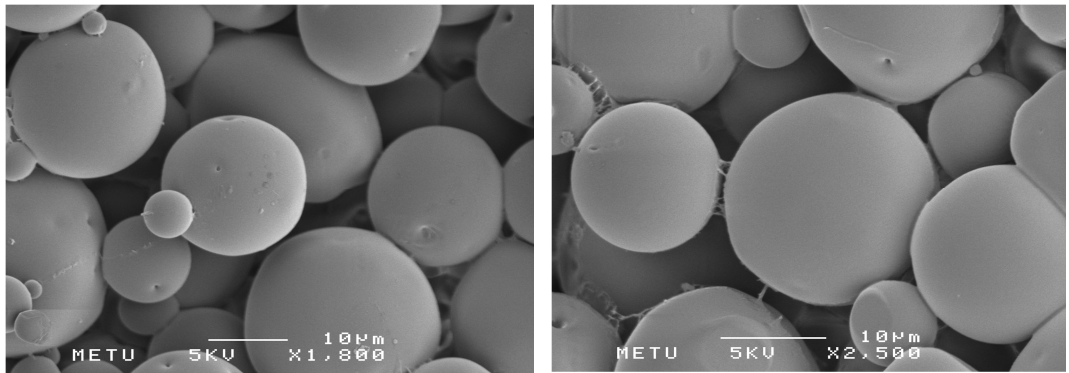
(a)

(b)



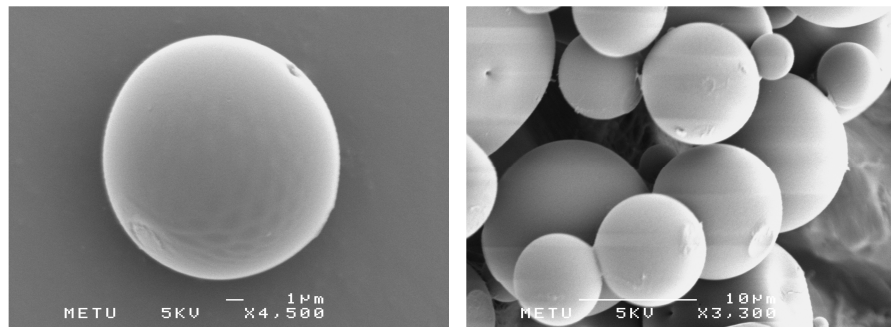
(c)

(d)



(e)

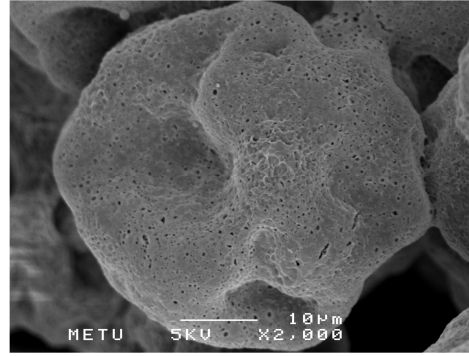
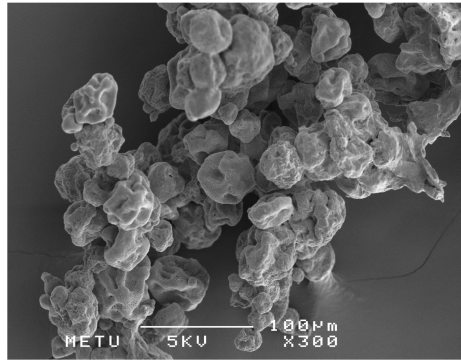
(f)



METU 5KV 1µm X4,500

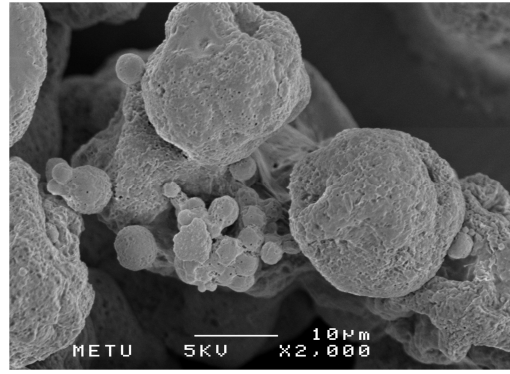
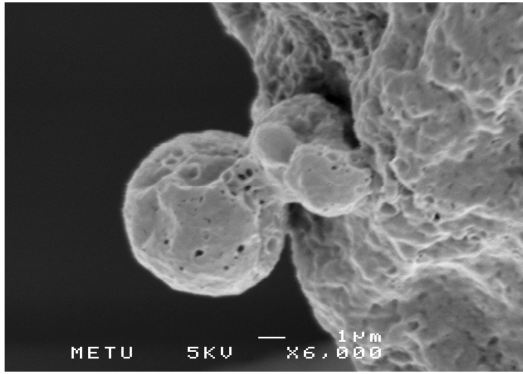
METU 5KV 10µm X3,300

(g) (h)
Şekil 3.20. F34 kodlu formülün SEM görüntüleri



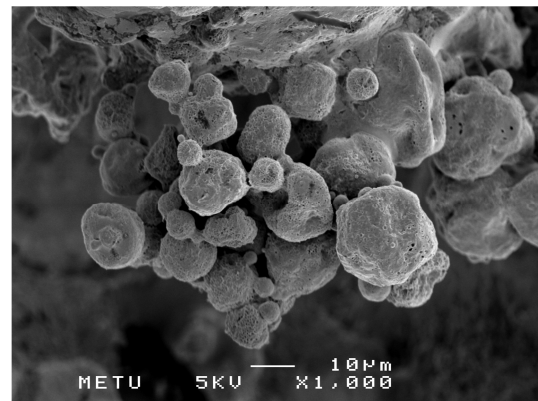
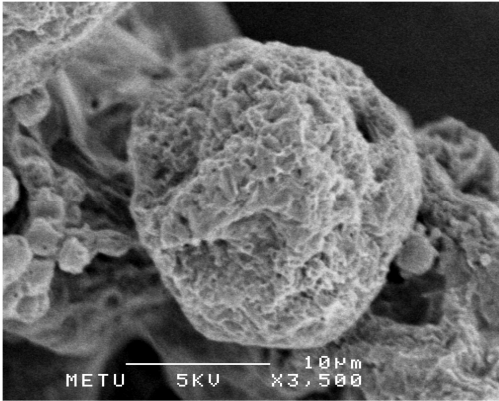
(a)

(b)



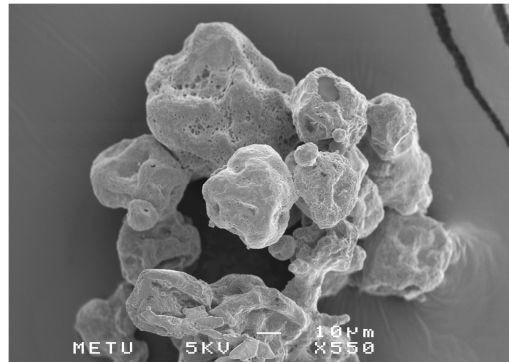
(c)

(d)



(e)

(f)

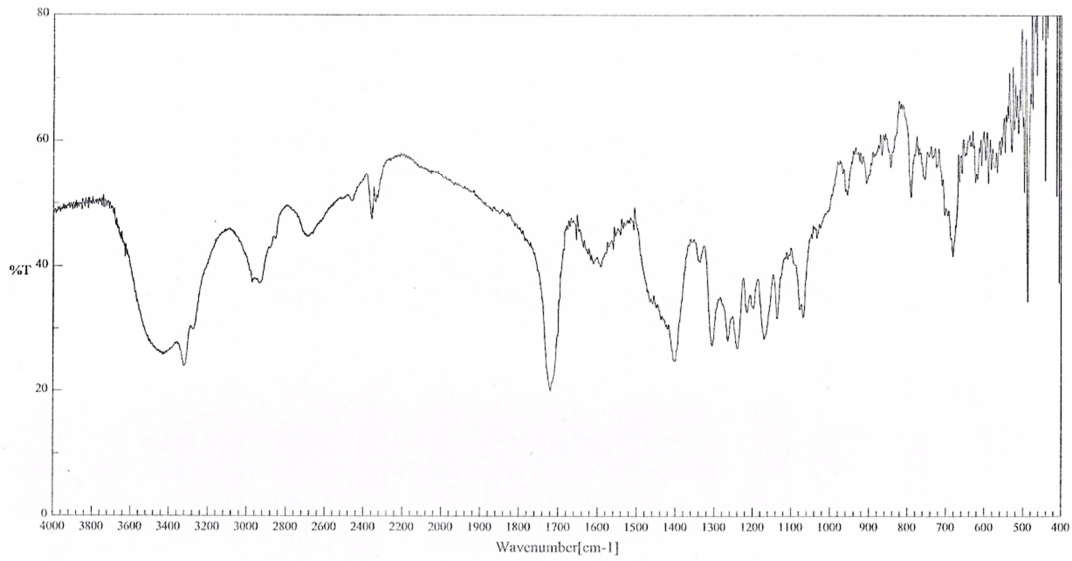


(g)

Şekil 3.21. F34 kodlu formülün *in vitro* salım deneyi ardından SEM görüntüleri

3.3.3. Hazırlanan Formüllerin IR Analizi

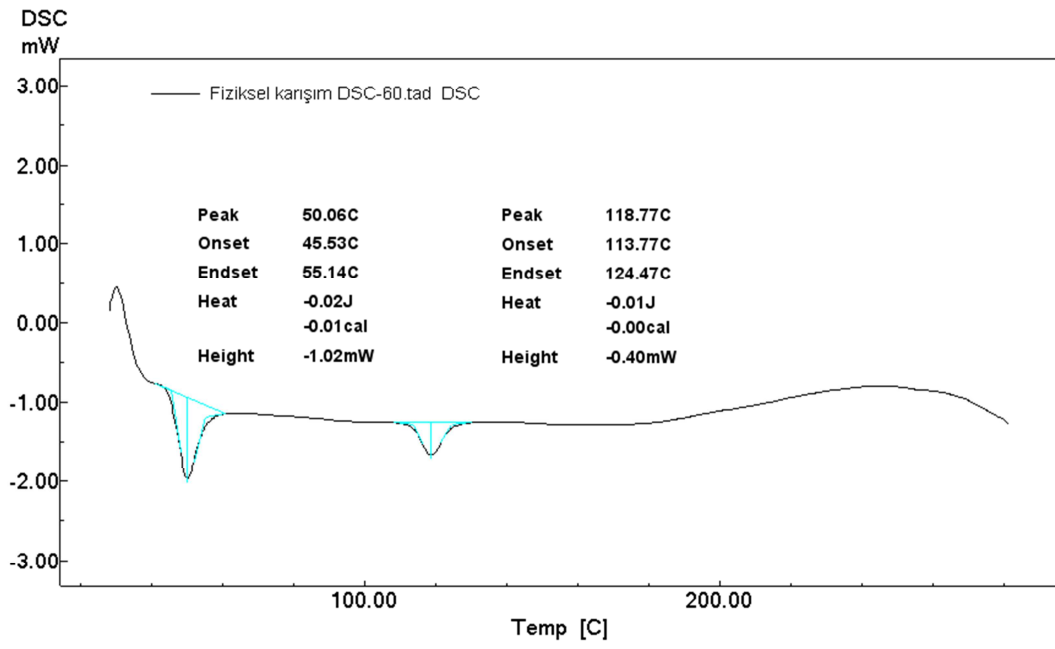
Formülasyon çalışmaları sonucunda polimer ve etkin maddenin yapısında bir değişiklik olup olmadığını görmek amacıyla F34 kodlu formülün Bölüm 2.2.4.3'te anlatıldığı şekilde elde edilen IR spektrumu Şekil 3.22'te gösterilmiştir.



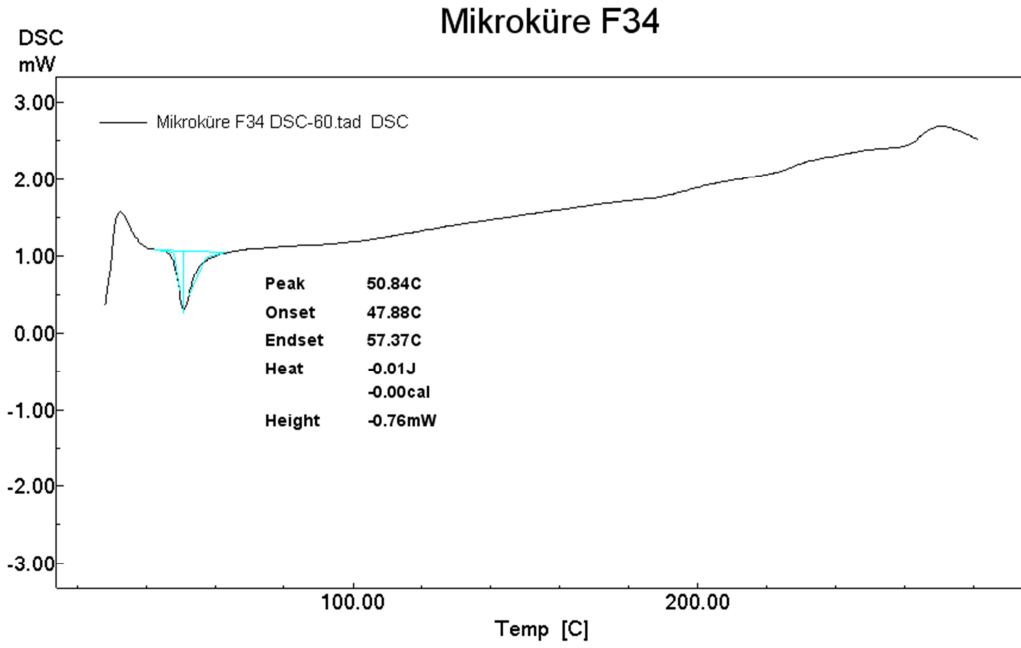
Şekil 3.22. F34 kodlu formülün IR spektrumu

3.3.4. Hazırlanan Formüllerin DSC Analizi

Formülasyon çalışmaları sonucunda polimerin yapısında bir değişiklik olup olmadığını ve etkin maddenin polimer içinde enkapsüle olup olmadığını görmek amacıyla F34 kodlu formüldeki maddeleri içeren fiziksel karışım ve F34 kodlu formülün Bölüm 2.2.4.4'te anlatıldığı şekilde elde edilen DSC termogramları Şekil 3.23 ve Şekil 3.24'de gösterilmiştir.



Şekil 3.23. F34 kodlu formüldeki maddeleri içeren fiziksel karışımın DSC termogramı



Şekil 3.24. F34 kodlu formülün DSC termogramı

3.3.5. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Tayinine İlişkin Bulgular

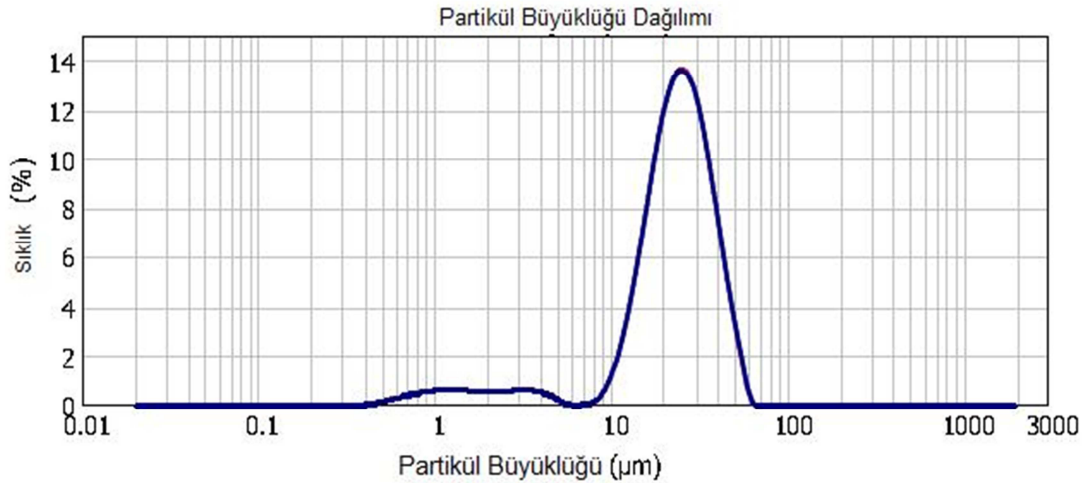
Bölüm 2.2.4.5'te belirtildiği şekilde, hazırlanan mikrokürelerin partikül büyüklüğü dağılımları lazer ışını kırınımı yöntemi kullanılarak bulunmuştur. Elde edilen veriler Çizelge 3.14 ve Çizelge 3.15'te verilmiştir. İdeal formül olarak belirlenen F34 kodlu formülün partikül büyüklüğü dağılımı Şekil 3.25'te görülmektedir.

Çizelge 3.14. Mikroküre formülasyonlarının geometrik ortalama çapları ve dağılımın genişliğini ifade eden span değerleri

Formüller	Geometrik Ortalama Çap (μm)	Span
F34	23,789	1,205
F40	19,290	1,156
F41	13,116	1,344
F42	58,409	1,713
F43	52,125	1,856
F45	8,839	25,368
F46	5,644	7,434
F47	5,843	28,293

Çizelge 3.15. Formülasyon değişkenlerinin partikül büyüklüğü ve dağılımı üzerine etkisi

Formülasyon Değişkenleri	Formüller		Geometrik Ortalama Çap (μm)	Span
	Kıyaslanan Formül	Partikül Büyüklüğü Saptanan Formül		
		F34	23,789	1,205
Stabilizatör tipi	F34 (PVA)	F40 (PVP)	19,290	1,156
Etkin Madde Miktarı	F34 (10 mg)	F41 (20 mg)	13,116	1,344
		F42 (100 mg)	58,409	1,713
Polimer Molekül Ağırlığı	F34 (MA 40000-75000)	F43 (MA 7000-17000)	52,125	1,856
Homojenizasyon Hızı	F34 (9500 rpm)	F45 (13500 rpm)	8,839	25,368
		F46 (20500 rpm)	5,644	7,434
		F47 (24000 rpm)	5,843	28,293



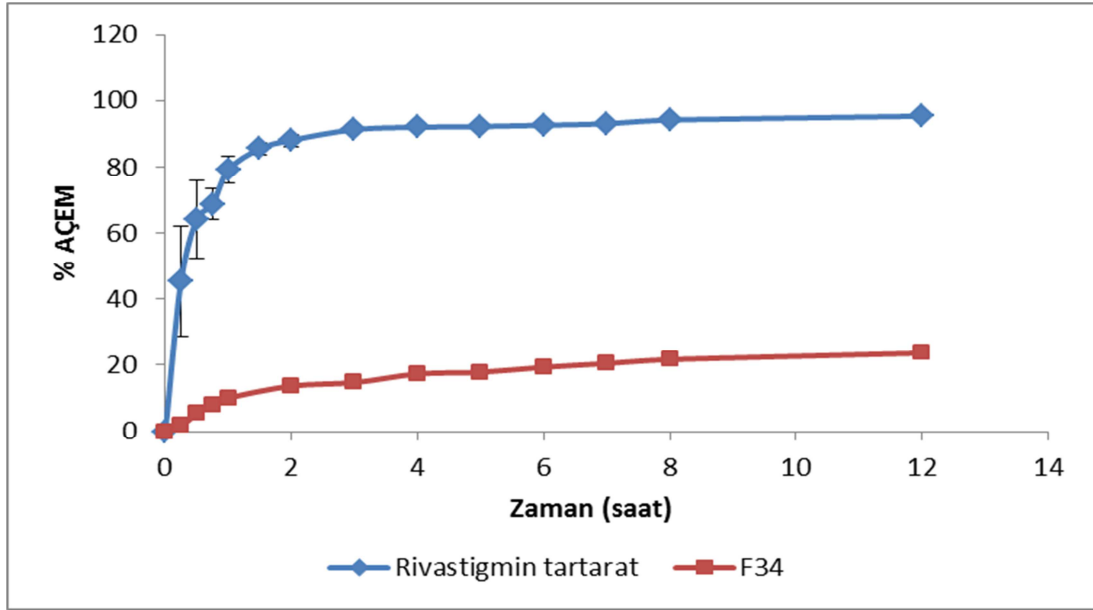
Şekil 3.25. İdeal formül olarak belirlenen F34 kodlu formülün partikül büyüklüğü dağılımı

3.3.6. Hazırlanan Formüllerde In Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları

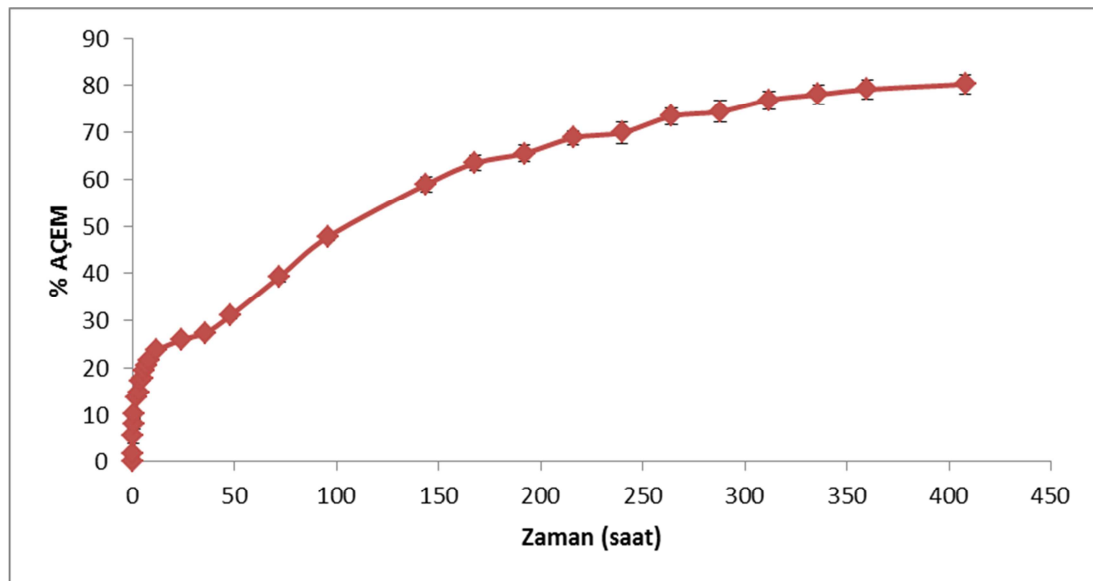
Yüksek enkapsülasyon etkinlikleri göz önüne alınarak seçilen F34, F35, F40, F41, F44, F49, F50, F51 kodlu formüllerin ve γ -radyasyonla sterilizasyonu yapıldıktan sonra F34 kodlu formülün Bölüm 2.2.4.5.2'de belirtildiği şekilde *in vitro* etkin madde salım çalışması yapılarak salım profilleri oluşturulmuştur. *In vitro* etkin madde salım hızı üzerine; mikroenkapsülasyonun, primer emülsiyon veya dış faza eklenen stabilizatör tipi ve miktarı, etkin madde miktarı ve sterilizasyonun etkileri incelenmiştir.

3.3.6.1. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Mikroenkapsülasyon İşleminin Etkisi

Yüksek enkapsülasyon etkinliği sebebiyle ideal formül olarak seçilen F34 kodlu formül ve saf etkin maddenin 12 saatlik *in vitro* etkin madde salım profilleri Şekil 3.26'da gösterilmiştir. F34 kodlu formülün 17 günlük *in vitro* etkin madde salım profili Şekil 3.27'de gösterilmiştir.



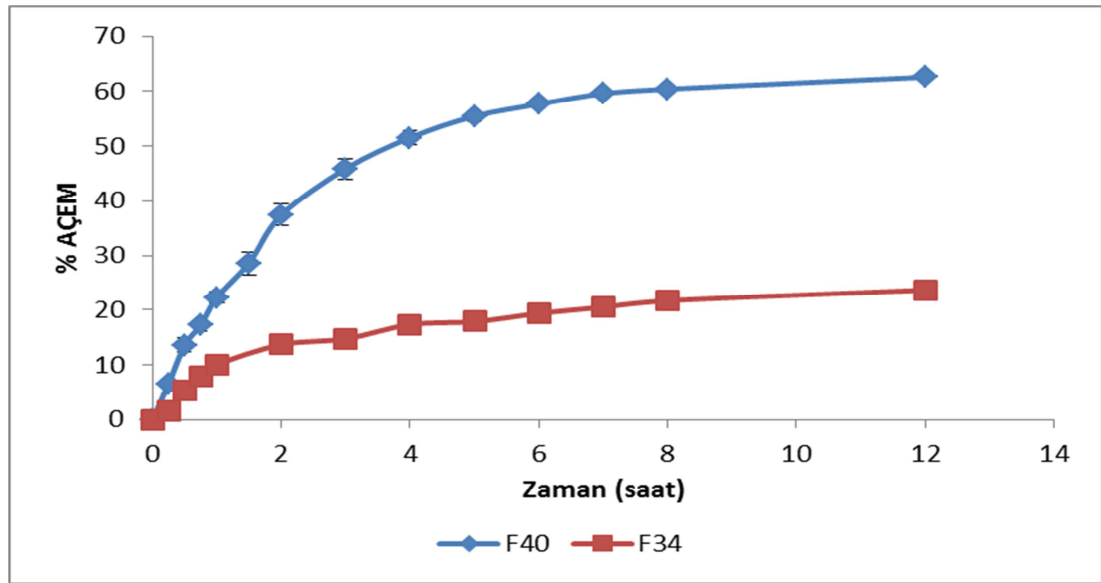
Şekil 3.26. Saf rivastigmin tartarat ve F34 kodlu formülün ilk 12 saatte elde edilen salım profili



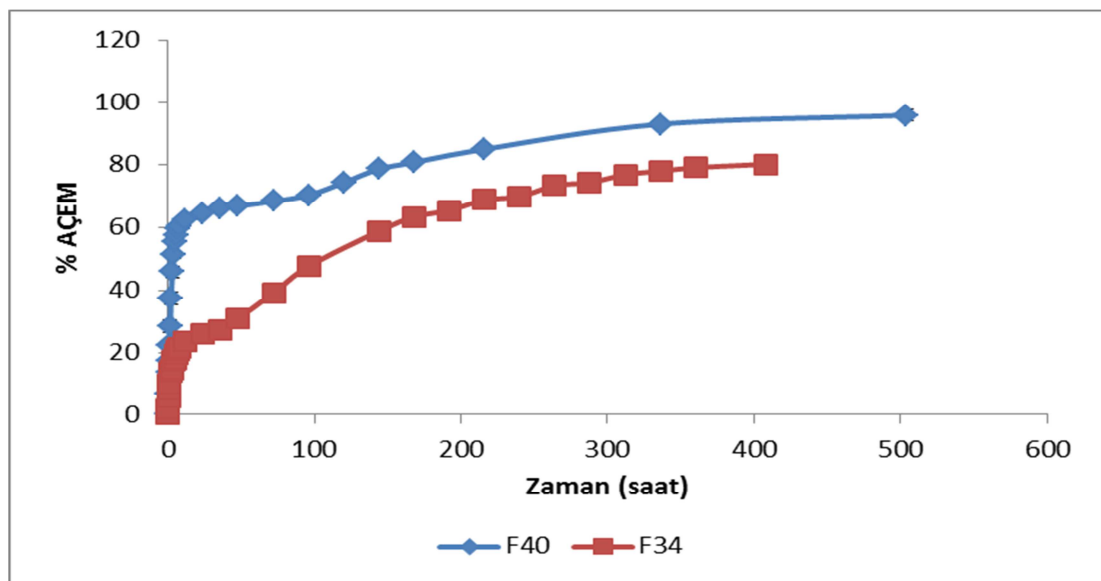
Şekil 3.27. F34 kodlu formülün 17. gün sonunda elde edilen salım profili

3.3.6.2. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Aynı Oranda Eklenen Farklı Stabilizatörlerin Etkisi

Dış faza % 0,3 a/h PVA eklenerek hazırlanan F34 kodlu formül ile % 0,3 a/h PVP eklenerek hazırlanan F40 kodlu formülün ilk 12 saatte ve 21. gün sonunda elde edilen *in vitro* etkin madde salım profilleri sırasıyla Şekil 3.28 ve Şekil 3.29'de gösterilmiştir.



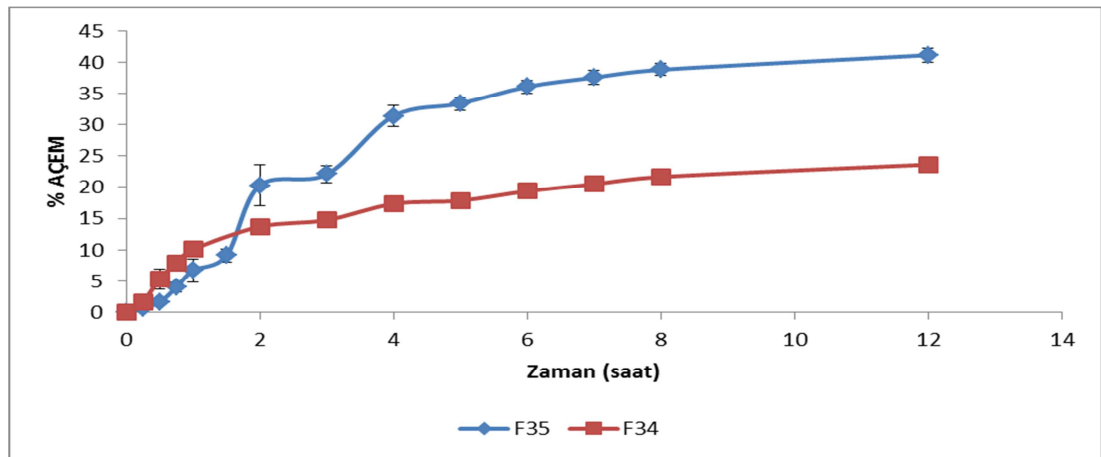
Şekil 3.28. F34 ve F40 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri



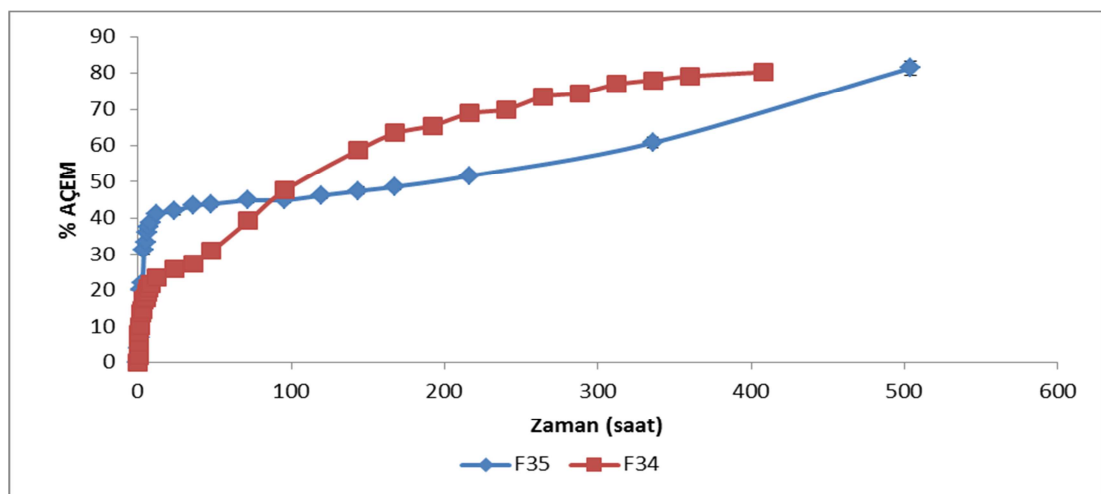
Şekil 3.29. F34 ve F40 kodlu formüllerin 21. gün sonunda elde edilen salım profilleri

3.3.6.3. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisi

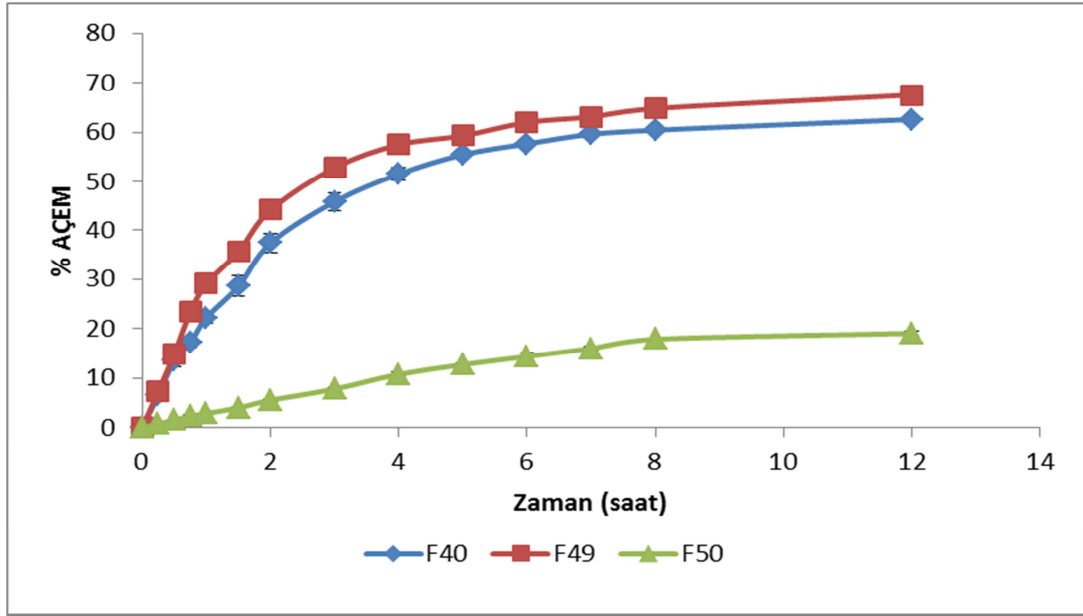
Dış faza % 0,3 a/h PVA eklenerek hazırlanan F34 kodlu formül ile % 0,1 a/h PVA eklenerek hazırlanan F35 kodlu formülün ilk 12 saatte ve 30. gün sonunda elde edilen *in vitro* etkin madde salım profilleri sırasıyla Şekil 3.30 ve Şekil 3.31'te, dış faza % 0,3 a/h PVP eklenerek hazırlanan F40 kodlu formül, % 0,9 a/h PVP eklenerek hazırlanan F49 kodlu formül ve % 1,5 a/h PVP eklenerek hazırlanan F50 kodlu formülün ilk 12 saatte ve 21. gün sonunda elde edilen *in vitro* etkin madde salım profilleri sırasıyla Şekil 3.32 ve Şekil 3.33'da gösterilmiştir.



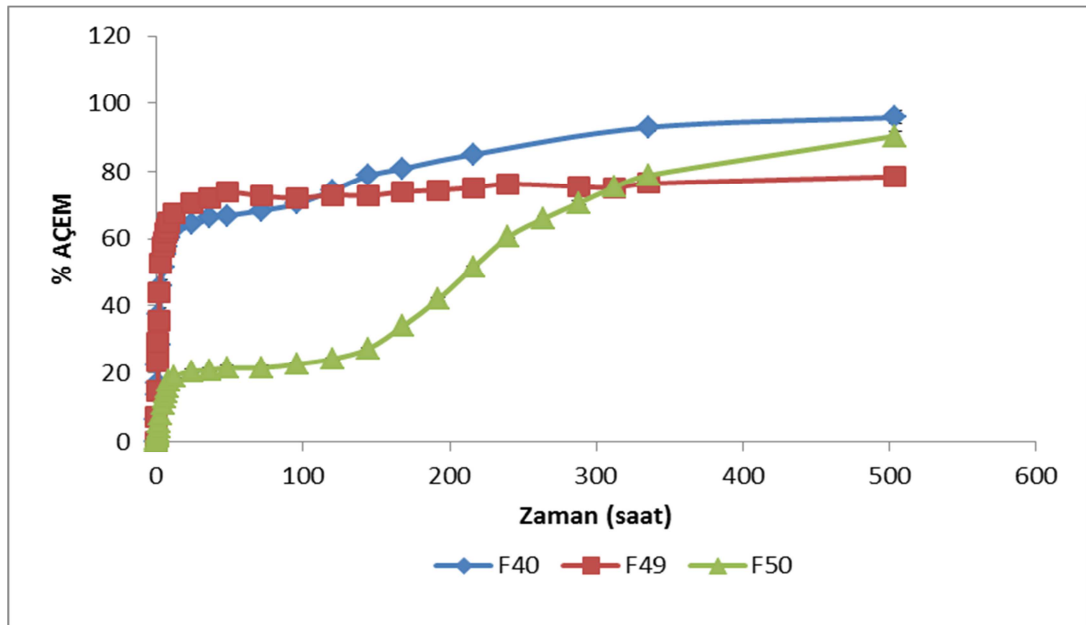
Şekil 3.30. F35 kodlu formülün ilk 12 saatteki salım profili



Şekil 3.31. F35 kodlu formülün 21. gün sonundaki salım profili



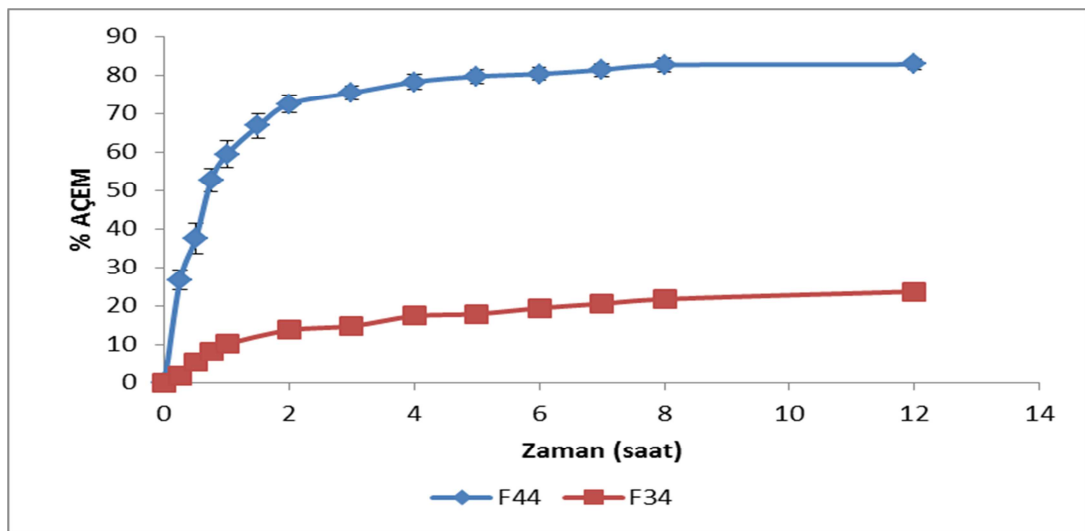
Şekil 3.32. F40, F49 ve F50 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri



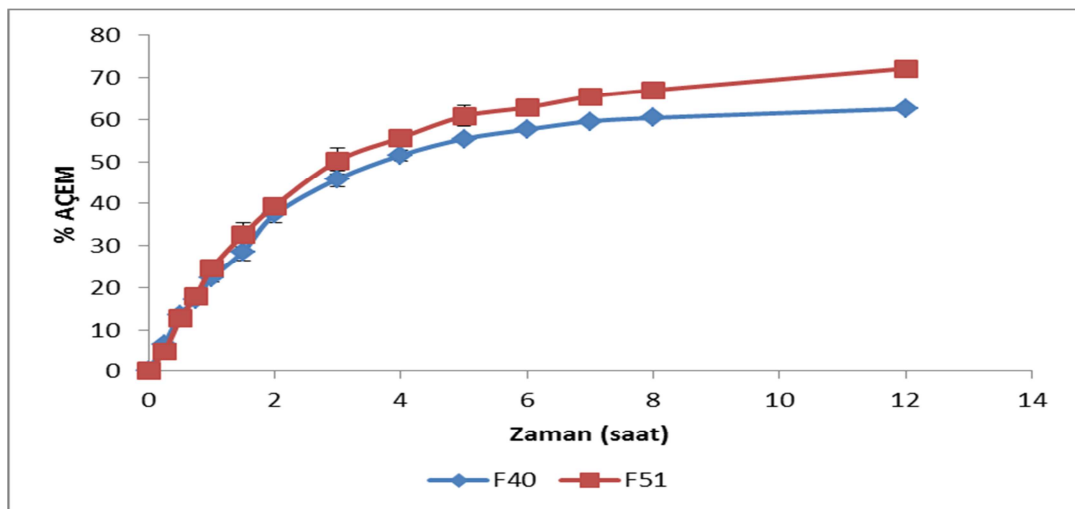
Şekil 3.33. F40 ve F50 kodlu formüllerin 21. gün sonunda elde edilen salım profilleri

3.3.6.4. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Primer Emülsiyona Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisi

Primer emülsiyona % 1 a/h PVA eklenerek hazırlanan F34 kodlu formül ile %5 a/h PVA eklenerek hazırlanan F44 kodlu formülün ilk 12 saatte elde edilen *in vitro* etkin madde salım profilleri Şekil 3.34'de, primer emülsiyona %1 a/h PVP eklenerek hazırlanan F40 kodlu formül ile %2 a/h PVP eklenerek hazırlanan F51 kodlu formülün ilk 12 saatte elde edilen *in vitro* etkin madde salım profilleri Şekil 3.35'de gösterilmiştir.



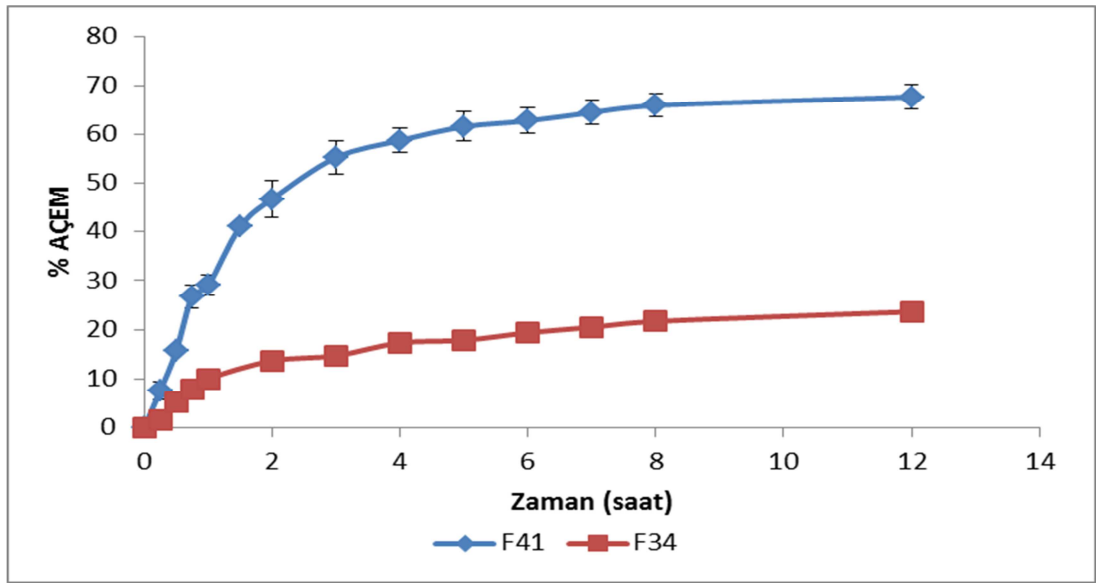
Şekil 3.34. F34 ve F44 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri



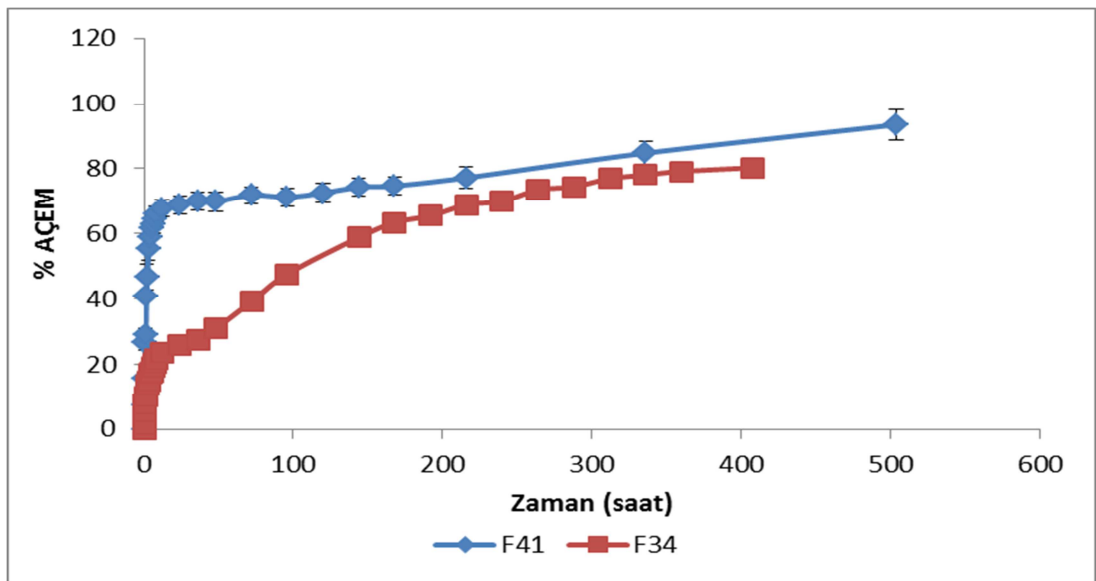
Şekil 3.35. F40 ve F51 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profili

3.3.6.5. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Farklı Miktarda Etkin Madde Kullanılmasının Etkisi

10 mg rivastigmin tartarat içeren F34 kodlu formül ile 20 mg rivastigmin tartarat içeren F41 kodlu formülün ilk 12 saatte ve 21. gün sonunda elde edilen *in vitro* etkin madde salım profilleri sırasıyla Şekil 3.36 ve Şekil 3.37’da gösterilmiştir.



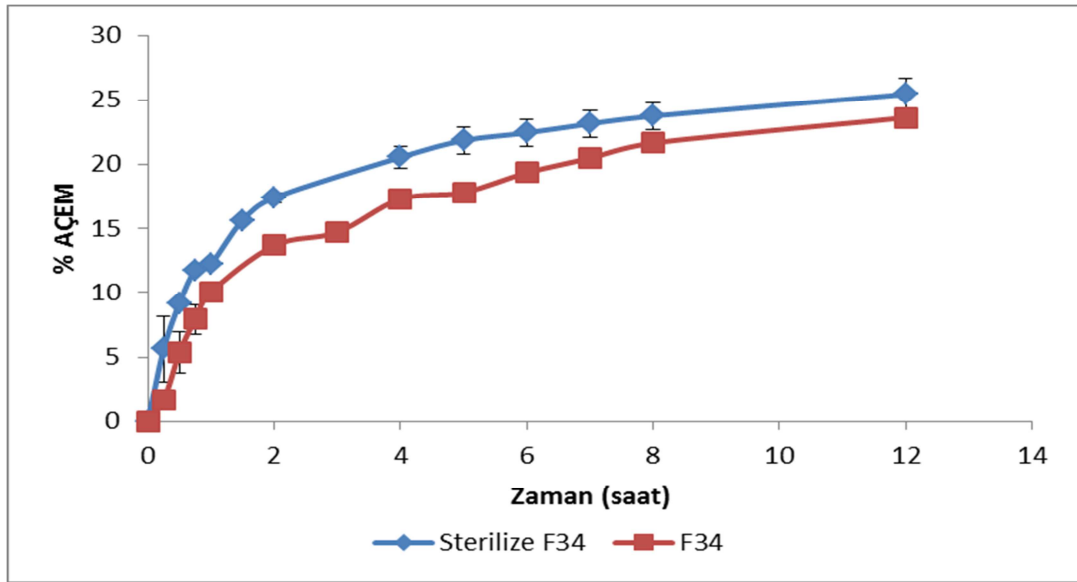
Şekil 3.36. F34 ve F41 kodlu formüllerin ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri



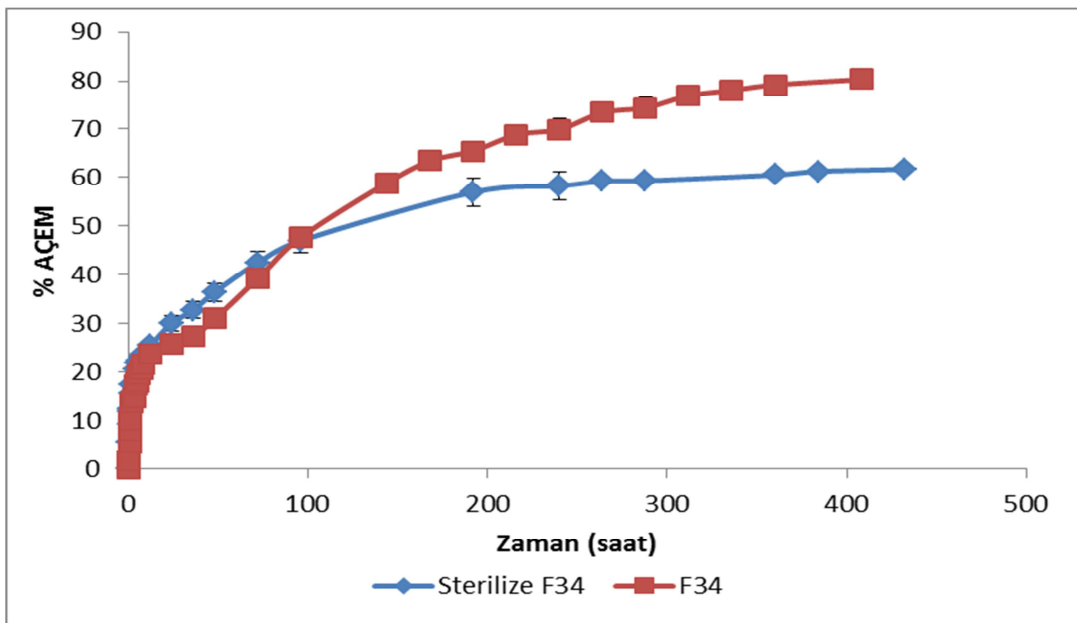
Şekil 3.37. F34 ve F41 kodlu formüllerin 21. gün sonunda elde edilen salım profilleri

3.3.6.6. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Sterilizasyonun Etkisi

F34 kodlu formülün γ -radyasyonla sterilize edilmeden önce ve edildikten sonra sonra ilk 12 saatte ve 10. gün sonunda elde edilen *in vitro* etkin madde salım profilleri sırasıyla Şekil 3.38 ve Şekil 3.39'de gösterilmiştir.



Şekil 3.38. γ -radyasyonla sterilizasyon öncesinde ve sonrasında F34 kodlu formülün ilk 12 saatte elde edilen salım profilleri



Şekil 3.39. γ -radyasyonla sterilizasyon öncesinde ve sonrasında F34 kodlu formülün 17. gün sonunda elde edilen salım profilleri

3.3.7. In Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları Verilerinin Kinetik Değerlendirmesi

Bölüm 2.2.4.6.4'te belirtildiği şekilde elde edilen *in vitro* etkin madde salım çalışmaları verileri, mikroküre formülasyonlarından etkin madde salımının uyum sağladığı mekanizmaları belirlemek amacıyla Bölüm 1.6'da verilen eşitliklere göre değerlendirilmiş ve bulunan değerler Çizelge 3,16'da verilmiştir. Çizelgede yer alan kısaltmaların açıklamaları şu şekildedir:

k_r^0 : Sıfır derece salım hız sabiti ($\mu\text{g}/\text{sa}$)

k_r^1 : Birinci derece salım hız sabiti (sa^{-1})

k : Higuchi kinetiği salım hızı sabiti ($\mu\text{g}/\text{sa}^{1/2}$)

r^2 : Determinasyon katsayısı

β : Şekil faktörü (RRSBW kinetiği)

T_d : Etkin maddenin % 63,2'sinin salınması için gereken süre (sa)

n : Difüzyonal sabit

k_p : Salım yapan sistemin yapısal ve geometrik özelliklerini birleştiren bir sabit

k_h : Hixson-Crowell kinetiği salım hızı sabiti ($\mu\text{g}^{1/3}/\text{sa}$)

SH : Kinetik mekanizmalara ait salım hızı sabitlerinin standart hatası

AOKT : Artık ortalama kareler toplamı

Çizelge 3.16. Formülasyonların *in vitro* salım hızı kinetik verileri

Kinetik Mekanizma		Formüller									
		F34	F35	F40	F41	F44	F49	F50	F51		
Sıfır Derece	k_r^0 ($\mu\text{g}/\text{sa}$)	0,824	0,436	0,428	0,348	0,236	0,292	0,644	0,392		
	r^2	0,916	0,661	0,457	0,376	0,206	0,285	0,899	0,358		
	*SH	0,012	0,016	0,024	0,023	0,024	0,022	0,010	0,024		
	**AOKT	69,771	194,768	430,764	401,132	428,695	385,856	83,964	496,098		
Birinci Derece	k_r^1 (sa^{-1})	0,005	0,003	0,005	0,002	0,004	0,002	0,004	0,003		
	r^2	0,987	0,890	0,909	0,792	0,629	0,409	0,955	0,583		
	*SH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001		
	**AOKT	0,005	0,037	0,089	0,021	0,250	0,136	0,021	0,211		
Qıt	k ($\text{sa}^{-1/2}$)	4,131	2,882	3,141	2,575	1,898	2,145	3,668	2,786		
	r^2	0,989	0,799	0,686	0,569	0,368	0,485	0,927	0,574		
	*SH	0,086	0,295	0,434	0,457	0,508	0,418	0,191	0,446		
	**AOKT	9,838	115,237	249,096	277,046	341,153	277,924	60,214	329,176		
RRSBW	β	0,507	0,518	0,390	0,310	0,213	0,267	0,598	0,354		
	T_d	160,372	140,190	26,647	23,148	1,976	37,414	300,788	24,859		
	r^2	0,959	0,760	0,885	0,787	0,804	0,731	0,919	0,802		
	*SH	0,021	0,061	0,029	0,034	0,022	0,031	0,033	0,033		
	**AOKT	0,012	0,089	0,021	0,028	0,012	0,028	0,034	0,033		
Peppas	n	0,421	0,464	0,582	0,634	0,598	0,612	0,490	0,768		
	k_p	13,062	13,900	4,943	3,917	1,671	4,178	28,054	4,977		
	r^2	0,880	0,677	0,944	0,922	0,987	0,932	0,883	0,948		
	*SH	0,039	0,070	0,038	0,076	0,049	0,055	0,038	0,064		
	**AOKT	0,017	0,092	0,001	0,003	0,000	0,007	0,029	0,008		
Hixson-Crowell	k_h	0,005	0,003	0,004	0,003	0,003	0,002	0,004	0,003		
	r^2	0,972	0,845	0,764	0,647	0,451	0,364	0,950	0,499		
	*SH	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,208	0,000	0,001		
	**AOKT	0,015	0,060	0,188	0,189	0,320	0,001	0,028	0,300		

*SH: Standart hata

**AOKT: Artık Ortalama Kareler Toplamı

4. TARTIŞMA

4.1. Etkin Maddenin Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Hafif ve orta seviyedeki Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan bir asetilkolinesteraz inhibitörü olan rivastigmin tartarat bu çalışmada model etkin madde olarak seçilmiştir.

Çalışmada etkin maddenin piyasadaki preparatlarının günde iki kere alınması gerekliliği unutma problemi olan hastanın tedaviye uyuncunu düşürmektedir. Genelde geriatrik bir rahatsızlık olması sebebiyle, hastanın ilaçlarını takip eden hasta yakınlarının veya bakıcıların takibini güçleştirmektedir ve hastalığın sebep olduğu ajitasyon sebebiyle hasta ilacı reddetmektedir. Bu sebeple daha uzun etki sağlamak ve hastanın uyuncunu artırmak amacıyla subkutan veya intramüsküler enjeksiyonla implante edilebilir rivastigmin içeren partiküler ilaç formu hazırlanması düşünülmüştür. Uygulama sonrasında polimer kalıntısının vücuttan uzaklaştırma sorununun da olmaması için formülasyonda biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan PLGA seçilmiştir. Yapılan ön incelemede rivastigmin tartaratın implant formülasyonu için uygun farmakokinetik özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Rivastigmin tartaratın alınan IR spektrumu (Şekil 3.1) ile etkin maddenin açık kimyasal formülü karşılaştırıldığında (Şekil 1.13), etkin maddenin açık formülünde görülen belirleyici kimyasal gruplarını ifade eden absorpsiyon bantlarının elde edilen IR spektrumunda yer aldığı saptanmıştır. 3320 cm^{-1} dalga sayısında hidroksil grubuna, 2974 cm^{-1} 'de C-H bağlarına, 1720 cm^{-1} 'de ester yapısındaki karbonil grubuna, 1619 cm^{-1} 'de aromatik halka C=C çifte bağına, 789 cm^{-1} 'de ise meta disüstitüe benzene ait gerilme bantları gözlenmiştir. Elde edilen verilerin literatür verileriyle uyumlu olduğu bulunmuştur (Prasad ve ark, 2010).

Erime noktası tayini sonucunda rivastigmin tartaratın 125°C'de eridiği görülmüştür. Literatürde rivastigmin tartaratın erime noktası 123-125°C olarak verilmiştir ve bulunan değer literatür verileriyle uyumludur (Clarke's, 2005).

Rivastigmin tartaratın DSC analizi sonucunda elde edilen termogramda rivastigmin tartaratın erimesi sonucu ortaya çıkan pik 130,79°C'de görülmektedir (Şekil 3.2). Elde edilen termogramın literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Joshi ve ark., 2010).

Çalışmada hazırlanan formülasyonların implante edilmesi düşünüldüğünden *in vitro* etkin madde salım çalışmaları pH 7,4 fosfat tamponu ortamında yapılmıştır. Hazırlanan mikrokürelerde etkin madde miktar tayini mikroküreler parçalandıktan sonra etkin madde su içine çekilerek yapılmış ve analiz edilmiştir. Bu sebeple kalibrasyon ve validasyon çalışmaları pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamlarında yapılmıştır.

Rivastigmin tartaratın pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamlarında UV spektrumu, UV spektrometresiyle ve HPLC ile alınmış ve sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılmıştır (Clarke's, 2005). Rivastigminin maksimum absorbans verdiği nokta 200 nm'nin altında bulunmuştur. Bu dalga boyunda, çözücüler ve safsızlıklar da yüksek absorbans verdiği için daha güvenilir tayin yapabilmek için referans veriler esas alınarak bundan sonraki analizlerin 210 nm'de yapılmasına karar verilmiştir (Arumugam ve ark., 2008; Wilson ve ark., 2008).

Rivastigmin tartaratın HPLC miktar tayininin analitik validasyonunda, Bölüm 3.1.6.1.1'deki bulgular doğrultusunda seçilen miktar tayin yönteminin rivastigmin tartarat için seçici bir yöntem olduğu bulunmuştur.

Doğrusallık ve aralığının tespiti için Bölüm 2.2.1.6.2'de belirtilen şekilde elde edilen bulgular Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3'te verilmiştir. Her iki ortam için elde edilen tayin doğrularına ait r^2 değerlerinin yüksek, regresyon doğrusundan sapmaların standart hatasını ($Sy.x$) gösteren değerlerin ise düşük olması elde edilen verilerin güvenilirliğini göstermektedir.

Doğruluğun tayini için elde edilen veriler Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5'te verilmiştir. Her iki ortam için de seçilen 3 farklı konsantrasyonda elde edilen % geri elde sonuçlarının ortalamasının bağıl standart sapma değerleri % 2'den azdır.

Kesinlik tayini için tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik çalışması Bölüm 2.2.1.6.4'te anlatıldığı gibi yapılmıştır ve bu çalışmalardan elde edilen veriler Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.10'da görülmektedir. Tekrarlanabilirliğin tayininde 3 farklı konsantrasyon için yapılan 6'şar okumadan elde edilen konsantrasyon verilerinin ortalamasının bağıl standart sapmasının % 2'den az olduğu bulunmuştur. Bu da seçilen yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Ara kesinliğin tayininde ise 3 farklı günde 3 farklı konsantrasyon için yapılan okumalardan hesaplanan konsantrasyon değerlerinin ortalamasının bağıl standart sapması % 2'den küçük bulunmuştur. Ayrıca ara kesinliğin tayininde, günler arasında anlamlı bir fark olup olmadığının tespiti için t-testi uygulanmıştır. T-testi sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.11'de görülmektedir. Hesaplanan p değerlerinin 0.05'ten büyük olması ve hesaplanan t değerlerinin t-tablo değerinden ($t_{\text{tablo}} = 2,23$) küçük olması sebebiyle günler arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmalar yöntemin kesinliğini göstermiştir.

Rivastigmin tartaratin pH 7,4 fosfat tamponu ve ultra saf su ortamlarındaki teşhis ve tayin sınırları belirlenmiş (Çizelge 3.12), bu değerlerin analitik validasyon çalışmalarında kullanılan konsantrasyon değerlerinin altında olduğu ve çalışmada miktar tayini gerekebilecek en küçük miktarların bile güvenle tayin edilebileceği görülmüştür.

Etkin maddenin *in vitro* salım çalışmalarının yapılacağı ortamdaki stabilitesinin incelenmesi çalışmasında, Bölüm 3.1.7'de elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *in vitro* etkin madde salım çalışması boyunca rivastigmin tartaratin stabil olduğu belirlenmiştir.

Etkin madde salım çalışmalarında statik yöntem kullanılmış olup pH 7,4 fosfat tamponunda çok çözünürdür ve çözünürlük çalışmasında çok yüksek miktarda etkin madde gerekeceği düşünülerek çözünürlük çalışması yapılmamıştır. *In vitro* etkin madde salım çalışmaları için belirlenen hacimde sink koşulu sağlanabilecek miktardan daha fazla etkin madde çözündüğü bulunmuştur.

4.2. Polimerin Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Polimerin özelliklerinin belirlenmesi, etkin madde ile polimer arasında bir etkileşim olup olmadığını anlamak amacıyla IR spektrumları alınmış ve DSC analizleri yapılmıştır.

PLGA 50:50'nin çekilen IR spektrumunda (Şekil 3.11), 3445 cm^{-1} dalga sayısında hidroksil grubuna, 2955 cm^{-1} 'de C-H bağına, 1761 cm^{-1} 'de ester yapısındaki karbonil grubuna ait gerilme bantları gözlenmiştir. Bu bulgular literatür verileriyle paralellik göstermektedir (Fernandez-Carballido ve ark., 2008).

DSC analizinden elde edilen termogramda, PLGA 50:50'nin referans camısı geçiş sıcaklığı aralığında, $49,61^{\circ}\text{C}$ 'de pik verdiği görülmüştür. Bu bulgunun literatür verileriyle uyumlu olduğu ve camısı geçiş sıcaklığının referans değerinde olduğu görülmüştür (Şekil 3.12) (Clarke's, 2005; Fernandez-Carballido ve ark., 2008).

4.3. Formülasyon Çalışmalarının ve Hazırlanan Formüller Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmada implante edilebilir rivastigmin tartarat içeren mikroküre formülasyonlarının hazırlanması amaçlanmaktadır ve bu amaçla biyolojik olarak parçalanabilir polimer olarak PLGA kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. PLGA vücutta biyolojik olarak parçalanarak elimine olur. Bu sebeple PLGA kullanılarak, implante edilen mikrokürelerin sistemden uzaklaştırılması sorunu giderilmektedir.

PLGA mikrokürelerin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yönteminin uygulanabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla laktik asit-glikolik asit oranı 50:50 olan PLGA kullanılarak etkin madde içermeyen mikroküre formülasyonu hazırlanmıştır (F0). İstenen partikül büyüklüğünde küresel partiküllerin oluştuğu gözlenmiştir ve işlem verimi hesaplanmıştır. Daha sonra aynı formülasyon etkin madde ilave edilerek hazırlanmıştır (F1) ve optik mikroskop altında küresel partiküllerin oluştuğu gözlenmiştir. Bu formülasyonun işlem verimi hesaplandığında etkin madde içermeyen mikroküre formülasyonuna (F0) göre işlem veriminin arttığı gözlenmiştir. F0 kodlu etkin madde içermeyen formülasyonda % 43,05 olan işlem verimi, F1 kodlu etkin madde içeren formülasyonda % 68,71'e yükselmiştir. Ön denemeler sonucunda çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yönteminin PLGA mikrokürelerin hazırlanmasında uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.1. Enkapsülasyon Etkinliğini Artırmaya Yönelik Çalışmaların Değerlendirilmesi

Rivastigmin tartarat suda çok çözünür özellikte bir maddedir (Clarke's, 2005). Suda çok çözünür olması, hidrofobik özellikte olan ve hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonunda başarılı sonuçlar elde edilen PLGA içine enkapsüle edilmesini güçleştirmektedir. Pek çok çalışmada da rivastigmin tartaratın enkapsülasyonunun güçlüğüne üstesinden gelmeye çalışılmıştır. Wilson ve ark. (2008), hazırladıkları nanopartiküllere %9,5-18 (a/a) arasında

rivastigmin tartarat enkapsüle etmeyi başarmışlardır. Joshi ve ark. (2010) ise farklı bir yöntemle (nanopresipitasyon) hazırladıkları PLGA nanopartiküllere % 74,46 ± 0,7 oranında rivastigmin tartarat yükleyebilmişlerdir. Ulaşılan bu değer rivastigmin tartarat için oldukça yüksek bir değerdir. Hazırlanan formüllerde öncelikli hedef enkapsülasyon etkinliğinin mümkün olduğu kadar artırılması olarak belirlenmiştir ve F1-F34 arasında bir seri formül incelenmiştir.

Çift emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi ile hidrofilik etkin maddelerin enkapsüle edilebileceği literatür verilerinde yer almaktadır; ancak bu yöntemle dahi, istenilen düzeyde enkapsülasyon etkinliği sağlanamamıştır. Enkapsülasyon etkinliğini artırmaya yönelik ön formülasyon çalışmalarına kullanılan polimerin etkisi incelenerek başlanmıştır. Farklı poliester yapıdaki polimerlerin (PLGA 50:50 MA 40 000-75 000, PLGA 50:50 MA 7000-17000 (Resomer® RG 502), PLGA 65:35, PLGA 75:25, PLGA 85:15 ve PLA) kullanımının enkapsülasyon üzerine etkisinin incelendiği F1, F2, F3, F4, F5, F6 kodlu formüllerde enkapsülasyon etkinlikleri arasında belirgin bir farklılık saptanamamıştır (F3 kodlu formül hariç). Ancak optik mikroskop incelemesi sonucunda PLGA 50:50'nin (MA 40 000-75 000) kullanıldığı F1 kodlu formül dışındaki formüllerin partiküllerinin belirgin bir şekilde büyük olduğu saptandığından, en küçük partikül boyutunun elde edildiği polimer olarak %50 laktik asit, %50 glikolik asit içeren PLGA 50:50 ((MA 40 000-75 000) kullanımının uygun olacağına karar verilmiştir. Hidrofilik özellikteki etkin maddelerin enkapsülasyon etkinliklerini artırmak ve etkin madde salımını düzenleyebilmek için içindeki yüksek glikolik asit miktarına bağlı olarak hidrofilik özelliği ve hidrolitik degradasyon hızı en yüksek olan PLGA 50:50 sıklıkla kullanılmaktadır (Lü ve ark., 2009; Makadia ve Siegel, 2011).

Çizelge 3.13'te görüleceği gibi PLGA 65:35 ile enkapsülasyon etkinliği yüksek partiküller elde edilmiş olduğundan bu polimer ile de formülasyon çalışmaları yapılmıştır (F26, F27); ancak bu formüllerde enkapsülasyon

etkinlikleri ve partikül irilikleri istenilen düzeye getirilemediğinden formülasyon çalışmalarına PLGA 50:50 ile devam edilmiştir.

F1, F7, F8, F9 ve F10 kodlu formülasyonlarda etkin madde miktarının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini görmek amacıyla sırasıyla polimer miktarı sabit tutularak (200 mg) 10, 25, 50, 75, 100 mg rivastigmin tartarat içeren mikroküreler hazırlanmış ancak etkin madde miktarındaki artışla doğru orantılı bir enkapsülasyon etkinliği artışı gözlenmemiştir.

Etkin maddenin mikroküreden dış sulu faza kaçmasını engelleyerek enkapsülasyon etkinliğini artırmak için, etkin maddenin daha az çözündüğü bazik pH'da bir dış faz kullanılması denenmiştir (F11, F12, F24, F25) (Joshi ve ark, 2010). pH 9 fosfat tamponunun dış faz olarak kullanıldığı F11 kodlu formülasyonda, F1 kodlu formülasyonda % 2,08 olan enkapsülasyon etkinliği %26,99'a yükselmiştir. Bazikliği artırmanın dış faza etkin madde geçişini daha da azaltacağı düşüncesiyle sırasıyla F24 ve F25 kodlu formülasyonlarda pH 10 ve pH 10,9 amonyum klorür tamponlarının dış sulu faz olarak kullanılması denenmiş ancak işlem verimi çok düşmüş, enkapsülasyon etkinliği %2'nin altında kalmıştır. Bu kadar yüksek pH'da mikropartiküler yapı oluşmamış ve polimer hidrolize uğramıştır.

F13 ve F14 kodlu formüllerde, dış sulu faz ve etkin madde miktarları sabit tutularak polimer miktarları 200 mg'dan sırasıyla 100 ve 150 mg'a düşürülmüştür. Polimer oranında yapılan bu değişiklik enkapsülasyon etkinliğinde belirgin bir değişiklik meydana getirmemiştir.

Sekonder emülsiyon oluşturulduktan sonra partiküllerin sertleştirilmesi aşamasında yapılan karıştırma esnasında dış sulu fazda çok çözünür olan etkin maddenin dış faza geçmesini azaltmak amacıyla F15 ve F16 kodlu formüllerde karıştırma süresi kısaltılmıştır; ancak enkapsülasyon etkinliğinde belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

Dış sulu faz hacminin de enkapsülasyon etkinliğini etkileyebileceği düşünülerek F17, F18, F19 ve F20 kodlu formüllerde sırasıyla 100, 300, 400 ve 500 mL sulu dış faz kullanılmıştır. Sulu dış faz hacmini artırmanın organik fazın dış faza ekstraksiyon hızını artırarak partiküllerin sertleşmesini hızlandırarak, etkin maddenin partikülün dışına geçmesini azaltabileceği düşünülürken bu yönde bir etki görülmemiş ve enkapsülasyon etkinliğinde belirgin bir değişiklik olmamıştır. Yalnız F18 kodlu 300 mL dış faz kullanılarak hazırlanan formülde enkapsülasyon etkinliğinin %19,03'e ulaştığı görülmüştür. Ancak, daha sonra aynı miktarda dış faz kullanılarak yapılan çalışmalarda yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilememiştir. Bu, enkapsülasyon etkinliğini artırmada dış faz miktarının değil, dış faz, etkin madde ve polimerin birbirlerine oranlarının enkapsülasyon etkinliğini artırmada etkili olabileceğini düşündürmektedir (Feczko ve ark., 2008).

Dış fazın pH'ının ve hacminin değiştirilmesinin yanısıra, dış sulu faz sodyum klorür ilavesiyle doymun hale getirilerek de etkin maddenin dış faza geçişinin önüne geçilebileceği ve böylece enkapsülasyon etkinliğinin arttırılabileceği düşünülmüştür (Pistel ve Kissel, 2000). Bu amaçla hazırlanan F31 kodlu formülün dış fazına %5 a/h oranında sodyum klorür ilave edilmiştir. F1 kodlu formülasyonda %2,08 olan enkapsülasyon etkinliği bu şekilde % 19,69'a çıkarılmıştır.

Enkapsülasyon etkinliğinin biraz daha arttırılabilmesi için F32 kodlu formülasyonda dış fazda pH 9 fosfat tamponu kullanılmış ve bu faza % 1 a/h oranında sodyum klorür ilave edilmiştir. Bu şekilde enkapsülasyon etkinliği %36,06'ya çıkarılmıştır. F34 kodlu formülasyonda ise yine dış fazda pH 9 fosfat tamponu kullanılmış ve bu sefer sodyum klorür ilavesi % 2 a/h'e çıkarılmıştır. Bu şekilde F34 kodlu formülasyonda enkapsülasyon etkinliği %75,09'a çıkarılmıştır. Sodyum klorür ilavesinin %3 a/h'e çıkarılması ile (F37) enkapsülasyon etkinliğinin %30,92'ye düştüğü bulunmuştur. Sağlanması gereken optimum sodyum klorür konsantrasyonu % 2 a/h olarak belirlenmiştir.

F1-F34 kodlu formüller arasında enkapsülasyon etkinliğini arttırmak amacıyla yapılan ön formülasyon çalışmaları sayesinde, F1 kodlu formülasyonda % 2,08 olan enkapsülasyon etkinliği F34 kodlu formülasyonda %75,09'a ulaşmıştır. Ulaşılan bu değer suda çok çözünen rivastigmin tartarat için oldukça yüksek bir değerdir.

F34 kodlu formüle kadar olan formülasyonlarda denenen etkin madde miktarı, dış faz hacmi, polimer miktarı, polimer tipi, karıştırma süresi değişikliklerin enkapsülasyon etkinliği üzerine belirgin bir etkisi gözlenmemiştir.

İstenen enkapsülasyon etkinliğine ulaşıldıktan sonra formülasyon çalışmaları salım profilini modifiye etmek ve partikül boyutunu küçültmek üzerine yoğunlaşsa da elde edilen partiküllerde yapılan değişikliklerin enkapsülasyon etkinliğini nasıl etkilediği takip edilmiştir.

F40 kodlu formülasyonda, F34 kodlu formülasyonda stabilizatör olarak yer alan PVA yerine aynı oranda PVP kullanılmasıyla enkapsülasyon etkinliği %75,09'dan % 36,05'e düşmüştür. Bu sonuç, Feczko ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada elde edilen bulguları destekler nitelikteyken, Coombes ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarıyla aynı doğrultuda bulunmamıştır.

Stabilizatör olarak dış sulu faza eklenen PVA miktarı, F34 kodlu formülde % 0,3 a/h oranında bulunmaktadır. F35 kodlu formülde bu oran % 0,1'e indirildiğinde, F34 kodlu formülde %75,09 olan enkapsülasyon etkinliği, F35 kodlu formülde % 44,30'a düşmüştür. Stabilizatör olarak PVP kullanılan F40, F49 ve F50 kodlu formüllerde ise sırasıyla PVP oranları % 0,3, % 0,9 ve %1,5'tir. Enkapsülasyon etkinlikleri ise sırasıyla % 36,05, % 39,26 ve %48,46'dır. Bu bulgular, tipi ne olursa olsun, dış faza eklenen stabilizatörün miktarının artmasının enkapsülasyon etkinliğini artırdığını göstermektedir. Bu da literatür verileriyle uyumludur (Feczko ve ark., 2008). Bunun, dış fazdaki stabilizatör miktarı arttırıldığında, partikül yüzeyine adsorbe olan stabilizatör

miktarının artması sebebiyle, dış fazın partikül içine penetre olması ve etkin maddenin partikül dışına çıkmasına karşı daha büyük bir engel teşkil etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Farklı molekül ağırlığında polimer kullanımının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisinin değerlendirilmesi için molekül ağırlığı 40 000-75 000 olan PLGA 50:50 kullanılarak hazırlanan F34 kodlu formül ile molekül ağırlığı 7000-17000 olan PLGA 50:50 (Resomer® RG 502) kullanılarak hazırlanan F43 kodlu formülün enkapsülasyon etkinlikleri kıyaslanmıştır. F34 kodlu formülde enkapsülasyon etkinliği % 75,09 iken F43 kodlu formülde enkapsülasyon etkinliği % 6,35 olarak bulunmuştur. Bunun da yüksek molekül ağırlıklı polimer çözeltisinin daha viskoz yapıda olduğu, bunun da etkin maddenin bu viskoz yapının içinden geçerek iç fazdan dış faza kaçmasını engellediği ve enkapsülasyon etkinliğinin bu sebeple daha yüksek olduğu düşünülmüştür (Ravi ve ark., 2008).

Dış fazda farklı molekül ağırlıklarında stabilizatör kullanımının mikrokürelerin enkapsülasyon etkinliklerine etkisi F38 ve F39 kodlu formüllerde incelenmiştir. F38 kodlu formülde molekül ağırlığı 40 000 olan PVP, F39 kodlu formülde ise molekül ağırlığı 10 000 olan PVP dış faza ilave edilen stabilizatör olarak kullanılmıştır. F38 kodlu formülün enkapsülasyon etkinliği %26,48; F39 kodlu formülün enkapsülasyon etkinliği ise %13,50 olarak bulunmuştur. Bu da molekül ağırlığı yüksek olan stabilizatör kullanılan F38 kodlu formülün enkapsülasyon etkinliğinin, molekül ağırlığı daha düşük stabilizatör kullanılan F39 kodlu formülden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bunun, partikül yüzeyine adsorbe olan PVP tabakasının yüksek molekül ağırlıklı PVP kullanıldığında daha viskoz olması sebebiyle, dış fazın partikül içine penetre olması ve etkin maddenin partikül dışına çıkmasına karşı daha büyük bir engel teşkil etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İç faza eklenen stabilizatör miktarının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi ise stabilizatör olarak PVA'nın kullanıldığı F34 ve F44 kodlu formüller ile

stabilizatör olarak PVP'nin kullanıldığı F40 ve F51 kodlu formüllerde görülmektedir. F34 kodlu formülde iç faza %1 oranında, F44 kodlu formülasyonda ise %5 oranında PVA çözeltisi eklenmiştir. Enkapsülasyon etkinliklerinin ise sırasıyla % 75,09 ve % 54,02 olduğu görülmüştür. Stabilizatör olarak PVP'nin kullanıldığı F40 kodlu formülde iç faza %1 oranında, F51 kodlu formülasyonda ise iç faza %2 oranında PVP çözeltisi eklenmiştir. Bu iki formülasyonda ise enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla % 36,05 ve % 41,35 olarak bulunmuştur. İç faza ilave edilen stabilizatör miktarının artırılması ile, stabilizasyon daha iyi sağlanarak, etkin madde içeren su damlacıklarının organik faz içinde daha iyi dağılması, koalesansın ve porların daha az olması sebebiyle enkapsülasyon etkinliğinin de artacağı düşünülmektedir (Yang ve ark, 2001). PVP kullanılarak hazırlanan F40 ve F51 kodlu formüllerin enkapsülasyon etkinliği, iç faza eklenen PVP miktarı arttıkça artış göstermiştir. Ancak PVA kullanılarak hazırlanan F34 ve F44 kodlu formüllerin enkapsülasyon etkinliğinde ise bir azalış görülmüştür. Bu, literatür verileriyle uyumlu değildir.

Farklı homojenizasyon hızlarıyla hazırlanan F34, F45, F46 ve F47 kodlu formüllerde homojenizasyon hızının enkapsülasyon hızına etkisi incelenmiştir. Bu formüller sırasıyla; 9 500, 13 500, 20 500 ve 24 000 rpm hızında homojenize edilmiştir. Elde edilen partiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri de sırasıyla % 75,09; % 20,14; % 18,23 ve % 12,47 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar homojenizasyon hızındaki artışın enkapsülasyon etkinliğini azalttığını göstermektedir. Homojenizasyon hızındaki artışla enkapsülasyon etkinliği ters orantılıdır. Bunun sebebi ise artan homojenizasyon hızıyla küçülen partiküllerdeki etkin yüzey alanının artışı dolayısıyla etkin maddenin partikül dışına daha çok difüze olması olarak düşünülmüştür.

Formülasyona eklenen etkin madde miktarının elde edilen mikrokürelerin enkapsülasyon etkinliğine etkisi F34, F41 ve F42 kodlu formüllerde görülmektedir. F34 kodlu formülde 10 mg, F41 kodlu formülasyonda 20 mg ve F42 kodlu formülde 100 mg rivastigmin tartarat kullanılmıştır.

Enkapsülasyon etkinlikleri ise F34 kodlu formülde % 75,09; F41 kodlu formülde %47,93 ve F42 kodlu formülde % 5,96 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, formülasyonda kullanılan etkin madde miktarı arttıkça enkapsülasyon etkinliğinin düştüğünü göstermektedir. Bu da literatür verileriyle paralellik göstermektedir (Lamprecht ve ark., 1999).

4.3.2. Hazırlanan Formüllerin Şekil ve Yüzey Morfolojilerinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan tüm formüller optik mikroskopta incelenmiş, hazırlanan formüllerin tamamında küresel partiküller elde edilmiştir. Homojenizasyon hızı artırıldığında daha küçük partiküller elde edildiği optik mikroskopta gözlemlenmiştir (Şekil 3.18). Daha sonra bunun doğruluğu partikül büyüklüğü analizi ile de kanıtlanmıştır. F34 kodlu formülün yüzeyinde yer yer porların olduğu optik mikroskopta belirlenmiştir (Şekil 3.14). Bu, SEM görüntüleriyle doğrulanmıştır. Ayrıca optik mikroskop görüntülerinde etkin madde miktarı ve etkin madde miktarının polimer miktarına oranı arttığında partikül çaplarının 200 µm'ye kadar ulaştığı görülmüştür (Şekil 3.13).

Yüksek enkapsülasyon etkinliği göz önünde bulundurularak ideal formülasyon olarak seçilen F34 kodlu formül SEM ile görüntülenmiştir. Görüntüleme küresel partiküllerin elde edildiği ve yüzeylerinin çok düzgün olduğu görülmüştür (Şekil 3.20). Partiküllerin üzerinde seyrek porlara rastlanmıştır. Bu porların mikropartikül üretimi esnasında organik fazın dış faza hızla ekstrakte olması veya liyofilizasyon esnasında yapısındaki suyun hızla dışarı çıkması sebebiyle oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca F34 kodlu formül, 21 günlük in vitro salım deneyinin ardından tekrar SEM ile görüntülenmiştir (Şekil 3.21). Görüntüleme sonucunda partiküler yapının korunduğu, partikül büyüklüğünün değişmediği, ancak partikül yüzeylerinde kanalların oluştuğu ve etkin madde salımı sebebiyle partikül yüzeylerinin deforme olduğu görülmüştür. Bu kanalların oluşumuna partikül yapısına difüze olan ortam sıvısının ve partikül yapısından ortama etkin

madde difüzyonunun sebep olduğu düşünülmektedir (Fredenberg ve ark., 2011). Partiküllerin çaplarının büyük ölçüde korunmuş olması, kütle kaybının olmaması ve partikül yüzeylerinde oluşan kanallar sebebiyle etkin madde salımının polimer degradasyonu ve erozyonundan çok partikül dışına etkin madde difüzyonu ile gerçekleştiği düşünülmektedir.

4.3.3. Hazırlanan Formüllerin IR Analizinin Değerlendirilmesi

İdeal formülasyon olarak seçilen F34 kodlu formülasyonun IR spektrumu çekilmiştir ve elde edilen spektrumda, hem rivastigmin tartarat hem de PLGA'nın IR spektrumlarında gözlenen hidroksik grubu, C-H bağı, ester yapısı karbonil grubuna ait gerilme bantlarının konrunduğu görülmüştür. Ayrıca 1617 cm^{-1} 'de rivastigmin tartarata ait aromatik halka C=C çifte bağı gerilme bandı ve 789 cm^{-1} 'de meta disüstitüe benzen gerilme bandı görülmüştür. Yapılan IR analizleri sonucunda, mikroenkapsülasyon işleminin rivastigmin tartarat ve PLGA'nın yapısında kimyasal bir değişikliğe yol açmadığı ve karakteristik gerilme bantlarının mikrokürenin IR spektrumunda da yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.22).

4.3.4. Hazırlanan Formüllerin DSC Analizinin Değerlendirilmesi

F34 kodlu formülde yapılan DSC analizi sonucunda elde edilen termogramda, $50,84^{\circ}\text{C}$ 'de PLGA 50:50'ye ait camsı geçiş piki görülmektedir; ancak rivastigmin tartaratın erimesine ait pik görülmemektedir (Şekil 3.24). Bu, etkin maddenin kristal yapıdan amorf yapıya geçtiğini ve PLGA içinde enkapsüle olduğunu göstermektedir. Ayrıca PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığında bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu da PLGA'nın mikroküre üretim işleminden etkilenmediğini göstermektedir.

4.3.5. Hazırlanan Formüllerin Partikül Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bölüm 2.2.4.5'te anlatıldığı şekilde yapılan partikül büyüklüğü analizlerinin sonuçları Çizelge 3.15'te gösterilmiştir. Partikül büyüklüğü analizi ile

mikroküre üretimi esnasındaki homojenizasyon hızının, üretimde kullanılan PLGA'nın molekül ağırlığının, formülasyona eklenen etkin madde miktarının ve kullanılan stabilizatörün partikül büyüklüğü üzerine etkisi geometrik ortalama çap ($d_{0,5}$) ve span değerleriyle değerlendirilmiştir. Formülasyon parametrelerinin partikül büyüklüğü üzerine etkileri F34 kodlu formül mukayese formülü olarak belirlenerek incelenmiştir.

Geometrik ortalama çap ($d_{0,5}$ veya D_g) değeri olasılık skalasındaki %50 partikül büyüklüğüne eşittir. Span değeri ise partikül büyüklüğü dağılımının yaygınlığını gösterir ve Denklem 4.1'de görüldüğü şekilde hesaplanır:

$$Span = \frac{d_{0,9} - d_{0,1}}{d_{0,5}} \quad (\text{Denklem 4.1})$$

$d_{0,1}$: Dağılımın %10'unun altında olduğu çap

$d_{0,5}$: Dağılımın %50'sinin altında olduğu çap (Medyan)

$d_{0,9}$: Dağılımın %90'ının altında olduğu çap

Span değerinin düşük olması partikül dağılım aralığının dar olduğunu, partikül büyüklüğü dağılımının tekdüze olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmada dış faza eklenen stabilizatör tipinin mikroküre partikül büyüklüğü üzerine etkisi olacağı düşüncesinden hareketle dış fazda kullanılan PVA yerine aynı oranlarda PVP ilave edilerek F40 kodlu formül hazırlandığında, F34 kodlu formülde geometrik ortalama partikül çapı 23,8 μm iken, F40 kodlu formülde geometrik ortalama partikül çapının 19,3 μm olduğu görülmüştür. Bu konuda literatürde farklı bulgulara rastlanmakla birlikte, elde edilen sonucun Coombes ve ark. (1998) tarafından yapılan çalışmayla paralellik gösterdiği bulunmuştur. Bunun, dış faza eklenen PVP'nin damlacıkların stabilizasyonunu daha iyi sağlayarak koalesansın daha iyi önlenmiş olabileceğini gösterdiği düşünülmektedir.

Formülasyona eklenen etkin madde miktarı arttırıldığında partikül büyüklüğünde, etkin madde miktarındaki artışla orantılı bir değişim saptanamamıştır (F34, F41 ve F42 kodlu formüller).

Kullanılan polimerin molekül ağırlığının partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde, molekül ağırlığı daha düşük PLGA ile hazırlanan mikrokürelerde (F43) geometrik ortalama partikül çapının 52,1 µm olduğu, molekül ağırlığı daha yüksek PLGA ile hazırlanan mikrokürelerde (F34) ise geometrik ortalama partikül çapının 23,8 µm olduğu görülmüştür. Literatür verilerinde polimer molekül ağırlığı arttıkça partikül büyüklüğünün arttığı görülmüştür ve bizim bulgularımız bu verilerle uyuşmamaktadır. Bunun sebebinin, düşük molekül ağırlıklı PLGA ile enkapsülasyon etkinliğinin düşük olması sebebiyle, F34 kodlu formülde aynı miktarda PLGA'nın, F43'e göre daha fazla miktarda etkin maddeyi kaplamak üzere, etkin madde üzerinde daha ince bir polimer tabakası oluşturmuş olabileceği, bu sebeple de partikül büyüklüğünün, F43'e göre daha küçük çıkmış olabileceği düşünülmüştür.

Homojenizasyon hızının partikül büyüklüğü üzerine etkisi incelendiğinde (F34, F45, F46, F47), homojenizasyon hızı arttıkça partiküllerin ters orantılı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Emülsiyon damlacıklarının homojenizasyon ile çok küçülmesi sonucunda partiküllerin çok küçüldüğü düşünülmüştür. Ancak, karıştırma hızı arttıkça span değerlerinin arttığı görülmüştür. Bu, partikül büyüklüğü dağılım aralığının geniş olduğunu göstermektedir. Buna ise, yüksek homojenizasyon hızı sebebiyle çok küçülen emülsiyon damlacıklarının stabilitesini stabilizatörün etkin biçimde sağlayamadığı ve koalesans gözleendiği, böylece küçük damlacıkların yanı sıra koalesansa uğrayan daha büyük damlacıklardan çözücünün uçurulması sonucunda elde edilen mikropartiküllerdeki partikül büyüklüğü dağılım aralığının geniş olduğu düşünülmüştür.

Partikül büyüklüğü üzerinde en etkili parametrenin homojenizasyon hızı olduğu tespit edilmiştir.

4.3.6. In Vitro Etkin Madde Salım Çalışmaları Sonuçlarının Değerlendirilmesi

F34, F35, F40, F41, F44, F49, F50, F51 kodlu formüllerin ve γ -radyasyonla sterilizasyonu yapıldıktan sonra F34 kodlu formülün Bölüm 2.2.4.5.2'de belirtildiği şekilde *in vitro* etkin madde salım çalışması yapılarak salım profilleri oluşturulmuştur. *In vitro* etkin madde salım hızı üzerine; mikroenkapsülasyonun, primer emülsiyon veya dış faza eklenen stabilizatör tipi ve miktarının, etkin madde miktarı ve sterilizasyonun etkileri incelenmiştir. *In vitro* etkin madde salım profilleri Şekil 3.26 ve Şekil 3.39 arasındaki şekillerde görülmektedir.

4.3.6.1. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Mikroenkapsülasyonun Etkisinin Değerlendirilmesi

Yapılan mikroenkapsülasyon işleminin etkin madde salımını nasıl şekillendirdiğini görebilmek için, enkapsülasyon etkinliği göz önüne alınarak ideal formül olarak seçilen F34 kodlu formül ile saf etkin maddenin salım profilleri incelenmiştir (Şekil 3.26 ve Şekil 3.27). Saf etkin maddenin %90'ı, 2 saat içinde diyaliz membrandan salım ortamına geçerken, F34 kodlu formülde saf etkin maddeye göre oldukça yavaş ve kontrollü bir salım olduğu görülmüştür. pH 7,4 fosfat tamponu ortamında çok çözünür olan etkin maddenin salımı mikroenkapsülasyon işlemiyle, F34 kodlu formülde 17 güne kadar uzatılmıştır.

4.3.6.2. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Aynı Oranda Eklenen Farklı Stabilizatörlerin Etkisinin Değerlendirilmesi

Dış faza aynı oranda eklenen stabilizatörlerin etkin madde salımına etkisi üzerine farklı veriler yer almaktadır. Feczko ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada dış faza aynı oranda PVA ekleyerek hazırladıkları partiküllerin salım çalışmalarında, PVP ilavesiyle hazırlanan partiküllere göre daha düşük bir ilk çıkışın ardından daha yavaş bir salım olduğunu gözlemlemişlerdir. Coombes ve ark. (1998) ise Feczko ve ark.'nın (2008) aksine PVP ilavesiyle,

PVA ilavesine göre daha düşük ilk çıkış ve daha yavaş bir salım elde etmişlerdir.

Çalışmamızda dış fazda % 0,3 a/h oranında PVA içeren F34 kodlu formül ile dış fazda % 0,3 a/h oranında PVP içeren F40 kodlu formülün salım profilleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.28 ve Şekil 3.29). Elde edilen profillerde, PVP ile hazırlanan F40 kodlu formülde PVA ile hazırlanan F34 kodlu formüle göre daha yüksek oranda ilk çıkışın olduğu ve salımın daha hızlı gerçekleştiği görülmüştür. Elde edilen bu bulgu Feczko ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda dış fazda PVA kullanıldığında, etkin madde moleküllerinin mikroküre içinde daha homojen bir şekilde dağılmasının sağlanabildiği, aynı oranda PVP kullanıldığında ise stabilizasyonun PVA kadar iyi sağlanamadığı, etkin madde moleküllerinin partikülün yüzeyinde toplandığı ve ilk çıkış etkisinin daha yüksek olduğu düşünülmüştür.

Ayrıca çalışmamızda PVP kullanılarak hazırlanan F40 kodlu formülün partikül büyüklüğünün, PVA kullanılarak hazırlanan F34 kodlu formüle göre daha az olduğu saptanmıştır. Partikül büyüklüğünün az olmasından dolayı etkin yüzey alanının daha yüksek olması ve difüzyon mesafesinin kısalığı sebebiyle bir ilk çıkış etkisinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Dış faza eklenen stabilizatör miktarının salım üzerine etkisi incelenirken, partikül büyüklüğünün salım üzerine etkisini elimine edebilmek için partiküllerin belli fraksiyonlara ayrılarak aynı partikül büyüklüğünde olan partiküllerde salım çalışmasının yapılması düşünülmüştür; ancak elde edilen partiküllerin boyutu elek analizi yapılabilecek partikül büyüklüğünden daha küçük olması sebebiyle ayırım işlemi yapılamamıştır.

4.3.6.3. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Dış Faza Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisinin Değerlendirilmesi

Literatürlerde dış faza eklenen stabilizatör miktarının artışının salımını farklı şekillerde etkileyebileceğine dair görüşler mevcuttur. Stabilizatör olarak PVA varlığında, PVA'nın yüksek molekül ağırlığı sebebiyle çift emülsiyonun viskozluğunu arttırıp, daha küçük damlacıkların oluşumunu engelleyerek partikül boyutunun artmasına sebep olabileceği gibi, dış fazda PVA varlığının emülsiyonu stabilize ederek damlacıkların koalesansını engelleyerek ve partikül büyüklüğünün az olmasını sağlayabildiği bulunmuştur (Yang ve ark., 2001). Partikül büyüklüğündeki bu düşüşün azalan difüzyon mesafesi ve artan etkin yüzey alanı sebebiyle salımı hızlandıracağı öne sürülmüştür (Roy ve ark., 1992). Ancak dış fazda daha yüksek oranda PVA bulunmasına ve partikül büyüklüğünün daha az olmasına rağmen *in vitro* etkin madde salımının daha yavaş olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Yang ve ark., 2001). Bunun da iki sebebi olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan birincisi, yüksek PVA konsantrasyonunun dış faz viskozitesini arttırarak etkin maddenin dış faza difüzyonunu zorlaştırması, ikincisi ise daha yüksek PVA konsantrasyonunun daha stabil bir emülsiyon oluşumu sağlayarak etkin maddenin kitlesel olarak taşınmasını engellemesi olarak belirtilmiştir. İkinci önermeye göre etkin madde mikrokürelerin içinde daha homojen olarak dağılır, yüzeyde toplanmaz ve böylece daha yavaş etkin madde salımı gerçekleşir.

Çalışmamızda stabilizatör olarak dış faza eklenen PVA ve PVP miktarlarının salım profiline etkileri ele alınmıştır. Dış faza % 0,3 a/h PVA eklenerek hazırlanan F34 kodlu formül ile dış faza % 0,1 a/h PVA ilavesiyle hazırlanan F35 kodlu formülasyon incelendiğinde (Şekil 3.30 ve Şekil 3.31), dış faz stabilizatör miktarı daha düşük olan F35 kodlu formülde ilk çıkış etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun, F35 kodlu formülde stabilizatörün yetersiz gelmesi sebebiyle, etkin maddenin mikroküre içinde homojen dağılmamış olması ve yüzeyde toplanan etkin maddenin ilk etapta hemen partikül dışına çıkmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Dış fazdaki PVA

miktarı daha yüksek olan F34 kodlu formülde ilk çıkış etkisi daha düşük bulunmuştur. Bu veriler literatür bulgularıyla paralellik göstermektedir (Yang ve ark., 2001).

Salım çalışmasının devamında dış faz stabilizatör miktarı düşük olan F35 kodlu formülde etkin madde salımının, dış faz stabilizatör miktarı yüksek olan F34 kodlu formüle oranla yavaşladığı ve 5. günde F35 kodlu formüldeki etkin madde salımının F34 kodlu formülün altında kaldığı tespit edilmiştir. F35 kodlu formülde partikül büyüklüğü analizi yapılmamış olmakla birlikte, literatür verilerinden yola çıkılarak, F34 kodlu formülün ortalama partikül büyüklüğünün, daha fazla miktarda stabilizatör içermesi sebebiyle F35 kodlu formülden daha küçük olabileceği, buna bağlı olarak daha yüksek etkin yüzey alanı ve daha kısa difüzyon mesafesi sebebiyle, 5. günden sonra F35 kodlu formülden daha hızlı etkin madde salımının gerçekleştiği düşünülmüştür (Roy ve ark., 1992). Ancak bu konuda daha kesin bir yorum yapılabilmesi için F35 kodlu formülün ortalama partikül büyüklüğünün belirlenip F34 kodlu formülün ortalama partikül büyüklüğü ile kıyaslanması gerekmektedir.

Dış faza stabilizatör olarak eklenen PVP'nin *in vitro* etkin madde salım profilleri üzerine etkisi ise dış fazda % 0,3 a/h oranında PVP içeren F40, dış fazda %0,9 a/h oranında PVP içeren F49 ve dış fazda % 1,5 oranında PVP içeren F50 kodlu formüllerde incelenmiştir. Dış fazda % 0,3 a/h oranında PVP içeren F40 kodlu formül ile dış fazda %0,9 a/h oranında PVP içeren F49 kodlu formüller arasında belirgin bir fark görülemezken, dış fazda % 1,5 oranında PVP içeren F50 kodlu formülde ilk çıkış etkisinin F40 ve F49 kodlu formüllere kıyasla oldukça az olduğu görülmüştür. Bu bulgu da PVA içeren formüllerdeki bulgularla paralellik göstermektedir. Yani, dış faz PVP miktarı arttığında, emülsiyon stabilitesindeki artışa bağlı olarak etkin maddenin partikül içindeki dağılımının homojen olduğu ve ilk çıkış etkisinin düşük olduğu düşünülmektedir. 5. günden sonra F50 kodlu formülden etkin madde çıkışının hızlandığı, aynı zaman aralığında F40 ve F49 kodlu formüllerden daha hızlı bir çıkışın gerçekleştiği görülmüştür. Bu da yine her üç formüle de partikül büyüklüğü analizi uygulanmamış olsa da, daha yüksek oranda

stabilizatör içeren F50 kodlu formülünün ortalama partikül büyüklüğünün daha az olabileceği ve bu sebeple belli bir noktadan sonra salımın daha hızlı gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda kesin yargıya varılabilmesi için F49 ve F50 kodlu formüllerde partikül büyüklüğü analizi yapılarak, bulunan değerlerin kıyaslanması gerekmektedir.

Elde edilen veriler ışığında dış faza eklenen stabilizatör miktarında yapılan değişikliklerle salımın istenen doğrultuda modifiye edilebileceği ve ilk çıkış etkisinin düşürülebileceği görülmüştür. Ayrıca stabilizatör olarak kullanımının yanısıra PVP kullanımıyla da başarılı sonuçlar elde edilebildiği görülmüştür.

4.3.6.4. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Primer Emülsiyona Eklenen Stabilizatör Miktarının Etkisinin Değerlendirilmesi

Literatür verilerinde iç faza ilave edilen stabilizatör miktarının düşük olması durumunda mikroküre yapısında büyük porların görüldüğü, stabilizatör miktarının artırılması ile daha tekdüze bir mikroküre yapısı elde edilebildiği yer almaktadır (Yang ve ark, 2001). Bunun da yapıda bulunan stabilizatörün iç su damlacıklarının koalesansını engellemesinden kaynaklandığı belirtilmiştir. İç faza ilave edilen stabilizatör miktarının düşük olması durumunda mikroküre yapısında oluşan birbirine bağlı porlardan etkin madde çıkışının daha hızlı olacağı belirtilmiştir.

Çalışmada primer emülsiyona eklenen stabilizatör miktarının etkisi, stabilizatör olarak PVA kullanılarak hazırlanan F34 ve F44 kodlu formüller ile stabilizatör olarak PVP kullanılarak hazırlanan F40 ve F51 kodlu formüllerde incelenmiştir.

Primer emülsiyona %5 a/h oranında PVA ilave edilerek hazırlanan F44 kodlu formülde, %1 a/h oranında PVA ilave edilerek hazırlanan F34 kodlu formülasyona göre, literatür verilerinin aksine, daha yüksek bir ilk çıkış etkisi ve daha hızlı bir etkin madde salımı görülmüştür. Çalışmada, literatürde yer

alandan çok yüksek oranda PVA kullanılmış olması sebebiyle literatür verisiyle uyumun olmayabileceği düşünülmüştür.

Primer emülsiyona %1 a/h oranında PVP ilave edilerek hazırlanan F40 kodlu formül ile %2 a/h oranında PVP ilave edilerek hazırlanan F51 kodlu formülasyonun salım çalışmalarında, iki formülde de birbirine yakın seviyede ilk çıkış etkisinin olduğu ve salım profillerinin benzerlik gösterdiği görülmüştür. Salım profili ve ilk çıkış etkisini etkileyebilecek kadar farklı oranda PVP miktarının seçilmemiş olduğu düşünülmüştür.

4.3.6.5. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Farklı Miktarda Etkin Madde Kullanılmasının Etkisinin Değerlendirilmesi

Farklı miktarda etkin madde kullanılmasının in vitro etkin madde salımı üzerine etkisinin değerlendirilmesi için hazırlama esnasında 10 mg etkin madde ilave edilen F34 kodlu formül ile 20 mg etkin madde ilave edilen F41 kodlu formüllerin salım profilleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.36 ve Şekil 3.37).

Etkin madde içeriğindeki artışla birlikte F41 kodlu formülasyonda, F34 kodlu formülasyona göre ilk çıkış etkisinde artış olduğu görülmüştür. Bunun literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Gabor ve ark., 1999).

Formülasyon çalışmalarında etkin madde/polimer oranının artması sonucunda enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına rağmen etkin madde açığa çıkışında ilk çıkış etkisinin belirgin bir şekilde artışı ortamda bulunan polimerin oluşturduğu kaplamanın daha ince olmasına, bu ince kaplama nedeniyle mikroenkapsülasyon işleminin hızlı olması ve bunun doğal bir sonucu olarak da partikül iriliğinin düşmesine, etkin yüzey alanının artmasına bağlanabilmektedir.

4.3.6.6. In Vitro Etkin Madde Salımı Üzerine Sterilizasyonun Etkisi

İmplant edilmek üzere hazırlanan partiküler sistemlerin steril olması gerekmektedir. Bu amaçla F34 kodlu formülasyona partiküler ilaç şekillerinin sterilizasyonunda en yaygın olarak kullanılan γ -radyasyonla sterilizasyon uygulanmış ve γ -radyasyonun salım profiline etkisi incelenmiştir. F34 kodlu formüle uygulanan γ -radyasyonla sterilizasyon sonrasında yapılan in vitro etkin madde salım deneyinden elde edilen salım profilinde etkin madde salımının 5. güne kadar paralellik gösterdiği bulunmuştur. Ancak 5. günden sonra sterilize edilmeden önceki salım profiline göre, sterilize edildikten sonraki profilinde bir miktar daha yavaş bir salım olduğu belirlenmiştir. Literatür verilerinde aynı dozda γ -radyasyon uygulanarak PLGA partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin sterilizasyonu yapıldığında ya salım profilinde, camsı geçiş sıcaklığında ve molekül ağırlığında bir değişiklik olmadığı ya da zincir kırılmasına bağlı olarak camsı geçiş sıcaklığında ve molekül ağırlığında düşme olduğu ve salımın sterilizasyon öncesine göre hızlandığı gözlenmiştir (Friess ve Schlapp, 2006); ancak literatürde γ -radyasyon uygulandığında PLGA partiküllerde salımın yavaşlandığı bir örneğe rastlanmamıştır. İstatistiksel veri analizi ile profiller arasındaki farkın öneminin belirlenmesinin bu konuda aydınlatıcı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, DSC analizi yapılarak polimerin camsı geçiş sıcaklığı ve molekül ağırlığı belirlenerek, bu değerlerin sterilizasyondan nasıl etkilendiği belirlenmelidir.

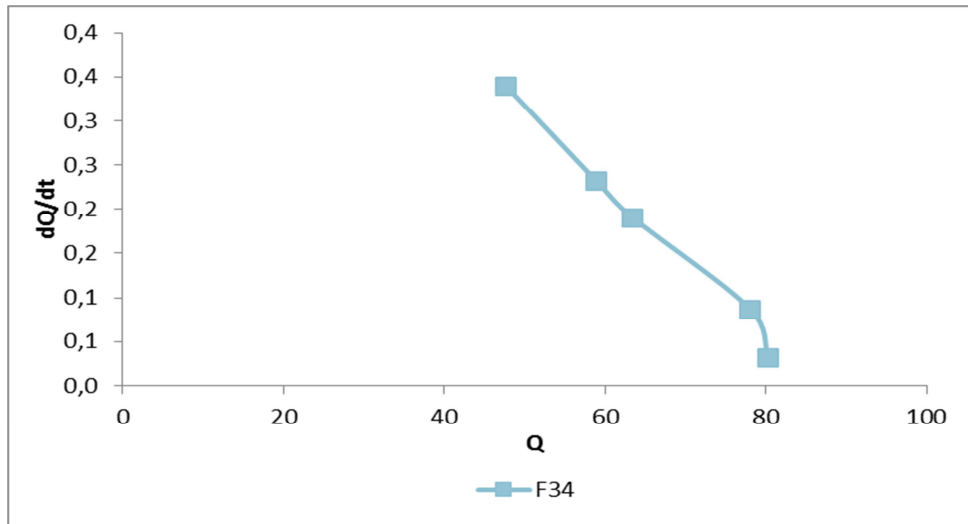
Farkın anlamlı bulunması durumunda γ -radyasyonla sterilizasyonun hazırlanan bu partiküller için uygun olmadığı düşünülebilir. Bu durumda, farklı şiddetlerde radyasyonun etkisi incelenerek, polimerin camsı geçiş sıcaklığı ve molekül ağırlığını değiştirmeyen, etkin madde salım profilini etkilemeyen ve etkin sterilizasyonu sağlayan minimum radyasyon miktarı bulunmalıdır.

4.3.7. Kinetik Mekanizmalara Uyumun İncelenmesi

Tüm *in vitro* salım çalışması yapılan mikroküre formülasyonlarında elde edilen çözünme hızı verileri kullanılarak SPSS programı yardımıyla kinetik modellere ait parametreler ve uyum ölçütleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.16).

F34 kodlu formülün etkin madde salım kinetikleri değerlendirildiğinde etkin madde çıkışının $Q\sqrt{t}$ ve 1. Derece kinetiğe uyum gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 3.16). Bu iki kinetikten gerçekte hangisine uyum olduğunu belirlemek için salınan etkin madde miktarına karşı (Q) belli bir zaman aralığında açığa çıkan etkin madde miktarları (dQ/dt) grafiğe geçirilmiştir. Çizilen grafikte dQ/dt değerinin Q değeri ile ters orantılı bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Bu da F34 kodlu formülün etkin madde salımının $Q\sqrt{t}$ kinetiğiyle gerçekleştiğini göstermektedir. Aynı grafik bifazik salım özelliği gösteren F34'ün salım profilindeki iki faz için (İlk 36 saat ve 36. saatten sonrası) ve profilin tamamı için uygulanmıştır ve üç grafikte de dQ/dt ve Q değerlerinin ters orantılı korelasyon gösterdiği görülmüştür. Bu da salımın tamamında $Q\sqrt{t}$ kinetiğine uyumun olduğunu göstermektedir. 36. saatten sonraki salım için çizilen grafik Şekil 4.1'de görülmektedir.

Hazırlanan mikropartiküllerin heterojen matris yapısında olması sebebiyle, $Q\sqrt{t}$ kinetiğine uyumun olması beklenen bir durumdur. Heterojen matris yapısındaki dozaj şekillerinin salım kinetikleri $Q\sqrt{t}$ kinetiğine uyum gösterirler.



Şekil 4.1. F34 kodlu formülde salımın 36. saatinden sonra salınan etkin madde miktarına karşı (Q), belli bir zaman aralığında açığa çıkan etkin madde miktarları (dQ/dt) grafiği

F34 kodlu formülasyonda yapılan *in vitro* etkin madde salım çalışmaları ve bu çalışmalar sonucunda hesaplanan kinetik verileri değerlendirildiğinde, etkin kan konsantrasyonu sağlandıktan sonra (klasik dozaj şekilleriyle tedaviyi takiben), 15 gün etkili rivastigmin tartarat içeren mikroküre enjeksiyonu ile tedavi yapılabileceği düşünülmektedir; ancak öncelikle *in vivo* hayvan deneyleri yapılarak mikrokürelerin biyolojik koşullardaki davranışı incelenmelidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Rivastigmin tartarat içeren çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle PLGA mikrokürelerin hazırlanması çalışmasında;

- Sentetik biyolojik olarak parçalanabilir bir polimer olan PLGA kullanılarak suda çok çözünen bir etkin madde olan rivastigmin tartaratın çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemiyle mikroküre formülasyonlarının hazırlanabileceği bulunmuştur. Hazırlanan partiküler sistemlerdeki enkapsülasyon etkinliğinin çok yüksek oranda artırılması sağlanmıştır.
- Hazırlanan mikrokürelerin enkapsülasyon etkinliğinin; dış faza etkin maddenin daha az çözünür olduğu bazik bir tampon konması, dış fazın iyonlarla doygun hale getirilmesi, dış faza eklenen stabilizatör miktarının artırılması ile önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Dış faz ve iç faza eklenen stabilizatör cinsi ve miktarı ile eklenen etkin madde miktarının da enkapsülasyon etkinliğini etkilediği görülmüştür.
- Hazırlanan partiküllerde homojenizasyon hızının artırılmasının, etkin madde miktarının arttırılmasının, dış fazda kullanılan stabilizatör cinsinin, polimer molekül ağırlığının partikül büyüklüğü üzerine etkili olduğu bulunmuştur.
- Hazırlanan mikroküreler SEM ile görüntülendiğinde, küresel yapıda oldukları ve yüzeylerinin çok düzgün olduğu tespit edilmiştir, yer yer porlara da rastlanmıştır. *In vitro* etkin madde salım çalışması sonrasında yapılan SEM incelemesinde, partiküllerin boyutunu koruduğu, partiküllerde oluşan kanallardan etkin maddenin salınmış olduğu görülmüştür.

- Hazırlanan mikrokürelerle yapılan *in vitro* etkin madde salım çalışmalarında; partiküllerden etkin maddenin salım hızını iç faz ve dış faza ilave edilen stabilizatör cinsi ve miktarının, farklı miktarda etkin madde ilavesinin etkilediği ve çıkışlarda $Q\sqrt{t}$ kinetiğine uyum sağlandığı bulunmuştur (F34 kodlu formül).
- Çalışmanın devamında F34 kodlu formülün ratlarda *in vivo* çalışması yapılarak, hazırlanan mikrokürelerin biyolojik ortamdaki etkin madde salım davranışı incelenecektir.

ÖZET

Kontrollü Salım Yapan Rivastigmin İçeren İmplant Partiküler Sistemlerin Formülasyonu Üzerine Çalışmalar

Bu çalışmada implante edilebilir mikroküre formülasyonları hazırlamak amacıyla başlangıç ve orta seviyede Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde kullanılan rivastigmin tartarat seçilmiştir. Rivastigmin tartarat, özellikle merkezi sinir sisteminde asetilkolinesteraz ve ve bütirikolinesteraz metabolizmasını reversibl olarak inhibe eden karbamat türevi bir bileşiktir.

Bu amaçla, biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumlu, sentetik bir polimer olarak PLGA kullanılmıştır. PLGA, kanıtlanmış güvenilirliği, toksisitesinin olmaması, geniş bir aralıktaki fizikokimyasal özellikleri, esnekliği sebebiyle işlenebilirliği, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olması sebebiyle çeşitli dozaj formlarının hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bir polimerdir.

PLGA mikrokürelerin hazırlanmasında çift emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak hidrofilik özellikteki rivastigmin tartaratın mikroküre içine hapsedilmesi sağlanmıştır.

Çalışmada hazırlanan mikrokürelerde, dış faz bileşenlerinin, stabilizatör tipinin ve miktarının, etkin madde-polimer oranının, PLGA cinsinin, karıştırma hızının etkin madde enkapsülasyonuna etkisi incelemiştir. Enkapsülasyon etkinliği artan formülasyonların, *in vitro* etkin madde salım çalışmaları yapılmış ve yüzey özellikleri SEM ile incelenmiştir. *In vitro* salım çalışmaları ve SEM görüntülemesi sonucunda implantasyona uygun salım özelliklerine sahip olan mikrokürelerin elde edildiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Alzheimer, Çözücü buharlaştırma, İmplant, Mikroküre, PLGA, Rivastigmin tartarat.

SUMMARY

Studies on Formulations of Controlled Release Rivastigmine Containing Implantable Particulate Delivery Systems

In this study, rivastigmine tartrate which is used in the symptomatic treatment of mild to moderate Alzheimer's Disease was selected to be incorporated into implantable microsphere formulations. Rivastigmine tartrate is a carbamate derivative which inhibits the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase metabolism reversibly especially in the central nervous system.

In the preparation of microspheres, PLGA, which is synthetic biodegradable and biocompatible polymer, is used. PLGA is used in the preparation of several dosage forms due to its safety, non-toxicity, physicochemical properties in a wide range, biodegradability, biocompatibility, flexibility which makes it processable.

Double emulsion/solvent evaporation technique is used to incorporate highly water soluble rivastigmine tartrate in PLGA.

Effects of external phase components, amount and type of stabilizer, drug-polymer ratio, PLGA type and stirring rate on the encapsulation of the drug was studied. In the formulations which had enhanced encapsulation, *in vitro* drug release tests were run and surface morphologies are studied by scanning electron microscopy. *In vitro* release tests and SEM monitoring showed that implantable microspheres which has appropriate release properties were obtained.

Key words: Alzheimer's Disease, Implant, Microsphere, PLGA, Rivastigmine tartrate, Solvent evaporation.

KAYNAKLAR

- ARUMUGAM, K., SUBRAMANIAN, G. S., MALLAYASAMY, S. R., AVERINENI, R. K., REDDY, M. S., UDUPA, N. (2008). A study of rivastigmine liposomes for delivery into the brain through intranasal route. *Acta Pharm.*, **58**: 287-297.
- BLACKSHEAR, P.J., ROHDE, T.D., GROTTING, J.C., DORMAN, F.D., PERKINS, P.R., VARCO, R.L., BUCHWALD, H. (1979). Control of blood glucose in experimental diabetes by means of a totally implantable insulin infusion device. *Diabetes*, **28 (7)**: 634-639.
- BOGDANSKY, S. (1990). Natural Polymers as drug delivery systems. In: *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Ed.: M. Chasin, R. Langer. New York: Marcel Dekker Inc. s.: 231-259.
- CHIEN, Y. W. (1991). *Novel Drug Delivery Systems*. 2nd Ed. Informa Healthcare.
- CHIEN, Y. W., LIN, S. (2007). Drug Delivery: Controlled Release. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Vol. I*, Ed.: J. Swarbrick. New York: Informa Healthcare USA, Inc., s.:1082-1103.
- CLARKE'S ANALYSIS OF DRUGS AND POISONS (2005). Ed.: A. J. Moffat, M. D. Osselton, B. Widdop, L. Y. Galichet. 3rd Ed. London: The Pharmaceutical Press.
- CONTROLLED DRUG DELIVERY: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS (1987). 2nd Ed. Ed.: J.R. Robinson, V.H.L. Lee. New York: Marcel Dekker, Inc.
- COOMBES, A. G. A., YEH, M., LAVELLE, E. C., DAVIS, S. S. (1998). The control of protein release from poly(DL-lactide co-glycolide) microparticles by variation of the external aqueous phase surfactant in the water-in oil-in water method. *J. Control. Release*, **52**: 311-320.
- ÇAPAN, Y. (2004). Çözünürlük ve çözünme hızına etki eden faktörler. *Farmasötik Teknoloji: Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, Ed.: A. Z. Gürsoy. İstanbul: Pıksel Bilişim Matbaacılık Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., s.: 85-100.
- DANCKWERTS, M., FASSIHI, A. (1991). Implantable controlled release drug delivery systems: A review. *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **17(11)**: 1465-1502.

- DASH, A. K., CUDWORTH, G. C. (1998). Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **40**: 1-12
- DORTUNÇ, B. (2004). Kontaminasyon ve sterilizasyon. *Farmasötik Teknoloji: Temel Konular ve Dozaj Şekilleri*, Ed.: A.Z. Gürsoy. İstanbul: Pıksel Bilişim Matbaacılık Reklamcılık ve Filmcilik Hizmetleri Ltd. Şti., s.: 101-115.
- DYAS, A.M., SHAH, U.U. (2007). Dissolution and dissolution testing. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Vol. I*, Ed.: J. Swarbrick. New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- EMA CPMP/QWP/468/95. (1996) Note for guidance on manufacture of the finished dosage form.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA (EP) 6.0 (2008). Council of Europe. 67075, Strasbourg, Cedex, France.
- FECZKO, T., TOTH, J., GYENIS, J. (2008). Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids Surf., A*, **319**: 188-195.
- FERGUSON, T.H., NEEDHAM, G.F., WAGNER, J.F. (1988). Compudose: an implant system for growth promotion and feed efficiency in cattle. *J. Control. Release*, **8**: 45-54.
- FERNANDEZ-CARBALLIDO, A., PASTORIZA, P., BARCIA, E., MONTEJO, C., NEGRO, S. (2008). PLA/PEG-derivative polymeric matrix for drug delivery system applications: characterization and cell viability studies. *Int. J. Pharm.*, **352 (1-2)**: 50-57.
- FREDENBERG, S., WAHLGREN, M., RESLOW, M., AXELSSON, A. (2011). The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. *Int. J. Pharm.*, **415**: 34-52.
- FREITAS, S., MERKLE, H.P., GANDER, B. (2005). Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of art of microsphere preparation process technology. *J. Control. Release*. **102**: 313-332.
- FRIESS, W., SCHLAPP, M. (2006). Sterilization of gentamicin containing collagen/PLGA microparticle composites. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **63**: 176-187.
- FUNG, L.K., SALTZMAN, W.M. (1997). Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **26**: 209-230.

- GABOR, F., ERTL, B., WIRTH, M., MALLINGER, R. (1999). Ketoprofen poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: Influence of manufacturing parameters and type of polymer on the release characteristics. *J. Microencaps.*, **16(1)**: 1-12.
- GENTA, I., PERUGINI, P., CONTI, B., PAVANETTO, F. (1997). A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.*, **152**: 237-246
- GÖPFERICH, A. (1996). Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, **17(2)**: 103-114.
- GRAPHPAD INSTAT (2000). Instat Version 3.05. GraphPad Software Inc.
- HASIRCI, N. (1994). Artificial substance in our body: Biomaterials. In: *1st National Symposium on Biomedical Science&Technology, Bildiri Özeti*, s.:2
- HELDER, J., DUJKSTRA, P.J., FEIJEN, J. (1990). In vitro degradation of glycine/DL-lactic acid copolymers. *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**: 1005-1020.
- HELLER, J. (1984). Biodegradable polymers in controlled drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **1 (1)**: 39-90.
- HIGUCHI, T. (1963). Mechanism of sustained action medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. Pharm. Sci.*, **52(12)**: 1145-1149.
- HOXEY, E., THOMAS, N., TALLENTIRE, A. (1995). Implementing standards for radiation sterilization: The challenges. *Med. Dev. Tech. Sep.*: 30-36.
- ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1) (1994)*
- ITO, F., FUJIMORI, H., MAKINO, K. (2007). Incorporation of water-soluble drugs in PLGA microspheres. *Colloid. Surface. B*, **54**: 173-178.
- JEONG, Y., NA, H., NAH, J., LEE, H. (2009). Preparation of ciprofloxacin-encapsulated poly(DL-lactide-coglycolide) microspheres and its antibacterial activity. *J. Pharm. Sci.*, **98(10)**: 3659-3665.

- JOSHI, S.A., CHAVHAN, S.S., SAWANT, K.K. (2010). Rivastigmine-loaded PLGA and PBCA nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, *in vitro* and pharmacodynamic studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **76**: 189-199.
- JUNI, K., OGATA, J., NAKANO, M., ICHIHARA, T., MORI, K. AND AKAGI, M. (1985). Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing doxorubicin. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**: 313-318.
- KAŞ, S. (2002). İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. In: *Kontrollü Salım Sistemleri*, Ed.: A. Z. Gürsoy, p.: 65-102.
- KIM, S., KIM, J, JEON, O., KWON, I.C., PARK, K. (2009). Engineered polymers for advanced drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **71**: 420-430.
- KONTROLLÜ SALIM SİSTEMLERİ (2002). Ed.: A. Z. Gürsoy. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti.
- KRANZ, H., UBRICH, N., MAINCENT, P., BODMEIER, R. (2000). Physicomechanical properties of biodegradable poly(d,l-lactide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide) films in the dry and wet states. *J. Pharm. Sci.*, **89**: 1558–1566.
- KORSMEYER R. W., GURNY R., DOELKER E., BURI P., PEPPAS N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.*, **15**: 25-35.
- LAMPRECHT, A., UBRICH, N., HOMBREIRO PEREZ, M., LEHR, C.M., HOFFMAN, M., MAINCENT, P. (1999). Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. *Int. J. Pharm.*, **184**: 97-105.
- LANGENBUCHER, F. (1976). Parametric representation of dissolution rate curves by RRSBW distribution. *Pharm. Ind.*, **38**: 472-477.
- LEACH, W.T., SIMPSON, D.T., VAL, T.N., YU, Z., LIM, K.T., PARK, E.J., WILLIAMS, R.O., JOHNSTON, K.P. (2005). Encapsulation of protein nanoparticles into uniform-sized microspheres formed in a spinning oil film. *AAPS PharmSciTech.*, **6(4)**: E605-E617.
- LEE, E.S., KWON, M.J., LEE, H., KIM, J.J. (2007). Stabilization of protein encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method. *Int. J. Pharm.*, **331**: 27-37.

- LEE, J., PARK, T.G., CHOI, H. (2000). Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.*, **196**: 75-93.
- LI, X., JASTI, B.R. (2006). Design of Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: McGraw-Hill Professional.
- LU, B., ZHANG, J.Q., YANG, H. (2003). Lung-targeting microspheres of carboplatin. *Int. J. Pharm.*, **265**: 1-11.
- LÜ, J., WANG, X., MARIN-MULLER, C., WANG, H., LIN, P.H., YAO, Q., CHEN, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **9 (4)**: 325-341.
- MAKADIA, H.K., SIEGEL, S.J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, **3**: 1377-1397.
- MARKLAND, P., YANG, V.C. (2007). Biodegradable polymers as drug carriers. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Vol. 1*, Ed.: J. Swarbrick. New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- MARTIN, A., BUSTAMANTE, P., CHUN, A.H.C. (1993). Physical Pharmacy, 4th Ed. Philadelphia: Lea&Febiger.
- MARTINDALE: The Complete Drug Reference (2009). 36th Ed. Ed.: S.C. Sweetman. London: Pharmaceutical Press.
- MORITA, T., SAKAMURA, Y., HORIKIRI, Y., SUZUKI, T., YOSHIRO, H. (2000). Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant. *J. Control. Release*, **69**: 435-444.
- MUNRO, C.J., LAUGHLIN, L.S., VONSCHALSCHA, T., BALDWIN, D.M. AND LASLEY, B.L. (1996). An enzyme immunoassay for serum and urinary levonorgestrel in human and non-human primates. *Contraception*, **54**: 43-53.
- NG, S.M., CHOI, J.Y., HAN, H.S., HUH, J.S., LIM, J.O. (2010). Novel microencapsulation of potential drugs with low molecular weight and high hydrophilicity: Hydrogen peroxide as a candidate compound. *Int. J. Pharm.*, **384**: 120-127.

- O'DONNELL, P.B., MCGINITY, J.W. (1998). Influence of processing on the stability and release properties of biodegradable microspheres containing thioridazine hydrochloride. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**: 83-94.
- ÖZALP, Y., ÖZDEMİR, N. (1996). Biyomateryaller ve biyouyumluluk. *A. Ü. Ecz. Fak. Der.*, **25(2)**: 57-72.
- ÖZALP, Y. (1997). Vankomisin içeren poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) implantların karakterizasyonu ve in vitro-in vivo salım davranışlarının incelenmesi. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- PARK, H., PARK, K. (1996). Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems. *Pharm. Res.*, **13 (12)**: 1770-1776.
- PARK, J.B., LAKES, R.S. (2007). *Biomaterials: An Introduction*, 3rd Ed. New York: Springer Science+Business Media.
- PARK, K., SAHALABY, W.S.W., PARK, H. (1993). Biodegradation. In: *Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery*. Basel: Technomic Publication, p.: 13-34.
- PEPPAS, L.B., PEPPAS, N. (2002). Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerler. *Kontrollü Salım Sistemleri*. Ed.: A.Z. Gürsoy., s.: 21-40.
- PEPPAS, N., GURNY, R., DOELKER, E., BURI, P. (1980). Modelling of drug diffusion through swellable systems. *J. Membrane Sci.*, **7**: 241-253.
- PISTEL, K.F., KISSEL, T. (2000). Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using w/o/w double emulsion technique. *J. Microencapsul.*, **17(4)**: 467-483.
- PRASAD, O., SINHA, L., MISRA, N., NARAYAN, V., KUMAR, N., KUMAR, A. (2010). Analysis of vibrational, structural and electronic properties of rivastigmine by density functional theory. *J. Appl. Spectrosc.*, **77(4)**: 468-478.
- RAVI, S., PEH, K.K., DARWIS, Y., MURTHY, B.K., SINGH, T.R.R., MALLIKARJUN, C. (2008). Development and characterization of polymeric microspheres for controlled release protein loaded drug delivery system. *Indian J. Pharm. Sci.*, **70(3)**: 303-309.

- RITGER, P.L., PEPPAS, N.A. (1987a). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Rel.*, **5**: 23-36.
- RITGER, P.L., PEPPAS, N.A. (1987b). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Rel.*, **5**: 37-42.
- ROY, S., PAL, M., GUPTA, B.K. (1992). Indomethasin-loaded microspheres: design and preparation by a multiple-emulsification technique and their in vitro evaluation. *Pharm. Res.*, **9**: 1132-1136.
- SALTZMAN, W.M. (2001). *Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy*. New York: Oxford University Press.
- SANSDRAP, P., MOES, A.J. (1997). In vitro evaluation of the hydrolytic degradation of dispersed and aggregated poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J. Control. Release*, **43**: 47–58.
- SOPPIMATH, K.S., KULKARNI, A.R., AMINABHAVI, T.M., BHASKAR, C. (2001). Cellulose acetate microspheres prepared by o/w emulsification and solvent evaporation method. *J. Microencapsul.*, **18(6)**: 811-817.
- SPENLEHAUER, G., VERT, M., BENOIT, J.P., BODDAERT, A. (1989). In vitro and in vivo degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials*, **10**: 557-563.
- ST. PIERRE, T., CHIellini, E. (1986). Biodegradability of synthetic polymers used for medical and pharmaceutical applications. Part 1: Principles of hydrolysis mechanisms. *J. Bioact. Compatible Polym.*, **1**: 467-497.
- UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP) 30 - NF 25 (2007). *The Official Compendia of Standards*. Part City Press, Vol. 1 Baltimore, USA.
- WILLIAMS, B. R., NAZARIANS, A., GILL, M. A. (2003). A review of rivastigmine: A reversible cholinesterase inhibitor. *Clin. Ther.*, **25(6)**: 1634-1653.
- WILSON, B., SAMANTA, M. K., SANTHI, K., KUMAR, K. P. S., PARAMAKRISHNAN, N., SURESH, B. (2008). Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease. *Brain Res.*, **1200**: 159-168.
- WOOD, D. A. (1980). Biodegradable drug delivery systems. *Int. J. Pharm.*, **7**: 1-18.

- YANG, Y.Y., CHUNG, T.S., NG, N.P. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, **22**: 231-241.
- YUAN, W., WU, F., GUO, M., JIN, T. (2009) Development of protein delivery microsphere system by a novel S/O/O/W multi-emulsion. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **36**: 212-218.
- ZHENG, W. (2009). A water-in-oil-in-oil-in-water (W/O/O/W) method for producing drug releasing, double walled microspheres. *Int. J. Pharm.*, **374**: 90-95.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı	Tuğrul Mert SERİM
Doğum Yeri ve Tarihi	Bursa / 04.08.1987
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Medeni Durumu	Bekar
Askerlik Durumu	Tecilli
İletişim Adresi	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Telefonu	05397217260
E-mail Adresi	mertserim@hotmail.com

Eğitimi

Yüksek Lisans	Eylül 2008-....., Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Lisans	2008, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Lise	2004, TED Ankara Koleji Vakfı Özel Lisesi
İlkokul	2001, TED Ankara Koleji Vakfı Özel İ.Ö.O.
Yabancı Diller	İngilizce, İspanyolca, Almanca

Ünvanları

Araştırma görevlisi, 2009

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

TÜFTAD (Türk Farmasötik Teknoloji
Araştırmacıları Derneği)

Bilimsel Etkinlikler

Seminer	“Polimerik Biyomateryaller ve İmplantlar” (2009)
----------------	-----------------------------------------------------